TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Ensayo Experimental

I. PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa: _____

Dr. Pedro Martino

Segundo miembro (tutor): _____

Dr. Ruben Acosta

Tercer miembro: _____

Dra. Adriana Medero

Cuarto miembro (co-tutor):_____

Dr. Gonzalo Marichal

Quinto miembro (co-tutor): _____

Dr. Fernando Vila

Fecha:15de Mayo de 2015

Autores:_____

Br. Caren Medina Marsico

_____

Br. Mauricio Souza Silva

II. AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias por su apoyo incondicional durante el tránsito de nuestra carrera.

A nuestro tutor Ruben Acosta y co-tutores Gonzalo Marichal y Fernando Vila por guiarnos y apoyarnos en la construcción de nuestra tesis.

A Juan Benech e Instituto Clemente Estable.

A Pedro Martino y ayudantes del Laboratorio de Facultad por su colaboración.

Al personal de biblioteca por los aportes brindados.

A la señora Gabriela Britos por su ayuda en la traducción.

A los docentes y compañeros que formaron parte del Proyecto de Investigación "Determinación de la variación de electrolitos séricos en caballos de Raid".

A los propietarios, clubes, jinetes y médicos veterinarios que participaron en la temporada de raid 2012 y 2013que colaboraron en este trabajo.

A las amistades que supimos construir en el tránsito de esta etapa de nuestra vida.

Por último y no menos importante a la Facultad de Veterinaria y a todos los docentes que la integran, por formarnos no solo en lo profesional sino también en lo humano.

TABLA DE CONTENIDO:

Página

I. PÁGINA DE APROBACIÓN……. 2
II. AGRADECIMIENTOS……... 3
III. LISTA DE TABLAS……... 5
IV. LISTA DE FIGURAS……. 6
1. RESUMEN:…… 7
2. SUMMARY:……... 8
3. INTRODUCCIÓN:……. 9
3.1. Raid……. 9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:……. 9
4.1. Fisiología del ejercicio…… 9
4.2. Hemolisis…… 11
4.3. Estrés mecánico…….. 11
4.4. Estrés oxidativo……..… 12
4.5. Estrés osmótico……... 13
4.6. Hemoglobina……...… 14
4.7. Mioglobina…….. 14
4.8. Rabdomiólisis del ejercicio……. 15
5. HIPÓTESIS:…… 16
6. OBJETIVOS:…….. 17
6.1. Objetivos Generales…… 17
6.2. Objetivos Específicos…….. 17
7. MATERIALES Y MÉTODOS:…….. 18
7.1. Animales…….. 18
7.2. Procesamiento de las muestras…… 18
7.3. Análisisestadístico……..… 18
7.4. Hematocrito y Proteínas totales……... 18
7.5. Índice de Confort……. 18
8. RESULTADOS:…….. 20
9. DISCUSIÓN:……... 27
10. CONCLUSIONES:…….. 29
11. BIBLIOGRAFÍA:…… 30
12. ANEXOS:…… 34

III. LISTA DE TABLAS:

Páginas

1.Composición de electrolitos en plasma y sudor equino…….. 10

2.Rangos de referencia para los parámetros eritrocitarios en los caballos de deporte…… 10

3.Rangos de referencia para los parámetros bioquímicos séricos en los caballos de deporte…….. 11

IV. LISTA DE FIGURAS:

Páginas

FIGURA 1: resultado de la técnica de sulfato de amonio…… 20

FIGURA 2: comparación hemoglobinuria en equinos en competencia y en reposo……... 21

FIGURA 3: comparación hemoglobinuria en equinos que completaron y no completaron el recorrido…….. 22

FIGURA 4: comparación hemoglobinuria en equinos que recorrieron hasta 60km inclusive omás…… 23

FIGURA 5: comparación hemoglobinuria en diferentes índices de confort……... 24

FIGURA 6: comparación hemoglobinuria asociada al aumento del hematocrito…….. 25

FIGURA 7: comparación hemoglobinuria con aumento de proteínas totales……. 26

1. RESUMEN

El raid hípico existe en nuestro País desde el año 1913, siendo cada vez más popular y a la vez más profesionalizado, aumentando así las exigencias para los equinos. Para lograr grandes performances los equinos ofertan una gran cantidad de oxígeno a su gran masa muscular y obtienen de esta manera energía de manera aeróbica.(Acosta, R., Marichal, G., comunicación personal).Este metabolismo aeróbico es fundamental en ejercicios de resistencia ya que permite obtener la mayor cantidad de energía sin producir metabolitos perjudiciales para su medio interno. La mayoría de las patologías metabólicas presentes en el ejercicio de resistencia, son debido a las pérdidas sudorales y a las características propias de este sudor, como la riqueza en diferentes electrolitos que lo hace hipertónico en comparación con el plasma. Dentro de los signos clínicos presentes en equinos de Raid luego de las competencias podemos citar la pigmenturia. El estudio y diferenciación del pigmento presente en la orina post competencia, brindauna mayor comprensión acerca de la fisiopatología del ejercicio de resistencia y posibilitará un tratamiento más eficaz para lograr así una mejor recuperación de estos equinos. Se comenzóanalizando 24 muestras de orina de equinos en reposo con la condición de que los mismos hubieran competido o hubiesen sido entrenados para competir, se buscó presencia de pigmentos en las mismas. Dichas muestras se tomaron como “basales”.Luego se concurrió a 4 pruebas de 90 kilómetros donde se tomaron muestras de la primer orina de un total de 24 equinos, después de que estos finalizaron la competencia (90 kilómetros) o luego de que debieran abandonar el recorrido por diversos motivos, se recolectaron en frascos estériles para orina de 100 ml.mediante micción directa. Dichas muestras fueron analizadas en el laboratorio de Facultad de Veterinaria y la prueba de sulfato de amonio fue la de elección para la diferenciación de los pigmentos presentes, dicha prueba permitió diferenciar y establecer como pigmento presente a la hemoglobina. Se analizaron variables como Distancia recorrida, Índice de Confort, Hematocrito y Proteínas Totales, Reposo y Competencia, para evaluar si había algún tipo de correlación con la presencia o no del pigmento, surgiendo resultados no significativos en la mayoría de ellas a excepción de la condición de “Competencia y reposo” existiendo presencia de hemoglobinuria en el 66.67% de los que compitieron, y 0% pigmenturia en equinos en condiciones de reposo.La hemoglobinuria post ejercicio se atribuye a la hemolisis intravascularproducida porel estrés oxidativo, mecánico y osmótico que se presentan en equinos durante ejercicios de largo aliento. Estos factores llevan a la alteración de la permeabilidad de la membrana del eritrocito y con ello a la fragilidaderitrocitariaestando propensos a la lisis celular. Cuando existe hemolisis intravascular la hemoglobina queda libre en el torrente sanguíneo, siendo rápidamente despejada por diversos mecanismos dentro de los cuales el más importante es la unión hemoglobina-haptoglobina que se transporta hacia el sistema fagocítico mononuclear del bazo e hígado pero cuando la hemolisis sobrepasa dicho mecanismo, la hemoglobina es eliminada mediante filtración glomerular, apareciendo hemoglobina en orina, produciendo el signo clínico “pigmenturia”.

2. SUMMARY

The Equestrian Endurance Race ("RaídHípico") has been in our country since 1913, and it has grown in popularity and professionalism, which has resulted in an increased demand on horses. In order to achieve great performances, horses release a big amount of oxygen into their large muscle mass and thus obtain energy in an aerobic form (Acosta, R., Marichal, G., personal contact). This aerobic metabolism is essential in endurance exercises, as it allows them to obtain the largest amount of energy possible without producing metabolites that neglect their internal medium. Most of the metabolic diseases that are present in endurance training are due to loss during sweating and to the characteristics of this kind of sweat, such as the abundance of electrolytes which makes it hypertonic as compared to plasma. Among the clinical signs that are present in race horses after competitions we can mention pigmenturia. The study and differentiation of pigment present in post-race urine offers a better understanding about the physiopathology of endurance exercises and will enable a more effective treatment in order to achieve a better recovery of these horses. This work was started by analyzing 24 urine samples of horses at rest with the condition that they had taken part in races or that had been trained for a race, and a search for pigments in the samples was performed. The samples were taken as reference samples. After that, samples of first urination after four 90-kilometres races were taken from a total of 24 horses. They were taken after the race or after they had to abandon it due to different reasons, and they were collected in 100 ml sterile flasks for urine through direct urination. The samples were analyzed in the laboratory of the Faculty of Veterinary and the ammonium sulphate test was performed in search of pigments, and this test allowed us to differentiate and establish that the pigment that was present was hemoglobin. Variables such as Covered Distance, Comfort Rate, Total Hematocrit and Proteins, Rest and Competition, were analyzed in order to evaluate if there was any kind of correlation with the presence or absence of the pigment. The results were not meaningful in most of them, except for the condition of "Competition and Rest", where there was hemoglobinuria in 66.67% of those horses which raced, and 0% pigmenturia in those that were under rest conditions. The post-exercise hemoglobinuria is attributed to intravascular hemolysis produced by oxidative, mechanical and osmotic stress that is present in horses during long-haul exercises. These factors produce an alteration of permeability in red blood cells and, as a result, erytrocytical fragility, with a tendency to cell lysis. When there is intravascular hemolysis hemoglobin remains free in the blood torrent, which is rapidly cleared by different mechanisms among which the most important is the hemoglobin-haptoglobin link that is transported towards the mononuclear fagocytical system of the spleen and liver but when hemolysis overcomes this mechanism, hemoglobin is eliminated through glomerular filtering, appearing in urine and producing the clinical sign of "pigmenturia".

3. INTRODUCCIÓN

3.1. RAID:

Concepto de Raid: entiéndase por raid hípico a las marchas de fondo a caballo en cualquier terreno, individual o por equipo, de una o varias jornadas, como las ya impuestas en nuestro país desde el año 1913 cuando en un recorrido de ida y vuelta entre Sarandí Grande y Florida participaron 13 binomios (Federación Ecuestre Uruguaya, 2014)

Dos años más tarde la misma prueba culminó con la vida de todos los equinos participantes excepto uno, siendo dichas pruebas objeto de fuertes críticas, lo que hizo que la actividad no se repitiera por 20 años, hasta el 12 de Octubre de 1935, en el marco de los 110 años de la Batalla de Sarandí. Dicha prueba es la más antigua y de las más populares de hoy en día. En aquella oportunidad con un descanso obligatorio de 20 minutos a mitad de competencia y con un recorrido Sarandí Grande- Durazno- Sarandí Grande sobre una distancia de 100 km (Maisonnave, M. N., y col., 2014).

Nueve años más tarde se fundó la Federación Ecuestre Uruguaya (FEU), el 31 de Octubre de 1944, que hoy, cuenta con 50 instituciones afiliadas, personería jurídica y un calendario de 45 pruebas “largas” (de 80 a 115 km) y 20 pruebas “cortas” (60 km). Dicha institución es entre otras cosas, la encargada de fiscalizar y regularizar dichas pruebas.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. FISIOLOGÍA DEL EJERCICIO:

La especie equina y dentro de ella los equinos deportivos, es la especie que mejor se adapta al ejercicio y esto se debe básicamente a su aparato cardiocirculatorio, su aparato respiratorio y su aparato muscular. Gracias principalmente a estas tres características el caballo es capaz de ofertar una gran cantidad de oxígeno a su gran masa muscular y obtener de esta manera grandes performances por medio de un alto consumo máximo de oxígeno, que le permite obtener energía de manera aeróbica (Boffi, F.M., 2006). Un objetivo importante del entrenamiento es aumentar el consumo máximo de oxígeno, (VO2 máx.) el cual, durante el ejercicio intenso al que es sometido el equino, puede aumentar hasta 35 veces, muy superior a la capacidad de otras especies. Este mayor consumo de oxígeno se manifiesta, no sólo como una intensificación del metabolismo en el ejercicio, sino también, por cambios adaptativos que se traducen en modificaciones de los niveles basales de algunos metabolitos (Radostis y col., 1999).

Este metabolismo aeróbico es fundamental en ejercicios de resistencia ya que permite obtener la mayor cantidad de energía y sin producir metabolitos perjudiciales para su medio interno.

La energía química almacenada se va a transformar en energía cinética a una tasa de un 20-30% aproximadamente, siendo liberada como energía calórica el restante 70-80% de esta (Boffi, F. M., 2006). La necesidad de eliminar este calor metabólico por parte de la sudoración y enfriamiento por evaporación, la cual es la principal forma de eliminar calor por los equinos, es responsable de la mayoría de las patologías metabólicas presentes en el ejercicio de resistencia, debido a las pérdidas sudorales y a las características propias de este sudor, como la hipertonicidad del mismo en comparación con el plasma debido a su riqueza en diferentes electrolitos (Acosta, R., Marichal, G., 2014, comunicación personal).

Los electrolitos corporales actúan desde el punto de vista fisiológico regulando el potencial de membranas biológicas, y participando en una serie de reacciones que son necesarias para la vida (Carlson 1992b). Son varios los iones involucrados en las pérdidas, sodio (Na), cloro (Cl), potasio (K), calcio (iCa), fosforo (P), magnesio (Mg) y otros compuestos (lactato, bicarbonato y proteínas), alterándose los más diversos sistemas del organismo como ser: cardiovascular, digestivo, renal y músculo esquelético.

Estas pérdidas sudorales pueden ser muy altas y están condicionadas de manera muy importante entre otros factores a las condiciones climáticas del ambiente que los rodea (temperatura, humedad y velocidad del viento). Algunos artículos recientes han registrado que durante el ejercicio de intensidad sub máxima, bajo condiciones de mucho calor y humedad, las perdidas por sudor en caballos pueden exceder 12 L por hora (Hinchcliff, 2007). Pudiendo llegar a causar deshidrataciones hipotónicas en casos graves.

1. Composición de electrolitos (mEq/l) en plasma y sudor equino (Carlson y col. 1976). *Clinicopathological alterations in normal and exhausted endurance horses.Theriogenology 6 (2-3), 93-104).*

Electrolitos	Na^+	K^+	Cl^-	Ca^{++}	Mg^{++}
Plasma	140	4	100	6	1.8
Sudor	131	53	174	6	4.6

El sudor en los equinos es hipertónico con respecto al plasma (Rose 1983, Flaminio y Rush 1998)
La patogenia de la deshidratación hipotónica es la siguiente:

Disminución de la presión osmótica extracelular.
Pasaje de agua del espacio extra al intracelular.
Disminución del agua extracelular con hiperhidratación celular.
Osmoreceptores distendidos, no hay sed ni secreción de Hormona Anti Diurética (ADH) por hipoosmolalidad, aunque la disminución del volumen circulante eficaz (VCE) estimula su liberación (Schott y col. 1993)

Como método para medir esta deshidratación de manera más objetiva se pueden tomarlos valores de hematocrito y proteínas plasmáticas totales, método usado por la federación ecuestre uruguaya para evaluar las condiciones de los equinos pre y post competencia.

El hematocrito esel porcentaje del volumen total de sangre ocupado por glóbulos rojos,siendo alterado por diferentes tipos de ejercicio. En general el ejercicio de alta intensidad da lugar a la movilización esplénica de eritrocitos, aumentando la masa eritrocitaria ya que el bazo tiene la capacidad de almacenar hasta un 50% del pool eritrocitario. Esta liberación esta mediada por catecolaminas y presenta una relación lineal hematocritovelocidad hasta un máximo de 60-65%.(Hinchcliff, 2007).

2. Rangos de referencia para los parámetros eritrocitarios en los caballos de deporte (Hinchcliff, 2007).

Caballos de resistencia.	*Hematocrito (L/L)*
Carlson y col., 1976. Caballos en competencia.	0.36 +/- 0.03
Rose, 1982. Caballos en competencia.	0.37+/- 0.01
Grosskpof y col., 1983. Caballos en competencia.	0.40 +/- 0.04

Al igual que el hematocrito, las proteínas plasmáticas constituidas por albumina (35-50%), globulinas y fibrinógeno, aumentan su concentración, probablemente debido a la disminución del volumen plasmático en respuesta a una importante pérdida de líquido durante ejercicios de resistencia prolongados (Hinchcliff, 2007).

3. Rangos de referencia para los parámetros bioquímicos séricos en los caballos de deporte (Hinchcliff, 2007).

Caballos de resistencia.	*Proteínas totales (g/dl)*
Carlson y col., 1976. Caballos en competencia.	7 +/- 0.4
Rose, 1982. Caballos en competencia.	6 +/- 0.7
Grosskpof y col., 1983. Caballos en competencia.	6.8 +/- 0.3

Asociadas a estas pérdidas sudorales y como consecuencia de las mismas el equino se ve afectado por diferentes patologías como ser: deshidratación, hipertermia, disturbios en el balance iónico, alcalosis metabólica, que ofrecen signos como Flutter Sincrónico Diafragmático, frecuencia cardiaca y respiratoria aumentada, fasciculaciones musculares, arritmias, los cuales entran dentro del llamado Síndrome de Equino Exhausto.
La exigencia de este tipo de competencias determina que entre un 20 y un 70% de los equinos participantes no logre culminar la carrera, ya sea por patologías locomotoras o por trastornos metabólicos, causas más frecuentes entre otras (Marichal, G., 2013).

4.2. HEMÓLISIS:

Se ha reconocido al ejercicio aeróbico moderado o intenso como productor de hemólisis intravascular, que presenta una gran variación individual y está influida por la duración y tipo de actividad física, así como por el grado de entrenamiento, y probablemente por la administración de antioxidantes inespecíficos. Se han postulado mecanismos para explicar la hemólisis por ejercicio: efecto mecánico, temperatura, cambios osmóticos y quizá estrés oxidativo (Bonilla, J., 2008).
Varios autores han descrito un incremento significativo en la destrucción de eritrocitos después de un ejercicio físico intenso (O´Toole, M., 1998). En 1943 Gilligan (Gilligan, D., 1943) evaluó la hemólisis asociada con el ejercicio extenuante, al determinar la hemoglobinemia plasmática y la hemoglobinuria en maratonistas. Los más afectados por esta condición son los practicantes de atletismo y la intensidad de la hemolisis depende en gran parte de la distancia recorrida (O´Toole, M., 1998).
En 1881, cuando Fleischerdescribió la presencia de orina oscura en un joven soldado después de participar en una marcha, la llamó hemoglobinuria del marchista. Siendo el primer informe acerca de hemoglobinuria asociada con el ejercicio. La hemoglobinuria, a veces asociada con hematuria, puede promover una condición anémica en atletas (Jones, G. 1997), especialmente en corredores de largas distancias (Siegel A., 1979). Es frecuente, autolimitada y benigna, ya que desaparece 48 a 72 horas post ejercicio (Reid R., 1987). Se puede relacionar o no con trauma vesical y/o renal, cuando no es traumática se asocia con isquemia glomerular debida a la vasoconstricción de los vasos renales y esplácnicos, o bien, puede deberse al aumento de la presión de filtración secundaria a la vasoconstricción de arteriolas eferentes. La severidad de la hematuria es proporcional a la intensidad y a la duración del ejercicio y puede cursar con deshidratación, mioglobinuria y peroxidación lipídica en eritrocitos (Fleischer, 1997; Ota M., 2004).
Otra de las causas establecidas de esta hemólisis consiste en que después de un ejercicio intenso los eritrocitos son más susceptibles al estrés, sea de tipo mecánico, oxidativo u osmótico (Smith, J., 1995).

4.3. ESTRÉS MECÁNICO:

Investigaciones recientes han sugerido la posibilidad de hemólisis en deportistas (Weight L., 1991) causada por efecto mecánico, debido a que este lesiona los eritrocitos y favorece su destrucción. Así sucede en corredores de largas distancias, en quienes la hemólisis ocurre como consecuencia del repetido impacto del pie (footstrike) sobre la superficie (Telford R., 2003).

4.4. ESTRÉS OXIDATIVO:

El estrés oxidativo puede también perturbar la homeostasis iónica y facilitar la deshidratación celular. Estos cambios disminuyen la elasticidad de las membranas celulares, alterando la capacidad de deformación del eritrocito, lo que dificulta su paso a través de la microcirculación (Smith, J., 1995). Por otra parte, la elevada producción de radicales libres del oxígeno que caracteriza a las carreras de larga duración puede alterar la permeabilidad y función de membranas (Martínez, R., 2001). Durante el ejercicio aeróbico, principalmente extenuante se producen radicales libres de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), así como fenómenos oxidativos asociados con ellos (estrés oxidativo). Al parecer, el entrenamiento físico aumenta la capacidad de los mecanismos antioxidantes del organismo. Los eritrocitos sometidos a la acción de ROS experimentan fenómenos oxidativos que pueden llevar a hemólisis. La defensa antioxidante del eritrocito es limitada y dependiente del poder reductor del NADPH + H+; los niveles intracelulares de éste último, dependen en gran medida de la reacción catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Bonilla, J., 2008).

Se estima que en reposo de 2% a 5% del flujo deelectrones en la cadena respiratoria se escapa para formarespecies reactivas del oxígeno (Carrell R, 1975) (ROS por su sigla eninglés,reactive oxygenspecies), como peróxido (O2.-),peróxido de hidrógeno (H2O2), hidroxilo (OH-) y losasociados con el óxido nítrico (NO) (Ji L., 1996). La mitocondria es una fuente de ROS, aunque no necesariamente la más importante (por lo menos in vitro),porque al hacer ejercicio aumenta la tasa de consumo de O2 en los tejidos. Existe evidencia experimental indicativade aumento en la producción de ROS, así como de estrésoxidativo y de daño tisular asociado con ejercicio sea agudo y exhaustivo (Chevion S, 2003) o moderado(Inayama T, 2000). Durante el ejercicioexhaustivo, el empleo de oxígeno por parte del músculo seincrementa en 100 o 200 veces si se compara con el estado de reposo (Sjodin B, 1990). Esto induce aumento en el flujo de electronesa través de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que a suvez redundará en alza de la producción de ROS (Ji L. 1996).

Recientementese ha determinado que la mitocondria también genera NO, que haría parte de la producción total deradicales libres en el ejercicio. Cuando el NO reacciona con O2.- forma peroxinitrito (ONOO-), un poderoso oxidante. Se cree que esta reacción representa la principalvía para generar especies reactivas de nitrógeno (RNS, siglas en inglés de reactive nitrogenspecies) (Leeuwenburgh C, 2001).

El estrés oxidativo puede ocurrir en individuos adaptadoso no al ejercicio, lo que los hace susceptibles de presentar daño en sus sistemas enzimáticos, así como ensus lípidos y receptores de membrana, e incluso en su ADN (Leeuwenburgh C, 2001), (Oostenburg G, 1997).Ahora bien, las acciones de los ROS y de los RNS pueden ocurrir al finalizar la sesión de ejercicio u horasdespués. La información disponible asocia el ejercicio conla producción de ROS y RNS, a través de tres evidencias relacionadas entre sí:

La producción de radicales libres en músculo, hígado, corazón y sangre.

El aumento en los biomarcadores de daño oxidativo,como carbonilos proteicos y sustancias reactivas alácido tiobarbitúrico (Sen C, 1997), así como elevación en los niveles de pentano exhalado, lo que es un posible producto deldaño oxidativo de los lípidos (Dillard C, 1978).

La disminución en los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de corazón, sangre (Viguie C, 1993),cerebro y músculo(Sen C, 1992).

Otra fuente generadora de ROS es la vía de la xantinaoxidasa (XO), que contribuye a la generación de H2O2 en tejidos con concentraciones elevadas de xantina e hipoxantina. La hipoxia tisular, a través de la vía de la XO (Oostenburg G, 1997), puede generar estrés oxidativo durante el ejercicio (Moller P, 2001). En el ejercicio extenuante se produce la activación de XO, hecho que favorece la generación de ROS en diferentes tejidos (Leeuwenburgh C, 2001), (Koyama K, 1999). Por ejemplo, en el músculo esquelético se libera hipoxantina a la sangre, de modo que la enzima XO es activada (Vina J, 2000).

RadakZ. y col. demostraron que la vía de la XO está comprometida también en la generación de O2 (Radak Z, 1995).
La tercera fuente de ROS son los peroxisomas. En condiciones fisiológicas estos organelos producen H2O2 pero no peróxido. La oxidación peroxisomal de ácidos grasos es una fuente importante de H2O2. Debido a que los ácidos grasos son fuente de energía para el corazón y el músculo esquelético durante el ejercicio prolongado, es probable que exista una contribución de los peroxisomas en el estado de estrés oxidativo en el deportista (Ji L. 1996).
Una cuarta fuente de ROS son los polimorfonucleares (PMN). Cuando se activan los PMN neutrófilos (respiratoryburst) liberan O2. Por tanto, si existe lesión tisular causada por el ejercicio intenso, la activación subsiguiente de los neutrófilos se convierte en una fuente de ROS (Ji L. 1996), (Peake J, 2004). Estas células activadas pueden causar peroxidación lipídica en células vecinas, como los eritrocitos (Claster S, 1984),debido a que sus productos son capaces de atravesar la membrana celular y producir oxidación de la Hb (Weiss S. 1982), para dar inicio al proceso de hemólisis (Weiss S. 1980). Además, la acción oxidante de los ROS sobre las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Liu M, 1999) y sobre los lípidos de membrana del eritrocito, se ha asociado con hemólisis (Claster S, 1984), (Azizova O, 2002). (Bonilla, J., 2005).

4.5. ESTRÉS OSMÓTICO:

El agua corporal total está distribuida en dos compartimentos líquidos separados por membranas, el intra y el extracelular. El intracelular representa el 40% del peso corporal. Mientras que para algunos investigadores el fluido extracelular representa aproximadamente entre el 18 y el 22% del peso corporal, para otros representa del 20 al 30% del peso corporal. El fluido extracelular puede ser subdividido en plasma, fluido intersticial y linfa, y fluido transcelular (Boffi, F. M., 2006).
El movimiento osmótico de agua se basa fundamentalmente en dos premisas:

La existencia de una membrana permeable selectivamente.
Un gradiente osmótico transmembrana.

Siempre que una membrana separe dos compartimentos líquidos y sea permeable al agua, pero no a las partículas disueltas, esta característica se denominara permeabilidad selectiva. Si además la concentración de las partículas disueltas osmóticamente activas a ambos lados de la membrana permeable selectivamente se hace considerablemente grande, se producirá una difusión neta de agua hacia el lado con mayor concentración de sustancias disueltas, proceso que se denomina osmosis.
La concentración de todas las partículas disueltas y así osmóticamente activas se denomina osmolalidad (si se refiere a kilogramo de disolvente) u osmolaridad (si se refiere a litro de disolvente)(Engelhardt, W., 2005).
Las soluciones de igual osmolalidad se denominan isosmolal. Cuando entre dos soluciones existe una membrana semipermeable hablamos de tonicidad. Una célula rodeada por una disolución isotónica no gana ni pierde agua. En una disolución hipertónica, aquella con una osmolalidad mayor que el citosol, la célula se encoge al salir agua hacia fuera. En una disolución hipotónica (de osmolalidad menor), las células se hinchan al penetrar el agua en ellas (Nelson, D.L, 2005).
Cuando un eritrocito normal se suspende en una solución isotónica, conserva su forma y tamaño y no ocurre destrucción, ya que el balance de entrada y salida de agua es nulo. Si la solución es hipotónica, el agua penetra en el eritrocito para diluir su concentración de sales y equilibrar su presión osmótica con la del medio, lo que lleva a un aumento progresivo de volumen del hematíe hasta que su capacidad se agota, adopta la forma esférica y se rompe y libera hemoglobina al medio (Young L.E., 1951).
La evaluación de la fragilidad osmótica del eritrocito proporciona un índice diagnóstico de la rigidez de las células rojas. La curva media de fragilidad osmótica del eritrocito de caballos

durante el ejercicio se desplaza hacia la izquierda, hacia una posición de mayor fragilidad, sus eritrocitos sufren hemólisis con concentraciones de cloruro sódico próximo a niveles plasmáticos isotónicos. (Sacristan, A.G., 1995).
El hinchamiento que se produce en un medio hipotónico se compensa de manera análoga mediante una disminución de la osmolalidad intracelular:

Aumento de la permeabilidad al potasio y así salida del mismo.

Transformación de numerosas moléculas de bajo peso molecular en un número pequeño de moléculas de elevado peso molecular (Engelhardt, W., 2005).

La membrana eritrocitaria mantiene la homeostasis celular a través de varios mecanismos, que incluyen retención de los componentes vitales, excreción de deshechos metabólicos, regulación del metabolismo y del pH eritrocitario, e importación del hierro para la síntesis de hemoglobina. (Gallagher PG., 2000).

4.6. HEMOGLOBINA:

La hemoglobina (Mr 64.500) es una proteína tetramérica que consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene un grupo hem. Cada tetrámetro de hemoglobina puede ligar cuatro moléculas de oxígeno cuando está completamente saturado. La molécula de oxigeno se combina en forma laxa y reversible con la porción hem de la hemoglobina (Hinchcliff, 2007).
La presencia de hemoglobina en orina está asociada primordialmente con anemias hemolíticas de distintos orígenes así como también a situaciones traumáticas en las que la destrucción de glóbulos rojos ocurre masivamente y en un corto período de tiempo, saturando de manera transitoria los mecanismos de reabsorción tubular (Beetham R., 2000).Cuando existe hemolisis intravascular la hemoglobina queda libre en el torrente sanguíneo, siendo la misma rápidamente despejada por diversos mecanismos dentro de los cuales el más importante es la unión hemoglobina-haptoglobina que se transporta hacia el sistema fagocítico mononuclear del bazo e hígado, donde sufren catabolización. Cuando la hemolisis sobrepasa este mecanismo la hemoglobina es eliminada mediante filtración glomerular, apareciendo hemoglobinuria (Feldman, F.B., 2000) (Acosta, R., comunicación personal).

4.7. MIOGLOBINA:

La mioglobina (Mr 16.700) está formada por una única cadena polipeptidica de 153 residuos aminoácidos de secuencia conocida y por solo un grupo ferroprotoporfirina o hemo. Un grupo hemo idéntico se halla en la hemoglobina, la proteína fijadora de oxígeno en los eritrocitos, y es el responsable del color rojo amarronado oscuro de la mioglobina y de la hemoglobina (Nelson, D.L, 2005).
Lapigmenturia post ejercicio puede verse relacionada también con esta proteína. La mioglobina es una proteína fijadora de oxigeno relativamente pequeña de las células musculares. Su función es almacenar y facilitar la difusión del oxígeno en el músculo en rápida contracción. Las lesiones musculares están asociadas a la pérdida de la fuerza de contracción y a la sensación de dolor, haciendo que tengan consecuencias prácticas.
Los signos clínicos de los trastornos musculares son inespecíficos y pueden incluir contracturas musculares de tamaño variable y zonas de edema con o sin dolor, rechazo a moverse, atrofia y mioglobinuria. El análisis de orina en las patologías musculares se utiliza para la detección de mioglobina. Si bien la mioglobina puede verse en forma directa en orina, hay otros compuestos como la hemoglobina y otras porfirinas que pueden dar un color similar. Es por esto que para hacer un diagnóstico preciso deben utilizarse otros métodos (Boffi, F. M., 2006).

4.8. RABDOMIÓLISIS DEL EJERCICIO:

Cuadros de rabdolmiólisis se presentan como consecuencia de un esfuerzo excesivo en caballos sin una miopatía subyacente o en caballos que ya poseen una miopatía subyacente. Algunos investigadores sugieren que puede ser de origen hereditario y relacionado al estrés, el cual podría generar alteraciones en la contractilidad muscular. La rabdomiólisis del ejercicio puede llegar a presentarse sólo una vez en la vida de un animal y como consecuencia de un ejercicio energético, asociado a circunstancias medioambientales o físicas, mientras que la rabdomiólisis crónica, como existe una condición patológica de base, puede ocurrir en forma repetitiva luego de esfuerzos físicos de moderada intensidad.

Si bien el iniciador común de la rabdomiólisis es la actividad física, las causas que la originan aún no se conocen con claridad. Hoy día, numerosos trabajos ponen en manifiesto que la rabdomiólisis es más frecuente de observar en animales sometidos a un ejercicio aeróbico, es decir sin un incremento significativo en la concentración de lactato. La deficiencia de vitamina E y selenio también ha sido propuesta como causa de rabdomiólisis, debido a la importante función que cumplen estos compuestos a nivel muscular en la prevención del daño por estrés oxidativo. Se ha propuesto que el nerviosismo es un factor predisponente. Además, la ingestión de dietas ricas en carbohidratos hace que los caballos sean más proclives a manifestar un temperamento nervioso.

Los signos clínicos consisten en calambres musculares de los miembros posteriores. El dolor generado por los calambres produce ansiedad, sudoración profusa, taquicardia, taquipnea y rechazo al movimiento. A la palpación los músculos se presentan firmes y dolorosos.

Los casos graves de rabdomiólisis sin miopatía subyacente pueden generar mioglobinuria, la cual puede generar insuficiencia renal aguda o retardada.

El diagnóstico se realiza por intermedio de biopsias musculares. La elevación de la concentración sérica de CK, AST y LDH, así como también de mioglobina, es de gran utilidad diagnostica. (Boffi, F. M., 2006).

5. HIPÓTESIS:

1) “La pigmenturia en equinos post competencia se debe a la presencia de hemoglobina en la orina”.

2) “La presencia de pigmento en orina está relacionada con la distancia recorrida”.

3) “La pigmenturia se presenta solo en condiciones donde el Índice de Confort es elevado”.

6. OBJETIVOS:

6.1. Objetivo general:

Diferenciar los pigmentos presentes en la primera orina de caballos, luego de competir en una prueba de resistencia (Raid).

6.2. Objetivos específicos:

1) Diferenciar cualitativamente la presencia de hemoglobina o mioglobina en la orina de equinos de diferente edad y sexo, post ejercicio en pruebas de resistencia (raid) de 90 km.

2) Verificar la asociación entre la presencia y el tipo de pigmento encontrado con las condiciones climáticas y con los valores de hematocrito y proteínas plasmáticas totales.

7. MATERIALES Y MÉTODOS:

7.1. Animales

Se obtuvieron 24 muestras de orina de equinos en condiciones de reposo con la condición de que los mismos hubieran competido o hubiesen sido entrenados para competir, estas se analizaron enbúsqueda de presencia de pigmentos. Dichas muestras se tomaron como basales.
Luego se concurrió a 4 pruebas de 90 kilómetros donde se tomaron muestras de la primera orina de un total de 24 equinos, después de que estos finalizaron la competencia (90 kilómetros) o luego de que debieran abandonar el recorrido por diversos motivos. Las muestras de aproximadamente 80 ml se recolectaron en frascos estériles para orina de 100 ml mediante micción directa y fueron refrigeradas inmediatamente hasta su procesamiento en el laboratorio.
Las muestras obtenidas fueron al azar sin tomar en cuenta sexo ni edad de los equinos.

7.2. Procesamiento de las muestras

La prueba de sulfato de amonio fue la de elección para la diferenciación de los pigmentos presentes, fue llevada a cabo en el Laboratorio de Facultad de Veterinaria. Dicha prueba permitió diferenciar de manera cualitativa la presencia de hemoglobina omioglobina en la orina.
El procedimiento para la realización de la misma consiste en agregar 2.8 grs. de sulfato de amonio a 5 ml de orina en un tubo de ensayo, disolver y luego centrifugar. Con el centrifugado la hemoglobina precipita y la mioglobina permanece en solución, posibilitando la diferenciación de dichos pigmentos (Graff, L. S., 1983).

7.3. Análisis estadístico

Estadística descriptiva - El resumen de datos mediante tablas, gráficos, y datos numéricos correspondientes a las variables en estudio.
Estadística inferencial - Dado que las variables en estudio son categóricas se realizó “Análisis de frecuencias de independencia-asociación (test de chi cuadrado)”, utilizando un nivel de significancia de 0.05.

7.4. Hematocrito y Proteínas Totales

Se obtuvieron valores de hematocrito y proteínas plasmáticas totales de los equinos muestreados, realizados por el laboratorio veterinario oficial de la prueba. De esta manera se pudo relacionar la presencia de pigmentos en orina con dichos valores. Los valores obtenidos son pre competencia e inmediatamente de finalizado el recorrido ya sea completando la prueba o no. Haciendo un valor promedio de los tres valores de referencia consultados en la bibliografía, pudimos estudiar y buscar relación entre el aumento de dichos valores y la presencia de hemoglobinuria.

7.5 . Índice de Confort

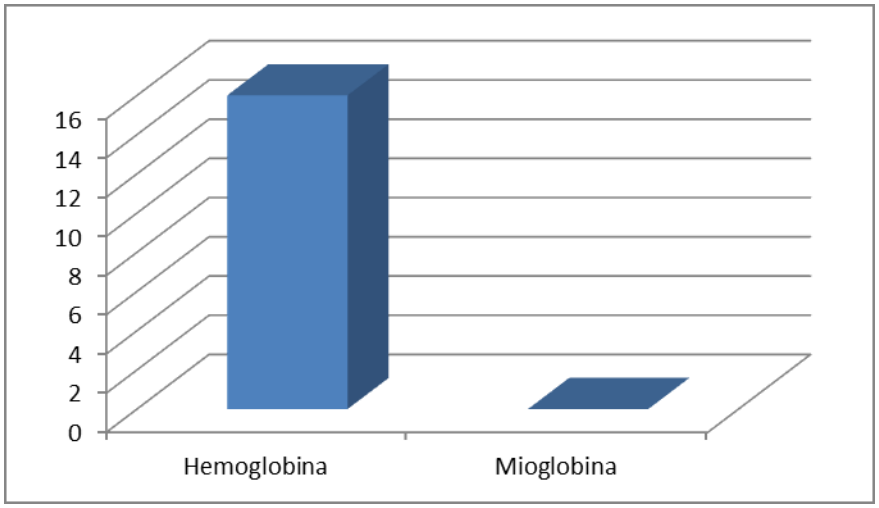
Para evaluar las condiciones climáticas de cada competencia y poder relacionar la temperatura y humedad, en Uruguay se calcula usualmente el Índice de Confort (IC). El cual toma en cuenta los factores climáticos y entrega información sobre la mayor facilidad o dificultad que el caballo puede tener para disipar calor de acuerdo a las condiciones del ambiente que lo rodea. El IC se utiliza para predecir el riesgo relativo de desarrollar un golpe de calor en los caballos que llevan a cabo un ejercicio de resistencia (Mackay-Smith y Cohen, 1982). (Laens, F. 2014).
A medida que el IC aumenta, se hace menos favorable el ejercicio y se ven afectados los mecanismos de termorregulación llevando a una mayor pérdida de electrolitos en el sudor con posibles desequilibrios, deshidratación y perturbaciones gastrointestinales.

El aumento de la humedad ambiente disminuye la eficiencia de la refrigeración por evaporación, dado que el aire ya se encuentra relativamente saturado de agua. Del mismo modo, en las vías respiratorias la pérdida de calor se verá comprometida. (Marlin y col., 1999)
Para grados Celsius, si el IC es inferior a 50, la termorregulación no debe ser una preocupación, si se encuentra entre 50 y 65, al sudar los caballos tendrán que reponer líquidos normalmente, cuando supera 65 y la humedad es mayor a 75%, la disipación de calor puede verse dificultada. Los jinetes deberán vigilar a sus caballos con mucho cuidado durante ejercicios extenuantes bajo estas condiciones. Cuando el IC supera 75, las rutas normales de disipación de calor no funcionan y el ejercicio se debería suspender (Jones, 2009).
El IC.se calcula de la siguiente manera: IC = T°+Humedad/1.8

8. RESULTADOS:

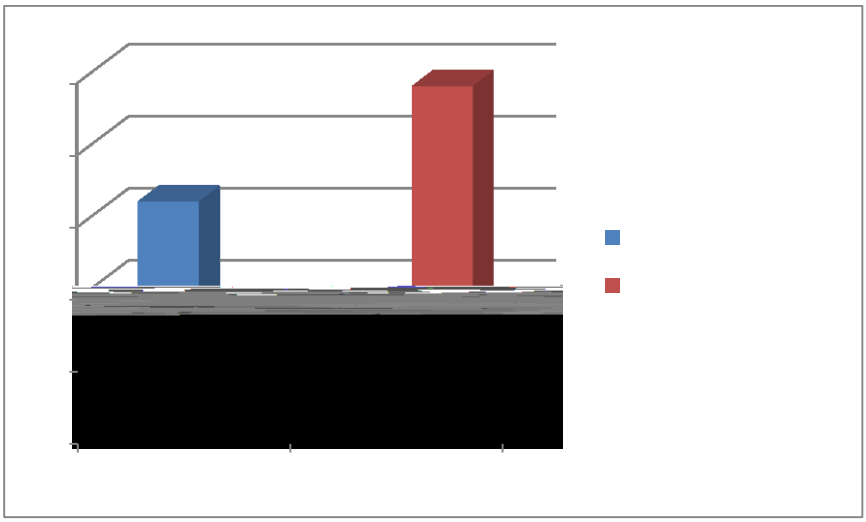
Estadística descriptiva:

Figura 1: resultado de la técnica de sulfato de amonio



- La técnica de sulfato de amonio mostró que el 100% de las muestras presentó a la hemoglobina como responsable de dicho color

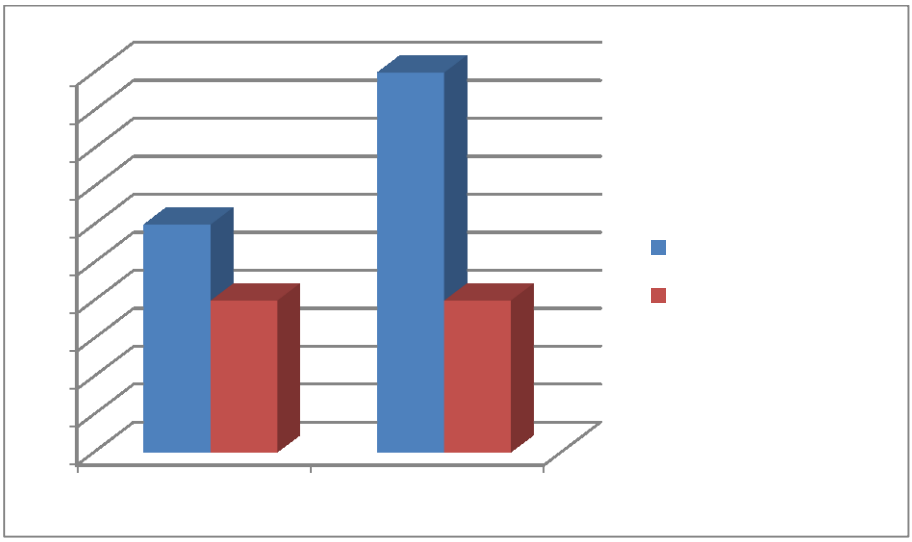
Figura 2: comparación hemoglobinuria en equinos en competencia y en reposo



- La hemoglobinuria se presentó solamente en equinos post competencia, en un 66.67% de los mismos. El total de las muestras tomadas a equinos en condiciones de reposo al igual que el 33.33% restante de las muestras post-ejercicio no presentaron pigmentos visibles macroscópicamente ni tampoco diferenciables mediante la técnica de sulfato de amonio.

  Diferencias significativas p=0.000

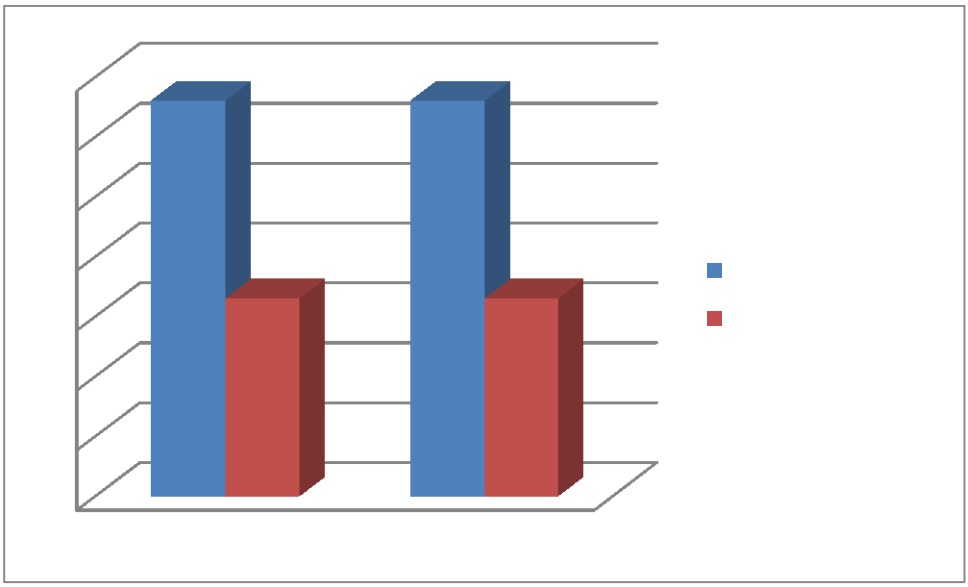
Figura 4: comparación hemoglobinuria en equinos que recorrieron hasta 60km inclusive o más.



- Dada la reglamentación de las pruebas Raid nos permitimos separar en dos categorías a los equinos participantes, los que hicieron hasta 60 kilómetros inclusive y los que superaron esa distancia, (primera etapa y segunda etapa). En la primer categoría, el 60% presentó hemoglobinuria y el 40% no. De los que hicieron por lo menos más de 60 kilómetros el 71.4% presentó hemoglobinuria y el 28.6% no.

  Diferencias no significativas p=0.556

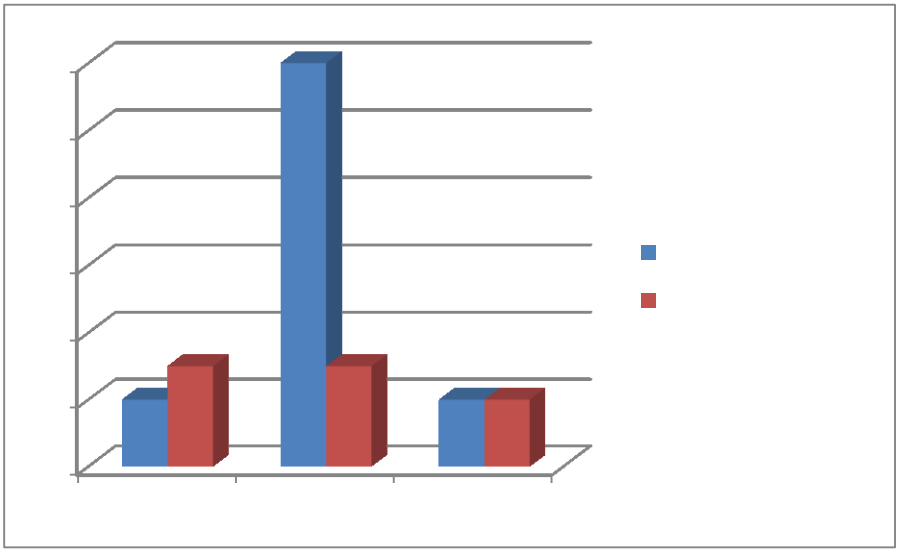
Figura 5: comparación hemoglobinuria en diferentes índices de confort



- Las pruebas donde se estudió a estos equinos cayeron dentro de los índices de confort entre 50-65 y mayor a 65. En ambas condiciones el 66.67% de los equinos presentó hemoglobinuria y el 33.33% no.

  Diferencias no significativas p=1

Figura 6: comparación hemoglobinuria asociada al aumento del hematocrito
Valor de referencia promedio de hematocrito: 0.376 L/L.



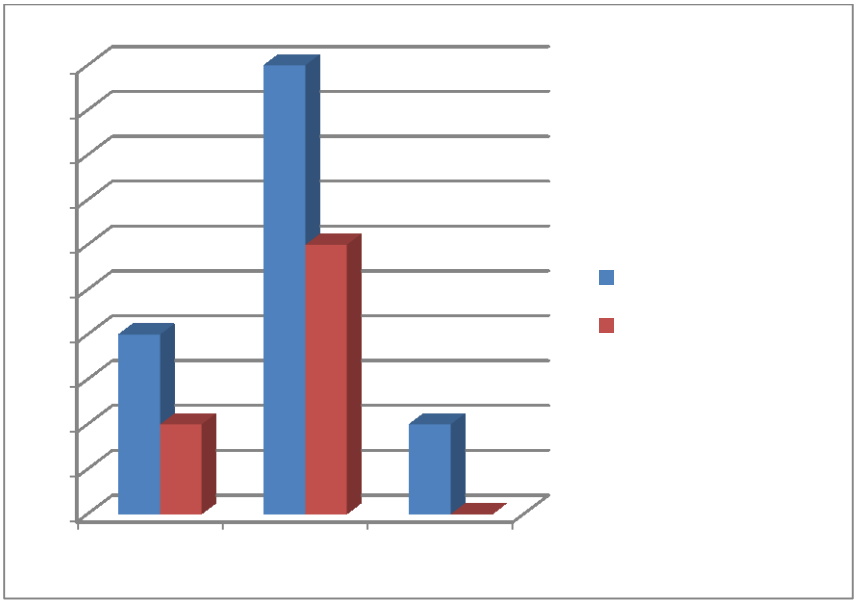
- El 20.8% de los equinos presentaron un aumento menor al 30% de hematocrito, de estos el 40% presentó hemoglobinuria y el 60% no.

- El 62.5% presentó un aumento de hematocrito de entre un 30%-60%, de estos el 80% presento hemoglobinuria y el 20% no.

- El restante 16.7% tuvo un aumento de hematocrito de entre un 60%-90%, donde el 50% presentó hemoglobinuria y el otro 50% no.

Diferencias no significativas p= 0.192

Figura 7: comparación hemoglobinuria con aumento de proteínas totales
Valor de referencia promedio de proteínas plasmáticas totales: 6.6 g/dl.



- El 25% de los equinos tuvo un aumento menor a un 20%, de estos el 66.7% presentó hemoglobinuria y un 33.3%no.
- El 66.7% tuvo un aumento de entre un 20%-40%, donde el 62.5% presentó hemoglobinuria y el 37.5% no.
- El restante 8.3% tuvo un incremento entre 40%-60%, dentro de estos el 100% presento hemoglobinuria.

Diferencias no significativas p=0.566

9. DISCUSIÓN:

La hemoglobina es responsable de la pigmenturia post ejercicio en los equinos analizados en nuestro trabajo. La técnica de sulfato de amonio permitió diferenciar la hemoglobina de la mioglobina gracias a la diferencia de solubilidad de estas moléculas, que mostró un claro resultado dejando un sedimento pigmentado (hemoglobina).

Si bien no todos los equinos que participaron en las pruebas (Raid) presentaron hemoglobinuria, esta se presentó solamente en equinos luego de dichas pruebas y no en equinos entrenados o que estaban compitiendo en la temporada en condiciones de reposo, ya que "Una de las causas establecidas de esta hemólisis consiste en que después de un ejercicio intenso los eritrocitos son más susceptibles al estrés, sea de tipo mecánico, oxidativo u osmótico" (Smith, J., 1995).

La proporción de equinos que presentó hemoglobinuria fue mayor en los que completaron el recorrido en comparación con los que no lo hicieron, y también hubo diferencias si comparamos a los que hicieron hasta 60 kilómetros con los que hicieron más de 60 kilómetros donde en estos también fue mayor. Esto contribuye por ejemplo a lo que afirmó O' Toole en 1998: "Los más afectados por esta condición son los practicantes de atletismo y la intensidad de la hemólisis depende en gran parte de la distancia recorrida" (O´Toole, M., 1998).
Se ha reconocido al ejercicio aeróbico moderado o intenso como productor de hemólisis intravascular, que presenta una gran variación individual y está influida por la duración y tipo de actividad física, así como por el grado de entrenamiento, y probablemente por la administración de antioxidantes inespecíficos. (Bonilla, J., 2008).

El presente trabajo no mostró diferencia en las proporciones de equinos que presentaron hemoglobinuria según el nivel del índice de confort, siendo de idénticas proporciones en ambos grupos estudiados.
La mayoría de los equinos presentó un aumento de hematocrito de entre un 30%-60%, dentro de estos el 80% de los mismos presentó hemoglobinuria post ejercicio. Si bien en las otras categorías analizadas los resultados no fueron similares, no podemos atribuir la presencia de hemoglobinuria solamente al aumento en el valor de hematocrito entre dichos valores.
Si comparamos la presencia de hemoglobinuria con el aumento del porcentaje de proteínas plasmáticas totales nos muestra en los dos primeros rangos un porcentaje bastante similar y en la última categoría con un aumento entre un 40%-60% de proteínas un 100% de hemoglobinuria. Aquí tampoco podemos atribuir la hemoglobinuria solamente a el aumento de proteínas plasmáticas totales, debido entre otros al número muy chico de casos que caen dentro de las categorías y a las variaciones que tendría cambiar solamente un caso de una categoría a otra.

Debemos aclarar que las diferencias fueron significativas solamente cuando comparamos la presencia de hemoglobinuria en equinos post ejercicio con equinos en condiciones de reposo y no en los demás grupos.

Antes de utilizar la técnica cualitativa de Sulfato de Amonio, las muestras fueron expuestas a la técnica de Electroforesis en gel de poliacrilamida con el fin de diferenciar de manera cualitativa y cuantitativa la presencia y cantidad de proteínas. Esta técnica se fundamenta en la diferenciación de moléculas biológicas en dependencia de su carga bajo la influencia de un campo eléctrico. Las partículas migran hacia el cátodo o ánodo en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. La electroforesis en gel,

químicamente inerte, forma geles transparentes que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado (Campbell, M.K., 1995).
No fue viable la utilización de esta técnica ya que las bandas que se formaban entraban en un rango de referencia de peso molecular muy próximo entre sí, siendo imposible la diferenciación a simple vista de las proteínas. Para hacerlo posible se debían importar marcadores específicos de proteínas ya fueran de mioglobina o de hemoglobina los cuales implicaban aumento de costos.

Las diferencias no significativas podrían deberse a que el número de muestras fue muy pequeño y a otros "ruidos" o factores que al ser un estudio observacional no se pueden modificar, como factores animales, meteorológicos y humanos.
Dentro de los factores animales, características como la edad, ya que en este tipo de competencias encontramos amplios rangos que por lo general van desde los 5 hasta los 15 años o más. La raza, la mayoría de los equinos de raid son mestizos, predominando cruzas de SPC, Árabe, Cuarto de Milla, Criollos, entre otros. El sexo no fue tenido en cuenta por lo que se analizaron muestras de machos y hembras por igual.

Este tipo de estudios tiene sus limitaciones, ya que los resultados para investigar el estrés climático inducido en estas carreras varían notablemente de un caballo a otro dependiendo del grado de esfuerzo, velocidad y ejercitación durante la competencia, del estado de entrenamiento y de la alimentación previa (Snow y col., 1982).
Otros factores meteorológicos como la velocidad del viento, la radiación solar y las precipitaciones, las cuales no fueron consideradas en el este estudio, pueden afectar la termorregulación del caballo.
Con respecto al tipo de terreno donde se llevan a cabo las competencias de Raid, se debe tener en cuenta que son variados y diversos por desarrollarse en distintos puntos del país, pasando desde basaltos, asfaltados, con llanuras o grandes ondulaciones y pisos más o menos empedrados, lo que puede contribuir o no a la teoría de "hemólisis por estrés mecánico".
En cuanto al entrenamiento, no existen requisitos previos para competir en las diferentes distancias, quedando a libre criterio y decisión del propietario, basándose en calidad y cantidad de entrenamiento la cual es meramente subjetiva ya que no existen cursos ni capacitaciones para entrenar un caballo de raid.

10. CONCLUSIONES:

El pigmento que se presentó en la primer orina post competencia de los equinos fue la hemoglobina.

No encontramos asociación entre la presencia de hemoglobinuria post ejercicio y las condiciones climáticas medidas como índice de confort.

El resultado de nuestro trabajo indica que al aumentar la distancia recorrida en las competencias, aumenta la proporción de equinos que presentan hemoglobinuria después de las mismas, lo que coincide con la bibliografía analizada, si bien estos resultados no fueron significativos por causas que fueron explicadas en dicha sección.

Tampoco encontramos asociación entre la presencia de hemoglobinuria con el aumento de los valores de hematocrito y proteínas, para lo cual consideramos conveniente en vez de un estudio observacional, un ensayo experimental, con variables bajo control y un número mayor de casos a estudiar.

11. BIBLIOGRAFÍA:

1. Acosta, R., Marichal, G. (2014) Apuntes del curso optativo, Fisiopatología del Ejercicio de Resistencia, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Comunicación personal.

2. Azizova O, Piryazev A, Nikitina N. (2002) Effect of oxidized LDL on hemolytic resistance erythrocyte. Bulletin of Experimental Biology and Medicine;134: 137-138.

3. Beetham, R. (2000) Biochemical investigation of suspected rhabdomyolysis. Annals of Clinical Biochemistry; 37: 581-587.

4. Boffi, F. M. (2006) Fisiología del Ejercicio en Equinos. Buenos Aires. Inter-Medica, 302 p.

5. Bonilla, J. F., Narváez, R., Chaurie, L. (2005) El deporte como causa de estrés oxidativo y hemólisis. Colombia Médica; 36: 275-280.

6. Bonilla, J. F., Palomino, F. (2008) Hemólisis inducida por el ejercicio: relación entre el nivel de actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y el grado de hemólisis. Colombia Médica; 39: 126-134.

7. Campbell, M. K. (1995) Biochemistry. 2a ed.Orlando.Saunders Collage publishing 522p.

8. Carlson, G. P., Ocen P. O., Harrold D. (1976). Clinicopathological alterations in normal and exhausted endurance horses. Theriogenology 6 (2-3): 93-104.

9. Carrell R, Winterbourn C, Rachmilewtz E. (1975) Activated oxygen andhemolysis. British Journal of Haematology. 30: 259-264.

10. Chevion S, Moran D, Heled Y. (2003) Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. Proceedings of the National Academy of Science USA; 100: 5119-5123.

11. Claster S, Chiu D., Quintanilha A., Lubin B., (1984) Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. Blood Journal; 64: 1079-1084.

12. Dillard C, Litov R, Savin W. (1978) Effect of exercise, vitamin E and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. Journal of Applied Physiology; 45: 927-932.

13. Engelhardt, W., Breves, G. (2005) Fisiología Veterinaria. Zaragoza. Acribia, 683p.

14. Federación Ecuestre Uruguaya. Disponible en: Http://www.federacionecuestreuruguaya.com.uy.Fecha de consulta: 16/04/2015.

15. Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C.,(2000) Schalm's Veterinary Haematology. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 1344p.

16. Flaminio RJ, Rush BR (1998) Fluid and electrolyte balance in endurance horses. VeterinaryClinics of North America. Equine Practice. 14(1):147-158.

17. Jones G. (1997) Newhouse I. Sport-related hematuria: a review. Clinical Journal of Sport Medicine; 7: 119-125.

18. Gallagher, P.G. (2000) Disorders of erythrocyte metabolism and shape. En: Christensen RD, Hematologic Problems of the Neonate.Philadelphia: WB Saunders. Págs.209-38.

19. Gilligan, D. R., Altschule, M. D., Katersky, E. M. (1943) Physiological intravascular hemolysis of exercise. hemoglobinemia and hemoglobinuria following cross-country runs. The Journal of Clinical Investigation, 22 (6): 859-869.

20. Graff, L. S. (1983) Análisis de orina. Buenos Aires. Médica panamericana. 222p.7

21. Grosskopf J.F.W, Van Rensburg JJ. (1983) Haematology and blood biochemistry of horses during a 210 km endurance ride. EquineExercisePhysiology: 416-424.

22. Hinchclif, K. W., (2007) Medicina y Cirugia en los Equinos de Deporte. Buenos Aires. Inter-medica. 2v.

23. Inayama T, Oka J, Kashiba M. (2000) Moderate physical exercise induces the oxidation of human blood protein thiols. Life Science Journal; 70: 2039-2046.

24. Ji L. (1996) Exercise, oxidative stress, and antioxidants. The American Journal ofSports Medicine. 24: 20-24.

25. Jones S, (2009), Horseback riding in the dog days. Animal Science e-News University of Arkansas 2: 3-4. Disponible en: http://www.uaex.edu/farmranch/animals-forages/docs/ansc%20e-news%20july2009.pdf.Fecha de consulta: 20/07/14.

26. Koyama K, Kaya M, Ishigaki T. (1999) Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology; 80: 28-33.

27. Laens Roig, F.,WünschNotejane, M. C. (2014) Efecto del índice de confort, velocidad, etapa, raza y sexo sobre el tiempo de recuperación cardíaca, en caballos de enduro. Tesis de grado. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. 75p.

28. Leeuwenburgh C, Heinecke J. (2001) Oxidative stress and antioxidants in exercise. Current Medicinal Chemistry; 8: 829-838.

29. Liu M, Berghol R, Mäkimattila S. (1999) A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. American Journal of Physiology; 39: 1083-1091.

30. Maisonnave, M. N., Lockhart, G., (2012).Uruguay Endurance. Montevideo, Banco Comercial, 193p.

31. Marichal, G., Hernandez, H. (2013) Determinación de las variaciones electrolíticas séricas pre, durante y post competencia en el equino de resistencia (RAID). Tesis de grado. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. 37p.

32. Marlin DJ, Scott CM, Schroter RC, Harris RC, Harris PA, Roberts CA, Mills PC, (1999). Physiological responses of horses to a treadmill simulated speed and endurance test in high heat and humidity before and after humid heat acclimation. EquineVeterinaryJournal. J. 31(1): 31-42.

33. Martínez, R. P., Scaglione, M., Luneburg, C. F., Hernández, E. A., Araneda, O. V., González, M. S., Estrada, M.H., White, A.O., (2001) Cambios sanguíneos y sudorales en equinos sometidos a carreras de resistencia. Avances en Ciencias Veterinarias, 16: 58-67.

34. Moller P, Loft S, Lundby G. (2001) Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal; 15: 1181-1186.

35. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2006) Lehninger principios de bioquímica. Barcelona. Ed. Omega. 1119p.

36. Oostenburg G, Mensink R, Hardemen M. (1997) Exercise performance red blood cell deformability and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. Journalof Applied Physiology; 83: 746-752.

37. Ota, M., Ozono, S., Ikeda,T. Nakanou, I., Hirao, Y. (2004) Analysis of sports hematuria after running in summer. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi; 95: 705-710.

38. O´Toole, M. L., Hiller, W. D. B., Roalstad, M. S., Douglas P. S. (1998) Hemolysis during triathlon races: its relation to race distance. Medicine & Science in Sports &Exercise; 20: 272-275.

39. Peake J, Wilson G, Hordern M. (2004) Changes in neutrophil surface receptor expression, degranulation, and respiratory burst activity after moderate- and high-intensity exercise. Journal of Applied Physiology; 97: 612-618.

40. Radak Z, Asano K, Inoue M. (1995) Superoxide dismutase derivate reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. Journalof Applied Physiology; 79: 129-135.

41. Radostis, O. M.,Gay, C. C.,Blood, D. C.,Hinchcliff, K. W.(1999) MedicinaVeterinaria. 9a ed. Madrid, Mc Graw – Interamericana. 2v.

42. Reid R, Hoshing D, Ramsey E. (1987) Haematuria following a marathon run: source and significance. British Journal of Urology; 59: 133-136.

43. Rose RJ (1986) Endurance exercise in the horse-a review. Part I. British Veterinary Journal. 142(6):532- 541.

44. Sacristan, A. G., Montijano, F. C., De La Cruz Palomino, L. F., Gallego, J. G., Murillo López de Silanes, M. D., Ruiz, G. S. (1995) Fisiologia Veterinaria.Madrid. Interamericana XXI, 1074p.

45. Schott II, H. C.,Hodgson, D. R., Bayly, W. M. (1995) Haematuria, pigmenturia and proteinuria in exercising horses. Equine Veterinary Journal, 27(1): 67-72.

46. Schott II, H.C., McGlade, K. S., Molander, H. A., Leroux, A. J., Hines, M. T. (1997) Body weight, fluid, electrolyte, and hormonal changes in horses competing in 50- and 100- mile endurance rides. American Journal of Veterinary Research, 58 (3): 303-309.

47. Sen C, Atalay M, Agren J.(1997) Fish oil and vitamin E supplementation in oxidative stress at rest and after physical exercise. Journal of Applied Physiology; 83: 189-195.

48. Sen C, Marin E, Kretzschmar M. (1992) Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, andimmobilization. Journal of Applied Physiology; 73: 1265-1272.

49. Siegel, A. J., Hennekens, C. H., Solomon, H. S., Van Boeckel, B. (1979) Exercise-related hematuria. Findings in a group of marathon runners. Journal of the American Medical Association; 26: 391-392.

50. Sjodin B, Hellsten W, Apple F. (1990) Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. Sports Medicine;10: 236-254.

51. Smith, J. A., Kolbuch-Braddon, M., Gillam, I., Telford, R. D., Weidemann, M. J. (1995) Changes in the susceptibility of red blood cells to oxidative and osmotic stress following submaximal exercise. European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology; 70: 427-436.

52. Smith, J. A. (1995) Exercise, training and RBC turnover. Sports Medicine; 19: 9-31.

53. Snow DH, Kerr MG, Nimmo MA, Abbott EM, (1982). Alterations in blood,sweat, urine and muscle composition during prolonged exercise in the horse.Veterinary Record. 110: 377-384.

54. Telford, R. D., Sly, G. J., Hahn, A. G., Cunningham, R. B., Bryant, C., Smith, J. A. (2003) Footstrike is the major cause of hemolysis during running. Journalof Applied Physiology; 94: 38-42.

55. Weight L, Byrne M, Jacobs P. (1991) Haemolytic effects of exercise. Clinical Science (London); 81: 147-152.

56. Viguie C, Frei B, Shigenaga K. (1993) Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. Journal of Applied Physiology; 75: 566-572.

57. Vina J, Gimeno V, Sastre J. (2000) Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life; 49: 539-544.

58. Weiss S. (1980) The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. The Journal of Biological Chemistry; 255: 9912-9917.

59. Weiss S. (1982) Neutrophil-mediated methemoglobin formation in the erythrocyte. The Journal of Biological Chemistry; 257: 2947-2953.

60. Young LE, Izzo MJ, Platzer RF. (1951) Hereditary spherocytosis. I. Clinical, hematologic and genetic features in 28 cases, with particular reference to the osmotic and mechanical fragility of incubated erythrocytes. Blood;6(11):1073-98.

12. ANEXOS

ÍNDICE DECONFORT:

Lugar	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	IC
Sarandí del Yi	6	92	57.1
Fray Marcos	0	94	58
J.P. Varela	15	98	69.4
Tupambaé	7	85	54

PLANILLAS DE LABORATORIO:

FRAY MARCOS

	MUESTRA: 1RA		**MUESTRA: 2DA**	
NOMBRE	**%HTO**	**PPT.**	**%HTO**	**PPT.**
DON PASCUAL	36	6.6	52	7.8
COSTERA	44	7.2	50	7.6

SARANDÍ DEL YI

	MUESTRA: 1RA		**MUESTRA: 2DA**	
NOMBRE	**%HTO**	**PPT.**	**%HTO**	**PPT.**
QUE BOMBA	37	6.6	56	8
LA JOVITA	40	6.2	65	8
MI CAMINANTE	37	6.9	60	8.8
FISCAL UNO	38	6	55	8
PIMENTON	40	6.8	50	8
EL LOLO SOY	42	7	48	8
EL HURRACA	42	6.2	48	6.6
CHUMBITO	40	6.2	57	8

JOSÉ PEDRO VARELA

	MUESTRA: 1RA		MUESTRA: 2DA	
NOMBRE	**%HTO**	**PPT.**	**%HTO**	**PPT.**

COMPARACIÓN HEMOGLOBINURIA ASOCIADA AL AUMENTO DEL HEMATOCRITO

VALOR DE REFERENCIA PROMEDIO DE HEMATOCRITO: 0.376 L/L

VALORES OBSERVADOS

VALORES CALCULADOS

COMPARACIÓN HEMOGLOBINURIA CON AUMENTO DE PROTEÍNAS TOTALES

VALOR DE REFERENCIA PROMEDIO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES: 6.6 G/DL

VALORES OBSERVADOS

VALORES CALCULADOS