



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“EFECTO DEL EJERCICIO INTENSO EN LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS NK (*NATURAL KILLER*) EN CABALLOS DE CARRERAS”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**CARLOS ZENTENO GAYTÁN**

**TUTOR:**

**DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS  
DR. FERNANDO GARCÍA TAMAYO  
DR. JORGE REYES ESPARZA**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIAS

A la memoria de mi Padre.

Este trabajo realizado es un esfuerzo más en mi desarrollo personal y profesional, que siempre fue apoyado por mi señora madre María de Jesús y mi tía Esperanza, por las que siento amor y agradecimiento.

A mi esposa María Susana a la que quiero y amo por su apoyo incondicional y solidario.

A mis hijos Erika y Carlos Raúl, de los cuales estoy muy orgulloso al poder compartir con ellos una familia.

A Rosario, Zenaida, Beatriz, Salvador y Mónica, de los cuales estoy orgulloso como hermano.

A la familia de mi esposa que me apoyó en momentos difíciles.

A todas aquellas personas que de forma directa o indirecta en mi vida han fomentado un aprendizaje a partir de sus enseñanzas.

Gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **COMITÉ TUTORAL**

- Dr. Andrés Romero Rojas, responsable de la Cátedra de Investigación en estudios de Inmunotoxicología e Inmunofarmacología, responsable del Laboratorio 8, Coordinación de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dr. Fernando García Tamayo, Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dr. Jorge Reyes Esparza, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

### **JURADO**

- Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello (Presidente)
- Dra. Gabriela Bárcenas Morales (Vocal)
- Dr. Fernando García Tamayo (Secretario)
- Dr. Jorge Reyes Esparza (Primer Suplente)
- Dr. Andrés Romero Rojas (Segundo Suplente)

### **CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

- Dr. Fernando Enríquez Rincón, Jefe del laboratorio 20, Departamento de Biología Celular.
- Q. Víctor Hugo Rosales García, encargado de la Unidad de Citometría de Flujo, Laboratorio Central.

### **LABORATORIOS TORNEL, S.A.**

- Sr. Luis Bravo Tornel, propietario de los Laboratorios Tornel, S.A.
- Cor. M.Sc. M.V. Raúl Armendáriz Félix, Director Médico de los Laboratorios Tornel, Clínica Privada en Equinos.

#### FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, CAMPO 4, UNAM

- MVZ Ana María Ríos Mena, coordinadora del proyecto para el Centro de Investigación, Docencia y Tecnología para la Salud Equina (CIDTSE) y del Módulo de Equinos, Universidad Nacional Autónoma de México.

#### COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES, PLANTEL NAUCALPAN, UNAM

- Biól. Angélica Galnares Campos, Directora del CCH Plantel Naucalpan, Universidad Nacional Autónoma de México.

#### HIPÓDROMO DE LAS AMÉRICAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO

- MVZ Rafael López de Loya, Secretaría de Carreras.
- MVZ Guadalupe Zariñana Leguizar, Control Antidoping.
- MVZ Elizabeth Camargo Martínez, Control Antidoping.
- MVZ Raúl Vázquez Islas, Clínica Privada en Equinos, cuadra T.
- MVZ Lucía Mejía Padilla, Clínica Privada en Equinos, cuadra T.
- Cuadra T, caballos de raza Pura Sangre, Propiedad del Sr. Luis Bravo Tornel.

#### CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

- Beca Crédito N° 176476 para estudios de Maestría en Ciencias.

#### CONSEJO MEXIQUENSE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

- Beca Tesis para Maestría, Oficio N° 205BD1A/1800/2004.

#### OTROS AGRADECIMIENTOS

- MVZ Sergio Hayen Valles, Clínica Privada en Equinos, Criadero Rancho Sayavedra, Atizapán de Zaragoza, Edo. de Méx.
- MVZ Silvestre González Mota, Clínica Privada en Equinos, Atizapán de Zaragoza, Edo. de Méx.

## CONTENIDOS

PÁGINA

LISTA DE CONTENIDOS	I
LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS	V
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LA RAZA PURA SANGRE	1
1.2. EFECTOS DEL EJERCICIO EN EL SISTEMA INMUNE	2
1.2.1. EFECTOS DEL EJERCICIO EN EL NÚMERO Y DISTRIBUCIÓN DE LEUCOCITOS	4
1.2.2. EFECTOS DEL EJERCICIO EN LA FUNCIÓN DE LOS LEUCOCITOS	5
1.3. MECANISMOS DEL ESTRÉS EN EL SISTEMA INMUNE	6
1.3.1. HORMONAS NEUROENDOCRINAS	6
1.3.1.1. CORTICOSTEROIDES	7
1.3.1.2. CITOCINAS	8
1.3.1.3. NEUROPEPTIDOS	9
1.3.1.4. CATECOLAMINAS	11
1.3.1.5. HORMONAS ESTEROIDALES	11
1.3.1.6. PROTEÍNAS DE ESTRÉS	12
1.4. RESPUESTA INMUNE INNATA	12
1.4.1. PRUEBAS DE INMUNIDAD INNATA	13
1.4.2. CÉLULAS NK Y LAK	13
1.4.2.1. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS NK	16
1.4.2.2. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS LAK	19
1.5. IMPORTANCIA CLÍNICA	19
1.6. CITOMETRÍA DE FLUJO	21
1.7. RADIOINMUNOANÁLISIS	24

	Página
1.8. ENSAYOS POR MEDIDA DE LA FUNCIÓN METABÓLICA	27
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS	30
4.1. OBJETIVO GENERAL	30
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1. UNIDADES EXPERIMENTALES	32
5.2. PROTOCOLO DEL EJERCICIO	33
5.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE VENOSA	34
5.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL PLASMÁTICO	36
5.4.1. OBTENCIÓN DEL PLASMA	37
5.4.2. PROCEDIMIENTO DEL RADIOINMUNOANÁLISIS EN FASE SÓLIDA	37
5.4.3. CÁLCULOS PARA DETERMINAR CORTISOL PLASMÁTICO	38
5.5. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CON CÉLULAS NK	39
5.5.1. CÉLULAS EFECTORAS	39
5.5.2. CÉLULAS BLANCO	40
5.5.3. CITOTOXICIDAD CON CÉLULAS NK	42
5.5.4. ADQUISICIÓN POR FACS	43
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
6. RESULTADOS	46
6.1. NIVELES DE CORTISOL PLASMÁTICO	46
6.2. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS NK	48
6.3. RELACIÓN ENTRE CORTISOL PLASMÁTICO Y ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE NK	52
7. DISCUSIÓN	53
8. CONCLUSIONES	57
9. APÉNDICES	58
10. REFERENCIAS	64

## LISTA DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
5.1.1.	Plan de alimentación suministrado a los caballos.	32
5.1.2.	Programa de medicina preventiva.	33
5.2.1.	Medicamentos aplicados antes de la carrera.	34
5.4.2.1.	Valores de los calibradores del <i>Coat-A-Count cortisol</i> .	38
5.5.3.1.	Tubos experimentales en el ensayo de citotoxicidad.	42
5.5.3.2.	Tubos control en el ensayo de citotoxicidad.	43
6.1.1.	Niveles de cortisol plasmático en caballos de raza Pura Sangre, antes y después de una carrera de velocidad.	46
6.2.1.	Actividad citotóxica de las células NK de caballos de raza Pura Sangre, antes y después de una carrera de velocidad.	48



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
5.1.	Actividades realizadas durante el estudio de manera general.	31
5.3.1.	Toma de muestras de sangre completa para la determinación de cortisol plasmático y la actividad citotóxica por células NK.	35
6.1.1.	Efecto del ejercicio intenso sobre los niveles de cortisol plasmático en el grupo control-experimental, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad.	47
6.2.1.	Efecto del ejercicio intenso sobre la actividad citotóxica de las células NK del grupo control-experimental, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad, a diferentes relaciones de efectora/blanco (E/T).	49
6.2.2.	Adquisición por citometría de flujo en un ensayo de citotoxicidad representativo a diluciones dobles seriadas, utilizando células mononucleares no adherentes de sangre periférica de caballo como efectoras (E) y células K562 marcadas con CFSE como blanco (T).	50
6.2.3.	Efecto del ejercicio intenso en la actividad citotóxica de las células NK sobre la línea celular blanco K562 marcadas con CFSE por citometría de flujo, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad, a diferentes relaciones efectora/blanco (E/T).	51
6.3.1.	Efecto del ejercicio intenso en la actividad citotóxica de las células NK en caballos de raza Pura Sangre, en una relación efectora/blanco 40:1 vs. la concentración de cortisol plasmático, a los 30 minutos después de la carrera de velocidad	52

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

°C	Grados centígrados
<sup>125</sup> I	Yodo radioactivo
Ab	Anticuerpo
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
Ag	Antígeno
APC	Célula presentadora de antígenos
ATCC	Colección Americana de Cepas de Referencia
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Antígeno de superficie
CFSE	5(6)-Carboxifluoresceína diacetato N-succinimidil éster
ConA	Concanavalina A
cpm	Cuentas por minuto
CRH	Hormona liberadora de la corticotrópica
CTL	Linfocito T citotóxico o citolítico
DC	Célula dendrítica
dl	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ELISA	Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas
F	Furlong (1 Furlong= 201.16 m)
FACS	Clasificador celular activado por fluorescencia o Citometría de flujo
FAS	Molécula CD95 en la membrana de una célula blanco
FAS-L	Ligando del antígeno CD95 que induce a apoptosis
FCS	Suero fetal bovino
g	Gramo
<i>g</i>	Gravedad o fuerza centrífuga relativa (RCF)
GH	Hormona de crecimiento
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana

HPA	Hipotálamo-pituitario-adrenal
HSP-	Proteína de choque térmico
IFN- $\alpha$	Interferón alfa
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleucina
kg	Kilogramo
l	Litro
LAK	Célula asesina activada por linfocinas
LL	Cuadrante inferior izquierdo
LPS	Lipopolisacárido
LR	Cuadrante inferior derecho
LT	Linfotoxina
M	Mol o molar
mAb	Anticuerpo monoclonal
mg	Miligramo
$\mu$ g	Microgramo
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
$\mu$ l	Microlitro
ml	Mililitro
$\mu$ M	Micromol o micromolar
mM	Milimol o milimolar
NCC	Citotoxicidad celular no específica
ng	Nanogramo
NK	Célula asesina natural ( <i>Natural Killer</i> )
nm	Nanómetro
nM	Nanomol o nanomolar
NO	Óxido nítrico
P	Neuropéptido que induce la liberación de histamina en mastocitos

PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
PG	Prostaglandina
pH	Potencial de hidrógeno
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Yoduro de propidio
PMN	Leucocito polimorfonuclear
PWM	Mitógenos de hiervas naturales (diésteres de forbol)
RIA	Radioinmunoanálisis
ROI	Intermediarios reactivos del oxígeno
RPMI-1640	Medio de crecimiento celular
SCID	Inmunodeficiencia combinada grave
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TCR	Receptor de la célula T
Th	Linfocito T cooperador
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
U	Unidades
UL	Cuadrante superior izquierdo
UR	Cuadrante superior derecho

## RESUMEN

El objetivo fue caracterizar el efecto *in vivo* que provoca un ejercicio intenso, como modelo de estrés agudo, en los niveles de cortisol plasmático y la actividad citotóxica de las células asesinas naturales (NK) en caballos atletas de raza Pura Sangre, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad. El grupo control-experimental se conformó con 41 caballos que compitieron en una carrera de velocidad. Se determinaron los niveles de cortisol plasmático por radioinmunoanálisis en fase sólida y la actividad citotóxica de las células NK por citometría de flujo. Las concentraciones de cortisol plasmático mostraron un incremento significativo ( $P<0.05$ ) a los 30 minutos después de la carrera de velocidad, en comparación con las concentraciones a las 48 horas antes de la carrera. La actividad citotóxica de las células NK mostró una disminución significativa ( $P<0.05$ ) a los 30 minutos después de la carrera de velocidad, en comparación con la actividad citotóxica a las 48 horas antes de la carrera. En conclusión, un ejercicio intenso genera una respuesta de estrés agudo, que induce a un incremento en las concentraciones de cortisol plasmático, lo cual puede estar asociado con la disminución de la actividad citotóxica de las células NK a los 30 minutos después de una carrera de velocidad en caballos atletas de raza Pura Sangre.

**Palabras clave:** Ejercicio intenso; Estrés agudo; Caballo; Cortisol plasmático; Célula asesina natural (NK).

## ABSTRACT

The objective was characterize the effect *in vivo* that causes an intense exercise, as model of acute stress, in plasmatic cortisol levels and cytotoxic activity of the natural killer cells (NK) in athletes thoroughbreds, at 48 hours before and 30 minutes after a speed race. The control-experimental group was conformed by 41 horses that competed in a speed race. Plasmatic cortisol levels by radioimmunoassay in solid phase and cytotoxic activity of NK cells by flow cytometry were determined. Plasmatic cortisol concentrations they showed a significant increase ( $P<0.05$ ) at 30 minutes after the speed race, comparing with the concentrations at 48 hours before the race. Cytotoxic activity of NK cells it showed a significant diminution ( $P<0.05$ ) at 30 minutes after the speed race, comparing with the cytotoxic activity at 48 hours before the race. In conclusion, an intense exercise generates an answer of acute stress that it induces an increase in plasmatic cortisol concentrations, which can be associated with the diminution of cytotoxic activity of NK cells at 30 minutes after a speed race in athletes thoroughbreds.

**Key words:** Intense exercise; Acute stress; Horse; Plasmatic cortisol; Natural killer cell (NK).

## **1. INTRODUCCIÓN**

La inmunología equina es un campo activo e importante de estudio que se enfoca al control de muchas enfermedades infecciosas comunes y condiciones inmunopatológicas de gran interés (Marti *et al.*, 2003).

Poco se sabe sobre los efectos específicos del ejercicio en la inmunidad de los animales domésticos. El ejercicio físico intenso que caballos y otros animales atletas realizan rutinariamente es un tema de gran importancia en el campo de la medicina veterinaria (Hines *et al.*, 1996).

### **1.1. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LA RAZA PURA SANGRE**

A los Pura Sangre se les conoce con el sinónimo de caballos de carreras. La raza Pura Sangre se desarrolló en Inglaterra a principios del siglo XVII. La evolución de la raza se atribuye a la cruce proveniente de tres caballos orientales: el Byerly Turk, el Darley Arabian, y el Godolphin Arabian (More O'Ferral y Cunningham, 1974; Willet, 1981; Langlois, 1983).

Los Pura Sangre son una raza híbrida de equinos con un registro genealógico de las primeras razas inglesas e irlandesas. En los últimos 200 años la industria del Pura Sangre se ha extendió por todo el mundo, siendo la influencia preponderante sobre la población caballar mundial de carreras, transmitiendo un mayor tamaño y conformación estética, mayor velocidad, coraje y resistencia mental, como resultado de la uniformidad genética adquirida mediante una cría selectiva cuidadosamente desarrollada (Langlois, 1980; Willet, 1991).

Los caballos de raza Pura Sangre, que compiten en carreras oficiales, son registrados en libros genealógicos en su país de origen. Es la raza de caballos más rápida y valiosa en el mundo. El mejor récord obtenido por un Pura Sangre en una carrera de velocidad fue registrado en Epsom, Inglaterra, alcanzando una velocidad promedio de 77 km/h (Willet, 1986).

Los caballos Pura Sangre al cumplir el año de edad comienzan un entrenamiento que implica la aceptación del peso y las órdenes del jinete, sin embargo algunos caballos de dos años participan en carreras. Su mejor momento de un Pura Sangre para competir en carreras de velocidad está entre los tres y los cinco años de vida (Willet, 1981; Saastamoinen y Nylander, 1996).

Los Pura Sangre son caballos muy nerviosos y sensibles, con galope ligero y tranco firme, cuartos anteriores largos y delgados, tórax amplio, cuartos traseros musculosos para el galope, ollares amplios para una mayor oxigenación, temperamento fuerte para la doma, cuerpo atlético, peso corporal medio de 450 kg y una alzada media de 1.63 m (Willet, 1991).

## **1.2. EFECTOS DEL EJERCICIO EN EL SISTEMA INMUNE**

Por medio de diversos estudios se ha investigado la relación entre ejercicio físico, respuesta inmune y enfermedad, reconociendo que el estrés, provocado por el ejercicio físico, tiene profundos y variables efectos en el sistema inmune (Gleeson, 2000).

El ejercicio predispone a una condición de estrés en cualquier organismo. El estrés de corta duración y moderada intensidad por lo general es una respuesta fisiológica benéfica, pero si se prolonga o se vuelve crónico, entonces altera significativamente la respuesta inmune, incrementando la probabilidad de desarrollar alguna enfermedad (Dohms y Metz, 1991).

Diversos estudios han definido la relación estrecha entre ejercicio, respuesta inmune y enfermedad. El sistema inmune está influenciado por varios tipos de estresores, incluyendo la actividad física (Jonsdottir, 2000a).

El estrés es un término comúnmente usado para describir una amplia variedad de fenómenos. Debe ser restringido para describir una respuesta adaptativa por un organismo, con la finalidad de tender a la homeostasis. Las amenazas para la homeostasis son llamadas estresores. Los estresores incluyen una amplia



variedad de causas físicas, psicológicas, químicas o infecciosas, que son modificados por factores extrínsecos y/o intrínsecos. Ejemplos de los modificadores incluyen: naturaleza del estresor, intensidad, duración, estado inmune y fondo genético del organismo (Dohms y Metz, 1991).

Los mecanismos del estrés crónico involucran una ruta descrita por Seyle como Síndrome de Adaptación General, incompletamente definida, implicando la modulación del sistema inmune y sistema nervioso autónomo, el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), la ruta extraadrenal (involucrando neuropéptidos), los neurotransmisores y mediadores inmunológicos (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994).

Muchos investigadores han estudiado los efectos del ejercicio físico en el sistema inmune, encontrando que se ven afectadas las respuestas del sistema inmune específico y no específico, cuyos resultados frecuentemente parecen conflictivos, según los estresores actúen en una forma aguda o crónica. El estrés induce cambios en varios parámetros inmunes, incluyendo la modulación de la actividad citotóxica de las células asesinas naturales (NK), asociada con la acción inmunosupresiva de los glucocorticoides (Wrona *et al.*, 2001).

En la regulación neuroendocrina hay que diferenciar al ejercicio como causa de distrés o eustrés (Hoffman-Goetz, 2000). Los efectos del ejercicio en el sistema inmune no pueden ser revisados de manera aislada de las influencias ambientales y biológicas (Gleeson, 2000).

Los mecanismos neuroendocrinos aún son poco conocidos. Los factores neuroendocrinos están involucrados en la inmunorregulación de la actividad citolítica del sistema inmune, a través del eje HPA, actuando en receptores hormonales de linfocitos T. Hay evidencia directa de la participación del sistema simpático y parasimpático que inervan órganos correspondientes al sistema inmune (Hoffman-Goetz, 2000).

### 1.2.1. EFECTOS DEL EJERCICIO EN EL NÚMERO Y DISTRIBUCIÓN DE LEUCOCITOS

El ejercicio moderado potencializa las funciones del sistema inmune y puede reducir la incidencia a las infecciones, mientras que el ejercicio intenso o de resistencia resulta en inmunosupresión, incrementando la susceptibilidad a las infecciones (Gleeson, 2000).

Se ha observado que la concentración de neutrófilos se incrementa durante el ejercicio físico, continuando aún así después del mismo. Las células asesinas naturales (NK), linfocitos B y linfocitos T están reclutados en los vasos sanguíneos durante el ejercicio, incrementando su conteo total. Los linfocitos T muestran una disminución en la relación  $CD4^+/CD8^+$ . Posterior a un ejercicio severo los niveles de linfocitos sanguíneos caen por debajo de los valores normales y la duración de esta supresión depende de la intensidad y duración del ejercicio (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994).

Durante el ejercicio físico el número absoluto y relativo de las células mononucleares en sangre periférica expresan marcadores o moléculas de adhesión tipo  $CD16^+$  y  $CD56^+$  de manera incrementada, simultáneamente se incrementa la actividad de las células NK (Hines *et al.*, 1996).

El ejercicio potencializa la actividad de las células NK. El incremento en la actividad es seguido por una subsecuente supresión en la función de las células NK, asociado con la liberación de prostaglandinas provenientes del número elevado de monocitos y neutrófilos activados (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994).

El número de linfocitos en la sangre periférica se incrementa durante el ejercicio. El ejercicio induce cambios en la respuesta proliferativa en las subpoblaciones de linfocitos (Hoffman-Goetz, 2000).

Se ha reportado en atletas humanos que el número de células NK y su actividad citotóxica disminuyeron después de un entrenamiento intenso, observándose a la vez un incremento en la respuesta linfoproliferativa (Mackinnon, 2000).

### 1.2.2. EFECTOS DEL EJERCICIO EN LA FUNCIÓN DE LOS LEUCOCITOS

Flamino *et al.*, (2000) documentaron que la función general inmune, la respuesta a mitógenos, la actividad de células asesinas activadas por linfocinas (LAK), la fagocitosis opsonizada y la actividad por estallido respiratorio en potros recién nacidos fueron similares a las de los caballos adultos.

Recientes estudios sobre linfocitos citotóxicos han definido dos principales mecanismos de citotoxicidad dependiente de contacto. El primer mecanismo implica exocitosis de gránulos citoplasmáticos contenidos en las células efectoras que son liberados contra las células blanco. Los gránulos contienen un número amplio de proteínas que forman poros, llamadas perforinas, y una familia de proteasas serinas, llamadas granzimas. El segundo mecanismo se induce por señales químicas derivadas del contacto con otras células o con sustancias producidas por ellas (también puede inducirse por señales originadas en el núcleo). Las células blanco expresan en su membrana la molécula Fas (CD95) y los linfocitos citotóxicos expresan el ligando de Fas (FasL). La interacción Fas-FasL causa la muerte de las células portadoras de Fas por activación del sistema de las caspasas (Derby *et al.*, 2001).

Los efectos del ejercicio intenso en la función de las células NK y su número, varían dependiendo del tipo, intensidad y duración del ejercicio (Jonsdottir, 2000a). El ejercicio moderado en atletas recreacionales incrementa la actividad citotóxica de las células NK al término de una carrera, durante las siguientes 24 horas (Furusawa *et al.*, 2003).

La fuente energética de los linfocitos es la glucosa y la glutamina. El músculo esquelético es el principal tejido en la producción de glutamina, por lo que la actividad del músculo esquelético puede influir directamente en el sistema inmune (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994; Noriega, 2000). Nesse *et al.*, (2002) documentaron que la respuesta linfoproliferativa a mitógenos disminuyó de 12 a 16 horas después de una carrera de velocidad en caballos.

Los linfocitos T requieren estimulación antigénica por células presentadoras de antígenos y coestimulación por señales de daño para ser activados. La señal de coestimulación puede ser recibida a través de la célula presentadora de antígenos y las células T reciben únicamente estimulación antigénica sin señal coestimuladora bajo apoptosis (Moseley, 2000).

En caballos el ejercicio moderado está asociado con incremento en la fagocitosis y tendencia a potencializar el estallido respiratorio en neutrófilos de sangre periférica. El ejercicio moderado puede tener un efecto benéfico en la inmunidad innata por mejoramiento en la función de los neutrófilos (Raidal *et al.*, 2000).

### **1.3. MECANISMOS DEL ESTRÉS EN EL SISTEMA INMUNE**

Los mecanismos del estrés prolongado o crónico involucran una inmunosupresión, la cual ha sido poco estudiada en animales domésticos (Dohms y Metz, 1991).

El ejercicio induce una cascada de respuestas hormonales coordinadas, que influyen el comportamiento de las células inmunes (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994).

#### **1.3.1. HORMONAS NEUROENDOCRINAS**

Las alteraciones en la función inmune son en parte inducidas por cambios, en las concentraciones de hormonas y neurotransmisores, provocados por estresores, subsecuentes a la activación del sistema nervioso simpático, sistema simpático-adrenal-medular y el eje HPA (Glaser *et al.*, 1999).

Mucha de la influencia del cerebro en eventos inmunes es ejercida a través del eje HPA. La actividad del eje HPA por estímulos estresantes resulta en secreción adrenocortical de cortisol (Wrona *et al.*, 2001).

La neuroinmunomodulación del estrés, provocada por el ejercicio físico, podría ocurrir a través de interacciones yuxtacrinas por modulación en el efecto de las citocinas, y/o directamente por la influencia de moléculas de adhesión y expresión de ligandos en las células inmunes (Hoffman-Goetz, 2000).

#### **1.3.1.1. CORTICOSTEROIDES**

Los corticosteroides son ejemplos clásicos de agentes inmunosupresores (Kurcz *et al.*, 1988). Exhiben un intenso rango de efectos en la respuesta inmune innata y adquirida (Wrona *et al.*, 2001). La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y el cortisol son indicadores del ejercicio intenso y se incrementan sus concentraciones a causa del estrés agudo o crónico (Furusawa *et al.*, 2003).

El cortisol es un potente inhibidor de la actividad de las células NK en modelos *in vitro*, sin embargo, hay resultados contrastantes en estudios humanos sobre el efecto del cortisol en la actividad de las células NK *in vivo*, mostrando incremento, decremento, cambio bimodal o sin cambios aparentes (Bodner *et al.*, 1998).

Los corticosteroides son inmunomoduladores que pueden suprimir la producción de interleucina 2 (IL-2). El cortisol inhibe la actividad de las células NK por la vía de la IL-2 (Lang *et al.*, 2003). Se han encontrado diferencias en las concentraciones de cortisol en animales jóvenes y adultos en respuesta al ejercicio. Los potros producen altas concentraciones de cortisol a frecuencias cardiacas de 180–200 latidos por minuto, con valores superiores a los de los caballos adultos, posterior al ejercicio (Horohov *et al.*, 1999).

De todos modos, no todos los autores coinciden y así, Bodner *et al.*, (1998) documentaron que el único cambio significativo en la actividad de las células NK fue independiente de los cambios en la concentración de cortisol plasmático y estuvo más relacionado a los cambios del ciclo circadiano. No hay datos sobre los efectos del cortisol en una concentración fisiológica más baja que la normal en la actividad de las células NK *in vivo*.

Los corticosteroides actúan a través de sus receptores esteroidales en el citoplasma, regulando aproximadamente el 1% de los genes en el organismo, resultando en inducción de la transcripción. Los corticosteroides suprimen la respuesta celular de los linfocitos cooperadores Th1, sin alterar la respuesta en los linfocitos Th2 (Zinder y Dar, 1999; Nieman, 2000).

La migración celular se ve afectada por la acción de los corticosteroides. Los corticosteroides, en el caballo, suprimen la migración de neutrófilos y su actividad fagocítica/bactericida. El mecanismo de migración se ve disminuido porque se expresan bajos niveles de selectinas e integrinas en las células (Hyypä, 2005).

La respuesta inmune iniciada en infecciones virales incluye la actividad de las células NK y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (Wrona *et al.*, 2001).

El cortisol de manera independiente no altera la actividad de las células NK *in vivo*, sin embargo en estudios *in vitro* si se ha observado su efecto inmunosupresivo sobre la función citotóxica (Bodner *et al.*, 1998).

Nesse *et al.*, (2002) documentaron que la concentración de cortisol sérico en caballos se incrementó entre los 40 y 60 minutos después de una carrera de velocidad, pero en reposo no hubo diferencia significativa en las concentraciones del cortisol sérico. Wong *et al.*, (1992) documentaron que las concentraciones de cortisol sérico se incrementaron a los 30 minutos después de un ejercicio físico, disminuyendo a las seis horas y retornando a sus valores basales a las 24 horas después del ejercicio.

#### **1.3.1.2. CITOCINAS**

El ejercicio intenso está asociado a un incremento en las citocinas proinflamatorias en la sangre periférica, y esta condición estimula la producción local de citocinas inflamatorias, similares a un estado de trauma o sepsis (Gleeson, 2000).

Las alteraciones bioquímicas inducidas por el estrés son responsables de los cambios en las concentraciones de citocinas. Posteriormente, las hormonas del

estrés (glucocorticoides) modulan la síntesis y liberación de citocinas de los leucocitos (Glaser *et al.*, 1999).

El ejercicio intenso involucra contracciones de los músculos esqueléticos, provocando la liberación de ácido láctico y daño muscular, induciendo un incremento en la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) en el tejido muscular, aumentando la actividad de la IL-1 en plasma, IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que son mediadores primarios en la respuesta de síntesis de proteínas de fase aguda (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994; Estberg *et al.*, 1995).

La IL-6 es producida en grandes cantidades con relación al ejercicio. Un estudio animal sugiere que el incremento en adrenalina durante un estado de estrés es responsable en el incremento de la IL-6 como respuesta a un ejercicio. La IL-6 se asocia con el daño muscular provocado por el ejercicio intenso (Pedersen, 2000).

Durante el ejercicio moderado la IL-2 estimula la actividad de las células NK, el incremento es más significativo que las concentraciones de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el cual también estimula la actividad de las células NK (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994).

El IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y la IL-2 estimulan la actividad de las células NK *in vitro* (Bodner *et al.*, 1998). La producción de IFN- $\gamma$  por las células NK produce un mecanismo de resistencia innato a muchos patógenos intracelulares. La IL-12, de manera individual, puede estimular la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK (Lieberman y Hunter, 2002).

### **1.3.1.3. NEUROPEPTIDOS**

La actividad física aumenta los niveles de neuropéptidos en el sistema nervioso central (SNC) y la sangre periférica. Los diferentes neuropéptidos se unen a receptores localizados en células del sistema inmune, siendo estas mismas

células capaces de producir neuropéptidos, creando una liga bi-direccional entre sistema nervioso y sistema inmune (Jonsdottir, 2000b).

Parece que la interacción de múltiples factores, así como opiáceos endógenos, hormona liberadora de la corticotrópica (CRH), citocinas, actividad simpática y hormona adrenocorticotrópica (ACTH) están involucrados en la relación compleja que existe entre los cambios en los niveles de cortisol en condiciones de estrés y las funciones inmunes (Wrona *et al.*, 2001).

Las  $\beta$ -endorfinas se sintetizan en la hipófisis y están involucradas en la respuesta al estrés (Jonsdottir, 2000b). El sistema de opiáceos endógenos es parte de la vía regulatoria entre SNC y sistema inmune (Jonsdottir, 2000b).

Muchos trabajos han documentado que las  $\beta$ -endorfinas estimulan la actividad de las células NK y su producción de IFN- $\gamma$  *in vitro*. Las  $\beta$ -endorfinas, ACTH, hormona del crecimiento y prolactina modulan la actividad de las células NK, pudiendo estar involucradas en el ejercicio el cual induce su aumento en la circulación. Los niveles de  $\beta$ -endorfinas se elevan concomitantemente con los niveles de glucocorticoides durante estados de estrés (Wrona *et al.*, 2001). El ejercicio, que es una estimulación estresante, eleva las concentraciones de  $\beta$ -endorfinas, hormona del crecimiento y prolactina en la circulación sanguínea (Hoffman-Goetz, 2000). Las  $\beta$ -endorfinas se unen a sus receptores en los linfocitos, monocitos y granulocitos. Las células NK son ricas en receptores para  $\beta$ -endorfinas (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994).

Los leucocitos producen endorfinas e histamina, las cuales incrementan la actividad citotóxica de las células NK y LAK (Lang *et al.*, 2003).

Pell y McGreevy, (1999) documentaron que a través de los opiáceos endógenos se facilita la conducta estereotípica en los caballos de raza Pura Sangre, asociándose un componente hereditario a dicha conducta, sugiriendo que los caballos estereotípicos tienen receptores opiáceos con una mayor sensibilidad que aquellos caballos normales.



#### **1.3.1.4. CATECOLAMINAS**

El posible mecanismo del incremento en la actividad citotóxica inducida por el ejercicio son las catecolaminas (Furusawa *et al.*, 2003). En respuesta al ejercicio, la descarga de nervios esplénicos simpáticos que inervan la médula adrenal, resulta en la liberación de adrenalina y noradrenalina en la circulación, provocando marcados efectos en la frecuencia cardiaca y el tono muscular, así como en el flujo sanguíneo a través del tejido linfoide y la circulación de leucocitos (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994).

El incremento en las concentraciones plasmáticas de adrenalina modula la función de las células NK, en respuesta al ejercicio (Furusawa *et al.*, 2003). Las catecolaminas estimulan la liberación celular de componentes específicos involucrados en la respuesta inflamatoria (Glaser *et al.*, 1999; Shephard, 2001).

Furusawa *et al.*, (2003) documentaron que el aumento en los niveles de adrenalina, durante una carrera de medio maratón en atletas recreacionales, provocó un incremento en la actividad citotóxica de las células NK.

La norepinefrina inhibe la actividad citotóxica de las células NK y está involucrada en condiciones de estrés agudo y crónico, causando aumento en la migración de las células NK y ligero incremento en los linfocitos T. Un neuropéptido que induce la liberación de histamina en los mastocitos (sustancia P) incrementa la actividad citotóxica, pero disminuye la migración en las células NK (Lang *et al.*, 2003).

#### **1.3.1.5. HORMONAS ESTEROIDALES**

La actividad citotóxica de las células NK se puede incrementar o disminuir por acción de la testosterona y el estradiol, respectivamente (Lang *et al.*, 2003).

#### **1.3.1.6. PROTEÍNAS DE ESTRÉS**

El choque térmico o respuesta al estrés es un mecanismo de respuesta adaptativa altamente conservada en la naturaleza. La respuesta al estrés implica una tolerancia a una gran variedad de estresores, incluyendo hipertermia, hiperoxia, hipoxia y otras condiciones que alteran la síntesis de proteínas (Moseley, 2000).

Existen proteínas relacionadas con el estrés que tienen la capacidad de modular la respuesta inmune celular. Las proteínas de estrés incluyen: las proteínas de choque térmico (HSPs), proteínas reguladoras de glucosa y ubiquitina. El papel central de las proteínas de estrés, en la transferencia de péptidos a través de la célula, puede participar en la modulación del sistema inmune. Las proteínas de estrés sirven como señal de daño para alertar al sistema inmune de la muerte celular bajo condiciones de estrés. El ejercicio induce una respuesta de fase aguda, similar a un estado de trauma o sepsis (Moseley, 2000; Pedersen *et al.*, 2000).

#### **1.4. RESPUESTA INMUNE INNATA**

La característica esencial de la respuesta inmune innata es que no muestra especificidad por los organismos invasores. La inducción de la respuesta inmune innata es que no requiere previa exposición al organismo invasor y no es aumentada por exposiciones repetidas al mismo organismo. La resistencia puede ser controlada genéticamente. Estos mecanismos son adecuados para eliminar invasores causales, sin embargo, organismos patógenos han desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune innata, originando que células especializadas y productos de la respuesta inmune adaptativa sean modificados (Hines *et al.*, 1996).

#### **1.4.1. PRUEBAS DE INMUNIDAD INNATA**

Componentes de la respuesta inmune innata que han sido medidos en el caballo incluyen: número de granulocitos y monocitos en sangre periférica y su función fagocítica, citotoxicidad natural de las células NK, actividad de las células LAK y medición de factores solubles, incluyendo proteínas de fase aguda y complemento (Hormansky *et al.*, 1992; Horohov *et al.*, 1996; Lunn *et al.*, 1996).

#### **1.4.2. CÉLULAS NK Y LAK**

Las células citotóxicas que no están restringidas por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) representan un importante componente de la inmunidad innata en mamíferos y son un mecanismo de defensa contra infecciones virales y neoplásicas (Wu y Lanier, 2003). Las células NK son una subpoblación de linfocitos de mayor tamaño y aspecto granular. No requieren maduración en el timo, no tienen memoria inmunológica, no tienen receptor de linfocito T (TCR). Se originan en la médula ósea y constituyen del 10 al 30% de los linfocitos en la sangre periférica del humano. La pulpa roja del bazo es la mayor fuente de células NK en humano y roedores, mientras que están ausentes en timo y nódulos linfoides (Jonsdottir, 2000a).

Las células NK reconocen y destruyen una gran variedad de células blanco, incluyendo células tumorales y/o infectadas por virus. Esta citotoxicidad natural es predominantemente mediada por las células NK que son identificadas fenotípicamente como CD3<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> y sus funciones no están restringidas por el MHC. Existe otra condición de linfocitos cultivados con altas concentraciones de IL-2 que origina las células LAK. Las células LAK exhiben un amplio rango de actividad citotóxica no restringida al MHC contra tumores y algunos tejidos normales, y también contra células blanco resistentes a NK (Viveiros y Antczak, 1999). La mayoría de células LAK en el humano son derivadas de células NK activadas (Carayannopoulos y Yokoyama, 2004).

En el caballo, una de las primeras investigaciones sobre las células citotóxicas naturales fue hecha en potros que sufrían de una inmunodeficiencia combinada grave (SCID), la cual es una condición recesiva autosómica que resulta en la ausencia de linfocitos T y B, pero con una población de células NK persistente. Perryman *et al.*, (1987) documentaron que células mononucleares de sangre periférica aislada de potros con SCID tenían características morfológicas de linfocitos grandes granulares, y cuando se incubaron por 24 horas con 100 U/ml de IL-2 recombinante humana, demostraron actividad citotóxica contra líneas celulares blanco YAC-1 y K562. Estos resultados indicaron que en ausencia de linfocitos T y B, las células citotóxicas con morfología y características funcionales de células NK son producidas por caballos con SCID. Cuando células mononucleares de sangre periférica de caballos normales fueron usadas en el mismo ensayo, estas mostraron inhabilidad para mediar la misma actividad citotóxica, sin embargo ellas pudieron mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos contra las mismas células blanco. La explicación para esta condición fue la baja frecuencia en los precursores de las células NK en sangre periférica de caballos normales.

Hormanski *et al.*, (1992) documentaron la generación de células LAK equinas por incubación de células mononucleares de sangre periférica de caballos normales con altas concentraciones de IL-2 (500 U/ml por tres días). La identificación de las células mediante la actividad de las LAK fue poco clara, proponiendo que fueron células del linaje de los linfocitos T.

Una investigación en potros con SCID, usando anticuerpos monoclonales (mAbs) demostró que un gran porcentaje de la población de linfocitos residuales expresó el antígeno equino EqCD8, mientras no expresó el antígeno EqCD3. La implicación de estos hallazgos fue que las células NK de equino pudieron haber representado la mayor población linfoide en potros con SCID, expresando el Ag EqCD8 (Lunn *et al.*, 1996).

Las células NK poseen más de un mecanismo de reconocimiento para destruir células blanco que no expresan el MHC clase I, o independiente a este mismo. Las interacciones moleculares involucradas en el reconocimiento de las células blanco pueden involucrar receptores específicos para NK en las células blanco, o interacciones de moléculas de adhesión múltiple (Carayannopoulos y Yokoyama, 2004).

Una serie de experimentos fueron conducidos a demostrar que la selección positiva de precursores LAK está basada en la expresión de los antígenos EqCD8 resultando en un incremento significativo en la actividad de las células LAK. En adición, bloqueando epítopes específicos de EqCD8 con mAbs disminuyó significativamente la actividad de las células LAK, sin embargo el estudio no demostró si las células precursoras de las LAK generadas por selección del EqCD8 fueron células NK o linfocitos T. Hay evidencias en que pueden ser células con el fenotipo EqCD8<sup>+</sup> y EqCD3<sup>-</sup>. La actividad de las células NK es difícil de demostrar en caballos sin IL-2 para generar células LAK. La actividad de las células LAK puede depender tanto de linfocitos T como de células NK (Lunn *et al.*, 1996).

Recientes evidencias muestran la importancia de las interacciones de las células NK con las células dendríticas (DC) para activación de las células NK. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado varios efectos de las interacciones NK-DC, incluyendo activación y producción de citocinas, maduración de células dendríticas y lisis por células NK de ciertas células dendríticas autólogas. Estas interacciones son importantes durante la respuesta inmune *in vivo*, sin embargo no está claro dónde las células NK pueden interactuar con las células dendríticas en el organismo, y si lo observado *in vitro* sucede *in vivo* (Cooper *et al.*, 2004).

#### 1.4.2.1. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS NK

El proceso citotóxico de las células NK implica las siguientes fases: unión a la célula blanco, liberación de mediadores líticos y lisis de la célula blanco. Las células NK para su acción citotóxica requieren que esté disminuida o ausente la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en las células blanco. El mecanismo lítico de las células NK es disparado por inducción de mecanismos que implican señales de transducción, así como la formación de fosfato de inositol e incremento intracelular de  $Ca^{++}$ . La generación intracelular de señales resulta en la exocitosis del contenido de los gránulos líticos contra la membrana de las células blanco, induciendo la lisis celular, así como alterando la expresión génica y/o proliferación de las células NK (Jonsdottir, 2000a).

Durante el ejercicio las células NK tienen alta capacidad de responder a la IL-2 y ser reclutadas en la circulación (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994).

La interacción física entre las células NK y las células blanco es un evento clave en la actividad de las células NK. Las células NK se definen como células capaces de reconocer y destruir células blanco que tienen baja o nula expresión de moléculas MHC clase I. Recientemente se ha descubierto que la maquinaria molecular que controla el comportamiento de las células NK, junto con otras células es más complicado de lo que parece. La actividad de las células NK parece estar regulada por mecanismos de estimulación e inhibición por medio de receptores. Estimulación múltiple y receptores inhibitorios pueden proveer las señales integrales que disparan la función celular del contacto mediado por células NK (Carayannopoulos y Yokoyama, 2004).

Chong *et al.*, (1992) documentaron que las células mononucleares de sangre periférica de caballos adultos y potros mostraron citotoxicidad de tipo celular NK contra un amplio rango de células blanco xenogénicas y alogénicas.

La citotoxicidad celular puede ser mediada por dos principales mecanismos dependientes de contacto. El primer mecanismo incluye la exocitosis del contenido

de gránulos, predominantemente usada por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, células NK y células LAK. Posterior a la conjugación con las células blanco, los gránulos citotóxicos migran al sitio de contacto, y vacían su contenido de perforinas sobre la membrana de la célula blanco, en la cual se forman poros que inducen la muerte celular. El segundo mecanismo está basado en las interacciones ligando receptor, por ejemplo, Fas/FasL, y es conocido por ser el principal mecanismo por el que los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, a través de la activación de caspasas, matan células que expresan el receptor apropiado (Fischer *et al.*, 2002).

Las células NK pueden atacar y destruir una célula blanco por diferentes mecanismos: a) mediado por células, tiene lugar de forma clásica, por daño a la membrana de la célula blanco por medio de perforinas, o a través de la inducción de citotoxicidad por medio de granzimas, lo cual requiere unión de la célula efectora con la célula blanco para su lisis; b) mediado por factores solubles, donde las células NK pueden ser estimuladas para producir TNF- $\alpha$  que ejerce un efecto citostático/citotóxico sobre células blanco específicas. Este mecanismo no requiere contacto físico entre células efectoras y células blanco (Papa *et al.*, 1988; Vitale *et al.*, 1989).

Cuando una célula NK reconoce a una célula blanco, los gránulos citotóxicos se mueven hacia la sinapsis inmunológica, fusionándose ambas membranas, liberando la célula NK su contenido para inducir la apoptosis en la célula blanco. Los principales efectores de muerte son las proteasas serinas, llamadas granzimas, y proteínas que alteran la membrana, llamadas perforinas o granzimas. Las células NK pueden además destruir células blanco por medio de receptores y ligandos de FAS (Lieberman, 2003).

Las células NK contienen muchas variedades de granzimas. La granzima B activa la ruta de las caspasas para inducir la apoptosis en la célula blanco. Activa la caspasa 3 y requiere de un ambiente mitocondrial para completar la activación. Induce a apoptosis bajo condiciones fisiológicas, induce muerte celular y daño mitocondrial e incrementa las concentraciones de oxígeno reactivo. La granzima A

no involucra la ruta de las caspasas, pero provoca daño en el DNA. Las células blanco que pueden evadir la muerte celular por caspasas o granzima B son susceptibles a la granzima A, la cual actúa directamente sobre el DNA, dañándolo y modificando la cromatina porque tiene afinidad por las histonas y lamininas, activando a una enzima DNAsa (Lieberman, 2003; Carayannopoulos y Yokoyama, 2004).

Diversos estudios han mostrado que el número y actividad citotóxica de las células NK están disminuidos por elevadas concentraciones de cortisol circulante. Es probable que bajo condiciones fisiológicas los glucocorticoides puedan no ser decisivos para los efectos inmunosupresivos del estrés en la actividad de las células NK (Wrona *et al.*, 2001).

La citolisis mediada por gránulos es utilizada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células NK (Lieberman, 2003). La función de las células NK en equinos es regulada por mecanismos del reconocimiento del MHC y algunas de estas células pueden expresar potencialmente receptores inhibitorios específicos de MHC clase I. Existe la hipótesis de que algunas células NK pueden expresar antígenos de superficie EqCD8<sup>+</sup> cuando existe una condición de SCID (Viveiros y Antczak, 1999).

Viveiros y Antczak, (1999) documentaron que las células NK de caballos sanos fueron EqCD8<sup>-</sup>. El 10% de los linfocitos en sangre se etiquetó con el mAb NK-5C6 de origen murino e isotipo IgM, el cual reconoce una proteína de membrana de 32 kDa expresada en células de citotoxicidad no específica y células NK/LAK. Las células NK destruyeron células blanco negativas a MHC clase I, pero no a MHC clase II. Los mononucleares de sangre periférica, estimulados con IL-2 se transformaron en células LAK y éstas destruyeron tanto células blanco positivas y negativas a MHC clase I. La mayoría de las células mononucleares postestimulación con IL-2 fueron EqCD3<sup>+</sup> y EqCd8<sup>+</sup>. La actividad lítica de las células NK y de las células LAK está mediada por perforinas y granzimas.



#### **1.4.2.2. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS LAK**

Caballos no acondicionados que son sometidos a un ejercicio intenso muestran múltiples alteraciones en la función inmune, incluyendo un aumento en la función de las células LAK. El aumento en la actividad de las células LAK no se debe a un mayor número en la circulación de sus precursores. Las células mononucleares de caballos acondicionados muestran una mayor respuesta a la estimulación con IL-2, y esto no es debido a un incremento en la expresión de receptores para IL-2 en las células. La generación de las células LAK está aumentada por catecolaminas y neuropéptidos que son producidos durante el ejercicio, sugiriendo un efecto directo de estos compuestos en la generación de las células LAK, posterior a la interacción con el receptor para IL-2 (Horohov *et al.*, 1996). El ejercicio intenso incrementa la actividad citotóxica de las células LAK en potros, pero no en caballos adultos (Horohov *et al.*, 1999).

Lunn *et al.*, (1996) documentaron que la selección positiva de linfocitos EqCD8<sup>+</sup> incubados con altas concentraciones de IL-2 incrementa la actividad de las células NK, generando altos niveles en la actividad citotóxica de las células LAK.

El reconocimiento de los MHC clase I por los receptores TCR de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> puede generar señales intracelulares que regulan el crecimiento celular. La selección positiva de precursores de las células LAK sobre la base en la expresión del EqCD8 parece ser una técnica valiosa para preparar poblaciones de células LAK potentes en el caballo (Horohov *et al.*, 1996; Lunn *et al.*, 1996; Viveiros y Antczak, 1999).

#### **1.5. IMPORTANCIA CLÍNICA**

El conocimiento de la relación entre ejercicio y función inmune ayudará en la prevención y control de ciertas enfermedades. La variabilidad en respuestas al ejercicio hace difícil establecer recomendaciones específicas. Evidencias

preliminares sugieren que el ejercicio puede ser utilizado para modular favorablemente la respuesta inmune (Yang y Glaser, 2002).

El estrés psicológico puede inhibir o deprimir alguna respuesta del sistema inmune. También puede afectar la inmunidad innata, por ejemplo la actividad de las células NK, así como la respuesta de los linfocitos T, *in vivo* e *in vitro* (Glaser *et al.*, 1999).

El ejercicio tiene un papel importante en el tratamiento de enfermedades que son caracterizadas por inmunosupresión. Por ejemplo, en humanos el ejercicio moderado, por medio de un programa de entrenamiento en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), demostró un incremento significativo en el número de linfocitos cooperadores Th1 (Pedersen y Nieman, 1997).

Se desconoce si una rutina de ejercicio moderado pudiese disminuir en algo los efectos inmunosupresivos de infecciones virales en animales. Pero esta posibilidad merece ser estudiada. Algunos estudios en animales han demostrado que el ejercicio moderado puede inhibir el crecimiento y metástasis de una variedad de tumores inducidos experimentalmente. Los mecanismos de como el ejercicio moderado induce resistencia al crecimiento tumoral son complejos, pero el incremento en el número y actividad de los macrófagos y células NK puede jugar un papel importante. Los neoplasmas son una importante causa de morbilidad y mortalidad en animales, y el conocimiento entre la relación ejercicio e inmunidad tumoral puede ser de peso, para mejorar los objetivos de control (Hines *et al.*, 1996).

Nieman (2000) documentó que el ejercicio moderado mejora la actividad de las células NK y la respuesta proliferativa de los linfocitos.

La causa iatrogénica más común de inmunosupresión es el tratamiento con corticosteroides. La modulación del sistema inmune proporciona defensa contra muchos tipos de enfermedades. Los inmunomoduladores pueden ser: productos

fisiológicos (componentes normales de la respuesta inmune), productos microbianos y agentes químicos. La dexametazona suprime la actividad de las células NK *in vitro*, pero no *in vivo* (Bodner *et al.*, 1998).

Las infecciones virales son responsables de la mayor importancia clínica y económica que tienen actualmente las enfermedades en caballos, tal es el caso de: influenza, rinoneumonítis y aborto equino (herpesviridae) y anemia infecciosa equina (retroviridae). La terapia específica para infecciones virales generalmente es inefectiva, impráctica y costosa en caballos. El tratamiento solo es de soporte y control para infecciones secundarias por bacterias. En muchos casos implica estrategias de vacunación, cuarentena o destrucción del animal infectado (Flamino *et al.*, 1998).

El ejercicio moderado estimula al sistema inmune, mientras que el ejercicio intenso causa deficiencia inmune (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994; Woods *et al.*, 1999; Nieman, 2001). El ejercicio moderado puede modular la función inmune del huésped, pero un ejercicio de resistencia o forzado puede tener efectos desfavorables en los mecanismos de defensa no específicos en caballos (Wong *et al.*, 1992).

## **1.6. CITOMETRÍA DE FLUJO**

La citometría de flujo es una técnica que permite obtener datos multiparamétricos sobre las características físicas y químicas de células en suspensión. El desarrollo de los anticuerpos monoclonales junto con el perfeccionamiento de los citómetros de flujo, ha permitido el uso de la citometría de flujo en el diagnóstico clínico. Desde el estudio de subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> para monitorizar el desarrollo del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), pasando por el diagnóstico de patologías hematológicas y estudios de ciclo celular (ploidías), ésta es una técnica de uso rutinario en laboratorios clínicos. La posibilidad de utilizar esta tecnología para separar células (*sorting*) según sus características, es una

opción reservada generalmente al ámbito de la investigación. Paralelamente, la mayoría de los contadores hematológicos del mercado utilizan también esta tecnología (Dean, 1997).

Un citómetro de flujo tiene tres sistemas principales:

**Sistema hidráulico:** Se compone de un conjunto de controles neumáticos e hidráulicos necesarios para establecer un flujo laminar que permita a la suspensión celular atravesar la cámara de flujo de forma estable e individual (Stovel, 1997).

**Sistema óptico:** Consta de un láser, filtros, lentes y detectores. La fuente de luz es producida normalmente por un láser (en algunos modelos, sobre todo en investigación, se combinan varias fuentes de luz). En la mayoría de los citómetros se instala un láser de gas (comúnmente argón) refrigerado por aire, que produce una luz monocromática de 488 nm. Esta luz es utilizada para la excitación de la mayoría de los fluorocromos y provoca la dispersión de luz que nos informa de las características celulares (Dean, 1997).

**Sistema electrónico-informático:** Convierte la luz dispersa en señales eléctricas y las procesa para su posterior análisis.

La perfecta integración de estos sistemas permite un rápido y preciso análisis, de un elevado número de células en poco tiempo para su adquisición (Dean, 1997).

La suspensión celular, preparada previamente con anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos, es introducida en el sistema hidráulico de manera que las células atraviesan individualmente la cámara de flujo, donde el haz del láser las intercepta.

El contacto del haz del láser con una célula produce dos tipos diferentes de dispersión: frontal y lateral (90°). La dispersión frontal (*Forward Scatter*) nos da información acerca del tamaño celular, mientras que la dispersión lateral (*Side Scatter*) nos informa de la complejidad celular (Dean, 1997).

Los anticuerpos monoclonales adheridos a la superficie celular son a la vez excitados por la luz del láser y generan fluorescencias que son recogidas por fotomultiplicadores que transforman la señal óptica en eléctrica, enviándose toda la información a un sistema informático para su análisis.

La longitud de onda, correspondiente a diferentes fluorocromos, permite evaluar antígenos (de membrana o intracelulares) u otras moléculas, mediante la combinación de los mismos. Las bandas de detección se denominan como fluorescencia y un número. Por ejemplo, fluorescencia 1 (FL1) registra fluorescencia verde como la 5(6)-carboxifluoresceína diacetato N-succinimidil éster (CFSE), la fluorescencia 2 (FL2) registra rojo como el yoduro de propidio (PI), y fluorescencia 3 (FL3) registra naranja como la peridin-clorofila (PerCP). Además permite realizar histogramas de distribución de cualquiera de los parámetros registrados, con análisis de su magnitud, modo (valor de la variable expresado por el mayor número de células, eventualmente permitiendo detección de bi- o pluri-modalidad), informando área bajo la curva y ancho de cada parámetro. Los registros se transmiten a una computadora acoplada y se analizan mediante programas especiales (Dean, 1997).

La citometría de flujo ha sido satisfactoriamente empleada para medir: unión de células efectoras a células blanco, citotoxicidad mediada por células efectoras, actividad citotóxica por tinción con PI de las células blanco muertas, etc. Esto tiene numerosas ventajas sobre otras técnicas que pueden medir la unión y citotoxicidad de las células NK. El método es rápido, independiente del operador, estadístico, y evita el uso de materiales radioactivos (Vitale *et al.*, 1989; Lee-MacAry *et al.*, 2001).

Los fluorocromos, que en algunas ocasiones van unidos a anticuerpos, interactúan con varios componentes de las células, incluyendo membrana celular, glicoproteínas de superficie, sistemas enzimáticos y DNA (De Clerck *et al.*, 1994).

Una ventaja de la CFSE es que se une de manera covalente a componentes intracelulares, por ejemplo a lisinas que son residuos de proteínas, incrementando su retención más tiempo en el citoplasma, relativamente a otras tinciones basadas en fluoresceína unida a anticuerpos (De Clerck *et al.*, 1994).

### 1.7. RADIOINMUNOANÁLISIS

El radioinmunoanálisis (RIA) ha sido uno de los descubrimientos que más ha contribuido al progreso de la endocrinología. Es una técnica que fue introducida por Rosalind Yalow y Solomon Berson en 1956, y fue publicada en 1960 (Lepage y Albert, 2006).

El RIA es un ensayo de unión competitiva que combina la especificidad de una reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) con la sensibilidad de un método radioquímico. El antígeno de la muestra y el antígeno marcado se ponen en contacto con un anticuerpo específico en una concentración limitante, compitiendo por los sitios de unión del anticuerpo específico. El RIA es una técnica muy sensible basada en la competencia de unión al anticuerpo específico entre la sustancia a cuantificar y cantidades conocidas de la misma sustancia marcada con un isótopo. A mayor antígeno a cuantificar, menor será el antígeno marcado unido al anticuerpo y viceversa. La vida media de un isótopo es el tiempo que tarda el núcleo original en desintegrarse a la mitad (Berson y Yalow, 1968).

Parámetros de una curva estándar:

- Ligado inespecífico (NSB): Es la cantidad de Ag marcado que se une a otra sustancia en ausencia de Ac. Es el ligado del estándar de concentración cero en ausencia de Ac y se expresa como  $\% \text{NSB/AT}$ , siendo AT la actividad total. En general es muy difícil conseguir una perfecta separación entre la fracción ligada y libre.
- Ligado máximo (Bo): Es la cantidad de Ag marcado que se une al Ac en ausencia del Ag frío. Es el ligado del estándar de concentración cero y se

expresa como % Bo/AT. En RIA se utilizan anticuerpos con un título que ligen aproximadamente alrededor del 50 % del Ag marcado presente con un rango óptimo de unión entre 30 – 60 % (Rodcar *et al.*, 1969).

Componentes básicos del RIA: anticuerpo, antígeno y antígeno marcado.

Tipos de emisiones radioactivas:

- $\alpha$ : Partícula pesada que consiste en un núcleo de helio con carga doble. Son raramente usadas en RIA.
- $\beta$ : Partícula procedente del núcleo, que tiene la misma carga y masa que un electrón. El tritio es el más usado en RIA.
- $\gamma$ : Radiación electromagnética similar a los rayos X y se origina cuando las partículas del núcleo cambian de estado energético. Se usan fundamentalmente en RIA el  $^{125}\text{I}$  y el  $^{57}\text{Co}$ .

Tipos de RIA:

- Método de equilibrio: Se realiza una sola incubación en la que se incuban conjuntamente el Ag frío y el marcado con el Ac, compitiendo ambos por los sitios de unión de éste.
- Métodos de no-equilibrio:
  - \* Método secuencial: Se realiza en dos pasos. Primero se incuba el Ag frío con el Ac en exceso, y después se añade el Ag para completar la saturación del Ac. Se consigue mayor sensibilidad.
  - \* Método de desplazamiento: Se incuba el Ag con el Ac y posteriormente se añade el Ag frío que desplaza al Ag del complejo.

Métodos de separación en fase sólida: El RIA en fase sólida permite una simple separación entre la fase ligada y libre, ya que el Ac es adsorbido o ligado químicamente a una matriz sólida insoluble, con lo que la separación de las fases ligada y libre no requiere centrifugación. Los sistemas más utilizados son los tubos revestidos de anticuerpo (tubos *coated*) y los anticuerpos adsorbidos a esferas o discos. Los tubos revestidos de anticuerpo son tubos de polipropileno o poliestireno que se exponen a una apropiada dilución de anticuerpo durante unas horas, se lavan y se utilizan para el RIA. El anticuerpo se adhiere a la superficie

del plástico debido a las interacciones no covalentes, no específicas e hidrofóbicas. Esta unión no debe interferir en la reacción primaria Ag-Ac (Lepage y Albert, 2006).

Las condiciones optimas de adsorción del Ac a las paredes del tubo son:

- pH: Las interacciones hidrofóbicas ocurren cuando la carga neta de la molécula es 0, para la IgG se da a un pH entre 8.5 - 10.
- Fuerza iónica: Las interacciones hidrofóbicas son promovidas por concentraciones de sales capaces de neutralizar las proteínas cargadas.
- Temperatura: A mayor temperatura mayor velocidad de difusión aumentando la probabilidad de que las moléculas de proteínas entren en contacto con la superficie de la fase sólida.
- Concentración de proteína.
- Almacenamiento de los tubos: Debe ser a 4 °C.
- Tratamiento previo de los tubos: Los tubos de plástico pueden tratarse con glutaraldehído para unir covalentemente los Ac a las paredes.
- Tiempo: Generalmente es un proceso rápido si se usan niveles saturantes de proteínas.

Para mejorar la especificidad de un RIA es importante:

- Purificar la muestra previamente al ensayo por extracción con solventes, cromatografía, etc.
- Bloquear los anticuerpos menos específicos con una sustancia incluida en el antisuero que produzca reactividad cruzada (Werner y Cargille, 1971).
  - \* Sensibilidad: La sensibilidad analítica es la más pequeña cantidad de Ag no marcado que puede ser distinguida del estándar 0 (Lepage y Albert, 2006).

Fundamento del contador gamma: Utiliza un cristal de ioduro sódico activado con trazas de talio, el diámetro del cristal es normalmente entre 5 y 7.5 cm. Cuando el cristal sólido absorbe la radiación ionizante se produce un pulso de luz de corta duración. El número de pulsos de luz es una medida de la frecuencia de la desintegración isotópica (desintegraciones por minuto, dpm). El cristal convierte la radiación gamma emitida por el isótopo en luz visible con una longitud de onda de



410 nm, algo de esta luz incide en el cátodo de un tubo fotomultiplicador y causa emisión de electrones que son amplificados por un factor de  $10^5$  a  $10^8$ . El centelleo de luz se registra en cpm (Werner y Cargille, 1971).

### **1.8. ENSAYOS POR MEDIDA DE LA FUNCIÓN METABÓLICA**

La presencia en la célula de actividades enzimáticas genéricas, tales como estererasas y deshidrogenasas, permiten plantear ensayos de viabilidad basados en la generación de productos con grupos cromóforos o fluoróforos, procedentes de la ruptura enzimática de sustratos sintéticos. Una alternativa, para tipos celulares concretos, es la determinación de una actividad enzimática específica, en cuyo caso es especialmente importante evitar que las condiciones experimentales afecten a dicha enzima (Nociari *et al.*, 1998; Derby *et al.*, 2001, Niu *et al.*, 2001).

La CFSE, poco ionizada, atraviesa la membrana celular por difusión; las estererasas citoplasmáticas la hidrolizan a carboxifluoresceína que, al tener mayor carga eléctrica, ya no puede atravesar la membrana y queda atrapada dentro de la célula. El PI se emplea como contraste, pues tiñe las células dañadas (Massaro *et al.*, 1989; Hodgkins *et al.*, 1996; Hasbold *et al.*, 1999; Parish, 1999).

De Clerck *et al.*, (1994) documentaron una viabilidad para linfocitos  $\geq$  al 99%, después del etiquetado con CFSE.

El ensayo de citotoxicidad por liberación de cromo tiene desventajas como: datos semicuantitativos por las bajas diluciones utilizadas, bajo nivel de sensibilidad, pobre etiquetado de algunas líneas celulares blanco, implicaciones para la salud y el ambiente, por el uso de material radioactivo (Derby *et al.*, 2001).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El caballo utilizado para carreras de velocidad, de raza Pura Sangre, es un organismo que está regularmente sometido a condiciones de estrés, por su biotipo constitucional y forma de explotación comercial.

Los síndromes de enfermedades, presentes en el caballo atleta, están asociados principalmente a infecciones del tracto respiratorio en general. Se conoce poco acerca de los efectos del ejercicio intenso sobre la respuesta en la inmunidad innata del caballo entrenado para carreras de velocidad.

Se requiere aportar conocimientos sobre la respuesta inmune innata, en función de la actividad citotóxica de las células NK que es modificada por efecto de un ejercicio intenso, como modelo de estrés agudo en el caballo de raza Pura Sangre, debido a que hay pocos trabajos de investigación que den explicación clara sobre éste tema.

Con el avance y desarrollo disciplinario de la inmunología es posible caracterizar una serie de eventos celulares y moleculares, que permitan diseñar estrategias científicas y tecnológicas, enfocadas a modular el estrés agudo generado por el ejercicio intenso en el caballo atleta de raza Pura Sangre, entrenado para carreras de velocidad.

### **3. HIPÓTESIS**

Si el ejercicio intenso induce a un estado de estrés agudo, entonces se modificarán significativamente las concentraciones de cortisol plasmático y la actividad citotóxica de las células asesinas naturales (NK) en caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, después de una carrera de velocidad.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

- 4.1.1. Caracterizar el efecto *in vivo* que provoca el ejercicio intenso, como modelo de estrés agudo, en los niveles de cortisol plasmático y la actividad citotóxica de las células NK, en caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad.

### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 4.2.1. Determinar los niveles de cortisol plasmático en caballos atletas de raza Pura Sangre, por el procedimiento de radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida, utilizando el producto *Coat-A-Count Cortisol*, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad.
- 4.2.2. Evaluar la actividad citotóxica de las células NK de caballos atletas de raza Pura Sangre sobre la línea celular K562, utilizando los fluorocromos 5(6)-Carboxifluoresceína diacetato N-succinimidil éster (CFSE) y yoduro de propidio (PI), por el procedimiento de citometría de flujo (FACS), a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad.
- 4.2.3. Establecer la asociación, por correlación estadística, entre los niveles de cortisol plasmático y la actividad citotóxica de las células NK en caballos atletas de raza Pura Sangre, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología empleada para evaluar el efecto del ejercicio intenso en los niveles de cortisol plasmático y la actividad citotóxica de las células NK en caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, entrenados para carreras de velocidad (Figura 5.1).

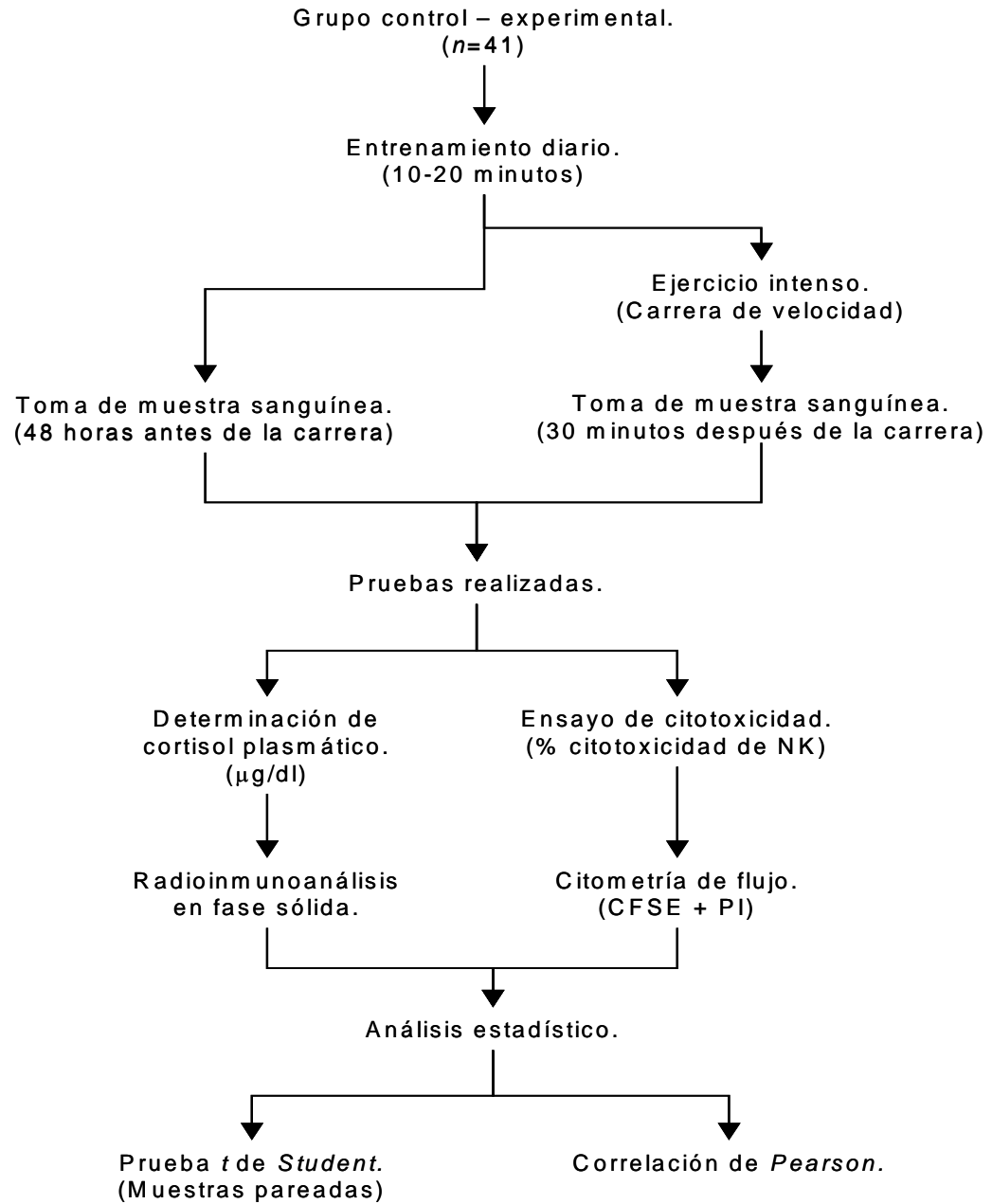


Figura 5.1. Actividades realizadas durante el estudio de manera general.

## 5.1. UNIDADES EXPERIMENTALES

Se utilizó un grupo control - experimental ( $n= 41$ ) de caballos atletas de raza Pura Sangre para el estudio (16 potros, 6 potrancas, 12 enteros, 6 castrados y 1 yegua), de 3, 4 y 5 años de edad, con biotipo constitucional cardio - respiratorio, procedentes de la cuadra T, propiedad del Sr. Luis Bravo Tornel, localizada en las instalaciones del Hipódromo de las Américas, en la Ciudad de México. Las instalaciones donde están alojados los caballos son consideradas de primer nivel por su construcción, diseño y funcionalidad.

El plan de alimentación fue suministrado y supervisado por encargados, caballerangos y médicos veterinarios autorizados en la cuadra T (Cuadro 5.1.1).

Cuadro 5.1.1. Plan de alimentación suministrado a los caballos.

Alimento	Mañana	Tarde
Avena rolada	2 kg	6 kg
Concentrado	*	1 kg
Salvado	*	300 g
Suplemento alimenticio	*	200 g
Alfalfa acicalada	3 kg	3 kg
Alfalfa en greña	*	1 kg
Agua de bebida	<i>ad libitum</i>	

\* No se suministra.

Los caballos fueron inspeccionados clínicamente por médicos veterinarios autorizados en la cuadra T y Secretaría de Carreras del Hipódromo de las Américas.

Los caballos utilizados en el estudio estuvieron sometidos a un programa de medicina preventiva y salud pública veterinaria que por norma oficial establece el Hipódromo de las Américas (Cuadro 5.1.2).

Cuadro 5.1.2. Programa de Medicina Preventiva.

Actividad	Frecuencia
Vacunación contra el virus de la Influenza	Anual
Vacunación contra el virus de la Rinoneumonitis	Anual
Desparasitación	Bimestral
Tratamiento de odontofitos*	Semestral
Aplicación de condroitin sulfato**	Quincenal
Control de garrapatas	Quincenal
Cambio de cama (aserrín)	Mensual
Trabajo en pista	Diario (10 - 20 minutos)

\* Aristas en el borde masticatorio de los molares.

\*\* Protector de cartílago.

## 5.2. PROTOCOLO DEL EJERCICIO

Los caballos, a partir de los dos años de edad, fueron sometidos a un programa de entrenamiento físico de 10 a 20 minutos diariamente, para competir en carreras de velocidad.

La fase de entrenamiento se realizó en la pista oficial de carreras, en forma de óvalo y con una longitud de 1 milla (1608.35 m), entre las 8:00 AM y 10:00 AM. Las sesiones de ejercicio fueron supervisadas y monitoreadas por un entrenador especialista y jinetes autorizados oficialmente por el Hipódromo de las Américas.

Durante el entrenamiento los caballos realizaron ejercicio físico en un nivel intenso, en función de la distancia a la que compitieron. Los caballos iniciaron con un ejercicio de calentamiento por 6 minutos, al paso (cadencia de 3 m/s), trote (cadencia de 5 m/s) y medio galope (cadencia de 7 m/s); de forma continua fueron ejercitados fuertemente durante dos minutos a galope (cadencia de 9 a 11 m/s) y galope intenso (cadencia de 11 a 16 m/s), aproximadamente.

Los caballos utilizados en el estudio registraron un estado de salud adecuado y favorable al momento de competir en una carrera de velocidad.

Los caballos compitieron los fines de semana en carreras de velocidad, recorriendo distancias de 6 furlongs (1,207.01 m), 6½ furlongs (1,307.60 m) y 1 milla (1,608.35 m). El horario de competencia fue de las 3:30 PM a las 8:00 PM los días viernes, sábado y domingo, durante los meses de junio y julio de 2005. Las unidades experimentales fueron sus propios controles a las 48 horas antes de la carrera.

Los caballos que compitieron en una carrera de velocidad se les aplicaron medicamentos indicados por norma oficial de la Secretaría de Carreras del Hipódromo de las Américas, como medida de seguridad para disminuir la probabilidad de riesgo de una hemorragia pulmonar después de la carrera, condición que no se pudo controlar en el grupo control - experimental (Cuadro 5.2.1).

Cuadro 5.2.1. Medicamentos aplicados antes de la carrera.

Clave	Principio activo	Dosis	Nombre comercial	Aplicación (día de la carrera)
D	Fenilbutazona	2 g	Danezona	4 horas antes
L	Furosemida	1.5 g	Lasix	4 horas antes
F	Meglumina de flunixin	500 mg	Finadyne	4 horas antes
P	Estrógenos	a efecto	Premarin	Epistaxis*

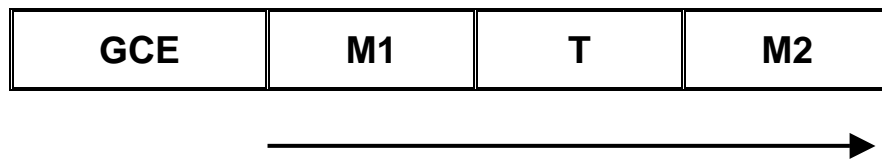
\* Hemorragia nasal.

### 5.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE VENOSA

Se tomaron muestras de sangre venosa, por triplicado, en tubos vacutainer, con heparina de sodio como anticoagulante. Las muestras fueron obtenidas 48 horas antes de la carrera en las instalaciones de la Cuadra T por personal médico veterinario autorizado, y a los 30 minutos después de la carrera (modificado de



Wong *et al.*, 1992), en las instalaciones del Control Antidoping por personal médico veterinario oficial del Hipódromo de las Américas (Figura 5.3.1). El horario de la toma de muestras de sangre venosa fue entre las 4:00 PM y 8:00 PM, por disposiciones oficiales de la Secretaría de Carreras del Hipódromo de las Américas, de la Ciudad de México.



- GCE = Grupo control - experimental ( $n= 41$  caballos).
- M1 = Muestra de sangre completa a las 48 horas antes del ejercicio.
- T = Ejercicio intenso (carrera de velocidad).
- M2 = Muestra de sangre completa a los 30 minutos después del ejercicio.

Figura 5.3.1. Toma de muestras de sangre completa para la determinación de cortisol plasmático y la actividad citotóxica por células NK.

El procedimiento consistió en colocar una aguja estéril para vacutainer de 21Gx1.25" (*Becton Dickinson Vacutainer Systems, product 368607, USA*) en la guía protectora amarilla (*Becton Dickinson Vacutainer Systems, product 364888, USA*).

Para realizar la punción venosa, se desinfectó la región de la vena yugular externa del caballo con alcohol etílico al 70 % y torunda de algodón. Se colectaron 10 ml de sangre venosa en cada tubo vacutainer con heparina de sodio como anticoagulante, de 16x100 mm, 10 ml (*Becton Dickinson Vacutainer, product 367874, USA*), para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y plasma, retirando cada tubo de la guía con cuidado para evitar la hemólisis. Concluida la toma de muestras se retiró la aguja con la guía del vacutainer, limpiando el sitio de la punción con alcohol etílico al 70 % y torunda de algodón (modificado de Pell y McGreevy, 1999).

Cada tubo se identificó con el número de la unidad experimental, fecha y hora correspondiente a su toma, colocando las muestras en una gradilla dentro de una hielera transportadora con refrigerantes a 4 °C, para su traslado al laboratorio donde fueron procesadas el mismo día.

#### **5.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL PLASMÁTICO**

Las concentraciones de cortisol plasmático fueron determinadas por el procedimiento de radioinmunoanálisis (RIA), empleando el producto *Coat-A-Count Cortisol* (*Diagnostic Products Corporation, product TKCO2, USA*) y un contador gamma automático (*Diagnostic Products Corporation, Gambyt CR20, USA*). Este producto está diseñado para utilizarse en humanos, sin embargo es adaptable para usarse en caballos (Wong *et al.*, 1992; Horohov *et al.*, 1999; Pell y McGreevy, 1999; Martínez *et al.*, 2000; Nesse *et al.*, 2002) y tiene una sensibilidad analítica de 0.2 µg/dl. El procedimiento *Coat-A-Count Cortisol* es un radioinmunoanálisis en fase sólida, donde el cortisol marcado con yodo radioactivo (<sup>125</sup>I) compete, durante un periodo de tiempo determinado, con el cortisol en la muestra del caballo, por los sitios de unión de los anticuerpos.

Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción unida al anticuerpo del cortisol marcado. El tubo se coloca en un contador gamma y da un número, que, mediante una curva de calibración estándar, se convierte en una medida de cortisol presente en la muestra del paciente.

Los equipos de laboratorio utilizados fueron: un contador gamma automático, vortex, tubos de ensayo de polipropileno (12x75 mm, 5 ml), micropipetas (25 y 1000 µl), baño de agua con termostato automático a 37 °C y soporte para decantación. Un control de inmunoanálisis, a tres niveles, basado en suero

humano, que contiene cortisol como uno de sus 25 constituyentes (*product CON6*).

#### **5.4.1. OBTENCIÓN DEL PLASMA**

Para determinar los niveles de cortisol plasmático, en cada caballo, se utilizaron 10 ml de sangre venosa con heparina de sodio como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 400 *g* durante 15 minutos a 4 °C, para compactar de manera óptima el paquete celular y poder obtener la mayor cantidad de plasma.

Cada muestra se recolectó con micropipeta en condiciones estériles, colocándola en un tubo Falcon de poliestireno para centrífuga 12x75 mm, 5 ml (*Becton Dickinson Falcon, product 352003, USA*), registrando el número de la unidad experimental, fecha y hora de su obtención.

Las muestras fueron conservadas a –20 °C hasta el momento del RIA (Pell y McGreevy, 1999).

#### **5.4.2. PROCEDIMIENTO DEL RIA EN FASE SÓLIDA**

El día del ensayo se llevaron las muestras a temperatura ambiente (15–28 °C) y se mezclaron por inversión. Se marcaron cuatro tubos de ensayo de polipropileno, sin recubrir (12x75 mm, 5 ml), tubos *T* (cuentas totales) y *NSB* (unión no específica), por duplicado. Se marcaron 12 tubos de ensayo de polipropileno (12x75 mm, 5 ml) recubiertos de anticuerpo con la letra *A* (máxima unión) y *B* hasta *F*, por duplicado. Se marcaron tubos adicionales recubiertos de anticuerpo, para casos y controles, por duplicado.

El volumen requerido fue de 25 µl de plasma por muestra. Se colocaron 25 µl del calibrador cero *A* en los tubos *NSB* y *A* (máxima unión). Se colocaron 25 µl del resto de los calibradores, controles y muestras de los caballos en sus correspondientes tubos (Cuadro 5.4.2.1).

Cuadro 5.4.2.1. Valores de los calibradores del *Coat-A-Count cortisol*.

Calibrador	µg/dl
<i>A (MB)</i>	0
<i>B</i>	1
<i>C</i>	5
<i>D</i>	10
<i>E</i>	20
<i>F</i>	50

Se adicionó 1 ml de cortisol marcado con  $^{125}$ I a todos los tubos y se mezclaron con un vortex (*Vortex - 2 Genie, Scientific Industries, product 65825, USA*). Se incubaron todos los tubos por 45 minutos a 37 °C, utilizando un baño de agua con termostato automático ajustable (*LAB-LINE, model 18000, USA*). Al terminar la incubación se decantaron los tubos, excepto los tubos *T*, dejándolos escurrir por dos minutos sobre un papel absorbente.

#### 5.4.3. CÁLCULOS PARA DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES DE CORTISOL PLASMÁTICO

Se realizó la lectura en cuentas por minuto (cpm) de cada tubo en un contador gamma automático. Para obtener los resultados en términos de concentración a partir de una representación *Logit-log* de la curva de calibración, primero se calcula de cada pareja de tubos las cuentas medias por minuto (*Media cpm*) corregidas con el *NSB*:

$$\text{Cuentas Netas} = (\text{Media cpm}) - (\text{Media NSB cpm})$$

En seguida se determina la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima (*MB*), tomando las cuentas corregidas con el *NSB* de los tubos *A* como el 100 %:

$$\text{Porcentaje de unión} = \text{Cuentas netas} / \text{Cuentas MB netas} \times 100$$

Usando papel gráfico *Logit-log*, se representa el porcentaje de unión en el eje vertical y la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador no - cero, dibujando la línea que pase por esos puntos aproximadamente.

En el presente trabajo los cálculos se realizaron por medio del software incluido en el contador gamma automático (*Diagnostic Products Corporation, GAMBYT CR20, USA*).

Se utilizó una tabla de calibración y los valores de cortisol plasmático se expresaron en  $\mu\text{g/dl}$  (Apéndice 9.2). La sensibilidad analítica de esta prueba es de  $0.2 \mu\text{g/dl}$ . Las determinaciones de cortisol plasmático se realizaron por duplicado (Pell y McGreevy, 1999).

## **5.5. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CON CÉLULAS NK**

El ensayo de citotoxicidad se realizó mediante la utilización de células efectoras NK, células blanco K562 marcadas con 5(6) - Carboxifluoresceína diacetato N - succinimidil éster (CFSE), periodo de incubación y adquisición de datos por medio de citometría de flujo (FACS) (modificado de Zamai, 1993; Kantakamalakul *et al.*, 2003).

### **5.5.1. CÉLULAS EFECTORAS**

Este procedimiento implicó el aislamiento de células mononucleares por centrifugación, utilizando un gradiente de densidad, y recolección de linfocitos no adherentes, como células efectoras en condiciones estériles.

En un tubo Falcon de poliestireno para centrífuga 12x75 mm, 5 ml (*Becton Dickinson Falcon, product 352003, USA*) se colocaron 2 ml de Histopaque - 1077, como gradiente de densidad 1.077 (*Sigma - Aldrich, product 10771, USA*), inmediatamente, sobre la capa de Histopaque, se adicionaron 2 ml de sangre venosa fresca con heparina de sodio como anticoagulante. El tubo se centrifugó a

400 *g* por 30 minutos a 4°C. Se recolectó con micropipeta la capa de células mononucleares, localizada entre la interfase del gradiente de densidad y el plasma, colocándola en otro tubo Falcon de poliestireno para centrifuga, resuspendiendo las células con buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2). Se realizaron tres lavados utilizando PBS (pH 7.2), centrifugando a 200 *g* por 5 minutos a 4 °C y decantando los sobrenadantes. Finalmente se resuspendieron las células mononucleares con medio de crecimiento RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS).

Las células mononucleares de sangre periférica, a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml, fueron colocadas en cajas de poliestireno para cultivo celular de 60x15 mm (*Becton Dickinson, Falcon, product 3002, USA*) e incubadas a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> por una hora para depletar macrófagos y monocitos adherentes. Los linfocitos no adherentes fueron colectados con micropipeta y resuspendidos con medio de crecimiento RPMI-1640 suplementado con 10 % de FBS, a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml para usarse como células efectoras en el ensayo de citotoxicidad por células NK (modificado de Kantakamalakul *et al.*, 2003).

### **5.5.2. CÉLULAS BLANCO**

Se utilizó la línea celular K562 (*ATCC N° CCL-243*) de origen humano, procedente de médula ósea y leucemia mielógena crónica, con propiedades de crecimiento en suspensión, con morfología de linfoblasto, caracterizada altamente como indiferenciada, utilizada principalmente como línea celular blanco, mostrando una alta susceptibilidad en ensayos de citotoxicidad con células NK de equino (Viveiros y Antczak, 1999).

Las células K562 fueron cultivadas en cajas de poliestireno para cultivos celulares de 60x15 mm (*Becton Dickinson, product 3002, USA*) con medio de crecimiento RPMI-1640 (*Gibco, product 11875-093, USA*) suplementado con 10 %

de FBS (*Sigma - Aldrich, product F2442USA*), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina 100 µg/ml, a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Un día previo al ensayo, un subpase de células K562 fue realizado para asegurar que estuvieran en fase logarítmica de crecimiento (*Kantakamalakul et al., 2003*).

El día del ensayo, el procedimiento consistió en centrifugar la suspensión celular de las K562 a 200 *g* por 5 minutos a 4 °C, decantando el sobrenadante, resuspendiendo las células en 2 ml de PBS (pH 7.2) adicionado con 0.1 % de albúmina sérica bovina (BSA, *Sigma - Aldrich, product A9056, USA*) a 4 °C.

La viabilidad celular de las K562 (*De Clerck et al., 1994*) se realizó por medio del procedimiento de tinción por exclusión, utilizando una solución de azul de trypan al 0.4 % (*Sigma - Aldrich product T8154, USA*). Una concentración de 2x10<sup>6</sup> células/ml se centrifugó a 200 *g* por 5 minutos, decantando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 250 µl de PBS (pH 7.2) adicionado con 0.1 % de BSA a 4 °C (modificado de *Hodgkins et al., 1996; Lyons, 1999*).

Para diluir la CFSE (solución stock 500 µg/ml) (*Sigma - Aldrich, product 21888, USA*) se utilizaron 5 µl de la solución stock en 250 µl de PBS (pH 7.2) adicionado con 0.1 % de BSA en un microtubo de 11x41 mm, 1.5 ml (*BRAND, product 7805 00, Germany*) (modificado de *Radcliff et al., 1991; Warren, 1999*).

Se adicionaron 250 µl de la CFSE diluida (concentración 5 µM) a la suspensión celular de las K562, las cuales fueron mezcladas con micropipeta. La suspensión celular se incubó durante 8 minutos a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Al finalizar la fase de incubación se adicionaron a la suspensión celular 3 ml de PBS (pH 7.2) con 0.1 % de BSA a 4 °C. Consecutivamente se realizaron tres lavados con PBS (pH 7.2) con 0.1 % de BSA, centrifugando a 200 *g* por 5 minutos a 4 °C y decantando los sobrenadantes. Para finalizar se resuspendieron las células con medio de crecimiento RPMI-1640 suplementado con 10 % de FBS, ajustando una concentración celular de 1x10<sup>6</sup> células/ml (modificado de *Hodgkins et al., 1996*).

### 5.5.3. CITOTOXICIDAD CON CÉLULAS NK

Para realizar el ensayo de citotoxicidad se prepararon diluciones dobles seriadas de células mononucleares no adherentes como efectoras (E), a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml.

Se utilizó la línea celular K562 (*ATCC N° CCL-243*) como células blanco (T), previamente marcadas con CFSE (*Sigma - Aldrich, product 21888, USA*), en fase de crecimiento logarítmico. Fueron ajustadas, con medio de crecimiento RPMI-1640 suplementado con 10 % de FBS, a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml, colocando 100  $\mu$ l de células blanco en cada tubo, en una relación E/T de 80:1, 40:1, 20:1 y 10:1 (Cuadro 5.5.3.1).

Se utilizaron tubos controles de células efectoras y blanco de manera independiente (Cuadro 5.5.3.2).

Cuadro 5.5.3.1. Tubos experimentales en el ensayo de citotoxicidad.

Tubo	RPMI ( $\mu$ L)	Efectoras (#)	RPMI ( $\mu$ L)	Blanco (#)	Volumen final ( $\mu$ L)	Relación E/T
1	800	800,000	100	10,000	900	80 : 1
2	800	400,000	100	10,000	900	40 : 1
3	800	200,000	100	10,000	900	20 : 1
4	800	100,000	100	10,000	900	10 : 1

Concentración de células efectoras:  $1 \times 10^6$  células/ml.

Concentración de células blanco:  $1 \times 10^5$  células/ml.



Cuadro 5.5.3.2. Tubos control en el ensayo de citotoxicidad.

Tubo control	RPMI (μL)	Efectoras (#)	Blanco (#)	RPMI (μL)	Volumen final (μL)	Fluorocromo
NK (-)	100	100,000	—	800	900	—
NK (+)	100	100,000	—	800	900	PI
K562 (-)	100	—	10,000	800	900	—
K562 (+)	100	—	10,000	800	900	CFSE
K562 (++)	100	—	10,000	800	900	CFSE+PI

Tubo control: negativo (-); positivo (+); doble positivo (++)

Todos los tubos fueron incubados a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Al término de la incubación se adicionaron 100 μl de PI (concentración 50 μg/ml) (*Sigma - Aldrich, product P4170, USA*) a cada tubo, incluyendo los tubos controles de las células efectoras y blanco, el PI se utilizó para marcar células dañadas (modificado de Kantakamalakul *et al.*, 2003).

#### 5.5.4. ADQUISICIÓN POR FACS

La actividad citotóxica fue analizada con un Citómetro de Flujo Analítico (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose, California, USA*).

La ampliación lineal de las señales *forward scatter* y *side scatter* (FSC/SSC), así como la amplificación logarítmica de la emisión de fluorescencia para la CFSE (FL1) y PI (FL2) fueron obtenidos adecuando las condiciones de adquisición a las poblaciones a estudiar, previa compensación en el nivel de fluorescencia del FACS.

Por medio del FACS se realizaron adquisiciones de 10,000 eventos por tubo de muestra. Los resultados se analizaron con el programa *CELL Quest* (*Becton Dickinson, USA*) empleando las funciones de graficación de puntos (*Dot Plot*) con cuadrantes (*UL*= cuadrante superior izquierdo, *UR*= cuadrante superior derecho, *LL*= cuadrante inferior izquierdo y *LR*= cuadrante inferior derecho) para cuantificar el número de células blanco vivas y muertas, en cada tubo, para evaluar la actividad citotóxica de las células NK de caballos (modificado de Kantakamalakul *et al.*, 2003) de raza Pura Sangre, entrenados para carreras de velocidad.

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad se utilizó la siguiente fórmula, a partir de los cuadrantes de los citogramas obtenidos:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{UR}{UR+LR} \times 100$$

Las técnicas de laboratorio estandarizadas y utilizadas en la realización de este trabajo se desarrollaron simultáneamente en el laboratorio 20 del Departamento de Biología Celular y en la Unidad de Citometría de Flujo del Laboratorio Central, pertenecientes al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la supervisión del Dr. Fernando Enríquez Rincón y el Q. Víctor Hugo Rosales García, respectivamente.

En el laboratorio 8 de la Coordinación de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión del Dr. Andrés Romero Rojas.

En el laboratorio 202 del Departamento de Biología de la Facultad de Química, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión del Dr. Fernando García Tamayo.

En el laboratorio 7 de la Facultad de Farmacia, perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la supervisión del Dr. Jorge Reyes Esparza.

## 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron los programas *SPSS 14* (SPSS Inc., 2005) y *Statgraphics 15* (StatPoint Inc., 2006) para realizar el análisis estadístico del estudio.

Se utilizó un grupo control - experimental de caballos de raza Pura Sangre para el estudio ( $n= 41$ ). Las unidades experimentales fueron sus propios controles a las 48 horas antes de la carrera (Apéndice 9.1).

Se utilizó la prueba *t* de *Student* de muestras pareadas (2 lados) para comparar los valores de cortisol plasmático y los porcentajes de citotoxicidad de las células NK, obtenidos en los caballos a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad ( Apéndice 9.4).

Se utilizó el análisis de regresión para calcular los coeficientes de correlación de *Pearson* y establecer la relación significativa entre los niveles de cortisol plasmático y la actividad citotóxica de las células NK, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad (Apéndices 9.6 y 9.7).

Los parámetros estadísticos calculados se reportaron como la media  $\pm$  su error estándar de la media (Apéndice 9.3).

La magnitud de la desviación estándar indica cuanta variabilidad hay en los datos, mientras que el error estándar de la media es el parámetro usado para comparar las medias de dos muestras y determinar si son o no diferentes significativamente (Ryder y Robakiewicz, 1998).

Un valor de *P* menor a  $0.05$  ( $P<0.05$ ) indicó una diferencia significativa entre los datos analizados en cada prueba estadística (Apéndice 9.5).

## 6. RESULTADOS

Los parámetros estadísticos se calcularon a partir de los valores individuales del grupo control-experimental (Apéndice 9.1) y se reportaron como la media  $\pm$  su error estándar de la media (Apéndice 9.3). Un valor de  $P$  menor a  $0.05$  ( $P < 0.05$ ) indica una diferencia significativa en los datos analizados (Apéndice 9.4).

### 6.1. NIVELES DE CORTISOL PLASMÁTICO

Las concentraciones de cortisol plasmático, en caballos de raza Pura Sangre, se determinaron por radioinmunoanálisis en fase sólida, reportándose en  $\mu\text{g/dl}$ , a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad (Cuadro 6.1.1).

Cuadro 6.1.1. Niveles de cortisol plasmático en caballos de raza Pura Sangre, antes y después de una carrera de velocidad.

Tiempo	Cortisol plasmático ( $\mu\text{g/dl}$ )	$n$
A las 48 horas antes de la carrera	$2.49 \pm 0.21$	41
A los 30 minutos después de la carrera	$11.42 \pm 0.29^*$	41

Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de la media.

\* Indica diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), comparada con antes de la carrera.

$n$  = Número de unidades experimentales.

Las concentraciones de cortisol plasmático en el grupo control-experimental registraron un incremento significativo ( $*P<0.05$ ;  $n=41$ ) a los 30 minutos después de la carrera de velocidad ( $11.42 \pm 0.29 \mu\text{g/dl}$ ), con relación a las concentraciones ( $2.49 \pm 0.21 \mu\text{g/dl}$ ) a las 48 horas antes de la carrera (Figura 6.1.1).

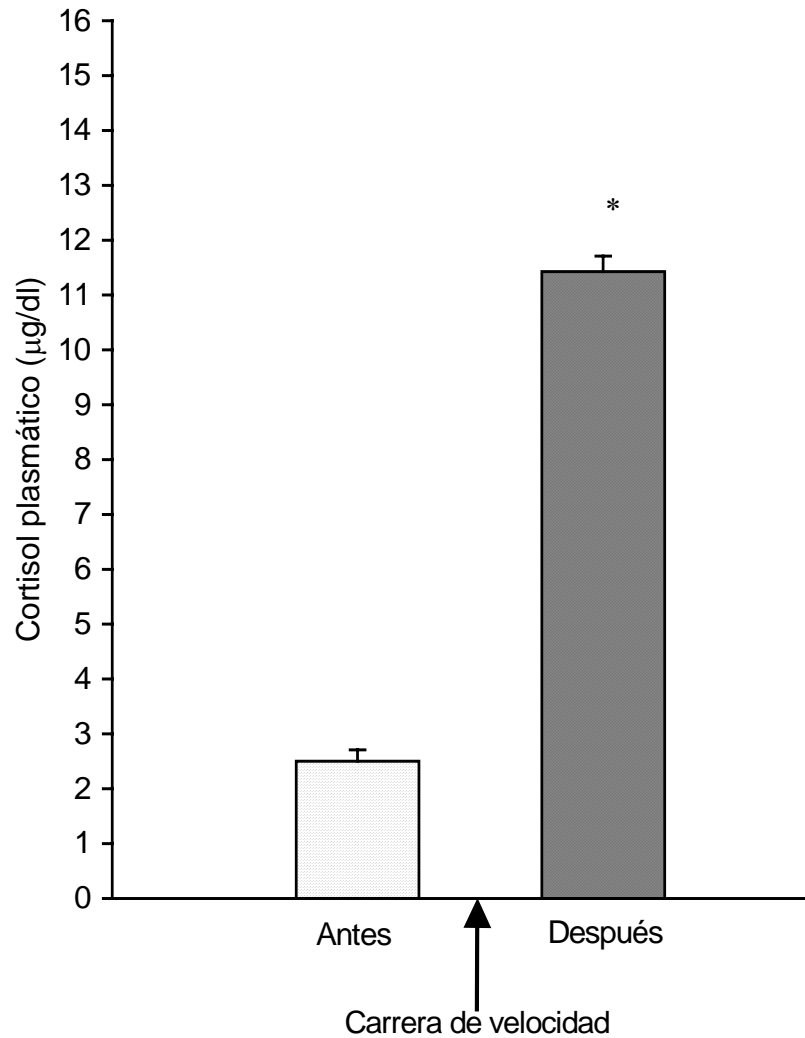


Figura 6.1.1. Efecto del ejercicio intenso sobre los niveles de cortisol plasmático en el grupo control-experimental, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad ( $*P<0.05$ ;  $n=41$ ). La altura de cada barra indica la media  $\pm$  el error estándar de la media.

## 6.2. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS NK

La actividad citotóxica de las células NK, de caballos de raza Pura Sangre, sobre la línea celular K562, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad, se analizó por citometría de flujo y se registró en porcentaje (%) de citotoxicidad de las células NK (Cuadro 6.2.1).

Cuadro 6.2.1. Actividad citotóxica de las células NK de caballos de raza Pura Sangre, antes y después de una carrera de velocidad.

Relación E/T	% de citotoxicidad de células NK		<i>n</i>
	Antes	Después	
80:1	28.88 ± 1.41	24.67 ± 1.48*	41
40:1	26.09 ± 1.42	21.96 ± 1.12*	41
20:1	23.03 ± 1.32	20.65 ± 1.53	41
10:1	20.94 ± 1.39	18.18 ± 1.31	41

Los valores representan la media ± el error estándar de la media.

E/T= Efectora/Blanco.

Antes se refiere a las 48 horas antes de la carrera de velocidad, y después a los 30 minutos después de la carrera de velocidad.

\* Indica diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), comparada con antes de la carrera.

*n* = Número de unidades experimentales.

La actividad citotóxica de las células NK en el grupo control-experimental disminuyó significativamente ( $*P<0.05$ ;  $n= 41$ ) a los 30 minutos después de la carrera de velocidad, comparada con la actividad citotóxica a las 48 horas antes de la carrera, en las relaciones efectora/blanco 80:1 y 40:1 (Figura 6.2.1).

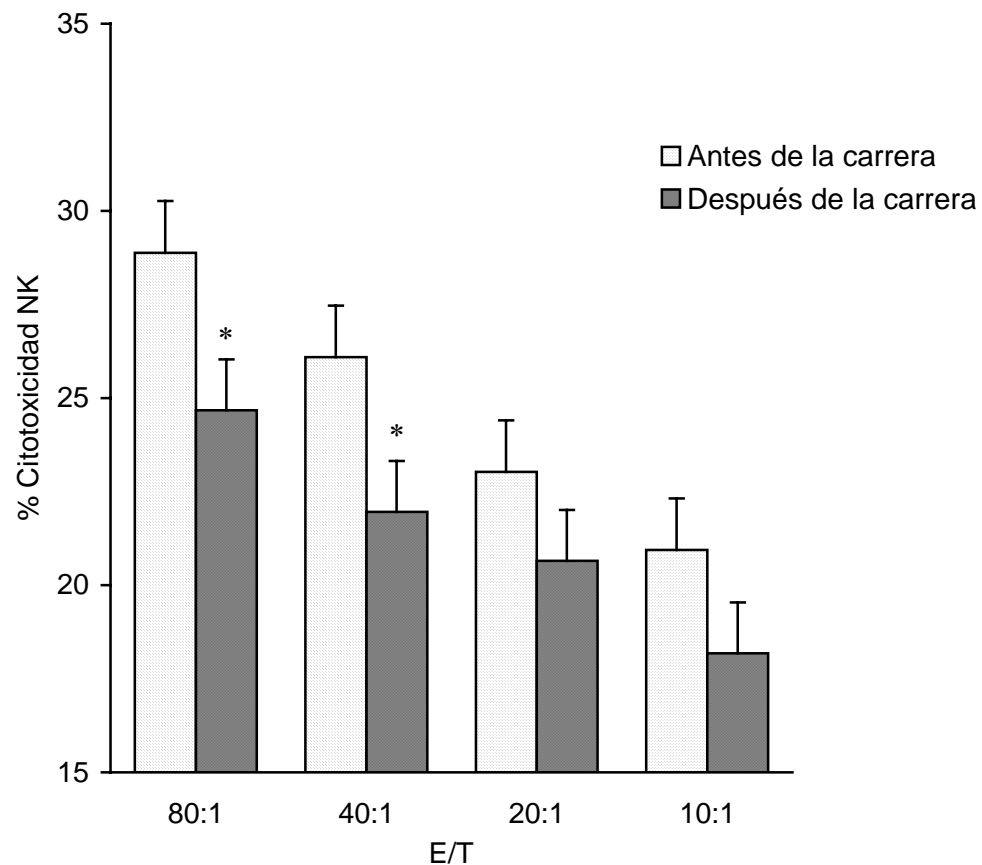


Figura 6.2.1. Efecto del ejercicio intenso sobre la actividad citotóxica de las células NK del grupo control-experimental, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad, a diferentes relaciones de efectora/blanco (E/T). La altura de cada barra indica la media  $\pm$  el error estándar de la media, \* indica diferencia significativa comparada con antes de la carrera ( $P<0.05$ ;  $n= 41$ ).

El ensayo de citotoxicidad se realizó por citometría de flujo, durante un periodo de incubación de 4 horas con células mononucleares no adherentes de sangre periférica de caballo como efectoras NK y células K562 marcadas con CFSE como blanco (Figura 6.2.2).

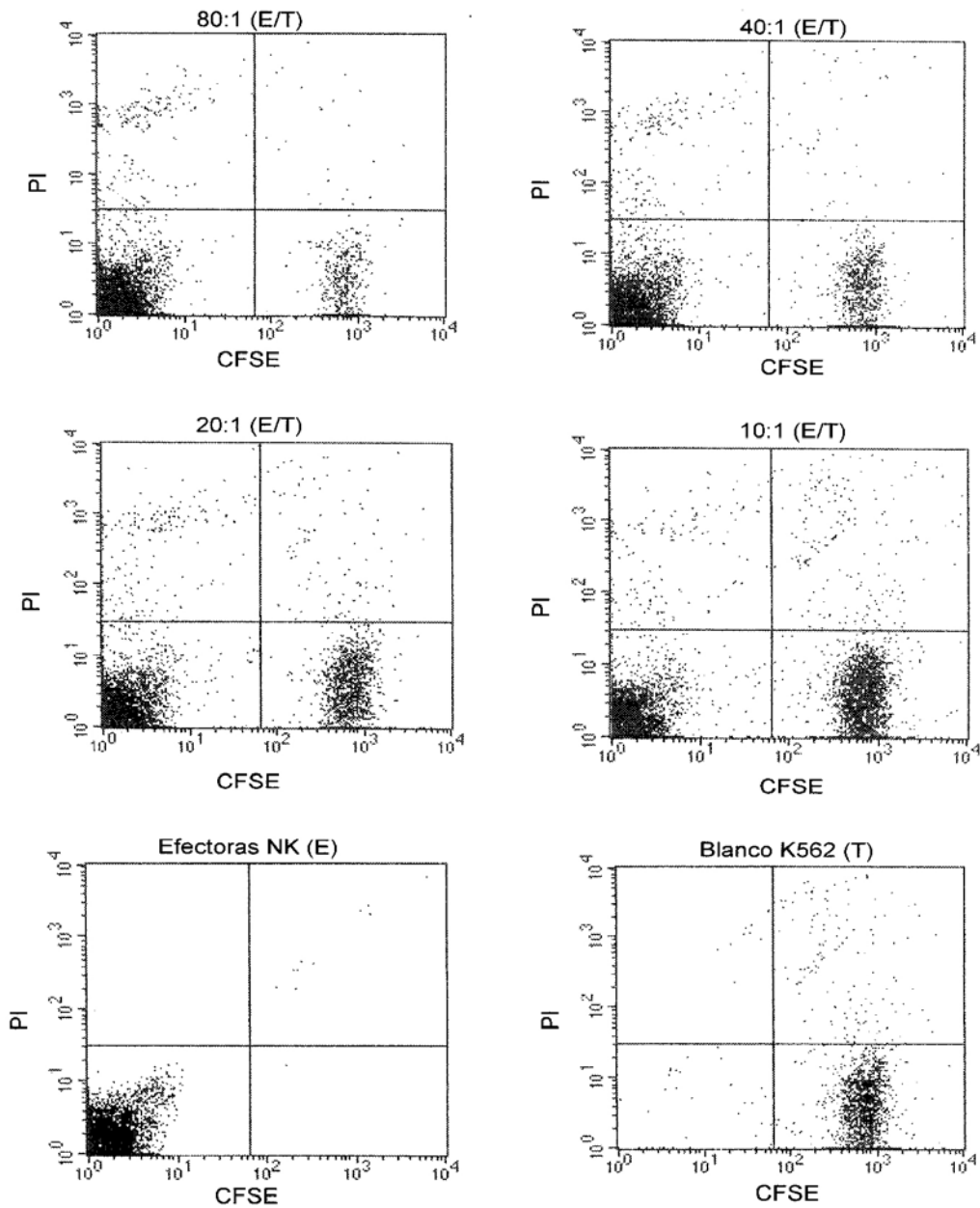


Figura 6.2.2. Adquisición por citometría de flujo en un ensayo de citotoxicidad representativo a diluciones dobles seriadas, con un periodo de incubación de 4 horas, a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, utilizando células mononucleares no adherentes de sangre periférica de caballo como efectoras (E) y células K562 marcadas con CFSE como blanco (T), colocando controles de células efectoras y blanco. El porcentaje de lisis de las células K562 se calculó utilizando la siguiente fórmula: % citotoxicidad = UR/UR+LR x 100.



La prueba de rangos múltiples de ANOVA (Apéndice 9.5) mostró una diferencia significativa entre los porcentajes de citotoxicidad en las relaciones efectora/blanco (E/T) 80:1 vs. 20:1 y 10:1, así como 40:1 vs. 10:1 (\* $P < 0.05$ ;  $n = 41$ ), a las 48 horas antes de una carrera de velocidad. También mostró una diferencia significativa entre los porcentajes de citotoxicidad en las relaciones E/T 80:1 vs. 20:1 y 10:1 (\* $P < 0.05$ ;  $n = 41$ ), a los 30 minutos después de la carrera de velocidad (Figura 6.2.3).

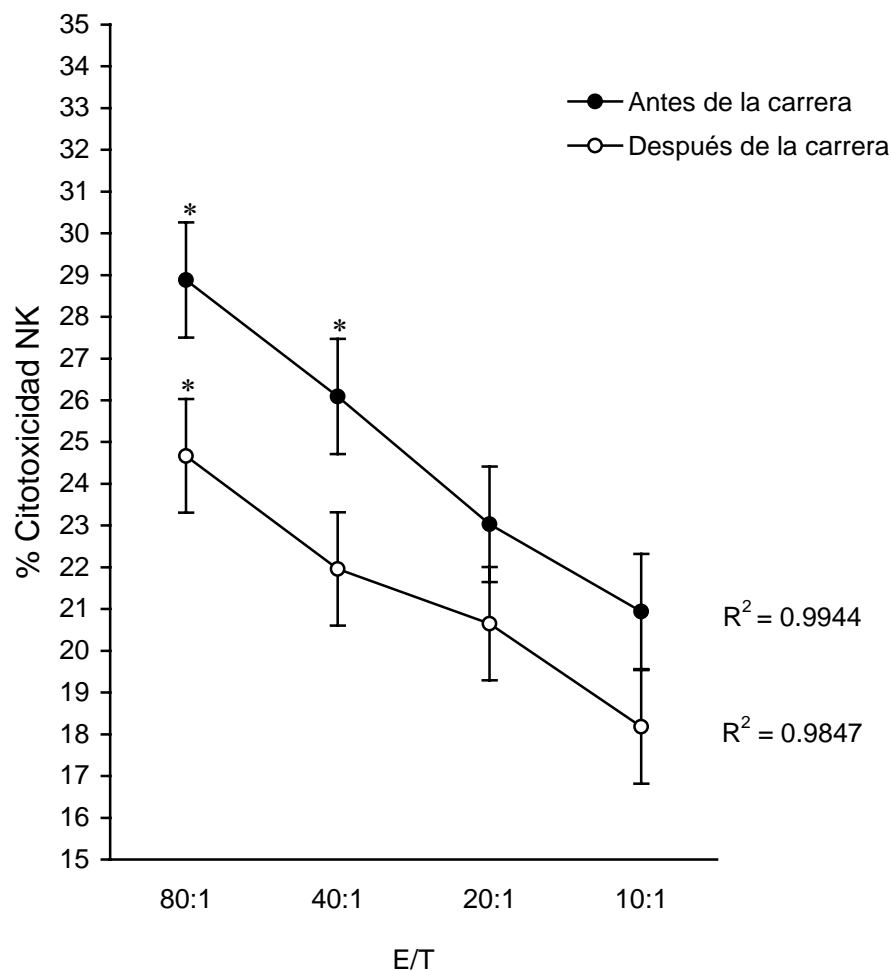


Figura 6.2.3. Efecto del ejercicio intenso en la actividad citotóxica de las células NK sobre la línea celular blanco K562 marcadas con CFSE por citometría de flujo, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad, a diferentes relaciones efectora/blanco (E/T). Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media, \*  $P < 0.05$  y  $n = 41$ .

### 6.3. RELACIÓN ENTRE CORTISOL PLASMÁTICO Y ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CÉLULAS NK

Los coeficientes de correlación de *Pearson* (Apéndice 9.7) en el estudio revelaron una relación significativa entre las concentraciones de cortisol plasmático y la actividad citotóxica de las células NK de caballos de raza Pura Sangre, en la relación efectora/blanco (E/T) 40:1 ( $r= 0.343$ ;  $P<0.05$ ;  $n= 41$ ), a los 30 minutos después de la carrera de velocidad (Figura 6.3.1).

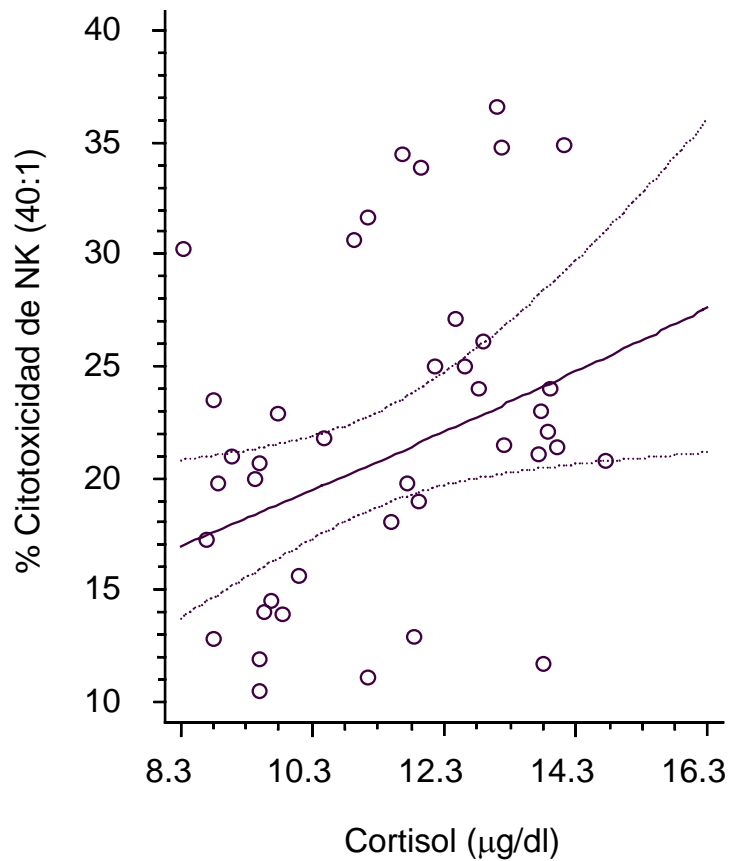


Figura 6.3.1. Efecto del ejercicio intenso en la actividad citotóxica de las células NK en caballos de raza Pura Sangre, en una relación efectora/blanco 40:1 vs. la concentración de cortisol plasmático, a los 30 minutos después de la carrera de velocidad ( $r= 0.343$ ;  $P<0.05$ ;  $n= 41$ ).

## 7. DISCUSIÓN

Existe un número reducido de trabajos publicados sobre los efectos que tiene el ejercicio intenso en la actividad citotóxica de las células NK, de caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, que son entrenados para competir en carreras de velocidad.

Los efectos del ejercicio en el sistema inmune dependen de las condiciones físicas del organismo, la intensidad y duración del ejercicio, así como la evaluación de los parámetros inmunológicos (Horohov *et al.*, 1996). El incremento significativo en las concentraciones de cortisol plasmático, después de un ejercicio intenso, es uno de los indicadores que se asocia a un estado de estrés agudo en un organismo (Furusawa *et al.*, 2003).

Se ha observado, en modelos *in vitro*, que el cortisol actúa como un potente inhibidor de la actividad citotóxica de las células NK, sin embargo hay estudios contrastantes en humanos sobre el efecto del cortisol en la actividad de las células NK *in vivo*, mostrando incremento, decremento, cambio bimodal o aparentemente sin cambios (Bodner *et al.*, 1998).

Los niveles de cortisol plasmático generados a consecuencia de un ejercicio intenso, como un factor en el mecanismo del estrés agudo, inducen a un estado de inmunosupresión transitoria en el organismo, provocando una disminución en la actividad citotóxica de las células NK (Wrona *et al.*, 2001).

Kurcz *et al.*, (1988) reportaron un incremento significativo en las concentraciones de cortisol plasmático a los 5 y 30 minutos después de un ejercicio intenso, en cuatro caballos hembras cuarto de milla, de 5 a 9 años de edad, los cuales fueron acondicionados físicamente y sometidos a una carrera de velocidad.

Nesse *et al.*, (2002) reportaron un incremento significativo en las concentraciones de cortisol plasmático de 40 a 60 minutos después de una carrera

de velocidad de una milla, comparadas con las concentraciones antes de la carrera, utilizando 9 caballos de raza Pura Sangre, de 2 a 9 años de edad.

Los trabajos reportados por Kurcz *et al.*, (1988); Wong *et al.*, (1992); Horohov *et al.*, (1999); Pell y McGreevy (1999); y Nesse *et al.*, (2002) utilizaron diseños experimentales con muestras de caballos en menor número, grupos heterogéneos en raza, sexo y rangos amplios de edad, acondicionados sin un programa de entrenamiento diario y constante, sometidos a estresores diferentes a las condiciones de un hipódromo, pertenecientes a escuelas de medicina veterinaria y utilizados para evaluar la función inmune innata a través de ensayos de proliferación de linfocitos, complemento, índice quimiotáctico, estallido respiratorio, etc.

El presente trabajo se enfocó a evaluar *in vivo* la relación entre los niveles de cortisol plasmático y la actividad citotóxica de las células NK de caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, entrenados para carreras de velocidad.

El grupo control-experimental, en el presente trabajo, estuvo conformado por caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, entrenados a partir de los 2 años de edad para iniciar su actividad de competencia a los 3 años y continuar bajo programas de entrenamiento diario y constante hasta los 5 años de edad.

Los resultados obtenidos muestran el alcance de los objetivos del presente trabajo, al determinar las concentraciones de cortisol plasmático y evaluar la actividad citotóxica de las células NK, para establecer la relación significativa entre los niveles de cortisol plasmático y la actividad citotóxica de las células NK en caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad.

Los resultados, en el presente trabajo, indican que los niveles de cortisol plasmático, en los caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, se incrementaron significativamente a los 30 minutos después de la carrera de

velocidad, con relación a los niveles de cortisol plasmático a las 48 horas antes de la carrera, en los mismos caballos (grupo control-experimental), observación que coincide con los reportes de Kurcz *et al.*, (1988); Wong *et al.*, (1992); Horohov *et al.*, (1999) y Nesse *et al.*, (2002).

Se observó, en el presente trabajo, que la actividad citotóxica de las células NK, a los 30 minutos después de la carrera de velocidad, disminuyó significativamente con relación a la registrada a las 48 horas antes de la carrera en los mismos caballos (grupo control-experimental), existiendo la posibilidad de que el ejercicio intenso tiene un efecto negativo *in vivo* sobre la actividad citotóxica de las células NK de caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, observación que coincide con el reporte de Horohov *et al.*, (1999).

En el presente trabajo, se observó que la actividad citotóxica de las células NK a los 30 minutos después de la carrera de velocidad registró una diferencia significativa entre los porcentajes de citotoxicidad sobre la línea celular K562, en las relaciones E/T 80:1 vs. 20:1 y 10:1; determinando que la relación E/T 80:1 fue la más eficiente en el ensayo de citotoxicidad, en función del análisis estadístico.

En el presente trabajo, se observó que la actividad citotóxica de las células NK a las 48 horas antes de la carrera registró una diferencia significativa entre los porcentajes de citotoxicidad sobre la línea celular K562, en las relaciones E/T 80:1 vs. 20:1 y 10:1; así como 40:1 vs. 20:1 y 10:1; determinando que la relación E/T 40:1 fue la más eficiente en el ensayo de citotoxicidad, en función del análisis estadístico.

En el presente trabajo se observó una relación significativa entre las concentraciones de cortisol plasmático y la actividad citotóxica de las células NK, en una relación E/T 40:1 a los 30 minutos después de la carrera de velocidad.

Es probable que bajo condiciones *in vivo* el incremento significativo en los niveles de cortisol plasmático, como único factor, no provoque un efecto supresivo en la actividad citotóxica de las células NK, debido a que se ha postulado un

mecanismo de inmunosupresión sin mediación de cortisol, en función de la acción central directa de la hormona liberadora de la corticotropica, sin participación directa del cortisol endógeno (Wrona *et al.*, 2001).

Los caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad utilizados en el presente trabajo, a pesar de estar bajo programas de entrenamiento diario y constante, mostraron un incremento significativo en las concentraciones de cortisol plasmático, el cual puede estar asociado con la disminución en la actividad citotóxica de las células NK a los 30 minutos después de una carrera de velocidad, en respuesta al mecanismo del estrés agudo, sin existir una relación significativa en todas las relaciones E/T.

El trabajo de investigación tuvo limitaciones debido a que no se cuantificó el número de células NK en la circulación sanguínea, no se determinaron los niveles de catecolaminas, prostaglandinas, neuropéptidos y hormonas esteroidales (testosterona y estrógenos), considerados como factores que pueden liberarse en respuesta al ejercicio intenso, los cuales pueden estar asociados con la actividad citotóxica de las células NK, así como la excitación en el caballo de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, antes y después de la carrera. Además no fue posible contar con un grupo control de caballos sin haber recibido medicamentos cuatro horas antes de una carrera, debido a que la secretaría de carreras del Hipódromo de las Américas, por norma oficial, no permite competir a ningún caballo si no va medicado.

Con relación a las limitaciones consideradas en el presente trabajo se sugiere evaluar las condiciones mencionadas a través de otros diseños experimentales, con la finalidad de incrementar y aportar un mejor conocimiento sobre los efectos que tiene el ejercicio intenso, como modelo de estrés agudo, en la actividad citotóxica de las células NK de caballos de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, que son entrenados para competir en carreras de velocidad.

## 8. CONCLUSIONES

Como conclusiones del presente trabajo se puede establecer que:

- Los caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, que compiten en carreras de velocidad, aunque están sometidos a programas de entrenamiento diario y constante, pueden mostrar una susceptibilidad marcada al efecto del ejercicio intenso, induciendo un estado de estrés agudo en el organismo a los 30 minutos después de una carrera.
- El ejercicio intenso realizado por caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, en una carrera de velocidad, puede inducir un incremento significativo en las concentraciones de cortisol plasmático y a la vez una disminución significativa en la actividad citotóxica de las células NK, a los 30 minutos después de la carrera.
- El incremento significativo en las concentraciones de cortisol plasmático, que es uno de los indicadores *in vivo* en un estado de estrés agudo, puede estar asociado con la disminución significativa de la actividad citotóxica de las células NK de caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, a los 30 minutos después de una carrera de velocidad.
- El ejercicio intenso puede diferencialmente modular las funciones de la inmunidad innata en el organismo, ya que una carrera de velocidad puede tener efectos negativos en la actividad citotóxica de las células NK de caballos atletas de raza Pura Sangre de 3 a 5 años de edad, después de una carrera.

## 9. Apéndices

### 9.1. Valores individuales del grupo control-experimental.

a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o
1	3	1	1	1	2.05	11.96	27.67	27.30	23.00	36.36	32.85	33.82	30.41	31.40
2	3	1	2	2	4.96	11.66	25.16	22.33	19.35	21.93	31.49	34.48	26.58	31.25
3	3	1	2	2	3.80	13.11	26.87	26.79	33.50	22.58	30.63	36.62	37.08	31.00
4	3	1	3	2	3.75	14.10	26.87	26.79	33.50	22.58	37.18	34.86	19.61	35.00
5	3	1	3	2	2.76	8.79	27.23	28.81	34.38	24.84	29.73	23.53	25.00	32.00
6	3	1	3	2	1.07	10.95	27.23	28.81	34.38	24.84	31.58	30.66	35.77	35.50
7	3	1	2	2	2.83	8.35	27.23	28.81	34.38	24.84	24.32	30.26	33.23	31.00
8	3	1	3	2	1.19	12.15	34.12	27.24	27.27	28.57	35.28	25.00	27.59	13.33
9	3	1	2	1	3.67	9.68	21.90	21.50	23.12	30.48	12.47	14.49	14.39	15.61
10	3	1	2	2	1.17	11.15	21.90	21.50	23.12	30.48	26.63	31.63	18.52	16.51
11	3	1	3	1	1.11	11.83	30.41	32.41	27.52	29.51	13.04	12.89	12.60	9.38
12	3	1	2	2	4.02	8.88	24.36	25.52	25.25	16.05	12.73	19.77	18.22	20.00
13	3	1	2	2	3.75	9.87	32.00	21.32	30.19	26.47	16.19	13.88	12.50	16.00
14	3	2	2	1	2.33	11.74	28.16	27.97	23.84	20.48	15.09	19.74	10.20	8.86
15	3	2	3	1	4.25	11.15	28.44	27.31	36.79	22.64	11.17	11.07	9.40	6.63
16	3	2	2	1	3.66	9.57	26.87	26.79	33.50	22.58	13.48	14.00	14.89	15.21
17	3	2	2	2	3.10	8.80	21.90	21.50	23.12	30.48	13.35	12.85	8.59	8.24
18	3	4	2	2	2.58	13.82	21.90	21.50	23.12	30.48	14.88	11.74	9.48	10.47
19	3	4	2	2	1.01	14.74	29.43	16.85	21.09	21.79	22.18	20.80	17.20	13.47
20	4	1	3	1	0.23	13.21	31.52	23.72	21.21	21.28	29.81	21.49	13.24	9.79
21	4	1	1	1	3.25	11.92	32.18	26.32	21.88	6.67	34.30	19.00	29.91	12.50
22	4	1	3	1	4.49	13.91	45.32	32.45	28.70	42.11	44.71	24.00	42.77	19.23
23	4	2	2	1	3.47	14.01	34.24	30.30	17.86	17.78	21.80	21.34	12.59	7.14
24	4	2	3	1	3.58	13.77	39.88	36.02	18.99	15.00	26.46	23.00	9.09	14.29
25	4	4	1	1	1.01	12.81	39.42	48.45	32.65	24.44	40.98	24.00	24.50	23.30
26	4	4	3	1	1.44	9.10	35.35	42.38	25.61	26.53	39.08	21.00	13.94	8.78
27	4	4	3	1	1.17	12.61	48.90	28.94	27.27	15.69	43.70	25.00	12.94	15.73
28	4	4	1	1	1.21	10.09	36.77	28.96	13.08	13.64	13.02	15.65	10.94	12.12
29	5	3	1	2	1.07	9.49	54.42	40.59	23.40	33.33	24.02	10.46	13.73	10.20
30	5	3	1	2	1.07	9.50	45.19	40.19	36.54	33.33	17.09	20.70	24.77	18.56
31	5	3	1	1	4.80	13.75	18.79	42.37	17.39	12.33	13.96	21.08	17.05	22.22
32	5	3	2	1	2.51	9.44	13.60	13.29	7.83	5.88	23.94	19.93	16.38	12.31
33	5	3	1	1	4.97	11.51	21.40	16.45	10.78	14.04	17.88	18.00	25.71	12.31
34	5	3	3	1	0.67	9.49	17.49	10.53	7.43	7.32	13.76	11.92	11.40	17.19
35	5	3	3	3	2.11	13.86	16.85	20.63	12.26	9.80	17.65	22.04	10.61	17.57
36	5	3	1	1	4.60	9.80	33.92	34.88	28.83	17.02	30.11	22.91	26.89	18.87
37	5	3	1	1	2.43	12.91	20.10	6.21	11.38	9.59	30.68	26.09	46.48	30.00
38	5	3	2	3	0.79	13.18	21.41	10.00	10.92	13.89	31.21	34.80	34.41	15.69
39	5	3	1	1	0.87	8.70	21.46	20.73	11.01	8.47	23.54	17.22	18.52	16.35
40	5	3	1	1	2.50	10.50	28.66	16.76	15.73	7.27	23.85	21.78	23.23	19.49
41	5	5	3	1	1.09	12.47	17.63	18.52	13.16	15.38	25.86	27.14	26.32	31.11

Unidad experimental (a); edad (b); sexo (c); distancia recorrida (d); medicamentos aplicados (e);  $\mu\text{g/ml}$  de cortisol plasmático a las 48 horas antes de la carrera (f);  $\mu\text{g/ml}$  de cortisol plasmático a los 30 minutos después de la carrera (g); % de citotoxicidad en una relación efectora/blanco 80:1, 40:1, 20:1 y 10:1 a las 48 horas antes de la carrera (h, i, j, k); % de citotoxicidad en una relación efectora/blanco 80:1, 40:1, 20:1 y 10:1 a los 30 minutos después de la carrera (l, m, n, o).

Edad= años; sexo= potro (1), potranca (2), entero (3), castrado (4), yegua (5); distancia recorrida= una milla (1), 6  $\frac{1}{2}$  furlongs (2), 6 furlongs (3); medicamentos aplicados= furosemida+butazolidona (1), butazolidona (2), furosemida+meglumina (3).



9.2. Tabla de calibración para cortisol por RIA en fase sólida.

Tubo	Duplicado cpm	Promedio cpm	Neto cpm	% de unión	Cortisol μg/dl
T	84,250 83,899	84,075	—	—	—
NSB	519 415	467	0	—	—
A (MB)	46,585 46,351	46,468	46,001	100	0
B	38,113 38,034	38,074	37,607	82	1
C	26,346 26,661	26,504	26,037	57	5
D	19,778 20,113	19,946	19,479	42	10
E	14,049 13,851	13,950	13,483	29	20
F	7,548 7,739	7,644	7,177	16	50

Radioinmunoanálisis (RIA); cuentas totales (T); unión no específica (NSB); máxima unión (MB); diferentes concentraciones de anticuerpo para cortisol (B-F); cuentas por minuto (cpm).

### 9.3. Estadística descriptiva de muestras pareadas.

	Variables	Media	N	SD	SEM
	a. Cortisol ( $\mu\text{g/dl}$ )	2.4973	41	1.40477	0.21939
	b. Cortisol ( $\mu\text{g/dl}$ )	11.4227	41	1.89058	0.29526
E/T	a. 80:1 (% citotoxicidad)	28.8817	41	9.04057	1.41190
	b. 80:1 (% citotoxicidad)	24.6751	41	9.52161	1.48703
	a. 40:1 (% citotoxicidad)	26.0912	41	9.12369	1.42488
	b. 40:1 (% citotoxicidad)	21.9668	41	7.19110	1.12306
	a. 20:1 (% citotoxicidad)	23.0324	41	8.48401	1.32498
	b. 20:1 (% citotoxicidad)	20.6507	41	9.84412	1.53739
	a. 10:1 (% citotoxicidad)	20.9456	41	8.94478	1.39694
	b. 10:1 (% citotoxicidad)	18.1856	41	8.43096	1.31670

Relación efectora/blanco (E/T); a las 48 horas antes de la carrera de velocidad (a); a los 30 minutos después de la carrera de velocidad (b); promedio (media); número de unidades experimentales (N); desviación estándar (SD); error estándar de la media (SEM).

9.4. Prueba *t* de muestras pareadas de cortisol plasmático y citotoxicidad, a las 48 horas antes y a los 30 minutos después de una carrera de velocidad.

	Pares	Diferencias pareadas			t	df	Sig.
		Media	SD	SEM			
	a. Cortisol-b. Cortisol	-8.92537	2.31475	0.36150	-24.690	40	0.000 *
E/T	a. 80:1 - b. 80:1	4.20659	10.31636	1.61114	2.611	40	0.013 *
	a. 40:1 - b. 40:1	4.12439	11.91519	1.86084	2.216	40	0.032 *
	a. 20:1 - b. 20:1	2.38171	12.28134	1.91802	1.242	40	0.222
	a. 10:1 - b. 10:1	2.76000	12.11723	1.89239	1.458	40	0.153

Relación efectora/blanco (E/T); a las 48 horas antes de la carrera de velocidad (a); a los 30 minutos después de la carrera de velocidad (b); promedio (media); desviación estándar (SD); error estándar de la media (SEM); grados de libertad (df); valor de significancia para la prueba de *t* (Sig); \* indica una diferencia significativa entre las dos medias comparadas ( $P < 0.05$ ).

9.5. Prueba de rangos múltiples para determinar diferencia significativa entre las medias.

Comparación de pares	Sig.	Diferencia	+/- Límites
a Cortisol - b Cortisol	*	-8.92537	3.45418
a80 - a40		2.79049	3.45418
a80 - a20	*	5.84927	3.45418
a80 - a10	*	7.9361	3.45418
a80 - b80	*	4.20659	3.45418
a80 - b40	*	6.91488	3.45418
a80 - b20	*	8.23098	3.45418
a80 - b10	*	10.6961	3.45418
a40 - a20		3.05878	3.45418
a40 - a10	*	5.14561	3.45418
a40 - b80		1.4161	3.45418
a40 - b40	*	4.12439	3.45418
a40 - b20	*	5.44049	3.45418
a40 - b10	*	7.90561	3.45418
a20 - a10		2.08683	3.45418
a20 - b80		-1.64268	3.45418
a20 - b40		1.06561	3.45418
a20 - b20		2.38171	3.45418
a20 - b10	*	4.84683	3.45418
a10 - b80	*	-3.72951	3.45418
a10 - b40		-1.02122	3.45418
a10 - b20		0.294878	3.45418
a10 - b10		2.76	3.45418
b80 - b40		2.70829	3.45418
b80 - b20	*	4.02439	3.45418
b80 - b10	*	6.48951	3.45418
b40 - b20		1.3161	3.45418
b40 - b10	*	3.78122	3.45418
b20 - b10		2.46512	3.45418

A las 48 horas antes de la carrera de velocidad (a); a los 30 minutos después de la carrera de velocidad (b); \* indica diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

9.6. Correlación de cortisol plasmático contra citotoxicidad de las células NK, a las 48 horas antes de la carrera de velocidad.

Variables	Estadística	E/T			
		80:1	40:1	20:1	10:1
Cortisol	Correlación de <i>Pearson</i>	- 0.136	0.061	0.167	- 0.003
	Sig. (2-colas)	0.397	0.703	0.296	0.987
	N	41	41	41	41

Relación efectora/blanco (E/T); número de unidades experimentales (N).

9.7. Correlación de cortisol plasmático contra citotoxicidad de las células NK, a los 30 minutos después de la carrera de velocidad.

Variables	Estadística	E/T			
		80:1	40:1	20:1	10:1
Cortisol	Correlación de <i>Pearson</i>	0.307	0.343*	0.127	0.052
	Sig. (2-colas)	0.051	0.028	0.429	0.745
	N	41	41	41	41

Relación efectora/blanco (E/T); número de unidades experimentales (N);  
\*correlación significativa ( $P < 0.05$ ).

## 10. REFERENCIAS

- Akens, M.K., Holznagel, E., Franchini, M. and Bracher, V. (1997). Comparative analysis of equine lymphocyte subsets in whole blood and gradient-purified samples. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58:231-237.
- Banks, K.L. and Greenlee, A. (1981). Isolation and Identification of Equine Lymphocytes and Monocytes. *American Journal Veterinary Research* 42(9):1651-1654.
- Bendali-Ahcène, S., Monier, J.C., Fontaine, M., Greenland, T. and Cadoré, J.L. (1995). Flow cytometric analysis of blood lymphocyte phenotypes in horses infected with the equine infectious anemia virus. *Journal of Equine Veterinary Science* 15(8):360-364.
- Berson, S. A. and Yalow, R. S. (1968). General principles of radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta* 22:51.
- Bodner, G., Ho, A. and Kreek, M.J. (1998). Effect of endogenous cortisol levels on Natural Killer cell activity in healthy humans. *Brain, Behavior and Immunity* 12:285-296.
- Carayannopoulos, L.N. and Yokoyama, W.M. (2004). Recognition of infected cells by natural killer cells. *Current Opinion in Immunology* 16:1-8.
- Chong, Y.C., Duffus, W.P.H. and Hannant, D. (1992). Natural Killer cells in normal horses and specific-pathogen-free foals infected with equine herpesvirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 33:103-113.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Fuchs, A., Colonna, M. and Caligiuri, M.A. (2004). NK cell and DC interactions. *Trends in Immunology* 5(1):47-52.
- De Clerck, L.S., Bridts, C.H., Mertens, A.M., Moens, M.M. and Stevens, W.J. (1994). Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *Journal of Immunological Methods* 172:115-124.
- Dean, P.N. (1997). Overview of Flow Cytometry Instrumentation. *Current Protocols in Cytometry*. Copyright © 1997 by John Wiley & Sons, Inc. 1.1.1-1.1.8.
- Derby, E., Reddy, V., Kopp, W., Nelson, E., Baseler, M., Sayers, T. and Malyguine, A. (2001). Three-color flow cytometric assay for the study of mechanisms of cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Letters* 78:35-39.
- Dohms, J.E. and Metz, A. (1991). Stress-mechanisms of immunosuppression. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 30:89-109.

- Estberg, L., Gardner, I.A., Stover, S.M., Johnson, B.J., Case, J.T. and Ardans, A. (1995). Cumulative racing-speed exercise distance cluster as a risk factor for fatal musculoskeletal injury in Thoroughbred racehorses in California. *Preventive Veterinary Medicine* 24(4):253-263.
- Fischer, K., Andreesen, R. and Mackensen, A. (2002). An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. *Journal of Immunological Methods* 259:159-169.
- Flaminio, M., Rush, B. and Shuman, W. (1998). Immunologic function in horses after non-specific immunostimulant administration. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 63:303-315.
- Flaminio, M., Rush, B., Davis, E., Hennessy, K., Shuman, W. and Wilkerson, M. (2000). Characterization of peripheral blood and pulmonary leucocyte function in healthy foals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 73:267-285.
- Furusawa, K., Tajima, Y., Umezu, Y., Ueta, M., Ide, M., Mizushima, T. and Ogata, H. (2003). Activation of natural killer cell function in recreational athletes with paraplegia during a wheelchair half-marathon race. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 84:706-711.
- Glaser, R., Rabin, B., Chesney, M., Cohen, S. and Natelson, B. (1999). Stress-induced immunomodulation. *Journal American Medical Association* 281(24):2268-2270.
- Gleeson, M. (2000). Exercise immunology. *Immunology and Cell Biology* 78:483-484.
- Hasbold, J., Gett, A.V., Rush, J.S., Deenick, E., Avery, D., Jun, J. and Hodgkin, P.D. (1999). Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation *in vitro* using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunology and Cell Biology* 77:516-522.
- Hines, M.T., Schott II, H.C., Bayly, W.M. and Leroux, A.J. (1996). Exercise and immunity: A review with emphasis on the horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10(5):280-289.
- Hodgkins, P.D., Lee, J.H., and Lyons, A.B. (1996). B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J. Exp. Med.* 184:277-281.
- Hoffman-Goetz, L. (2000). Commentary on exercise and neuroendocrine regulation of immune responses. *Int. J. Sports Med.* 21(1):531-532.
- Hoffman-Goetz, L. and Pedersen, B.K. (1994). Exercise and the immune system: a model of the stress response? *Immunology Today* 15(8):382-387.

- Hormanski, C.E., Truax, R., Pourciau, S.S., Folsom, R.W. and Horohov, D.W. (1992). Induction of lymphokine-activated killer cells of equine origin: specificity for equine target cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 32:25-36.
- Horohov, D.W., Dimock, A., Guirnalda, P., Folsom, R.W., McKeever, K.H. and Malinowski, K. (1999). Effect of exercise on the immune response of young and old horses. *American Journal of Veterinary Research* 60(5):643-647.
- Horohov, D.W., Keadle, T.L., Pourciau, S.S., Littlefield-Chabaud, M.A., Kamerling, S.G., French, D.D. and Melrose, P.A. (1996). Mechanism of exercise-induced augmentation of lymphokine activated killer (LAK) cell activity in horse. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 53(3-4):221-233.
- Hyypä, S. (2005). Endocrinal responses in exercising horses. *Livestock Production Science* 92:113-121.
- Jonsdottir, I.H. (2000a). Exercise Immunology: Neuroendocrine regulation of NK-Cells. *Int. J. Sports Med.* 21(1):520-523.
- Jonsdottir, I.H. (2000b). Neuropeptides and their interaction with exercise and immune function. *Immunology and Cell Biology* 78:562-570.
- Kantakamalakul, W., Jaroenpool, J. and Pattanapanyasat, K. (2003). A novell enhanced green fluorescent protein (EGFP)-K562 flow cytometric method for measuring natural killer (NK) cell cytotoxic activity. *Journal of Immunological Methods* 272:189-197.
- Kurcz, E.V., Lawrence, L.M., Kelley, K.W. and Miller, P.A. (1988). The effect of intense exercise on the cell-mediated immune response of horses. *Equine Nutrition & Physiology Society* 8(3):237-239.
- Lang, K., Drell, T.L., Niggemann, B., Zänker, K.S. and Entschladen, F. (2003). Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells. *Immunology Letters* 90:165-172.
- Langlois, B. (1980). Heritability of racing ability in thoroughbreds. *Livestock Production Science* 7(6):591-605.
- Langlois, B., Minkema, D. and Bruns, E. (1983). Genetic problems in horse breeding. *Livestock Production Science* 10(1):69-81.
- Lee-MacAry, A.E., Ross, E.L., Davies, D., Laylor, R., Honeychurch, J., Glennie, M.J., Snary, D. and Wilkinson, R.W. (2001). Development of a novel flow cytometric cell-mediated cytotoxicity assay using the fluorophores PKH-26 and TO-PRO-3 iodide. *Journal of Immunological Methods* 252:83-92.



- Lepage, R. and Albert, C. (2006). Fifty years of development in the endocrinology laboratory. *Clinical Biochemistry* 39:542-557.
- Lieberman, J. (2003). Mechanisms of granule-mediated cytotoxicity. *Current Opinion in Immunology* 15:513-515.
- Lieberman, L.A. and Hunter, C.A. (2002). Regulatory pathways involved in the infection-induced production of IFN- $\gamma$  by NK cells. *Microbes and Infection* 4:1531-1538.
- Lunn, D.P., Schram, B.R., Vagnoni, K.E., Schobert, C.S., Horohov, D.W. and Ginther, O.J. (1996). Positive selection of EqCD8<sup>+</sup> precursors increases equine lymphokine-activated killing. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 53:1-13.
- Lyons, A.B. (1999). Divided we stand: Tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunology and Cell Biology* 77:509-515.
- Mackinnon, L.T. (2000). Overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunology and Cell Biology* 78:502-509.
- Marti, E., Horohov, D.W., Antzak, D.F., Lazary, S. and Lunn, D.P. (2003). Advances in equine immunology: Havemeyer workshop reports from Santa Fe, New Mexico, and Hortobagy, Hungary. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 91:233-243.
- Martínez, R., Scaglione, M., Luneburg, C., Hernández, E., Araneda, O., González, M., Estrada, M. y White, A. (2000). Cambios sanguíneos y sudorales en equinos sometidos a carreras de resistencia. *Avances en Ciencias Veterinarias* 15(1)(2):19-30.
- Massaro, E.J., Elstein, K.H., Zucker, R.M. and Bair, K.W. (1989). Limitations of the fluorescent probe viability assay. *Mol. Toxicol.* 2(4):271-284.
- May, S.A., Hooke, R.E. and Lees, P. (1991). Isolation of equine peripheral blood mononuclear cells using Percoll. *Research in Veterinary Science* 50:116-117.
- More O'Ferral, G.J. and Cunningham, E.P. (1974). Heritability of racing performance in thoroughbred horses. *Livestock Production Science* 1(1):87-97.
- Moseley, P. (2000). Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* 48:299-302.

- Nesse, L.L., Johansen, G.I. and Blom, A.K. (2002). Effects of racing on lymphocyte proliferation in horses. *American Journal of Veterinary Research* 63(4):528-531.
- Nestved, A. (1996). Evaluation of an immunostimulant in preventing shipping stress related respiratory disease. *Journal of Equine Veterinary Science* 16(2):78-82.
- Nieman, D.C. (2000). Exercise effects on systemic immunity. *Immunology and Cell Biology* 78:496-501.
- Nieman, D.C. (2001). Does exercise alter immune function and respiratory infections? *Research Digest* 3(13):1-8.
- Niu, Q., Zhao, C. and Jing, Z. (2001). An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 251:11-19.
- Nociari, M.M., Shalev, A., Benias, P. and Russo, C. (1998). A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 213:157-167.
- Noriega, E. (2000). La actividad física, sus beneficios y usted. *Cuadernos de Nutrición* 23(3):413-419.
- Papa, S., Vitale, M., Mariani, A.R., Roda, P., Facchini, A. and Manzoli, F.A. (1988). Natural killer function in flow cytometry. I. Evaluation of NK lytic activity on K562 cell line. *Journal of Immunological Methods* 107(1):73-78.
- Parish, C.R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and Cell Biology* 77:499-508.
- Pedersen, B.K. (2000). Exercise and cytokines. *Immunology and Cell Biology* 78:532-535.
- Pedersen, B.K. and Nieman, D.C. (1997). Exercise immunology: integration and regulation. *Immunology Today* 19(5):204-206.
- Pedersen, B.K., Bruunsgaard, H., Ostrowski, K., Krabbe, K., Hansen, H., Krzykowski, K., Toft, A., Sondergaard, S.R., Petersen, E.W., Ibfelt, T. and Schjerling, P. (2000). Cytokines in aging and exercise. *Int. J. Sports Med.* 21(1):54-59.
- Pedersen, B.K., Rohde, T. and Ostrowski, K. (1998). Recovery of the immune system after exercise. *Acta Physiol. Scand.* 162:325-332.

- Pell, S.M. and McGreevy, P.D. (1999). A study of cortisol and beta-endorphin levels in stereotypic and normal Thoroughbreds. *Applied Animal Behaviour Science* 64:81-90.
- Perryman, L.E., Bue, C.M., Magnuson, N.S., Mottironi, V.D., Ochs, H.S., and Wyatt, C.R. (1987). Immunologic reconstitution of foals with combined immunodeficiency. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 17(1-4):495-508.
- Radcliff, G., Waite, R., LeFevre, J., Poulik, M.D. and Callewaert, D.M. (1991). Quantification of effector/target conjugation involving natural killer (NK) or lymphokine activated killer (LAK) cells by two-color flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 139:281-292.
- Raidal, S.L., Love, D.N., Bailey, G.D. and Rose, R.J. (2000). Effect of single bouts of moderate and high intensity exercise and training on equine peripheral blood neutrophil function. *Research in Veterinary Science* 68:141-146.
- Rodcar, D., Bridson, W. and Rayford, P. (1969). Rapid calculation of radioimmunoassay results. *J. Lab. Clin. Med.* 74:770.
- Ryder, E.F. and Robakiewicz, P. (1998). Statistics for Molecular Biologist: Group Comparisons. *Current Protocols in Molecular Biology*. Copyright © 2004 by John Wiley & Sons, Inc. 67:A.31.1-A.31.22
- Saastamoinen, M.T. and Nylander, A. (1996). Genetic and phenotypic parameters for age at starting to race and racing performance during early career in trotters. *Livestock Production Science* 45(1):63-68.
- Sedgwick, A.D., Morris, T., Russell, B.A. and Lees, P. (1986). Single step purification procedure for the rapid separation of equine leucocytes. *Veterinary Research Communications* 10:445-452.
- Shephard, R.J. (2001). Exercise in the heat: A double threat to the immune system? *The Physician and Sportsmedicine* 29(6):21-31.
- Stovel, R. (1997). Fluidics. *Current Protocols in Cytometry*. By John Wiley & Sons, Inc. 1.2.1-1.2.7.
- Vitale, M., Neri, L.M., Comani, S., Falcieri, E., Rizzoli, R., Rana, R. and Papa, S., (1989). Natural killer function in flow cytometry. II. Evaluation of NK lytic activity by means of target cell morphological changes detected by right angle light scatter. *Journal of Immunological Methods* 121(1):115-120.

- Viveiros, M.M. and Antczak, D.F. (1999). Characterization of equine natural killer and IL-2 stimulated lymphokine activated killer cell populations. *Developmental and Comparative Immunology* 23:521-532.
- Warren, H.S. (1999). Using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester to monitor human NK cell division: Analysis of the effect of activating and inhibitory class I MHC receptors. *Immunology and Cell Biology* 77:544-551.
- Werner, C. K. and Cargille, C. M. (1971). Radioimmunoassay a simplified procedure for dose interpolation. *J. Lab. Clin. Med.* 77:661.
- Willet, P. (1981). *The Classic Racehorse*. The University Press of Kentucky. U.S.
- Willet, P. (1986). *Makers of the Modern Thoroughbred*. The University Press of Kentucky, 1984. U.S.
- Willet, P. (1991). *A History of the General Stud Book [and] An Introduction to the General Stud Book*. 2 Vols. Weatherby's. U.S.
- Wong, C.W., Smith, S.E., Thong, Y.H., Opdebeeck, J.P. and Thornton, J.R. (1992). Effects of exercise stress on various immune functions in horses. *American Journal of Veterinary Research* 53(8):1414-1417.
- Woods, J.A., Ceddia, M.A., Wolters, B.W., Evans, J.K., Lu, Q. and McAuley, E. (1999). Effects of 6 months of moderate aerobic exercise training on immune function in the elderly. *Mechanisms of Ageing and Development* 109:1-19.
- Wrona, D., Trojnar, W., Borman, A., Ciepielewski, Z. and Tokarski, J. (2001). *Brain, Behavior, and Immunity* 15:54-64.
- Wu, J. and Lanier, L.L. (2003). Natural Killer Cells and Cancer. *Advances in Cancer Research*. 90:127-156.
- Yang, E.V. and Glaser, R. (2002). Stress-induced immunomodulation and the implications for health. *International Immunopharmacology* 2:315-324.
- Zamai, L., Falcieri, F., Zauli, G., Cataldi, A. and Vitale, M. (1993). Optimal detection of apoptosis by cytometry depends on cell morphology. *Cytometry* 14:891.
- Zinder, O. and Dar, D.E. (1999). Neuroactive steroids: their mechanism of action and their function in the stress response. *Acta Physiol. Scand.* 167:181-188.