



**Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Departamento de
Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Centro de Medicina
Deportiva Equina. Universidad de Córdoba**

**EFEECTO DEL EJERCICIO DE TIRO Y ARRASTRE
SOBRE EL EJE RENINA-ANGIOTENSINA-
ALDOSTERONA Y COCIENTE
TESTOSTERONA/CORTISOL EN CABALLOS
EUHIDRATADOS Y DESHIDRATADOS**

Elena Tofé Povedano

Directoras: Dra. Ana Muñoz Juzado

Dra. Cristina Castejón Riber

Córdoba, 2016



**TÍTULO DE LA TESIS: EFECTO DEL EJERCICIO DE TIRO Y
ARRASTRE SOBRE EL EJE RENINA ANGIOTENSINA
ALDOSTERONA Y COCIENTE TESTOSTERONA/CORTISOL EN
CABALLOS EUHIDRATADOS Y DESHIDRATADOS**

DOCTORANDO/A: Elena Tofé Povedano

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE
LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Medicina Deportiva Equina, CEMEDE, de la Universidad de Córdoba, bajo la tutela de dos directoras pertenecientes a los Departamentos de Medicina y Cirugía Animal y Biología Celular, Fisiología e Inmunología.

Durante la realización de esta tesis, la doctoranda ha mostrado un gran interés y dedicación al trabajo. Además de llevar a cabo la tesis doctoral, y en relación a ella, ha publicado los siguientes artículos:

Tofé E, Muñoz A, Castejón F, Trigo P, Castejón-Riber C, Gómez-Díez M, Riber C (2013). *Behaviour of the renin angiotensin aldosterone axis during exercise in euhydrated and dehydrated horses. Research in Veterinary Science* 95, 615-622.

Esta revista está indexada en el ISI Web of Knowledge, en la categoría de Veterinary Sciences, con un índice de impacto en el año de su publicación de 1,511 y con una posición de la revista 29/129.

Trigo P, **Tofé E**, Riber C, Castejón-Riber C, Castejón FM, Muñoz A (2011). *Regulação neuroendocrina em cavalos de tiro em relação a intensidade do exercício, o metabolismo eo peso corporal. Revista Veterinaria e Zootecnica em Minas*, 109, 106-108.

Además, la doctoranda ha presentado las siguientes comunicaciones a congresos internacionales:

Trigo P, **Tofé E**, Riber C, Castejón-Riber C, Castejón F, Muñoz A (2011). *Regulação neuroendocrina em cavalos de tiro em relação a intensidade do exercício, o metabolismo eo peso corporal. V Simposio International do Cavalo Atleta e VII Semana do Cavalo. Belo Horizonte, Brasil.*

Gómez-Díez M, **Tofé E**, Riber C, Castejón F, Muñoz A (2012). *Effect of strength exercise on testosterone, cortisol and muscle enzymes in horses. European Veterinary Conference Voorjaardsdagen. Holanda, 5-7 abril.*

Tofé E, Muñoz A, Gómez-Díez M, Castejón F, Rubio MD, Castejón-Riber C, Riber C (2013). *Activation of the sympathetic nervous system in euhydrated*

*and dehydrated horses during exercise. 11th Congress of the World Equine
Veterinary Association WEVA, Budapest, Hungría, 3-5 octubre.*

Debido al rigor científico, calidad de la tesis, formación científica y labor realizada por la doctoranda, se autoriza la presentación de la presente tesis doctoral.

Córdoba, marzo de 2016

Fdo.: Ana Muñoz Juzado

Dpt. Medicina y Cirugía Animal
Centro de Medicina Deportiva Equina
Universidad de Córdoba

Fdo.: Cristina Castejón Riber

Dpt. Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Centro de Medicina Deportiva Equina
Universidad de Córdoba

ÍNDICE

1. LISTADO DE TABLAS.....	Pág 17
2. LISTADO DE FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS.....	Pág 21
3. LISTADO DE ABREVIATURAS.....	Pág 29
4. INTRODUCCIÓN GENERAL Y DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	Pág 33
5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	Pág 39
6. MATERIAL Y MÉTODOS	Pág 43
6.1. Caballos.....	Pág 45
6.2. Competiciones de tiro y arrastre (grupo DH).....	Pág 45
6.3. Ejercicio en el grupo control (grupo CTR)	Pág 47
6.4. Extracción y procesamiento de las muestras sanguíneas	Pág 47
6.5. Parámetros laboratoriales	Pág 49
6.6. Estudio estadístico.....	Pág 49
7. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág 51
8. ESTUDIO I. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE RENINA, ANGIOTENSINA Y ALDOSTERONA EN CABALLOS EUHIDRATADOS Y DESHIDRATADOS DURANTE UN EJERCICIO DE TIRO Y ARRASTRE	Pág 59
8.1. INTRODUCCIÓN	Pág 61
8.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	Pág 63
8.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	Pág 65
8.3.1. Generalidades sobre el eje renina-angiotensina-aldosterona	Pág 65
8.3.2. Concentraciones séricas de renina, angiotensina y aldosterona en respuesta a diferentes tipos de ejercicio en el caballo	Pág 68
8.3.2.1. Concentración-actividad renina en caballos en ejercicio.....	Pág 68

8.3.2.2. Concentración de angiotensina II en caballos en ejercicio	Pág 70
8.3.2.3. Concentración de aldosterona en caballos en ejercicio.....	Pág 70
8.3.3. Variaciones electrolíticas del caballo durante el ejercicio	Pág 73
8.3.3.1. Variaciones de la natremia durante el ejercicio en el caballo	Pág 73
8.3.3.2. Variaciones de la calemia durante el ejercicio en el caballo.....	Pág 74
8.3.3.3. Variaciones de la cloremia durante el ejercicio en el caballo	Pág 76
8.4. MATERIAL Y MÉTODOS	Pág 77
8.4.1. Caballos.....	Pág 77
8.4.2. Competiciones de tiro y arrastre (grupo DH).....	Pág 77
8.4.3. Ejercicio en el grupo control (grupo CTR)	Pág 78
8.4.4. Extracción y procesamiento de las muestras sanguíneas	Pág 79
8.4.5. Procedimientos analíticos	Pág 79
8.4.6. Análisis estadístico.....	Pág 81
8.5. RESULTADOS.....	Pág 83
8.5.1. Resultados del análisis multivariante	Pág 83
8.5.2. Efecto de la categoría de peso y del tiempo de extracción de muestras en el grupo DH.....	Pág 85
8.5.3. Efecto de la categoría de peso y del tiempo de extracción de muestras en el grupo CTR.....	Pág 92
8.5.4. Diferencias entre grupos DH y CTR.....	Pág 97
8.5.5. Análisis de correlación.....	Pág 103
8.6. DISCUSIÓN	Pág 105

8.6.1. Efecto de la categoría de peso y del ejercicio	Pág 105
8.6.2. Diferencias entre los grupos CTR y DH	Pág 107
8.6.2.1. Diferencias entre los grupos CTR y DH en reposo.....	Pág 107
8.6.2.2. Diferencias entre los grupos CTR y DH en ejercicio y recuperación	Pág 110
8.7. CONCLUSIONES.....	Pág 114
8.8. RESUMEN.....	Pág 115
8.9. SUMMARY	Pág 117
8.10. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág 119
9. ESTUDIO II. TESTOSTERONA, CORTISOL Y COCIENTE TESTOSTERONA/CORTISOL EN CABALLOS CON DIFERENTE ESTADO HÍDRICO DURANTE UN EJERCICIO DE TIRO Y ARRASTRE	Pág 133
9.1. INTRODUCCIÓN	Pág 135
9.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	Pág 138
9.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	Pág 140
9.3.1. Respuesta de la testosterona al ejercicio	Pág 140
9.3.2. Respuesta del cortisol al ejercicio	Pág 142
9.3.3 Cociente testosterona/cortisol (T/C) en el ejercicio	Pág 146
9.3.4. Influencia del estado hídrico sobre las concentraciones de testosterona, cortisol y cociente T/C	Pág 149
9.4. MATERIAL Y MÉTODOS	Pág 152
9.4.1. Caballos.....	Pág 152
9.4.2. Competiciones de tiro y arrastre, grupo DH	Pág 152
9.4.3. Ejercicio en el grupo control, grupo CTR.....	Pág 153

9.4.4. Extracción y procesamiento de las muestras sanguíneas	Pág 154
9.4.5. Procedimientos analíticos	Pág 154
9.4.6. Análisis estadístico.....	Pág 155
9.5. RESULTADOS.....	Pág 156
9.5.1. Resultados del análisis multivariante	Pág 156
9.5.2. Efecto de la categoría multivariante del tiempo de extracción de muestras en el grupo DH.....	Pág 157
9.5.3. Efecto de la categoría de peso y del tiempo de extracción de muestras en el grupo CTR.....	Pág 160
9.5.4. Diferencias entre grupos DH y CTR.....	Pág 163
9.5.5. Correlaciones entre las concentraciones de testosterona y cortisol durante el ejercicio y la recuperación	Pág 171
9.6. DISCUSIÓN	Pág 173
9.6.1. Limitaciones del estudio II.....	Pág 174
9.6.2. Respuesta de las concentraciones de testosterona al ejercicio de tiro y arrastre.....	Pág 175
9.6.3. Respuesta de las concentraciones de cortisol al ejercicio de tiro y arrastre.....	Pág 178
9.6.4. Respuesta del ratio T/C al ejercicio de tiro y arrastre	Pág 180
9.6.5. Influencia del estado hídrico en la respuesta de las concentraciones de testosterona, cortisol y ratio T/C	Pág 180
9.7. CONCLUSIONES.....	Pág 184
9.8. RESUMEN.....	Pág 186
9.9. SUMMARY	Pág 189
9.10. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág 191
10. CONCLUSIONES GENERALES	Pág 213
11. RESUMEN GENERAL.....	Pág 217

12. MAIN SUMMARY Pág 223

13. ARTÍCULO DERIVADO DE LA TESIS (indicios de calidad)..... Pág 229



1. LISTADO DE TABLAS

Tablas del estudio I

Tabla 1. Valores medios (\pm DS) y valores máximos y mínimos (entre paréntesis) de la edad, peso, carga arrastrada y tiempo de ejercicio en los caballos del grupo DH ... Pág 78

Tabla 2. Valores medios (\pm DS) y valores máximos y mínimos (entre paréntesis) de la edad, peso, carga arrastrada y tiempo de ejercicio en los caballos del grupo CTR . Pág 79

Tabla 3. Resultados del análisis multivariante (valores F y probabilidad p) y de los efectos de los tres factores principales (grupo de caballo, categoría de peso y tiempo de extracción de las muestras sanguíneas)..... Pág 84

Tabla 4. Resultados del análisis de correlación entre las variables estudiadas en los caballos del grupo CTR..... Pág 103

Tabla 5. Resultados del análisis de correlación entre las variables estudiadas en los caballos del grupo DH..... Pág 104

Tablas del estudio II

Tabla 6. Concentraciones de cortisol descritas por varios autores en caballos tras diferentes tipos de ejercicio..... Pág 146

Tabla 7. Valores medios (\pm DS) y valores mínimos y máximos (entre paréntesis) de la edad, peso, carga arrastrada y tiempo de ejercicio de los caballos del grupo DH . Pág 153

Tabla 8. Valores medios (\pm DS) y valores mínimos y máximos (entre paréntesis) de la edad, peso, carga arrastrada y tiempo de ejercicio de los caballos del grupo CTRPág 153

Tabla 9. Resultados del análisis multivariante (valores F y probabilidad) y de los efectos de los tres factores principales (grupo de caballo, categoría de peso y tiempo de extracción de las muestras sanguíneas)..... Pág 157

Tabla 10. Coeficientes de correlación entre el peso, el tiempo de ejercicio y las concentraciones de albúmina, cortisol y ratio T/C en caballos durante el ejercicio de tiro y arrastre..... Pág 172

Tabla 11. Coeficientes de correlación entre el peso, el tiempo de ejercicio y las concentraciones de albúmina, cortisol y ratio T/C en caballos durante la recuperación de tiro y arrastre Pág 172



2. LISTADO DE FIGURAS Y **FOTOGRAFÍAS**

Figuras del estudio I

Figura 1. Valor hematocrito (%) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso Pág 86

Figura 2. Concentración plasmática de albúmina (mg/dl) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 86

Figura 3. Concentración plasmática de lactato (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 87

Figura 4. Concentración plasmática de sodio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 88

Figura 5. Concentración plasmática de potasio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 88

Figura 6. Concentración plasmática de cloro (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 89

Figura 7. Concentración sérica de renina (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso Pág 90

Figura 8. Concentración sérica de angiotensina (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 90

Figura 9. Concentración sérica de aldosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 91

Figura 10. Concentración sérica de aldosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (Figura tras eliminar a un caballo con valores anormalmente elevados) Pág 91

Figura 11. Valor hematocrito (%) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 92

- Figura 12.** Concentración plasmática de albúmina (g/dl) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 93
- Figura 13.** Concentración plasmática de lactato (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 94
- Figura 14.** Concentración plasmática de sodio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 94
- Figura 15.** Concentración plasmática de potasio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 95
- Figura 16.** Concentración plasmática de cloro (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 95
- Figura 17.** Concentración sérica de renina (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 96
- Figura 18.** Concentración sérica de angiotensina (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 96
- Figura 19.** Concentración sérica de aldosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 97
- Figura 20.** Valor hematócrito (%) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición Pág 98
- Figura 21.** Concentración plasmática de albúmina (g/dl) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición Pág 98
- Figura 22.** Concentración plasmática de lactato (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición Pág 99
- Figura 23.** Concentración plasmática de sodio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición Pág 99

- Figura 24.** Concentración plasmática de potasio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición Pág 100
- Figura 25.** Concentración plasmática de cloro (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición Pág 100
- Figura 26.** Concentración sérica de renina (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición..... Pág 101
- Figura 27.** Concentración sérica de angiotensina (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición Pág 101
- Figura 28.** Concentración sérica de aldosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición Pág 102
- Figura 29.** Variación inducida por el ejercicio en las variables estudiadas en los dos grupos de caballos con diferente estado hídrico Pág 103

Figuras del estudio II

- Figura 30.** Concentración plasmática de albúmina (g/dl) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 158
- Figura 31.** Concentración sérica de testosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 158
- Figura 32.** Concentración sérica de cortisol (mg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 159
- Figura 33.** Cociente T/C en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso Pág 160

Figura 34. Concentración plasmática de albúmina (g/dl) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 161

Figura 35. Concentración sérica de testosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 162

Figura 36. Concentración sérica de cortisol (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso..... Pág 162

Figura 37. Cociente T/C en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso Pág 163

Figura 38. Concentración plasmática de albúmina (g/dl) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición Pág 164

Figura 39. Concentración sérica de testosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso I, de los grupos CTR y DH, durante una competición Pág 165

Figura 40. Concentración sérica de testosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso II, de los grupos CTR y DH, durante una competición Pág 165

Figura 41. Concentración sérica de testosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso III, de los grupos CTR y DH, durante una competición..... Pág 166

Figura 42. Concentración sérica de cortisol (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso I, de los grupos CTR y DH, durante una competición Pág 166

Figura 43. Concentración sérica de cortisol (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso II, de los grupos CTR y DH, durante una competición..... Pág 167

Figura 44. Concentración sérica de cortisol (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso III, de los grupos CTR y DH, durante una competición Pág 167

Figura 45. Ratio T/C en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso I, de los grupos CTR y DH, durante una competición Pág 168

Figura 46. Ratio T/C en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso II, de los grupos CTR y DH, durante una competición Pág 168

Figura 47. Ratio T/C en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso III, de los grupos CTR y DH, durante una competición Pág 169

Figura 48. Variación inducida por el ejercicio en la concentración sérica de cortisol en dos grupos de caballos con diferente estado hídrico y pertenecientes a tres categorías de peso Pág 170

Figura 49. Cambios durante la recuperación, en comparación con el ejercicio en la concentración sérica en dos grupos de caballos con diferente estado hídrico y pertenecientes a tres categorías de peso Pág 170

Figura 50. Variación inducida por el ejercicio en la concentración sérica de testosterona en dos grupos de caballos con diferente estado hídrico y pertenecientes a tres categorías de peso Pág 171

Fotografía 1. Se muestra un caballo participante en una competición de tiro y arrastre (categoría III de peso) Pág 46



3. LISTADO DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormona adrenocorticotropa	ELISA: Análisis enzimático de inmuno- ensayo
ADH: Hormona antidiurética	FC: Frecuencia cardiaca
ALB: Albúmina	HAD: 3-hidroxi-acil coenzima A deshidrogenasa
ALD: Aldosterona	HTO: Valor hematócrito
AMPc: Adenosina monofostato cíclico	K: Potasio
ANG: Angiotensina II	LA: Lactato
AVP: Arginina vasopresina	LH: Hormona luteinizante
BUN: Nitrógeno ureico en sangre (urea)	Na: Sodio
C: Cortisol	PAN: Péptido atrial natriurético
Cl: Cloro	REN: Renina
CREAT: Creatinina	T/C: Cociente testosterona/cortisol
CS: Citrato sintasa	T: Testosterona
CTR: Control	VO _{2max} : Consumo máximo de oxígeno
DH: Deshidratado	
DHEA: Dihidroepiandrosterona	



4. INTRODUCCIÓN GENERAL Y **DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**

Se ha demostrado que el estado hídrico (hiperhidratación- euhidratación- deshidratación o hipohidratación) es clave en el rendimiento deportivo de atletas humanos (Kraft *et al.*, 2012; Bardis *et al.*, 2013; Benton *et al.*, 2015; Cheung *et al.*, 2015; Racinais *et al.*, 2015). El rendimiento del ejercicio, evaluado mediante el tiempo de ejercicio hasta la fatiga, a una determinada intensidad de esfuerzo, aumenta tras la ingestión de soluciones que contienen agua y electrolitos (González-Alonso *et al.*, 1999; Sawka *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2005; Jeukendrup *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2005; Merson *et al.*, 2008). El descenso de la volemia asociado a deshidratación impide el mantenimiento de una perfusión adecuada para el músculo en contracción (Montain *et al.*, 1998). Además, limita el aporte de sangre hacia la piel, lo cual puede favorecer la hipertermia, altera la función metabólica e incrementa la temperatura muscular propiciando la fatiga.

La relación entre el estado hidroelectrolítico y el rendimiento en competición no se ha investigado de una forma detallada en el caballo. No obstante, se acepta que si los animales inician la competición en un estado de deshidratación, podrían presentar una función termorreguladora comprometida, y una gran limitación en el rendimiento deportivo, particularmente en competiciones de media y larga duración como concurso completo de equitación o resistencia. Por este motivo, en caballos de deporte, se ha evaluado la respuesta a una sobrehidratación previa al ejercicio y los procedimientos para conseguir dicha sobrehidratación (Düsterdieck *et al.*, 1999; Manohar *et al.*, 2005; Tennent-Brown *et al.*, 2006).

La defensa de la presión sanguínea aguda y crónica y del equilibrio hidroelectrolítico se lleva a cabo mediante la activación del eje renina angiotensina aldosterona. Cuando se produce un descenso de la volemia o bien una alteración electrolítica, fundamentalmente hiponatremia y/o hipercalemia, se produce una liberación de la renina (REN) por parte de las células yuxtaglomerulares renales. La REN liberada, actúa sobre el angiotensinógeno, el cual es convertido hacia angiotensina I y con posterioridad, hacia angiotensina II (ANG). Esta última hormona, por un lado favorece la liberación de aldosterona (ALD) y por otro lado, es un potente agente vasoconstrictor,

dando lugar a una elevación de la presión sanguínea. La ALD interviene en la conservación de sodio (Na), al aumentar la reabsorción de este electrolito a nivel renal y en el colon (McKeever *et al.*, 1991; 1992; Clarke *et al.*, 1992; Schott *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 2007; 2010a,b,c; 2011; Tofé *et al.*, 2013). En caballos durante una competición de resistencia, se ha demostrado que cuando existe deshidratación, se produce una elevación de las concentraciones de ANG y ALD (Muñoz *et al.*, 2010a,b,c; 2011). Además, se han encontrado correlaciones significativas entre estas hormonas y algunos marcadores de estado hídrico, tales concentraciones plasmáticas de urea (BUN), creatinina (CREAT), proteínas totales, albúmina (ALB) y valor hematocrito (HTO) (Muñoz *et al.*, 2010b,c).

La realización de un ejercicio implica una movilización de sustratos energéticos, en parte regulada por la relación entre las hormonas anabólicas, como la testosterona (T), y las hormonas catabólicas, como el cortisol (C). Ambas hormonas poseen importantes funciones en el metabolismo de los carbohidratos y de las proteínas y además son agonistas competitivos a nivel de los receptores de las células musculares. Así, el C promueve el desdoblamiento de las proteínas musculares, mientras que la T incrementa su síntesis. Por este motivo, en atletas humanos, se ha utilizado el cociente T/C como un marcador de equilibrio hormonal anabólico-catabólico (Urhausen *et al.*, 1995; Debigaré *et al.*, 2003; Elloumi *et al.*, 2003; Judelson *et al.*, 2008; McLellan *et al.*, 2010). Este cociente se utiliza en atletas humanos para llevar a cabo un seguimiento deportivo, evitar sobreentrenamiento y controlar el estrés del entrenamiento y de la competición (Urhausen *et al.*, 1995; Elloumi *et al.*, 2003; Maso *et al.*, 2004; Banfi y Dolci, 2006; Doan *et al.*, 2007; McLellan *et al.*, 2010).

La respuesta del cociente T/C al ejercicio en personas no está claramente definida, posiblemente porque depende de numerosos factores, además de las características de duración e intensidad del ejercicio y del nivel de entrenamiento. De este modo, si bien se acepta que un ejercicio agudo da lugar a un incremento de T y C, esta respuesta puede ser modulada por el nivel de entrenamiento, tipo y duración del ejercicio. Así, algunos autores han demostrado que se produce un incremento del ratio T/C tras ejercicios de resistencia (Lac y Berthon, 2000; Elloumi *et al.*, 2003; Maresh *et al.*, 2006; Gaviglio *et*

al., 2015; Hayes *et al.*, 2015), mientras que, por el contrario, otros autores han encontrado un descenso de este cociente o una ausencia de variaciones (Hoogeveen y Zonderland, 1996; Lac y Berthon, 2000; Fry y Lohnes, 2010; Li *et al.*, 2015).

En el caballo, se han analizado los cambios en las concentraciones circulantes de C en respuesta a diversos tipos de ejercicio y en animales con un nivel de entrenamiento diferente (Snow y Rose, 1981; Desmecht *et al.*, 1996; Jensen-Waern *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 1999; Marc *et al.*, 2000; Cayado *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2007; Cravana *et al.*, 2010; Janczarek *et al.*, 2013). Sin embargo, los cambios experimentados por las concentraciones de T en respuesta al ejercicio y al entrenamiento no se han estudiado en esta especie. La investigación sobre T en caballos de deporte se limita a detectar la administración fraudulenta de andrógenos como agentes anabolizantes (Soma *et al.*, 2008; 2012; Decloedt *et al.*, 2015; Knych *et al.*, 2015). De forma puntual, Golland *et al.* (1999) detectaron un incremento de las concentraciones de T tras un ejercicio máximo en caballos Standardbred machos castrados y con posterioridad, Leleu y Haentjens (2010) describieron que las concentraciones de T no difieren entre caballos trotones Standardbred con y sin sobreentrenamiento.

Sería interesante conocer las variaciones del cociente T/C en caballos en ejercicio, ya que, como se ha comentado antes, en atletas humanos, un aumento de C junto a un descenso de T (y por tanto, una reducción del ratio T/C) implica un estado catabólico. Esta circunstancia, en algunos estudios, se ha vinculado con una capacidad inferior para realizar el ejercicio. Este hallazgo se ha encontrado al inicio del entrenamiento, modificándose una vez entrenado el individuo (Häkkinen *et al.*, 1987; Hoogeveen y Zonderland, 1996). Por otro lado, un descenso superior al 30% en el cociente a lo largo de una temporada de competición puede indicar un inicio de sobreentrenamiento (Maso *et al.*, 2004).

En medicina deportiva humana, está claro que las variaciones en el equilibrio hidroelectrolítico afectan significativamente a los dos grupos de hormonas descritos en los párrafos anteriores (eje REN-ANG-ALD) y T, C y cociente T/C. En cuanto al caballo,

se ha estudiado el eje REN-ANG-ALD en caballos con grados de deshidratación variados, que habían competido en pruebas de resistencia de 1 y 2 días de duración (Muñoz *et al.*, 2010b,c). En estos estudios, se observó que los caballos con una deshidratación más intensa mostraban valores superiores de ANG y ALD, pero no de REN. Sin embargo, en estas investigaciones, todos los caballos estaban euhidratados al inicio del ejercicio.

En la Comunidad Valenciana se celebran competiciones de tiro y arrastre con caballos, reguladas por la '*Federació de Tir i Arrossegament de la Comunitat Valenciana*'. Es un deporte tradicional que consiste en demostrar la fuerza y aguante de los caballos, y que tiene sus raíces en el uso del animal en las labores cotidianas de los trabajos agrícolas. La competición consiste en recorrer una pista de arena de 60 m de longitud, arrastrando un carro cargado de arena. La cantidad de arena en el carro depende del peso del animal. Cada caballo se pesa al inicio de la temporada deportiva y debe mantener su peso con una variación máxima de $\pm 20\%$. Por este motivo, los propietarios restringen el consumo de comida y bebida antes de la competición, para garantizar que el peso queda comprendido dentro del peso al principio de la temporada $\pm 20\%$. Si no es así, el caballo es eliminado de la competición. Esta restricción de agua y comida conlleva a una deshidratación hipertónica (Koupt *et al.*, 2000; Freeman *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2011). Se trata, por tanto, de un modelo natural para evaluar los cambios en las hormonas del eje REN-ANG-ALD, T, C y ratio T/C en caballos que realizan ejercicios de alta intensidad y corta duración. En la literatura se han utilizado otros procedimientos para estudiar el efecto de la deshidratación antes del ejercicio, siendo el más común la administración de diuréticos, tanto en personas (Watson *et al.*, 2005) como en caballos (Butudom *et al.*, 2002; 2004).

Por todo ello, en la presente investigación, se analizarán las modificaciones de las concentraciones de REN, ANG, ALD, marcadores de estado hidroelectrolítico, T, C y ratio T/C en respuesta al ejercicio en dos grupos de caballos que comienzan un ejercicio con dos estados hídricos diferentes: euhidratados y deshidratados.



5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

La presente investigación ha sido realizada para incrementar nuestro conocimiento sobre la actuación del eje REN-ANG-ALD y sobre las modificaciones en las concentraciones circulantes de T, C y ratio T/C en caballos que realizan un ejercicio explosivo de corta duración, inferior a 5 minutos, arrastrando pesos diferentes. Además, se pretende analizar el efecto del estado hídrico antes del ejercicio en la respuesta de estas hormonas. Para ello, se han diferenciado dos grupos de caballos, según iniciaran la competición con euhidratación o con deshidratación hipertónica asociada a una restricción de agua y comida.

Los objetivos particulares fueron los siguientes:

Primer objetivo. Analizar si los caballos con deshidratación hipertónica, en reposo, muestran concentraciones superiores de REN, ANG, ALD y C, inferiores de T y de ratio T/C como corresponde a una activación del eje REN-ANG-ALD y a un estado catabólico.

Segundo objetivo. Evaluar si el peso del caballo y por tanto, el peso de la carga que arrastra condicionan en parte la respuesta neuroendocrina al ejercicio, tanto en animales deshidratados como euhidratados.

Tercer objetivo. Determinar si el ejercicio induce una activación del eje REN-ANG-ALD y un estado catabólico de mayor intensidad en animales deshidratados que en animales euhidratados.

Como HIPÓTESIS DE PARTIDA para este estudio, se presentan las siguientes:

Primera hipótesis: Que los caballos con deshidratación hipertónica mostrarán en reposo, concentraciones de REN, ANG, ALD y C significativamente superiores y concentraciones de T y ratio T/C significativamente inferiores a los de los caballos euhidratados.

Segunda hipótesis: Que los caballos con mayor peso corporal y que arrastran pesos superiores, mostrarán elevaciones mayores de REN, ANG, ALD y C en respuesta al ejercicio.

Tercera hipótesis. Que los caballos con deshidratación hipertónica experimentarán incrementos más intensos de REN, ANG, ALD y C en respuesta al ejercicio en comparación con los caballos con euhidratación.



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. CABALLOS

En la presente investigación se han introducido caballos de tiro que compitieron en diversas pruebas de tiro y arrastre en la Comunidad Valenciana. En el estudio I se estudiaron 64 caballos, machos, tanto enteros como castrados, mientras que en el estudio II se incluyó a 54 animales, ya que al determinar las concentraciones de T, se descartaron los machos castrados. Las características específicas de edad media, peso y carga arrastrada se presentarán en los apartados correspondientes a Material y Métodos para los dos estudios (secciones 8.4.1., 8.4.2, 8.4.3., 8.4.1., 9.4.2. y 9.4.3.)

Además, los animales fueron divididos en dos grupos, en función de su estado hídrico. El grupo deshidratado, DH estuvo formado por aquellos animales que participaron en competiciones federadas por la Federación Hípica de la Comunidad Valenciana. Todos ellos fueron sometidos a una restricción de agua y de comida antes de la competición, para mantener su peso corporal dentro de la variación permitida por la Federación. El segundo grupo, control, CTR estuvo integrado por caballos que realizaron ejercicio en condiciones de euhidratación, es decir, sin restricción de agua y comida.

Las condiciones para la inclusión en este estudio fueron las siguientes: 1) Consentimiento escrito o verbal por parte del propietario o representante del caballo para participar en la investigación; 2) Tener un estado general de salud correcto; 3) Participar de forma habitual en competiciones de tiro y arrastre; 4) Realizar la prueba de forma individual (no se han introducido competidores en grupos de 2 ó 3 caballos tirando de un mismo carro).

6.2. COMPETICIONES DE TIRO Y ARRASTRE (GRUPO DH)

Los caballos del grupo DH participaron en competiciones de tiro y arrastre, realizadas en diversos pueblos de la Comunidad Valenciana, concretamente en Castelló, Borbotó, Cullera y Algemesí. Esta competición consiste en cubrir una distancia de 60 m, llevados de la cuerda por el dueño o competidor, en una pista de arena de playa dura, con

una altura de 1 m y una anchura de 3 m. A lo largo de los 60 m de longitud de la pista, se colocan tres señalizaciones, de modo que la pista queda dividida en 4 trayectos de 15 m cada uno. El inicio de la pista presenta una inclinación ascendente, para dificultar la llegada a la primera señalización. El final de la pista muestra, igualmente, una segunda pendiente, en este caso descendente, para facilitar la salida del animal (Fotografía 1).



Fotografía 1. Se muestra un caballo participante en una competición de tiro y arrastre (categoría III de peso)

Para considerar superada la prueba, en cada señalización, se debe hacer una parada obligatoria, por lo que cada caballo efectuó 3 paradas obligatorias en su recorrido de la pista. El reglamento no establece el tiempo máximo y mínimo de parada, por lo que fue determinado por el conductor del animal. No obstante, el tiempo máximo de cada caballería (binomio: caballo + ayudante) para recorrer los 60 m de la pista es de 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, el caballo queda eliminado de la competición.

Durante las competiciones, se procedió al registro del tiempo de ejercicio, considerado desde que el animal inició el ejercicio, en la subida a la pista hasta que concluyó el mismo. En dicho tiempo de ejercicio, quedaron incluidos los periodos de parada obligatoria.

Además, en función del peso corporal, los caballos se dividieron en tres categorías: categoría I (peso inferior o igual a 350 Kg), II (peso comprendido entre 351 y 450 Kg) y III (peso superior o igual a 451 Kg). Cada caballo arrastró un carro tradicional, cargado con sacos de arena, con un peso de 2 (categoría I), 2,25 (categoría II) o 2,5 (categoría III) veces su peso corporal. La carga de la prueba se prepara mediante sacos llenos de arena,

que llevan grabado el peso correspondiente de 5, 10, 25, 50 ó 100 Kg. El registro de peso de las caballerías se realiza al inicio de la temporada deportiva. Durante todo el tiempo de competiciones, se acepta que el animal no modifica su peso, considerándose válida una variación inferior al $\pm 20\%$. Al concluir cada prueba, se procede al pesaje del caballo, quedando certificado su peso. Si el animal supera el 20% de variación del peso del inicio de la temporada, es descalificado.

Se considera animal ganador el que invierte un menor tiempo en recorrer los 60 m o bien, el que cubra una distancia mayor, en aquellos casos en los que ningún caballo sea capaz de completar la distancia. Los caballos pueden competir de forma individual, o en agrupaciones de 2 ó 3 caballerías. En esta Tesis, solo hemos incluido los caballos que participaron individualmente, como se ha especificado en el epígrafe 6.1.

6.3. EJERCICIO EN EL GRUPO CONTROL (GRUPO CTR)

Los caballos del grupo CTR realizaron un ejercicio similar (competición simulada) al del grupo DH, en una pista de competición y siguiendo las mismas normas. De igual modo, se controló el tiempo de ejercicio. Este segundo grupo se estudió para evaluar las diferencias entre los caballos con deshidratación hipertónica (grupo DH) y con un estado de euhidratación (CTR). Por tanto, los animales incluidos en el grupo CTR no fueron sometidos a privación de agua o comida.

La comida de estos animales consistió en una fuente de concentrado comercial y heno, en cantidades variables según el propietario y el peso corporal. El ejercicio se efectuó, al menos, 3 h después de comer. El agua fue proporcionada “ad libitum”.

6.4. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS

Tanto para los caballos DH como CTR, y en los dos estudios, se procedió a la extracción de sangre de la vena yugular externa en los siguientes tiempos: en reposo (R,

condiciones basales, previamente al ejercicio), dentro de los 30 s iniciales tras concluir la actividad física (E) y a los 5, 10, 15 y 30 minutos de recuperación (5REC, 10REC, 15REC y 30REC).

En cada uno de estos tiempos, se obtuvo un volumen total de 10 ml de sangre venosa, la cual fue dividida en tres fracciones. La primera de ellas fue introducida en tubos con EDTA-3K¹ como anticoagulante y se usó para la determinación del valor microhematócrito (HTO). La segunda fracción se introdujo en tubos con heparina-litio y se usó para el análisis de los diversos parámetros bioquímicos que posteriormente se indicarán. Finalmente, la tercera fracción se dispuso en tubos sin anticoagulante, con promotores de la coagulación² para la obtención del suero, donde se midieron las concentraciones hormonales.

Inmediatamente tras la extracción de la sangre, se repartió la muestra entre los tres tubos, como EDTA, heparina-Li y sin anticoagulante. De la muestra con EDTA, se llenó un tubo capilar y se procedió in situ a la determinación del HTO, mediante una centrífuga de microhematócrito³. Los tubos con heparina-Li y sin anticoagulante fueron centrifugados a 3000 r.p.m. durante 10 minutos⁴. La centrifugación se realizó dentro de los 5 y 30 min de introducir la sangre en los tubos con heparina-Li y sin anticoagulante de forma respectiva. El plasma heparinizado y el suero fueron transvasados y permanecieron congelados a -20°C hasta su análisis, realizado dentro de los 2 meses posteriores. Las muestras de suero fueron enviadas en nieve carbónica al laboratorio para el análisis hormonal.

¹Tubos Tapval®, Barcelona, España

²Tubos Tapval®, Barcelona, España

³Centrífuga de microhematócrito, Orto-Alresa®, modelo Biocen, España

⁴Centrífuga Selecta®, modelo Centronic, España

6.5. PARÁMETROS LABORATORIALES

En este estudio, se han determinado los siguientes parámetros:

Estudio I: Valor microhematócrito (HTO, %), concentraciones plasmáticas de sodio (Na, mmol/l), potasio (K, mmol/l), cloro (Cl, mmol/l), albúmina (ALB, g/dl) y lactato (LA, mmol/l), y concentraciones séricas de renina (REN (pg/ml), angiotensina II (ANG, ng/ml) y aldosterona (ALD, pg/ml).

Estudio II: Concentraciones séricas de albúmina (ALB, g/dl) testosterona (T, pg/ml), cortisol (C, ng/ml), ratio T/C.

Las técnicas laboratoriales utilizadas para determinar estos parámetros se presentan en los apartados 8.4.5. (estudio I) y 9.4.5. (estudio II).

6.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, DS. La normalidad de las variables analizadas se comprobó mediante un test de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de la varianza con un test de Levene. A continuación se realizó un test multivariante, considerando tres factores: grupo de caballos (DH y CTR), categoría de peso (I, II y III) y tiempo de toma de muestras (R, E, 5REC, 10REC, 15REC y 30REC).

Las diferencias entre las tres categorías de peso (I, II y III) dentro de cada grupo (DH y CTR), así como las diferencias entre grupos para cada categoría de peso se evaluaron mediante un análisis ANOVA para muestras independientes. El efecto del tiempo de toma de muestra se analizó mediante un test ANOVA para muestras repetidas. Seguidamente, se llevó a cabo un test de comparación de medias (*post-hoc comparison of means*) para determinar entre qué tiempos de toma de muestra existían diferencias. Finalmente, se efectuó un análisis de correlación entre las diversas variables analizadas, mediante una correlación lineal (*Pearson product-moment correlation*).

El nivel de significación se estableció a nivel de $p < 0,05$. El estudio estadístico se realizó con un programa estadístico⁵.

⁵ *Statistica for Windows, v. 10.0, Statsoft®, USA*



7. BIBLIOGRAFÍA

- BANFI G, DOLCI A (2006). Free testosterone/ cortisol ratio in soccer: usefulness of a categorization of values. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 46(4), 611-616.
- BARDIS CN, KAVOURAS SA, ARNOUTIS G, PANAGIOTAKOS DB, SIDOSSIS LS (2013). Mild dehydration and cycling performance during 5-kilometer hill climbing. *J. Athl. Train.* 48(6), 741-747.
- BENTON D, BRAUN H, COBO JC, EDMONDS C, ELMODFA I, EL-SHARKWAY A, FEEHALLY J, GELLERT R, HOLDSWORTH J, KAPSOKEFALOU M, KENNEY WL, LEPIER JP, MacDONALD IA, MAFFEIS C, MAUGHAN RJ, SHIRREFFS SM, TOTHHEYN P, WATSON P (2015). Executive summary and conclusions from the European hydration Institute expert conference on human hydration, health and performance. *Nutr. Rev.* 73 (Suppl. 2), 148-150.
- BUTUDOM P, BARNES DJ, DAVIS MW, NIELSEN BD, EBERHART SW, SCHOTT HC 2nd (2004). Rehydration fluid temperature affects voluntary drinking in horses dehydrated by furosemide administration and endurance exercise. *Vet. J.* 167(2), 72-80.
- BUTUDOM P, SCHOTT HC II, DAVIS MW, KOBE CA, NIELSEN BD, EBERHART SW (2002). Drinking salt water enhances rehydration in horses dehydrated by frusemide administration and endurance exercise. *Equine Vet. J.* 34(S34), 513-518.
- BYRNE C, LIM CL, CHEW SA, MING ET (2005). Water versus carbohydrate-electrolyte fluid replacement during loaded marching under heat stress. *Mil. Med.* 170(8), 715-721.
- CAYADO P, MUÑOZ-ESCASSI B, DOMÍNGUEZ C, MANLEY W, OLABARRI B, SÁNCHEZ DE LA MUELA N, CASTEJÓN F, MARAÑÓN G, VARA E (2006). Hormone response to training and competition in athletic horses. *Equine Vet. J.* 36, 274-278.
- CHEUNG SS, McGARR CW, MALLETT MM, WALLACE PJ, WATSON CL, KIM IM, GREENWAY MJ (2015). Separate and combined effects of dehydration and thirst sensation on exercise performance in the heat. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 25(Suppl. 1), 104-111.
- CLARKE LL, ROBERTS MC, GRUBB BR, ARGENZIO RA (1992). Short-term effect of aldosterone on Na-Cl transport across equine colon. *Am. J. Physiol.* 262

(Regulatory Integrative Comp. Physiol. 31), pp. 939-946.

CRAVANA C, MEDICA P, PRESTOPINO M, FAZIO E, FERLAZZO A (2010). Effects of competitive and noncompetitive show jumping on total and free iodothyronines, β -endorphin, ACTH and cortisol levels in horses. *Equine Vet. J.* 38, 179-184.

DEBIGARÉ R, MARQUIS K, COTÉ CM, TREMBLAY RR, MICHAUD A, LeBLANC P, MALTAIS F (2003). Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 124(1), 83-89.

DECLOEDT A, BAILLY-CHOURIBERRY L, VANDEN BUSSCHE J, GARCIA P, POPOT MA, BONNAIRE Y, VANHAECKE L (2015). A validated UHPLC-MS/MS method to quantify low levels of anabolic-androgenic steroids naturally present in urine of untreated horses. *Anal. Bioanal. Chem.* 407(15), 4385-4396.

DESMECHT D, LINDEN A, AMORY H, ART T, LEKEUX P (1996). Relationship of plasma lactate production to cortisol release following completion of different types of sporting events in horses. *Vet. Res. Commun.* 20(4), 371-379.

DOAN BK, NEWTON RV, KRAEMER WJ, KWON Y-H, SCHEET TP (2007). Salivary cortisol, testosterone, and T/C ratio responses during a 36-hole golf competition. *Int. J. Sports Med.* 28, 470-479.

DÜSTERDIECK KF, SCHOTT HC 2nd, EBERHART SW, WOODY KA, COENEN M (1999). Electrolyte and glycerol supplementation improve water intake by horses performing a simulated 60 km endurance ride. *Equine Vet. J.* 30, 418-424.

ELLOUMI M, MASO F, MICHAUX O, ROBERT A, LAC G (2003). Behaviour of saliva cortisol (C), testosterone (T) and T/C ratio during a rugby match and during the post-competition recovery days. *Eur. J. Appl. Physiol.* 90, 23-28.

FREEMAN DA, HINCHCLIFF KW, SCHOTT HC 2nd (2001). Effect of water restriction on equine behaviour and physiology. *Equine Vet. J.* 33(1), 97-98.

FRY AC, LOHNES CA (2010). Acute testosterone and cortisol responses to high power resistance exercise. *Fiziol. Cheloveka* 36(4), 102-106.

GAVIGLIO CH, OSBORNE M, KELLY VG, KILDUFF LP, COOK CJ (2015). Salivary testosterone and cortisol response to four different rugby training exercise protocols. *Eur. J. Sports Sci.* 15(6), 497-504.

- GOLLAND LC, EVANS DL, STONE GM, TYLER-McGOWAN CM, HODGSON DR, ROSE RJ (1999). Maximal exercise transiently disrupts hormonal secretory pattern in Standardbred geldings. *Equine Vet. J.* 30, 581-585.
- GONZÁLEZ-ALONSO J, TELLER C, ANDERSEN SL, JENSEN FB, HYLDIG T, NIELSEN B (1999). Influence of body temperature on the development of fatigue during prolonged exercise in the heat. *J. Appl. Physiol.* 86(3), 1032-1039.
- GORDON ME, McKEEVER KH, BETROS CL, MANSO FILHO HC (2007). Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin and cortisol in horses. *Vet. J.* 173(3), 532-540.
- HÄKKINEN K, PAKARINEN A, ALEN M, KAUKANEN H, KOMI PV (1987). Relationship between training volume, physical performance capacity, and serum hormone concentrations during prolonged training in elite weight lifters. *Int. J. Sports Med.* 8(Suppl. 1), 61-65.
- HAYES LD, GRACE FM, BAKER JS, SCULTHORPE N (2015). Exercise-induced responses in salivary testosterone, cortisol and their ratios in men: a meta-analysis. *Sports Med.* 45(5), 713-726.
- HOOGEVEEN AP, ZONDERLAND ML (1996). Relationship between testosterone, cortisol and performance in professional cyclists. *Int. J. Sports Med.* 17(6), 423-428.
- JANCZAREK I, BEREZNOWSKI A, STIZELEC K (2013). The influence of selected factors and sport results of endurance horses on their saliva cortisol concentrations. *Pol. J. Vet. Sci.* 16(3), 533-541.
- JENSEN-WAERN M, LINDBERG A, JOHANNISSON A, GRÖNDAHL G, LINDGREN JA, ESSÉN-GUSTAVSSON B (1999). The effects of an endurance ride on metabolism and neutrophils function. *Equine Vet. J.* 30, 605-609.
- JEUKENDRUP AE, JENTJENS RL, MOSELEY L (2005). Nutritional considerations in triathlon. *Sports Med.* 25(2), 163-181.
- JUDELSON DA, MARESH CM, YAMAMOTO LM, FARRELL MJ, ARMSTRONG LE, KRAEMER WJ, VOLEK JS, SPIERING BA, CASA DJ, ANDERSON JM (2008). Effect of hydration state on resistance exercise-induced endocrine markers of anabolism, catabolism and metabolism. *J. Appl. Physiol.* 105, 816-824.

KNYCH HK, ARTHUR RM, STANELY SD, McKERNIE DS (2015). Dehydroepiandrosterone (DHEA) following administration as part of a nutritional supplement to exercised horses. *Drug. Test Anal.* 7(1), 39-47.

KOUPK KA, EGGLESTROM A, KUNKLE K, HOUPK TR (2000). Effect of water restriction on equine behavior and physiology. *Equine Vet. J.* 32(4), 341-344.

KRAFT JA, GREEN JM, BISHOP PA, RICHARDSON MT, NEGGERS YH, LEEPER JD (2012). The influence of hydration on anaerobic performance: a review. *Res. Q Exerc. Sport* 83(2), 282-292.

LAC G, BERTHON P (2000). Changes in cortisol and testosterone levels and T/C ratio during an endurance competition and recovery. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 40(2), 139-144.

LELEU C, HAENTJENS F (2010). Morphological, haemato-biochemical and endocrine changes in young Standardbreds and maladaptation to early training. *Equine Vet. J.* 42(38), 171-178.

LI CY, HSU GS, SUZUKI K, KO MH, FANG SH (2015). Salivary immune factors, cortisol and testosterone responses in athletes of a competitive 5,000 m race. *Chin. J. Physiol.* 58(4), 263-269.

MANOHAR M, GOETZ TE, HASSAN AS (2005). Acute hypervolemia does not improve arterial oxygenation in maximally exercising thoroughbred horses. *Eur. J. Appl. Physiol.* 93(4), 480-488.

MARC M, PARVIZI N, ELLENDORFF F, KALLWEIT E, ELSAESSER F (2000). Plasma cortisol and ACTH concentrations in the warmblood horse in response to a standardized treadmill exercise tests as physiological markers for evaluation of training status. *J. Animal Sci.* 78(7), 1936-1946.

MARESH CM, WHITTLESEY MJ, ARMSTRONG LE, YAMAMOTO LH, JUDELSON DA, FISH KE, CASA DJ, KAVOURAS SA, CASTRACANE VD (2006). Effect of hydration state on testosterone and cortisol responses to training-intensity exercise in collegiate runners. *Int. J. Sports Med.* 27, 765-770.

MASO F, LAC G, FILAIRE E, MICHAUX O, ROBERT A (2004). Salivary testosterone and cortisol in rugby players: correlation with psychological overtraining items. *Br. J. Sport Med.* 38, 260-263.

MCKEEVER KH, HINCHCLIFF KW, SCHMALL LM, MUIR WW 3RD (1992). Changes in plasma renin activity, aldosterone, and vasopressin during

incremental exercise in horses. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1290-1293.

MCKEEVER KH, HINCHCLIFF KW, SCHMALL LM, REED SM, LAMB DR, MUIR WW 3RD (1991). Tubular renal function in horses during submaximal exercise. *Am. J. Physiol.* 261, R553-R560.

McLELLAN C, LOVELL D, GASS GC (2010). Creatine kinase and endocrine responses of elite players pre, during and post rugby league match play. *J. Strength Cond. Res.* 24(1), 2908-2919.

MERSON SJ, MAUGHAN RJ, SHIRREFFS SM (2008). Rehydration with drinks differing from moderate exercise-induced hypohydration in man. *Eur. J. Appl. Physiol.* 103(5), 585-594.

MONTAIN SJ, SMITH SA, MATTOT RP, ZIENTARA GP, JOLESZ FA, SAWKA MN (1998). Hypohydration effects on skeletal muscle performance and metabolism: a ³¹P-MRS study. *J. Appl. Physiol.* 84(6), 1889-1894.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN FM (2010a). Clinical applications of the renin-angiotensin-aldosterone-vasopressin axis in the horse and future directions for research. *J. Equine Vet. Sci.* 30(11), 607-616.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN FM (2010b). Muscle damage, hydration, electrolyte balance and vasopressin concentrations in successful and exhausted endurance horses. *Polish J. Vet. Sci.* 13(2), 373-379.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN FM, LUCAS RG, PALACIO J (2011). The effects of hypertonic dehydration changes on renal function and arginine vasopressin in the horse during pulling exercises. *Vet. J.* 189, 83-88.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN-RIBER C, CASTEJÓN FM (2010c). Dehydration, electrolyte imbalances and renin-angiotensin-aldosterone-vasopressin axis in successful and unsuccessful endurance horses. *Equine Vet. J.* 38, 83-90.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, REQUENA F, CASTEJÓN-RIBER C, CASTEJÓN FM (2007). Concentraciones séricas de aldosterona en caballos con diferente rendimiento deportivo. *Rec. Vet.* II(8), 1-11.

NAGATA S, TAKEDA F, FUROSAWA M, MIMA K, HIRAGA A, KAI M, TAYA K (1999). Plasma adrenocorticotropin, cortisol and catecholamines response to various exercises. *Equine Vet. J.* 30, 570-574.

RACINAIS S, ALONSO JM, COUTTS AJ, FLOURIS AD, GIRARD O, GONZALEZ-ALONSO J, HAUSSWIRTH C, JAY O, LEE JK, MITCHELL N, NASSIS GP, NYBO L, PLUIM BM, ROELANDS B, SAWKA MN, WINGO J, PERIARD JD (2015). Consensus recommendations on training and competing in the heat. *Br. J. Sports Med.* 29(18), 1164-1173.

SAWKA MN, MOUNTAIN SJ, LATZKA W (2001). Hydration effects on thermoregulation and performance in the heat. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 128(4), 679-690.

SCHOTT HC 2nd, McGLADE SK, MOLANDER HA, LEROUX AJ, HINES MT (1997). Body weight, fluid, electrolyte, and hormonal changes in horses competing in 50- and 100-mile endurance rides. *Am. J. Vet. Res.* 58(3), 303-309.

SNOW DH, ROSE RJ (1981). Hormonal changes associated with long distance exercise. *Equine Vet. J.* 13(3), 195-197.

SOMA LR, UBOTH CE, GUAN F, MCDONNELL S (2008). Plasma concentrations of testosterone and 19-nortestosterone (nandrolone) in the nonracing intact male horse by liquid chromatography-mass spectrophotometry. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 31, 587-590.

SOMA LR, UBOTH CE, YOU Y, MCDONELL S (2012). Plasma concentrations of testosterone and nandrolone in racing and nonracing intact male horses. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1218(26), 3982-3993.

TENNENT-BROWN BS, GOETZ TE, MANOHAR M, HASSAN AS, FREEMAN DE, BUNDY JS, EVANS MR (2006). Hyperhydration prior to a simulated second day of the 3-day moderate intensity equestrian competition does not cause arterial hypoxemia in thoroughbred horses. *Eur. J. Appl. Physiol.* 97(4), 462-470.

TOFÉ E, MUÑOZ A, CASTEJÓN F, TRIGO P, CASTEJÓN-RIBER C, GÓMEZ-DÍEZ M, RIBER C (2013). Behaviour of the renin angiotensin aldosterone axis during exercise in euhydrated and dehydrated horses. *Res. Vet. Sci.* 95, 615-622.

URHAUSEN A, GABRIEL H, KINDERMANN W (1995). Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med.* 20(4), 251-256.

WATSON G, JUDELSON DA, ARMSTRONG LE, YEARGIN SW, CASA DJ, MARESH CM (2005). Diuretic-induced dehydration on competitive sprint and power performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37(7), 1168-1174.



8. ESTUDIO I.

**Concentraciones séricas de renina,
angiotensina y aldosterona en caballos
euhidratados y deshidratados durante
un ejercicio de tiro y arrastre**

8.1. INTRODUCCIÓN

El eje renina-angiotensina-aldosterona-vasopresina (REN-ANG-ALD-AVP) desempeña un papel esencial en la regulación aguda y crónica de la presión sanguínea, de la volemia y del equilibrio hidroelectrolítico, fundamentalmente de la natremia y de la cloremia (McKeever y Hinchcliff, 1995; McKeever, 1998; 2002; Muñoz *et al.*, 2010a,b,c; 2011; 2016; Tofé *et al.*, 2013). Los cambios en las concentraciones séricas de electrolitos o en el flujo sanguíneo (presión y/o volumen) desencadenan la producción de REN por parte de las células del aparato yuxtaglomerular renal. La REN actúa sobre el angiotensinógeno, que es convertido hacia angiotensina I y posteriormente hacia ANG. Este compuesto promueve la liberación de ALD en la glándula adrenal. La ALD actúa en la conservación de Na en el espacio extracelular y aumenta la reabsorción de Na y Cl desde el colon (McKeever *et al.*, 1991; 1992; Clarke *et al.*, 1992; Schott *et al.*, 1997; McKeever, 2002; Muñoz *et al.*, 2007). Además, la ANG, ALD y AVP dan lugar a vasoconstricción y por tanto, elevan la presión sanguínea (McKeever *et al.*, 1991; 1992; McKeever, 1998; Muñoz *et al.*, 2011).

El papel de estas hormonas durante el ejercicio se ha estudiado en caballos durante diversos tipos de esfuerzo. McKeever *et al.* (1991) observaron incrementos significativos de REN, ALD y AVP durante un ejercicio submáximo constante de 1 h de duración en cinta rodante. Igualmente, McKeever *et al.* (1992) describieron aumentos de REN, ALD y AVP durante un ejercicio de intensidad incremental. Más recientemente, se ha analizado la respuesta de estas hormonas durante una competición de resistencia en caballos (Muñoz *et al.*, 2010a,b). En conocimiento de los autores, existe un único estudio realizado en caballos de tiro, que analiza el efecto de la AVP sobre la regulación hidroelectrolítica (Muñoz *et al.*, 2011).

El caballo de tiro realiza un ejercicio de corta duración, inferior a 5 minutos, pero de gran intensidad. Estos animales arrastran varias veces su peso corporal (según su categoría de peso) en un carro cargado de sacos de arena, cubriendo una distancia de 60 m y haciendo 3 pausas obligatorias. Lo más interesante, es que los animales son pesados

al inicio de la temporada, y durante ésta, su peso corporal debe variar un porcentaje inferior al 20%, para que el animal no sea descalificado de la competición. Esta condición impuesta por el Reglamento de Tiro y Arrastre de la Comunidad Valenciana, lleva a la práctica de restringir el acceso al agua y a la comida durante más de 24 h, en un intento de reducir el peso corporal. A esta circunstancia, hay que unir que el caballo es transportado hacia el lugar de competición, a veces con temperaturas ambientales y humedades relativas elevadas. Por ello, es muy probable que estos animales posean unas alteraciones importantes en su equilibrio interno, concretamente en su estado hidroelectrolítico, que teóricamente deben conllevar a una activación del eje REN-ANG-ALD. De hecho, Muñoz *et al.* (2011) confirmaron que estos caballos poseían concentraciones elevadas de AVP en reposo. Sin embargo, el aumento de AVP derivado del ejercicio de tiro no fue más elevado en estos animales, con deshidratación hipertónica, por restricción de agua y comida, que en animales con un estado de euhidratación.

En este estudio, se analizarán los cambios en las concentraciones de REN, ANG y ALD en relación al estado hidroelectrolítico en caballos de tiro con deshidratación hipertónica (por restricción del consumo de agua y comida) en comparación con caballos euhidratados. El estudio de este modelo “natural” de deshidratación puede proporcionar datos muy interesantes sobre la regulación neuroendocrina por parte del eje REN-ANG-ALD-AVP en caballos durante el ejercicio.

8.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

En este estudio, se analizarán los cambios de las concentraciones de REN, ANG y ALD en caballos de tiro con dos estados hidroelectrolíticos diferentes (con deshidratación hipertónica vs euhidratación). El OBJETIVO fundamental es proporcionar información sobre la actuación del eje REN-ANG-ALD en caballos que inician el ejercicio con estados hídricos diferentes. Además, los caballos se han clasificado en tres categorías, según su peso corporal, los cuales arrastraron 2, 2,25 y 2,5 veces su peso en un carruaje.

Como objetivos puntuales, se persiguen los siguientes:

Primer objetivo. Evaluar si los caballos con deshidratación hipertónica poseen, en reposo, concentraciones de REN, ANG y ALD superiores a los caballos con euhidratación.

Segundo objetivo. Describir los cambios en las concentraciones séricas de REN, ANG y ALD en relación a la intensidad de ejercicio y estado hidroelectrolítico en caballos con diferentes pesos corporales y que arrastraron cargas diversas.

Tercer objetivo. Determinar si el estado hidroelectrolítico modifica la respuesta de las hormonas REN, ANG y ALD al ejercicio, de modo que los caballos deshidratados mostrarán un incremento superior tras el ejercicio y durante la recuperación en comparación con los caballos euhidratados.

Como HIPÓTESIS DE PARTIDA para este capítulo, proponemos las siguientes:

Primera hipótesis: Que los caballos con deshidratación hipertónica mostrarán concentraciones basales de REN, ANG y ALD significativamente superiores a los de los caballos euhidratados.

Segunda hipótesis. Que los caballos con mayor peso corporal y que arrastran pesos superiores, mostrarán elevaciones mayores de REN, ANG y ALD y alteraciones hidroelectrolíticas más evidentes en respuesta al ejercicio.

Tercera hipótesis. Que los caballos con deshidratación hipertónica experimentarán incrementos más intensos de REN, ANG y ALD en respuesta al ejercicio en comparación con los caballos con euhidratación.

8.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

8.3.1. GENERALIDADES SOBRE EL EJE RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

La renina (REN) es una enzima proteolítica, sintetizada y almacenada en las células del aparato yuxtaglomerular renal. Estas células actúan como sensores de las modificaciones del flujo y presión sanguíneas, de las concentraciones sanguíneas de Na y Cl y de la presión arterial de oxígeno, PaO₂ (McKeever, 1998; Muñoz *et al.*, 2010a). La liberación de REN activa un sistema en cascada, en el cual la REN actúa sobre el angiotensinógeno para formar angiotensina I, convertida posteriormente en angiotensina II (ANG) mediante la intervención de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA o ACE, *angiotensin-converting enzyme*) (Gómez-Díez *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2010a; 2016). La ECA se localiza en la mayoría de los tejidos, presentando además, una fracción libre, circulante en sangre, si bien su actividad en los pulmones es especialmente elevada (Sisson, 2004; Otte y Spier, 2009; Muñoz *et al.*, 2010; 2016; Gómez-Díez *et al.*, 2014).

Los principales estímulos implicados en la liberación de REN incluyen un incremento en la actividad β 1-adrenérgica, una reducción en la perfusión renal y/o una menor absorción renal de Na por los túbulos renales (McKeever, 1998; 2002; McKeever y Gordon, 2004).

La ANG media la mayoría de los efectos sistémicos del eje REN-ANG-ALD mediante la activación de dos subtipos de receptores. Los receptores AT1 se sitúan en vasos sanguíneos, riñón, glándula adrenal, hígado, corazón y cerebro (Sisson, 2004). Los receptores AT2 son muy abundantes durante la vida fetal en el cerebro, riñón y otras localizaciones, si bien sus niveles decrecen durante el periodo post-natal (Wintour *et al.*, 1999; Verdonk *et al.*, 2012). No obstante, existen evidencias que indican que, a pesar de su reducida expresión en adultos, la estimulación de los receptores AT2 da lugar a vasodilatación y además, se estimulan acciones antiproliferativas y apoptóticas en la musculatura lisa de los vasos sanguíneos. Por ello, podrían actuar inhibiendo el

crecimiento y la remodelación miocárdica (Wintour *et al.*, 1999; Atlas, 2007; Segervård *et al.*, 2015). Sin embargo, las acciones fisiológicas más importantes de la ANG están mediadas por los receptores AT1.

La ANG es un potente vasoconstrictor y estas acciones presoras se producen de forma directa, a través de la estimulación del sistema nervioso simpático (central o periférico) y/o por la inhibición del control parasimpático (Lumbers, 1999; Hasser *et al.*, 2000). La ANG también estimula la reabsorción de Na a nivel renal, al actuar sobre las membranas basolateral y luminal de los túbulos proximales, el túbulo ascendente y los túbulos colectores corticales (Atlas, 2007; Otte y Spier, 2009; Sparks *et al.*, 2015).

Uno de los efectos de la ANG es la regulación de la liberación de ALD, mediante la activación de los receptores AT1 de la zona glomerulosa adrenal. Se ha demostrado que la depleción de Na regula de forma positiva los receptores para ANG, mientras que el exceso de Na reduce los receptores en la zona glomerulosa (Atlas, 2007; Bollag, 2014). En consecuencia, el equilibrio hidroelectrolítico se regula de este modo y la presión vascular se mantiene mediante la acción conjunta de ANG y ALD (Sisson, 2004). Adicionalmente, y en respuesta a un descenso del volumen plasmático, la ANG, junto con el sistema nervioso simpático, da lugar a la liberación de arginina vasopresina (AVP).

Otra acción de la ANG es su capacidad mitógena, que conduce a la producción y liberación de citocinas y factores de crecimiento. La producción del factor de crecimiento transformador β (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor nuclear $\kappa\beta$ conlleva a inflamación, formación de fibroblastos y deposición de colágeno (Bouzeghrane y Thibault, 2002; Brewster *et al.*, 2003; Takayanagi *et al.*, 2015).

La ALD es un mineralocorticoide liberado por la zona glomerulosa adrenal, que posee funciones similares a la ANG. La ALD promueve la homeostasis del K, la activación y agregación plaquetaria, da lugar a vasoconstricción, estimula la sed, incrementa la reabsorción de Na y está implicada en la fibrosis y remodelación vascular (McKeever *et al.*, 1991; 1992). La ALD se une a los receptores de los conductos colectores corticales de la nefrona, favoreciendo la reabsorción de Na y agua y la

excreción de K. Además, la ALD favorece la reabsorción de Na en las glándulas salivales, glándulas sudoríparas y colon, dando lugar a una expansión del volumen intravascular (Lumbers, 1999; Jansson *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2010a; Brown, 2013). De forma similar a la ANG, la ALD también presenta acciones mitogénicas y profibróticas, incrementando la expresión y la producción de TGF- β , y originando fibrosis e inflamación (Huang *et al.*, 2012; Brown, 2013; Gómez-Díez *et al.*, 2014). Tanto la ANG como la ALD están implicadas en la coagulación sanguínea, a través de la potenciación de la producción de plaquetas, aumentando la actividad del inhibidor-activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y promoviendo la agregación y activación de las plaquetas (Weber, 2001; Mogielnicki *et al.*, 2014).

Los principales inhibidores de la liberación de ALD son la hipocalemia, la liberación del péptido atrial natriurético (PAN) y la dopamina, mientras que las concentraciones plasmáticas de Na parecen no tener un efecto directo claro sobre la ALD, al menos en caballos en ejercicio, si bien estos datos derivan de solo 2 artículos (McKeever *et al.*, 1991; 1992). La dopamina posee un efecto inhibitor directo sobre la ALD, al reducir la respuesta adrenal a la administración exógena de ANG. Por otro lado, el PAN, producido por los miocitos atriales, en respuesta a una dilatación auricular y a la taquicardia, inhibe la secreción de REN y bloquea la acción de la ANG sobre la secreción de ALD (Lumbers, 1999; Porzionato *et al.*, 2010).

La AVP, también conocida como hormona antidiurética o ADH, se sintetiza en el interior de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo y se almacena en el lóbulo caudal de la hipófisis, para su posterior liberación hacia el torrente sanguíneo (McKeever, 1998; 2002; Mutlu y Factor, 2004; Muñoz *et al.*, 2010a,b; 2011). Sus acciones principales son: la reabsorción de agua en los túbulos colectores renales y la vasoconstricción del músculo vascular liso. Además, posee efectos inotrópicos positivos leves sobre el corazón (McKeever, 1998; Mutlu y Factor, 2004; Sisson, 2004; Wong *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2010a,b; 2011).

8.3.2. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE RENINA, ANGIOTENSINA Y ALDOSTERONA EN RESPUESTA ADIFERENTES TIPOS DE EJERCICIO EN EL CABALLO

8.3.2.1. CONCENTRACIÓN-ACTIVIDAD RENINA EN CABALLOS EN EJERCICIO

Como se ha citado con anterioridad, la REN es una hormona producida por el aparato yuxtaglomerular renal en respuesta a diversos estímulos, como por ejemplo, la hipoxia captada por las células situadas en la vasculatura de la matriz renal (Zambraski *et al.*, 1984; Claybaugh *et al.*, 1986). Se trata de la sustancia activadora de la cascada REN-ANG-ALD, con un potencial importante de alterar la presión sanguínea, volumen y tonicidad (McKeever, 1998; Muñoz *et al.*, 2010a,b).

Durante el ejercicio, la actividad REN se considera una medida indirecta de la tasa de producción de la angiotensina I (Wade *et al.*, 1989; Wade y Freund, 1990; Zambraski, 1990; McKeever *et al.*, 1992). Como se ha indicado antes, la angiotensina I y II son potentes vasoconstrictores, que intervienen en el control de la presión arterial y del flujo sanguíneo durante el ejercicio (Wade *et al.*, 1989; Wade y Freund, 1990; Zambraski, 1990). Inmediatamente tras el ejercicio, la REN actúa de forma directa sobre la función renal y la ANG estimula la sed, alterando el equilibrio hidroelectrolítico post-esfuerzo (Claybaugh *et al.*, 1986; Wade *et al.*, 1989; Wade y Freund, 1990; Convertino, 1991; McKeever *et al.*, 1992).

Los principales estímulos que condicionan el aumento de la actividad REN durante el ejercicio son la estimulación del nervio renal, a través del sistema nervioso simpático, los cambios en el flujo y presión renal asociados a la función yuxtaglomerular y las modificaciones en las concentraciones de Na y Cl en el aparato yuxtaglomerular renal (Zambraski *et al.*, 1984; Wade *et al.*, 1989; Wade y Freund, 1990).

Diversas investigaciones han cuantificado la actividad o la concentración REN en caballos en reposo y tras diferentes tipos de ejercicios (Guthrie *et al.*, 1980; 1982;

McKeever *et al.*, 1991; 1992; Cooley *et al.*, 1994; McKeever, 1998; 2002; Muñoz *et al.*, 2010b,c). Se ha encontrado una correlación lineal entre intensidad (y duración) del ejercicio y el aumento en REN y frecuencia cardiaca (FC) en caballos durante un ejercicio de intensidad progresiva en cinta rodante. Por encima de 9 m/s, la FC y la REN alcanzaron un “plateau” o estado constante, de modo que no experimentaron un incremento adicional al pasar a 10 m/s (McKeever *et al.*, 1992). En investigaciones precedentes, la actividad REN aumentó desde $1,9 \pm 1,0$ ng/ml/h en reposo hasta un máximo de $5,2 \pm 1,0$ ng/ml/h a 9 m/s (McKeever *et al.*, 1992). El estado constante de la FC y de la actividad REN sugiere que el incremento en REN durante este tipo de ejercicio en el caballo resulta del predominio simpático. De hecho, en otras especies, se ha visto una correlación entre la actividad REN y la actividad simpática del nervio renal (Wade y Freund, 1990; Zambraski, 1990).

Durante un ejercicio submáximo de intensidad constante, el principal factor que condiciona un incremento inicial de la actividad REN en el caballo fue, igualmente, el predominio de la actividad simpática (Wade *et al.*, 1989; Wade y Freund, 1990; McKeever *et al.*, 1991). Sin embargo, se apreció una segunda elevación a los 40 min de ejercicio, posiblemente asociada al descenso de la cloremia. La concentración de Na durante este estudio permaneció constante (McKeever *et al.*, 1991).

Más recientemente, se ha analizado la evolución de la concentración de REN durante un ejercicio de resistencia (Muñoz *et al.*, 2010c). Se encontró que las concentraciones de REN no se modificaron de forma significativa, ni en caballos que cubrieron una distancia de 91 km en un día, ni cuando recorrieron 166 km en 2 días, 83 km/día. Quizá la diferencia con los otros estudios es que, en este caso, se midió la concentración REN, mientras que las investigaciones anteriores determinaron la actividad REN. No obstante, se considera que tanto la actividad como la concentración son medios válidos de medir la REN y que se ven influidos por los mismos factores (Sealey y Laragh, 1990; McKeever *et al.*, 1991). Además, Muñoz *et al.* (2010c) documentaron un descenso de la cloremia y de la natremia, sin existir correlaciones significativas con la concentración REN. Una posible hipótesis que justificaría estos resultados es que, los

caballos recibieron suplementación electrolítica muy variada y no estandarizada durante las competiciones (Muñoz *et al.*, 2010).

8.3.2.2. CONCENTRACIÓN DE ANGIOTENSINA EN CABALLOS EN EJERCICIO

Se acepta que, funcionalmente, un incremento en REN durante el ejercicio eleva la concentración de ANG en sangre (Wade *et al.*, 1989; Wade y Freund, 1990; McKeever *et al.*, 1991; 1992; Muñoz *et al.*, 2010c; Williams *et al.*, 2013). Los estudios que han cuantificado la concentración de ANG en respuesta a un ejercicio son escasos en el caballo. Muñoz *et al.* (2010c) midieron la concentración de ANG en caballos de resistencia, encontrando un aumento significativo en respuesta al ejercicio prolongado, posiblemente en respuesta a un estado hídrico comprometido. De hecho, se describieron correlaciones significativas entre la concentración de ANG y diversos marcadores de estado hidroelectrolítico, tales como HTO, proteínas séricas totales, ALB, urea (BUN) y creatinina (CREAT) (Muñoz *et al.*, 2010c). Además, los caballos que fueron eliminados por extenuación, con un estado hidroelectrolítico más comprometido y que en algunos casos, requirieron tratamiento médico, mostraron concentraciones de ANG más elevadas. No obstante, el aumento de ANG en este grupo de animales extenuados no fue tan marcado como el que se observó para otras hormonas, como ALD o AVP (Muñoz *et al.*, 2010c).

8.3.2.3. CONCENTRACIÓN DE ALDOSTERONA EN CABALLOS EN EJERCICIO

La ALD es una hormona esencial en la regulación de la homeostasis electrolítica, particularmente del Na y Cl (Thornton, 1985; Willmore y Costill, 1994; McKeever y Hinchcliff, 1995; McKeever, 1998; 2002). Se conoce que la ALD actúa a nivel renal, promoviendo la reabsorción de Na y Cl y la excreción de K (Willmore y Costill, 1994;

McKeever, 1998; Muñoz *et al.*, 2007; 2010c; Jansson *et al.*, 2010). También interviene en el intestino, más concretamente en el colon, para facilitar la absorción de electrolitos y agua (McKeever y Hinchcliff, 1995; McKeever, 1998; McKeever y Gordon, 2004). La liberación de ALD se ve estimulada por el descenso de la natremia o por el incremento de H, calemia, liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACHT) y/o aumento de REN. No obstante, el estímulo más importante parece ser las variaciones en la calemia (McKeever, 1998; Oöpik *et al.*, 2010).

Varios estudios han intentado elucidar cual/es son los estímulos principales que dan lugar a la liberación de ALD en caballos en ejercicio (Guthrie *et al.*, 1980; 1982; McKeever *et al.*, 1992; Cooley *et al.*, 1994; McKeever, 1998; 2002). Parece ser que, en el caballo, los factores condicionantes del aumento de ALD durante la actividad física son la hipercalemia y el aumento de REN. En el trabajo de McKeever *et al.* (1991), se sometió a los caballos a un ejercicio de intensidad submáxima de 1 h de duración, y se detectó que la elevación de la concentración de ALD era paralela al aumento de REN, si bien la magnitud de los cambios en ambas hormonas fue diferente. La REN se elevó un 66%, mientras que la ALD aumentó un 709%. Estos autores concluyeron que, debían intervenir otros factores, además de la REN en la liberación de ALD. Además, vieron que un aumento de tan solo 0,3 mmol/l de K fue suficiente para inducir una liberación de ALD, independientemente de la intervención de la cascada REN-ANG-ALD, posiblemente a través de la conversión del colesterol en pregnenolona o un eslabón posterior en la cadena de biosíntesis (Sealey y Laragh, 1990). Estos datos son consistentes con los elevados requerimientos homeostáticos del caballo de deporte, animal en el que la alteración electrolítica más importante es la variación en la calemia (Masri *et al.*, 1990; McKeever *et al.*, 1992; Muñoz *et al.*, 2003).

La correlación entre la concentración sérica de ALD y la intensidad de ejercicio se ha descrito en caballos en cinta rodante o *treadmill*, encontrándose un incremento desde 20-50 pg/ml en reposo hasta casi 200 pg/ml, a una velocidad de 10 m/s (McKeever *et al.*, 1992; Kokkonen *et al.*, 2002). Si bien parece existir una relación lineal entre la evolución

de las concentraciones circulantes de ALD y la intensidad de esfuerzo, no se consigue un estado constante o “*plateau*” en las concentraciones de esta hormona.

La ALD también se ha estudiado en caballos de resistencia (Michaux *et al.*, 1987; Schott *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2010c). Michaux *et al.* (1987) describieron un aumento progresivo de ALD hasta alcanzar unos valores aproximados de 200 pg/ml durante un raid de 100 km. Schott *et al.* (1997) hallaron que la concentración de ALD en caballos de raid, sobre distancias de 80 km, mostró una tendencia no significativa hacia valores más elevados en los caballos más veloces (330 ± 91 pg/ml) en comparación con los menos veloces (127 ± 28 pg/ml). A pesar de que esta diferencia no alcanzó la significación estadística, se encontró una correlación positiva entre velocidad y ALD. Además, las elevaciones más intensas se vieron en los caballos con extenuación y flutter o aleteo diafragmático sincrónico. Estos caballos mostraron concentraciones medias de ALD post-esfuerzo de 1050 y 438 pg/ml respectivamente.

Con posterioridad, Martínez *et al.* (2000) asociaron la elevación en la concentración de ALD durante una prueba de 80 Km con la hipercalemia y con una ligera acidosis metabólica, ya que la concentración de Na no experimentó variaciones significativas. Más recientemente, Muñoz *et al.* (2010c) documentaron que no existía una correlación significativa entre las concentraciones de K y ALD en caballos de raid. Se sugirió que, esta circunstancia estaba asociada a que el K es un ión intracelular y su concentración en sangre depende del tiempo transcurrido desde el cese del ejercicio y la extracción de la muestra de sangre, así como de la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en las fibras musculares (Hess *et al.*, 2005; 2006). Según los datos derivados de la investigación de Muñoz *et al.* (2007; 2010c), los principales determinantes de la liberación de ALD en caballos de raid fueron la reducción de la natremia y la activación de la cascada REN-ANG-ALD. Al contrario que lo documentado por Schott *et al.* (1997), Muñoz *et al.* (2010c) no encontraron diferencias significativas en la concentración de ALD entre caballos con una mayor y menor velocidad en competición.

Un hallazgo interesante en algunos estudios que la concentración de ALD persiste elevada durante la noche posterior a la competición (Schott *et al.*, 1997; Muñoz *et*

al.,2010c). Esta circunstancia podría ser beneficiosa, al mejorar la conservación renal de agua y de Na y la reabsorción digestiva de electrolitos, contribuyendo a la expansión de la volemia y a una recuperación más rápida de un estado de euhidratación (Convertino, 1991; Hyypä *et al.*, 1996; Schott *et al.*, 1997; Kokkonen *et al.*, 2002; Nyman *et al.*, 2002).

8.3.3. VARIACIONES ELECTROLÍTICAS DEL CABALLO DURANTE EL EJERCICIO

Los electrolitos Na, K y Cl poseen unas acciones biológicas esenciales, al intervenir en la conducción nerviosa, contracción muscular, regulación del equilibrio hídrico y ácido-básico, mantenimiento de la volemia..., por lo que sus concentraciones plasmáticas suelen estar sometidos a una regulación estricta (Stockham, 1995; Muñoz *et al.*, 2006a,b). Los valores de referencia para équidos son los siguientes: Na, 133-136 mmol/l, K, 3,6-4,5 mmol/l y Cl, 98,4-101 mmol/l (Stockham, 1995; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999; Muñoz *et al.*, 2006b).

8.3.3.1. VARIACIONES DE LA NATREMIA DURANTE EL EJERCICIO EN EL CABALLO

La natremia es un reflejo de las variaciones en el contenido en agua, de modo que una pérdida relativa de agua condiciona hipernatremia y por el contrario, un exceso relativo de agua, una hiponatremia. El Na es el catión extracelular más abundante y es el determinante de la osmolalidad plasmática y del volumen del compartimento extracelular (Stockham, 1995).

Los ejercicios de intensidad elevada o media y de duración corta, como las carreras de velocidad o el concurso de salto, generalmente provocan hipernatremia, derivada de los cambios intercompartimentales de fluidos, sobre todo hipotónicos, por el

aumento de la presión intravascular al inicio del ejercicio y por el déficit relativo de agua (Art *et al.*, 1990; Muñoz *et al.*, 2006a,b). Aunque los caballos de resistencia pueden presentar hipernatremia, lo más habitual es hallar una normonatremia o hiponatremia, según el estado físico del caballo y condiciones de la carrera (velocidad, duración, tipo de suelo, pendientes, condiciones ambientales...). La hiponatremia se debe a la eliminación de sudor, de características hipertónicas en los équidos, con pérdida de este electrolito (Muñoz *et al.*, 2006a,b).

8.3.3.2. VARIACIONES DE LA CALEMIA DURANTE EL EJERCICIO EN EL CABALLO

El K es un electrolito importante para mantener una funcionalidad correcta de numerosas funciones corporales, sobre todo de la actividad neuromuscular. El caballo, al ser herbívoro, ingiere grandes cantidades de K con la dieta, eliminando aproximadamente 2/3 de dicho K con la orina (Stockham, 1995). Es un ión intracelular, de modo que solo un 2% de su contenido total se encuentra en el espacio extracelular. Por este motivo, la calemia no es representativa del estado del K del organismo (Muñoz *et al.*, 2003; 2006b). Por otro lado, la calemia está parcialmente supeditada al estado ácido-básico, elevándose en acidosis metabólica y descendiendo en alcalosis metabólica (Muñoz *et al.*, 2006b; McGowan, 2008).

Este electrolito alcanza una gran importancia en el ejercicio, debido a su asociación con la fatiga muscular, por alteraciones en los procesos de excitación de membrana y acumulación de K en el espacio intersticial fibrilar o en el sistema tubular transversal (Harris y Snow, 1992; Muñoz *et al.*, 2003; Hess *et al.*, 2006). A estos efectos, hay que añadir la influencia sobre otros órganos vitales, como el corazón, donde produce un efecto negativo sobre la contracción miocárdica, o sobre el riñón, conduciendo a una insuficiencia renal aguda (Messer, 1995; Stockham, 1995; Hesselkilde *et al.*, 2014; Mullen *et al.*, 2014).

La calemia durante un ejercicio resulta de la combinación de los siguientes factores: 1) Liberación de K desde el interior de las fibras musculares activas, en cada potencial de acción, según la masa muscular; 2) Capacidad de recaptura del K previamente expulsado del interior celular, dependiente del número de bombas Na⁺-K⁺ y de la tipología fibrilar; 3) Perfusión muscular y distribución del K entre los diversos tejidos; 4) Hemoconcentración con pérdidas por sudoración y/o movimientos intercompartimentales de fluidos (Muñoz *et al.*, 2003; 2006b; Hess *et al.*, 2006).

Durante un ejercicio de intensidad incremental, existe un aumento progresivo de la calemia, con una concentración máxima al final del esfuerzo (Harris y Snow, 1992). Dentro de cada escalón de esfuerzo, la calemia experimenta una elevación inicial durante los 1,5 minutos, una meseta o mantenimiento de las concentraciones, seguida de una declinación posterior (Harris y Snow, 1992). La meseta parece ser un reflejo de equilibrio entre la liberación desde la fibra en contracción y captura por parte de las fibras inactivas (Schott *et al.*, 2002). De igual modo, un ejercicio máximo o supramáximo conduce a hipercalemia (Harris y Snow, 1988; Bayly *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2010).

El K experimenta un incremento ligero al inicio de un ejercicio de resistencia, generalmente hasta los 60 km de distancia. A partir de este momento se inicia una tendencia hacia el descenso, si bien parece ser que esto depende de la velocidad de ejercicio (Hess *et al.*, 2005; 2006; Nostell *et al.*, 2006). El aumento inicial se asocia a la contracción miofibrilar. Cuando los mecanismos de termorregulación se ponen en funcionamiento, el K se elimina por sudor, si bien los niveles sanguíneos se mantienen constantes a expensas de la salida del compartimento intracelular (Snow *et al.*, 1982; Hess *et al.*, 2005; Viu *et al.*, 2010). Por otro lado, el descenso de K en los ejercicios de resistencia parece deberse a la alcalosis metabólica, que promueve la entrada de K hacia el interior de las células (Rose, 1982), mientras que la liberación de cortisol (C) por el ejercicio sostenido acelera la pérdida de K por orina y sudor (Mansmann *et al.*, 1974; Smith y Wagner, 1985).

8.3.3.3. VARIACIONES DE LA CLOREMIA DURANTE EL EJERCICIO EN EL CABALLO

El Cl es el principal anión del espacio extracelular, con altas concentraciones en sudor. La principal entrada de Cl en el organismo es la dieta, fundamentalmente a partir del consumo de leguminosas, excretándose a nivel renal (Groenendyk *et al.*, 1988; Muñoz *et al.*, 2006b). En caballos de deporte, el hallazgo más común en cuanto a este electrolito, es la hipocloremia, debido a la sudoración (Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1999; Muñoz *et al.*, 2006b).

Los ejercicios intensos, pero de corta duración, se acompañan de normocloremia o hipercloremia, debido a los cambios intercompartimentales de fluidos por el aumento de presión hidrostática tras la esplenotomía y agravada por la acidosis metabólica por producción de ácido láctico (LA) (Williamson *et al.*, 1996; Carlson y Jones, 1999).

El descenso de las concentraciones de Cl en el transcurso de una competición de resistencia es una variación electrolítica bastante frecuente, describiéndose descensos de hasta 15 mmol/l (Snow *et al.*, 1982; Muñoz *et al.*, 2006b; Schott *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2010b,c; Viu *et al.*, 2010). La reducción de la concentración de Cl se debe, en primer lugar, a la elevada composición de Cl en el sudor y en segundo lugar, la alcalosis metabólica, con incrementos significativos de bicarbonato en sangre como compensación aniónica (Barton *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2006a,b, 2010; Fielding *et al.*, 2009; Viu *et al.*, 2010). Se ha descrito que las temperaturas ambientales elevadas y las velocidades de ejercicio altas favorecen la pérdida de Cl en sudor. Asimismo, existe una correlación positiva entre descenso de la cloremia y distancia cubierta (Ecker y Lindinger, 1995).

8.4. MATERIAL Y MÉTODOS

8.4.1. CABALLOS

En este primer estudio, se han introducido un total de 64 caballos adultos, machos (tanto enteros como castrados), con edades comprendidas entre los 5 y 16 años (media \pm desviación estándar, DS: $9,75\pm 4,21$ años), que compitieron en pruebas de tiro y arrastre. Los caballos fueron clasificados en los grupos DH o deshidratado ($n=53$), los cuales compitieron en pruebas federadas por la Federación Hípica de la Comunidad Valenciana. Para mantener su peso corporal dentro de la variación permitida por la Federación, como se ha explicado en el apartado 6.2., los caballos permanecieron sin comer un tiempo medio de $15,0\pm 4,2$ h y sin beber un tiempo medio de $10,0\pm 3,3$ h, previamente a la competición. Se ha demostrado que los caballos pueden tolerar hasta 72 hrs sin consumo de agua, seguidas de una rehidratación voluntaria, sin presentar efectos secundarios (Sneddon, 1993; Sneddon *et al.*, 1993; Houpt *et al.*, 2000). El segundo grupo, control o euhidratado (CTR) estuvo formado por 11 caballos, que hicieron el ejercicio sin restricción de agua y comida.

8.4.2. COMPETICIONES DE TIRO Y ARRASTRE (GRUPO DH)

Las características de estas competiciones se han descrito en el apartado 6.2.

Según la categoría de peso, los animales del grupo DH para el estudio I, se dividieron en tres categorías: categoría I (peso inferior o igual a 350 kg; $n=23$), II (peso comprendido entre 351 y 450 kg; $n=18$) y III (peso superior o igual a 451 kg; $n=12$). Cada caballo arrastró un carro tradicional, cargado con 2 (categoría I), 2,25 (categoría II) o 2,5 (categoría III) su peso.

Las características de los animales del grupo DH se muestran en la tabla 1. En esta misma tabla se presenta, además, la duración del ejercicio realizado por cada categoría de peso.

Tabla 1. Valores medios (\pm DS) y valores mínimos y máximos (entre paréntesis) de la edad, peso, carga arrastrada y tiempo de ejercicio de los caballos del grupo DH

	Categoría I	Categoría II	Categoría III
N	23	18	12
Edad (años)	8,455 \pm 3,053 (5-14)	9,083 \pm 3,416 (4-16)	9,909 \pm 5,374 (5-14)
Peso (kg)	288,4 \pm 37,57 (193-344)	399,2 \pm 26,11 (360-440)	515,9 \pm 46,79 (460-600)
Carga (kg)	602,5 \pm 113,0 (388-688)	884,5 \pm 144,5 (810-990)	1286,4 \pm 103,1 (1150-1500)
Tiempo de ejercicio (min)	1,091 \pm 1,271 (0,360-4,950)	1,461 \pm 1,001 (0,380-4,080)	1,202 \pm 0,943 (0,350-4,997)

8.4.3. EJERCICIO EN EL GRUPO CONTROL (GRUPO CTR)

Las características del ejercicio realizado por los caballos euhidratados (n=11), introducidos dentro del grupo control o CTR se describen en el apartado 6.3. Estos animales no fueron sometidos a restricción de agua y comida. La comida de estos animales consistió en una fuente de concentrado comercial y heno, en cantidades variables según el propietario y el peso corporal. El ejercicio se efectuó, al menos, 3 hrs después de comer. El agua fue proporcionada “ad libitum”.

El número de animales del grupo CTR pertenecientes a las tres categorías de peso fue la siguiente: categoría I (n=3), categoría II (n=3) y categoría III (n=5). Las características de los caballos de este grupo se presentan en la tabla 2, incluyendo la duración del ejercicio que realizaron.

Tabla 2. Valores medios (\pm DS) y valores mínimos y máximos (entre paréntesis) de la edad, peso, carga arrastrada y tiempo de ejercicio de los caballos del grupo CTR

	Categoría I	Categoría II	Categoría III
N	3	3	5
Edad (años)	12,33 \pm 1,283 (10-14)	8,333 \pm 0,485 (7-9)	7,200 \pm 1,186 (5-8)
Peso (kg)	283,3 \pm 33,95 (260-330)	396,7 \pm 37,89 (350-440)	586,0 \pm 67,34 (470-700)
Carga (kg)	545,5 \pm 100,3 (520-660)	870,6 \pm 122,8 (787,5-900)	1223 \pm 120,7 (1175-1750)
Tiempo de ejercicio (min)	1,210 \pm 0,897 (0,380-3,450)	1,345 \pm 0,998 (0,430-4,320)	1,530 \pm 0,678 (0,440-4,987)

8.4.4. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS

Se siguió un procedimiento común para la extracción y procesamiento de las muestras sanguíneas, como se describe en el apartado 6.4.

8.4.5. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

En este estudio, se han determinado los siguientes parámetros: valor microhematócrito (HTO, %), concentraciones plasmáticas de sodio (Na, mmol/l), potasio (K, mmol/l), cloro (Cl, mmol/l), albúmina (ALB, g/dl) y lactato (LA, mmol/l), y concentraciones séricas de renina (REN (pg/ml), angiotensina II (ANG, ng/ml) y aldosterona (ALD, pg/ml).

El valor microhematócrito, HTO, fue medido mediante una centrífuga de microhematócrito⁶. Las concentraciones plasmáticas de Na, K y Cl se cuantificaron con un analizador con electrodos selectivos para los tres iones⁷. Estas mediciones se basaron

⁶ Centrífuga de microhematócrito Orto-Alresa®, modelo Biocen, España

⁷ Analizador selectivo de electrolitos, Idexx®, modelo Vetlyte, USA.

en la comparación entre la muestra y un electrodo de referencia con concentraciones conocidas de los citados electrolitos.

Los dos parámetros bioquímicos analizados en este primer estudio, ALB y LA se cuantificaron en plasma heparinizado, con un espectrofotómetro⁸, usando reactivos específicos⁹. La concentración de ALB se midió mediante la reacción con el verde de bromocresol, con la formación de un compuesto coloreado (Doumas *et al.*, 1971). La concentración plasmática de LA se determinó mediante un método enzimático, basado en la oxidación del LA de la muestra hacia piruvato por la acción de la enzima lactato oxidasa. Posteriormente, por la intervención de una peroxidasa, se produce un producto de color púrpura, de modo que la intensidad del color fue proporcional a la concentración de LA (Shimojo *et al.*, 1989).

La concentración de REN se cuantificó mediante una técnica inmunoradiométrica sandwich para la detección de REN activa en suero. Se usaron tubos de poliestireno cubiertos con anticuerpo policlonal anti-REN producido en conejo¹⁰ y el anticuerpo secundario marcado con I-125¹¹. Esta técnica presentó una elevada especificidad para la REN, con un porcentaje de recuperación del 95-10%. Se han descrito reacciones cruzadas del primer anticuerpo policlonal y del segundo anticuerpo marcado con I-125 con la pro-renina (3 y 1,8% respectivamente). La sensibilidad de esta técnica fue de 1 pg/ml. Los coeficientes de variación intra-análisis e inter-análisis fueron inferiores a 5 y 15% respectivamente.

La concentración de ANG (ng/ml) se cuantificó mediante un inmuno-análisis enzimático ELISA de competición, basado en el sistema biotina- estreptavidina – peroxidasa. Se usaron placas de ELISA recubiertas con el anticuerpo secundario¹², el

⁸Espectrofotómetro RAL®, modelo Clima M5-15, Sant Joan Desoí, Barcelona, España

⁹Reactivos RAL®, Sant Joan Desoí, Barcelona, España

¹⁰Tubos de poliestireno recubiertos con anticuerpo policlonal anti-renina, Biogénesis Morphosys 7929-9930, Cergy Saint-Cristophe, Francia

¹¹Anticuerpo secundario marcado con I-125, DRG Diagnostics, Marburgh/Lahn, Alemania

¹²Placas de ELISA EK-plate con anticuerpo para ANG, Phoenix Pharmaceuticals Inc®, Belmont, California, USA

anticuerpo primario¹³, la ANG biotilada¹⁴ y el conjugado estreptavidina – peroxidasa¹⁵. Este procedimiento analítico mostró una especificidad elevada para la ANG, con un porcentaje de recuperación del 98,5%. La sensibilidad fue de 100 pg/ml y los coeficientes de variación intra-análisis e inter-análisis fueron menores del 5 y del 14% respectivamente.

La concentración de ALD (pg/ml) se cuantificó mediante un ELISA de competición, usando el anticuerpo policlonal AD97¹⁶ y el conjugado ALD 3CMO-HRP¹⁷. Esta prueba tiene una especificidad elevada para la ALD, con porcentajes de recuperación del 97,6%. No obstante, muestra reacciones cruzadas con anticuerpos policlonales de 11-deoxicorticoesterona (1,1%) y cortisona, corticosterona, 11-deoxicortisol y 21-deoxicortisol, menos de 0,1% para estos últimos. La sensibilidad de la técnica fue de 15 pg/ml. Los coeficientes de variación intra-análisis e inter-análisis quedaron comprendidos entre 4,7-6,4 y 8,5-9,6, respectivamente.

8.4.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar, DS. La normalidad de las variables analizadas se comprobó mediante un test de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de la varianza con un test de Levene. Seguidamente, se realizó un test multivariante, considerando tres factores: grupo de caballos (DH y CTR), categoría de peso (I, II y III) y tiempo de toma de muestras (R, E, 5REC, 10REC, 15REC y 30REC).

Las diferencias entre las tres categorías de peso (I, II y III) dentro de cada grupo (DH y CTR) y las diferencias entre grupos para cada categoría de peso se evaluaron

¹³Anticuerpo policlonal anti-ANG-II, RAB 002-12, Phoenix Pharmaceuticals Inc®, Belmont, California, USA

¹⁴ANG-II biotilada, Phoenix Pharmaceuticals Inc.®, Belmont, California, USA

¹⁵Conjugado estreptavidina-peroxidasa, EK-SA-HRP, Phoenix Pharmaceuticals Inc.®, Belmont, California, USA.

¹⁶Anticuerpo policlonal AD97, Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

¹⁷ Conjugado ALD 3CMO-HRP, Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

mediante un análisis ANOVA para muestras independientes. El efecto del tiempo de toma de muestra se analizó mediante un test ANOVA para muestras repetidas. Seguidamente, se llevó a cabo un test de comparación de medias (*post-hoc comparison of means*) para determinar entre qué tiempos de toma de muestra existían diferencias. Finalmente, se efectuó un análisis de correlación entre las diversas variables analizadas, mediante una correlación lineal (*Pearson product-moment correlation*).

El nivel de significación se estableció a nivel de $p < 0,05$. El estudio estadístico se ha realizado con un programa estadístico¹⁸.

¹⁸ *Statistica for Windows, v. 10.0, Statsoft®, USA*

8.5. RESULTADOS

La sección de resultados se ha dividido en cuatro apartados. En primer lugar, se mostrarán los resultados del análisis multivariante, seguidamente se presentarán los datos relativos a la influencia de la categoría de peso (I, II y III) para los dos grupos de caballos estudiados (DH y CTR) en los diversos tiempos de toma de muestras sanguíneas (R, E, 5REC, 10REC, 15REC y 30REC). Seguidamente, se indicarán los datos derivados del análisis comparativo para ambos grupos de caballos (DH y CTR) y para concluir, se detallarán los resultados del análisis de correlación entre las diversas variables analizadas.

8.5.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIANTE

La tabla 3 muestra los resultados del análisis multivariante. Como se puede apreciar, el grupo de caballo, en función del estado hídrico y el tiempo en el que se extrajeron las muestras, influyeron la mayoría de las variables estudiadas. Así, existieron diferencias entre grupos de caballos (CTR y DH) en HTO, ALB, LA, Na, K, Cl, ANG y ALD. La categoría de peso (I, II y III) solo influyó a la concentración sérica de ALD. Finalmente, se apreciaron diferencias en HTO, ALB, LA, Na, K y Cl al comparar el tiempo de extracción de las muestras (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del análisis multivariante (valores *F* y probabilidad *p*) y de los efectos de los tres factores principales (grupo de caballo, categoría de peso y tiempo de extracción de las muestras sanguíneas). $P < 0,05$

	Grupo caballo¹⁹	Categoría de peso²⁰	Tiempo de extracción de muestras²¹
HTO	F= 64,32 p= 0,000	F= 2,430 p= 0,089	F= 128,6 p= 0,000
ALB	F= 353,2 p= 0,000	F= 2,030 p=0,133	F= 30,03 p= 0,000
LA	F= 228,2 p= 0,000	F= 0,501 p= 0,606	F= 175,5 p= 0,000
Na	F= 339,4 p= 0,000	F= 0,400 p= 0,670	F= 72,70 p= 0,000
K	F= 32,31 p= 0,000	F= 2,120 p= 0,121	F= 50,44 p= 0,000
Cl	F= 76,60 p= 0,000	F= 2,120 p= 0,127	F= 34,60 p= 0,000
REN	F=1,230 p=0,230	F=2.110 p=0,324	F=3,210 p=0,430
ANG	F= 62,41 p= 0,000	F= 0,140 p= 0,870	F= 5,990 p= 0,000
ALD	F= 43,19 p= 0,000	F= 17,81 p= 0,000	F= 0,235 p= 1,375

¹⁹ DH vs. CRT

²⁰ I, II y III

²¹ R, E, 5REC, 10REC, 15REC y 30REC

8.5.2. EFECTO DE LA CATEGORÍA DE PESO Y DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS EN EL GRUPO DH

En este apartado, vamos a evaluar la influencia de la clasificación de los caballos en grupo de peso (que tiraron de diferente carga durante el ejercicio) del grupo DH en los diversos tiempos de toma de muestras. Estos resultados se presentan en figuras independientes para cada una de las variables (figuras 1 a 10).

Hemos observado que, la categoría de peso, no influye muy intensamente en la adaptación de estos animales al ejercicio de tiro y arrastre, a pesar de arrastrar diferente carga. Así, hemos encontrado que, en reposo (tiempo R), los caballos de la categoría de peso I tuvieron concentraciones de LA significativamente superiores a los de la categoría III. Por otro lado, al concluir el ejercicio (tiempo E), los caballos de la categoría de peso II tuvieron HTO significativamente inferiores a los de la categoría I. Durante los diversos tiempos de recuperación, no se vieron diferencias significativas entre las tres categorías de peso.

El ejercicio, sin embargo, sí afectó de forma significativa a la mayor parte de las variables analizadas (HTO, ALB, LA, Na, K y Cl). La ANG se vio afectada por el ejercicio solo en las categorías de peso I y III, mientras que la REN y la ALD no se modificaron con el ejercicio en ninguna de las tres categorías de peso. Las diferencias asociadas al ejercicio para cada categoría de peso se han identificado con el tiempo de obtención de muestra con el cual se han observado tales diferencias y la categoría de peso (por ejemplo, R-I, diferencias con los valores de reposo para la categoría de peso I).

El HTO aumentó en el tiempo E en comparación R en las tres categorías. A los 15 min de recuperación, ya no se apreciaron diferencias con R, como se muestra en la figura 1.

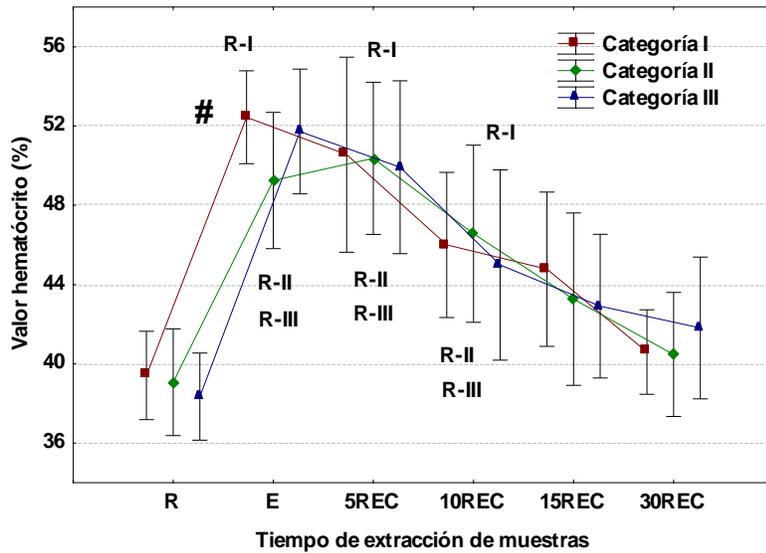


Figura 1. Valor hematocrito (%) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (#: diferencias entre categorías I y II; R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

La concentración de ALB aumentó de forma significativa en el ejercicio en las categorías de peso I y III, pero no en la II, como indica la figura 2. No se hallaron diferencias entre las 3 categorías de peso.

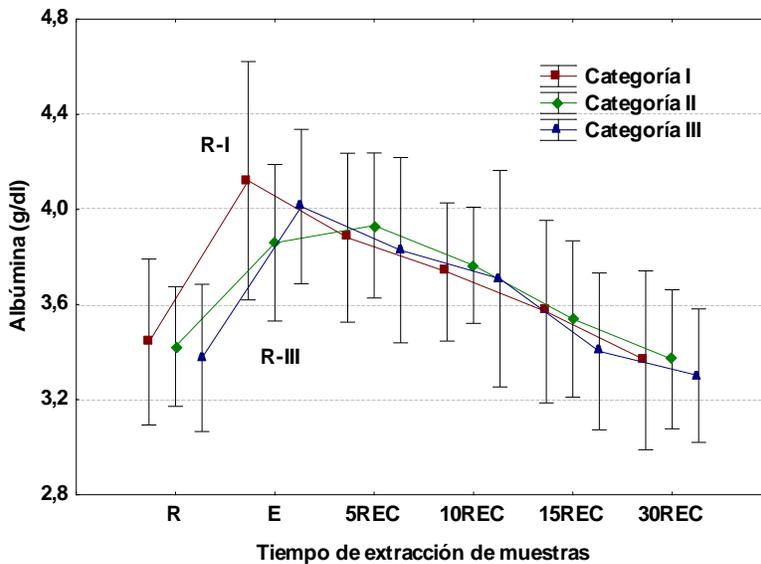


Figura 2. Concentración plasmática de albúmina (mg/dl) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

La concentración de LA aumentó con el ejercicio en las 3 categorías de peso en los caballos DH. Además, en reposo (R) los animales de la categoría I tuvieron una concentración de LA superior a los de la categoría III. No se apreciaron diferencias significativas entre las 3 categorías de peso en los restantes tiempos de muestreo (Figura 3). Las concentraciones de LA permanecieron significativamente elevadas hasta los 30REC. Por tanto, no se observó una recuperación de este parámetro en los caballos DH, independientemente de la categoría de peso.

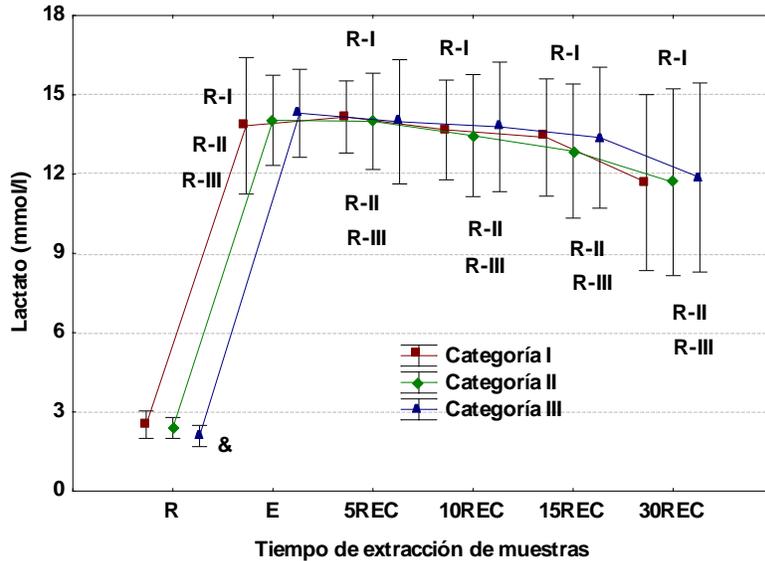


Figura 3. Concentración plasmática de lactato (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (&: diferencias entre categorías I y III; R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

La concentración de Na aumentó a consecuencia del ejercicio, y permaneció con valores superiores a los basales hasta los 10 min (10REC) para las categorías de peso I y II y hasta los 15 min de recuperación (15REC) para la categoría III. No se apreciaron diferencias significativas entre las 3 categorías de peso (Figura 4).

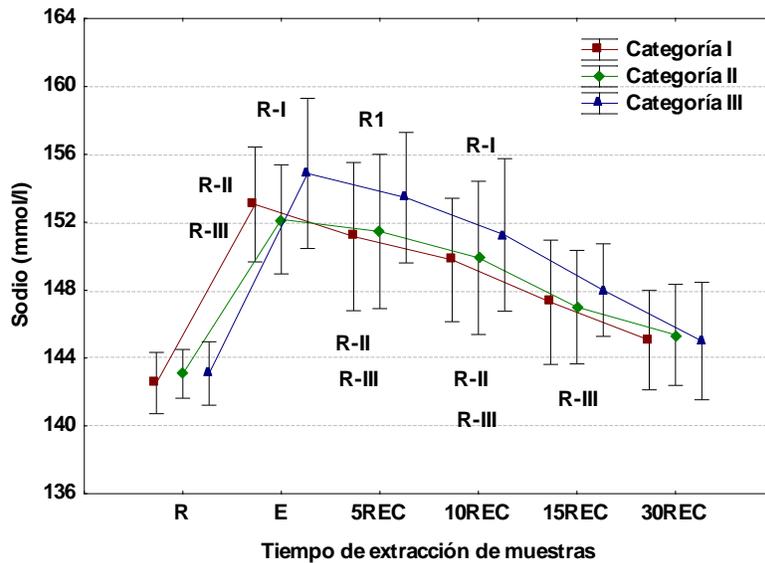


Figura 4. Concentración plasmática de sodio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

La concentración de K aumentó con el ejercicio en las tres categorías de peso del grupo DH, permaneciendo significativamente elevada hasta los 5 min (5REC) para la categoría II y hasta los 10 min (10REC) para las categorías I y III. No existieron diferencias significativas entre las tres categorías de peso en los diversos tiempos de extracción de muestras (Figura 5).

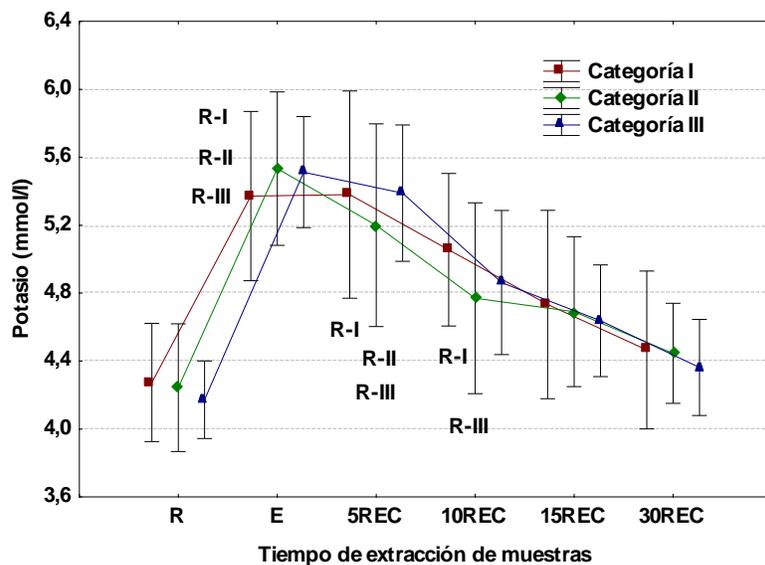


Figura 5. Concentración plasmática de potasio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

Inmediatamente tras el ejercicio, la concentración de Cl aumentó significativamente en las 3 categorías de peso. No se encontraron más diferencias en cuanto al Cl en el grupo DH (Figura 6).

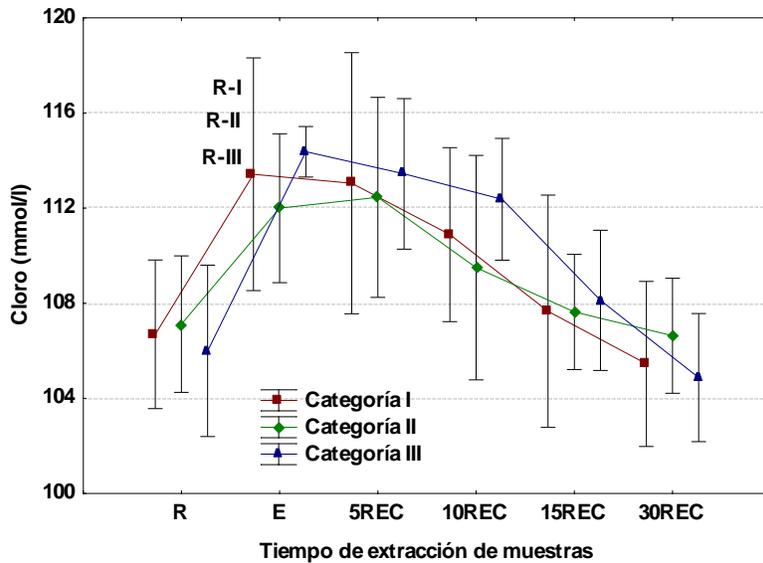


Figura 6. Concentración plasmática de cloro (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

La concentración de REN no se vio afectada de forma significativa por el ejercicio en ninguna de las categorías de peso. Del mismo modo, tampoco se apreciaron diferencias significativas entre las 3 categorías de peso (Figura 7).

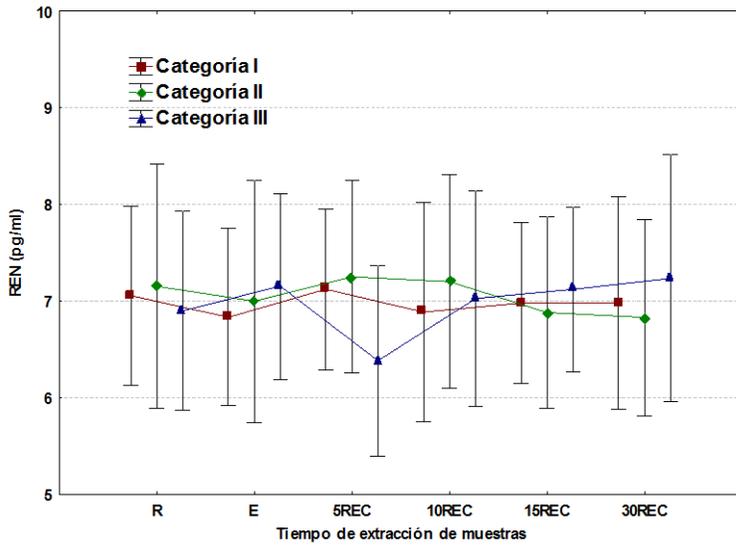


Figura 7. Concentración sérica de renina (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso.

La concentración de ANG aumentó con el ejercicio en las categorías de peso I y III, recuperándose los niveles basales a los 5 min de recuperación (5REC). No se observaron diferencias entre las categorías de peso (Figura 8).

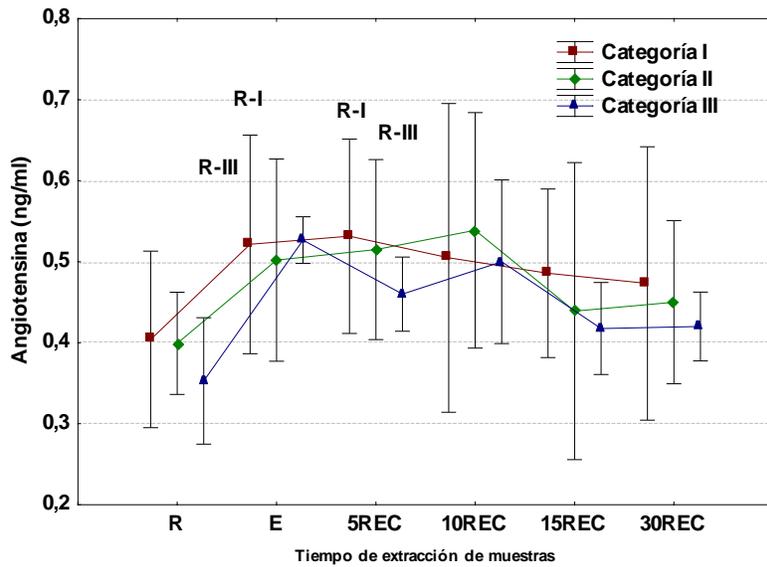


Figura 8. Concentración sérica de angiotensina (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso

(R: diferencias con reposo).
 $P < 0,05$.

Finalmente, la concentración de aldosterona no se modificó con el ejercicio. No obstante, como se observa en la figura 9, las desviaciones estándar fueron muy marcadas, debido a que un caballo mostró unos valores muy superiores al resto de los animales.

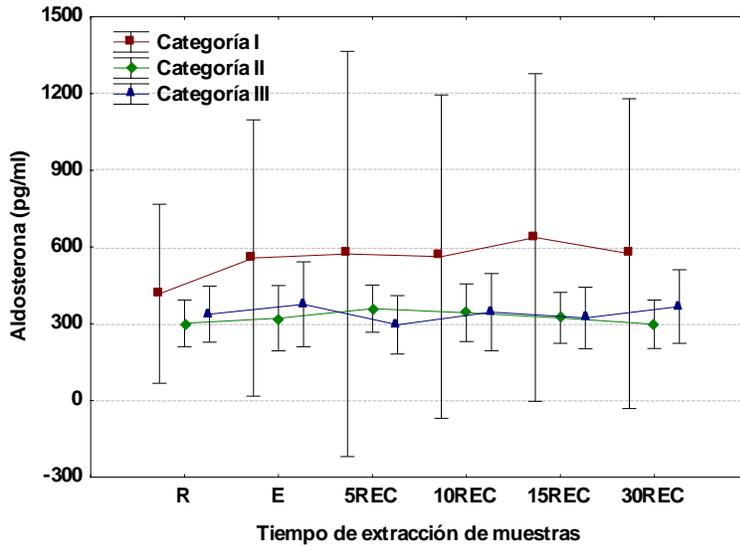


Figura 9. Concentración sérica de aldosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

Si se elimina este caballo, obtenemos la figura 10. No se hallaron diferencias entre categorías de peso. De igual modo, el ejercicio no indujo ninguna variación significativa (Figura 10).

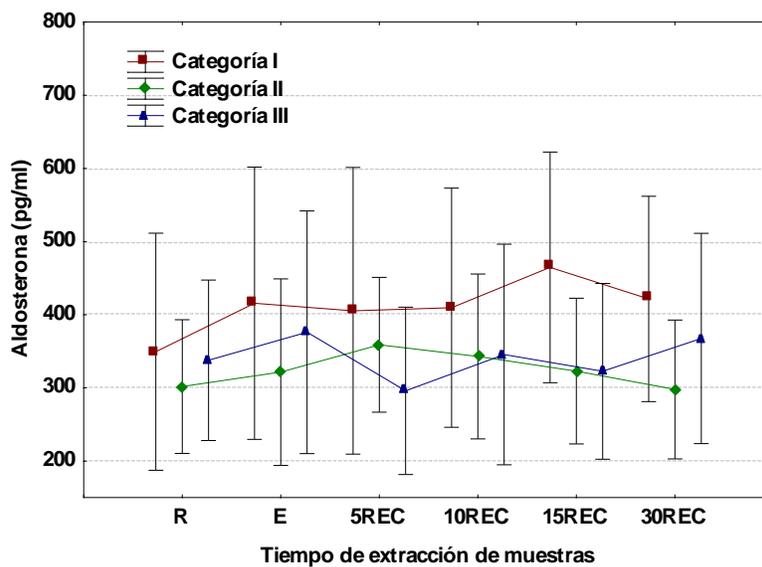


Figura 10. Concentración sérica de aldosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (Figura tras eliminar a un caballo con valores anormalmente elevados)

8.5.3. EFECTO DE LA CATEGORÍA DE PESO Y DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS EN EL GRUPO CTR

En este apartado, vamos a analizar si existen diferencias asociadas a la categoría de peso (I, II y III) en cada uno de los tiempos de muestreo, así como el efecto del ejercicio dentro de cada categoría de peso, para los caballos del grupo CTR. Los resultados se muestran en las figuras 11 a 19.

El HTO aumentó de forma significativa con el ejercicio en las tres categorías de peso del grupo CTR. Los valores en reposo se lograron a los 10 min de recuperación en las categorías I y II y a los 5 min de recuperación en la categoría III. Además, inmediatamente tras el ejercicio (E), la categoría de peso II mostró un HTO significativamente inferior a la categoría III (Figura 11).

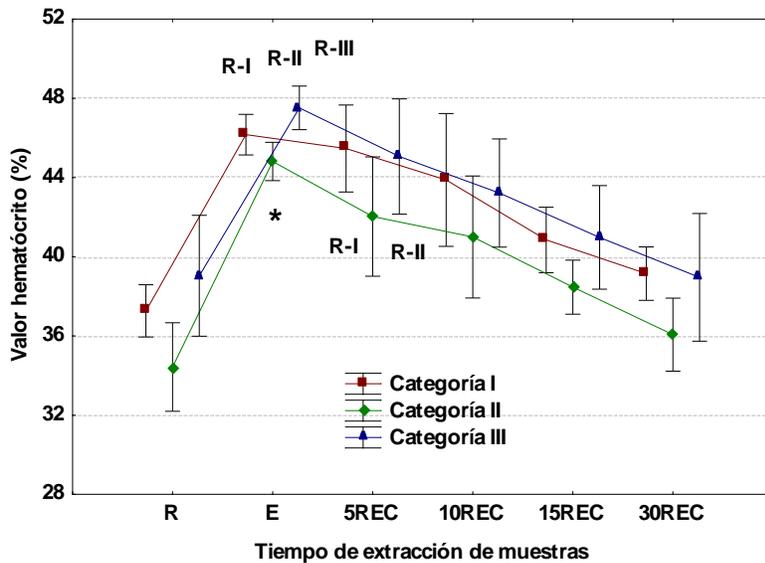


Figura 11. Valor hematócrito (%) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso (* diferencias entre categorías II y III; R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

La concentración de ALB fue similar en las tres categorías de peso, en los diversos tiempos de extracción de sangre. Además, el ejercicio no condicionó ningún cambio significativo en este parámetro en la categoría II, mientras que dio lugar a una elevación significativa en las categorías I y III (Figura 12).

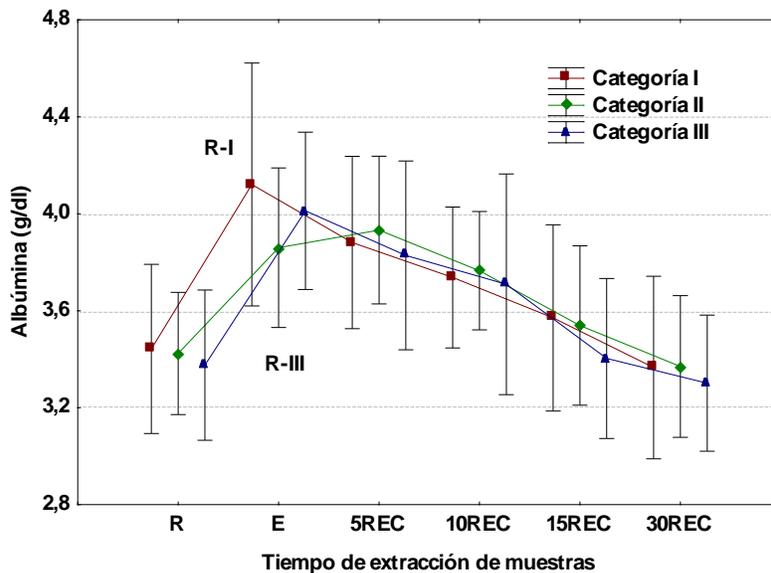


Figura 12. Concentración plasmática de albúmina (g/dl) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

Se han hallado notables variaciones asociadas a la categoría de peso en la acumulación de LA en sangre. La categoría I de peso mostró concentraciones de LA significativamente superiores en los siguientes tiempos: E, 5REC, 10REC y 15REC. Las diferencias significativas asociadas por el ejercicio solo han sido significativas en la categoría de peso I (Figura 13). En esta categoría, además, se observó que la recuperación de las concentraciones de LA no se llevó a cabo hasta los 30 min.

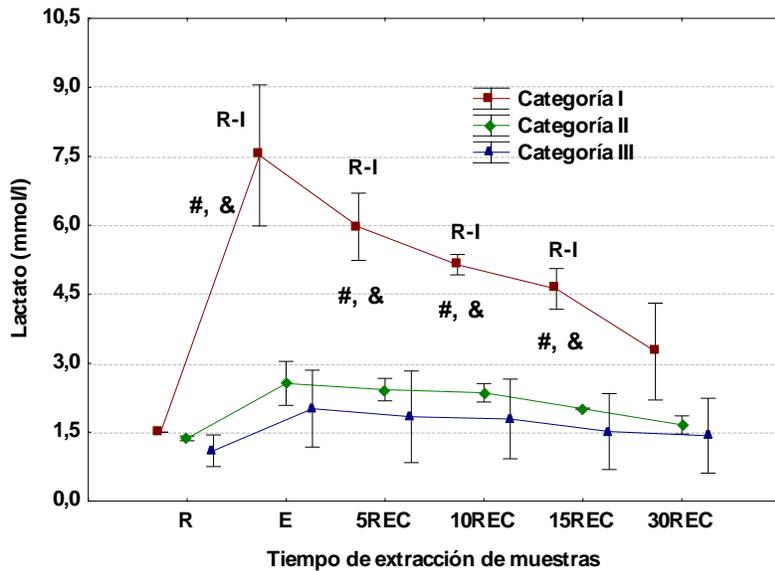


Figura 13. Concentración plasmática de lactato (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso (#: diferencias entre categorías I y II; &: diferencias entre categorías I y III) (R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

La única diferencia significada encontrada en la concentración de Na en el grupo CTR fue en la categoría I, donde el ejercicio dio lugar a un incremento (Figura 14).

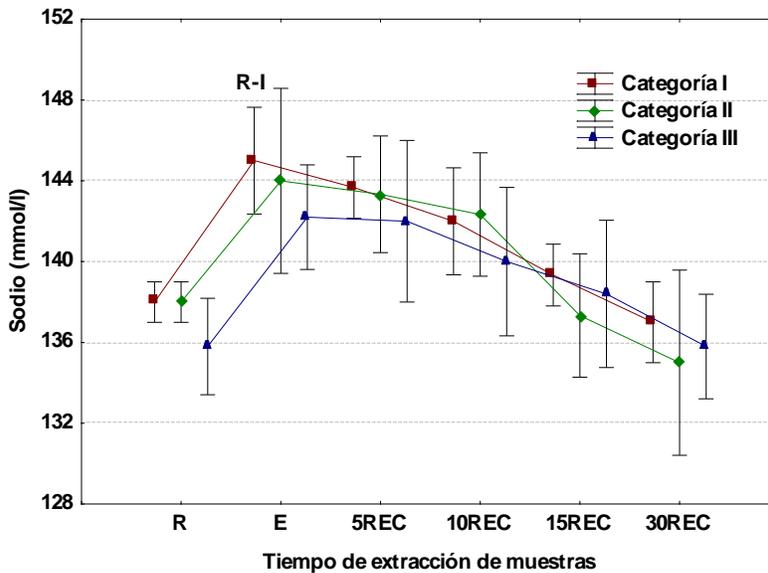


Figura 14. Concentración plasmática de sodio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

La concentración de K no fue diferente entre categorías de peso, ni tampoco se vio afectada por el ejercicio de tiro y arrastre ni por la posterior recuperación, en el grupo CTR (Figura 15).

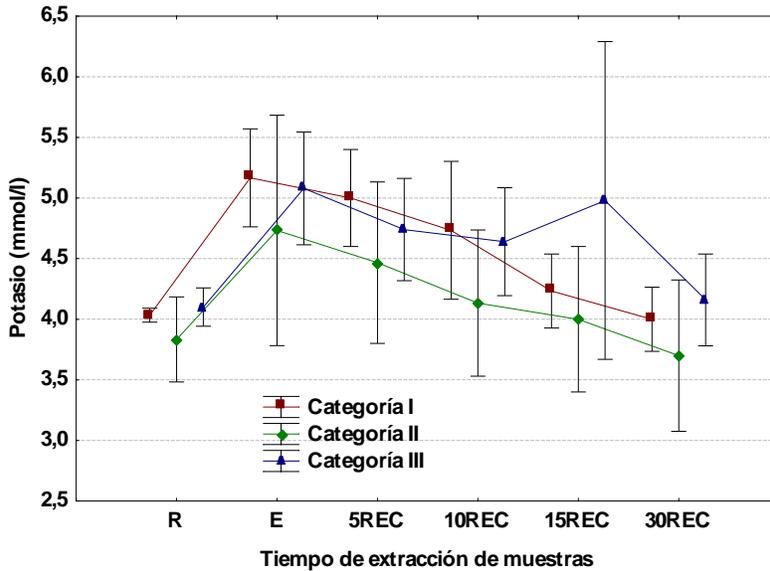


Figura 15. Concentración plasmática de potasio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso

La categoría de peso II presentó concentraciones medias de Cl superiores a las de la categoría III en el tiempo de extracción 10REC, sin evidenciarse otras diferencias significativas (Figura 16).

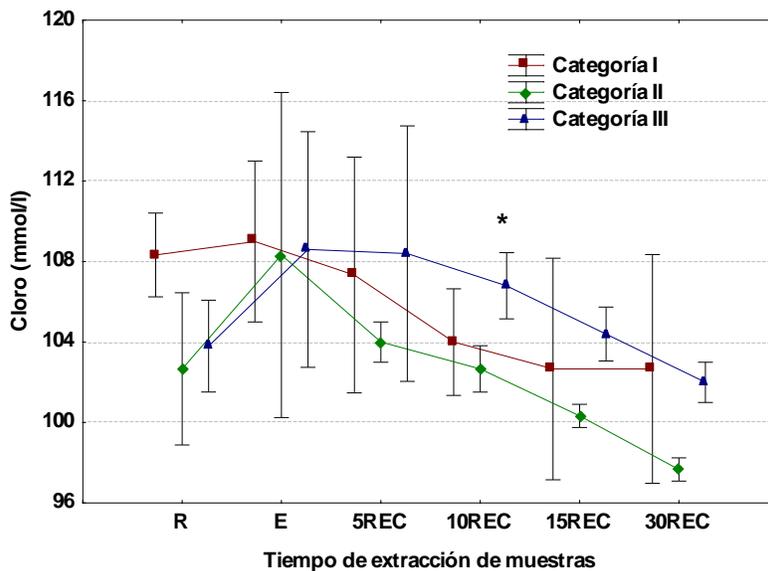


Figura 16. Concentración plasmática de cloro (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso (*: diferencias entre categorías II y III). $P < 0,05$.

La concentración de REN no se vio afectada por el ejercicio en el grupo CTR y tampoco se detectaron diferencias asociadas a la categoría de peso (Figura 17).

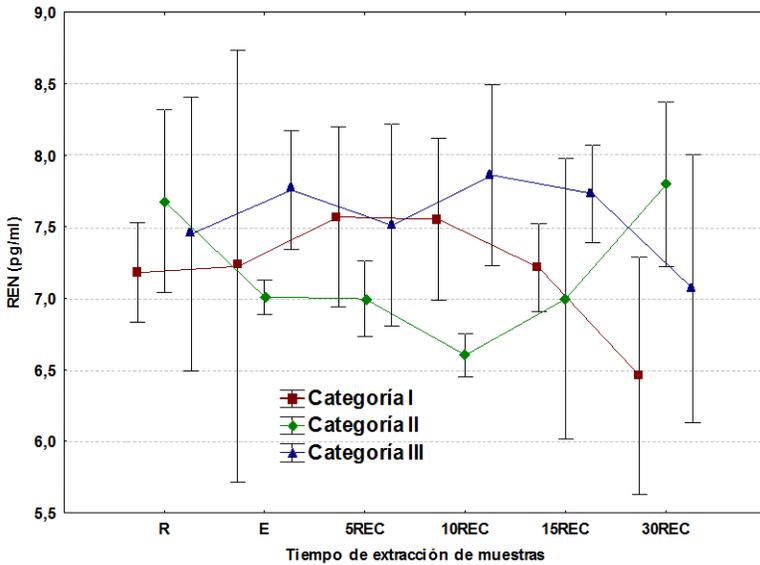


Figura 17. Concentración sérica de renina (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso

No se hallaron diferencias significativas en la concentración de ANG, ni al considerar el efecto del ejercicio, ni al valorar la categoría de peso (Figura 18).

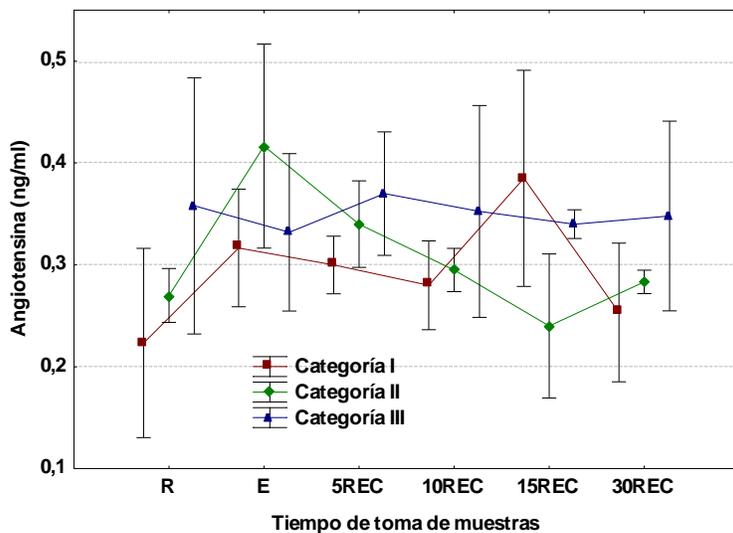


Figura 18. Concentración sérica de angiotensina (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso

Finalmente, y con respecto a la ALD, se observó un incremento significativo con el ejercicio en las tres categorías de peso. En la categoría I, las concentraciones al final de los 30 min de recuperación (30REC) fueron significativamente superiores a las de reposo. Por el contrario, los animales de las categorías II y III recuperaron sus valores de reposo a los 150 min de recuperación (15REC). Por otro lado, la categoría I mostró medias superiores a las otras dos categorías de peso (Figura 19).

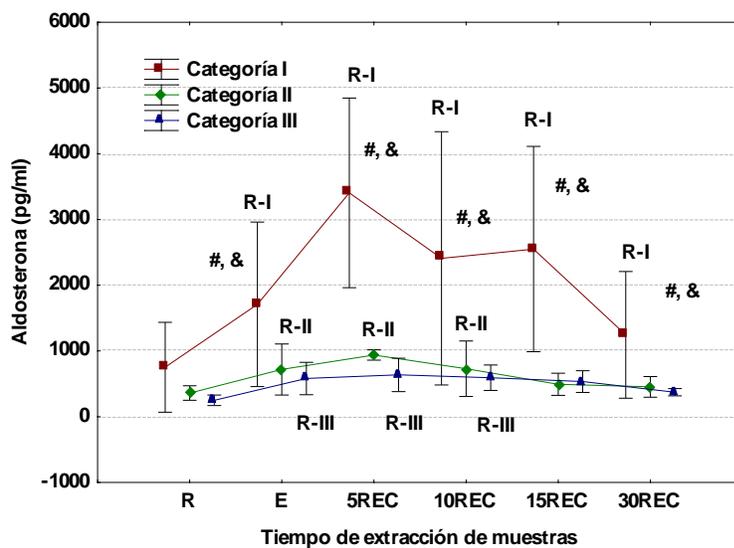


Figura 19. Concentración sérica de aldosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso (#: diferencias entre categorías I y II; &: diferencias entre categorías I y III) (R: diferencias con reposo). $P < 0,05$.

8.5.4. DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS DH Y CTR

A continuación, vamos a valorar las diferencias entre los grupos DH y CTR para cada una de las variables en cada tiempo de toma de muestras. Para este apartado, vamos a considerar las 3 categorías de peso juntas, ya que como hemos encontrado en los apartados 8.5.1, 8.5.2. y 8.5.3., las diferencias asociadas a la categoría de peso son mínimas. La mayor parte de las variables, en los tiempos de obtención de muestras, han presentado diferencias significativas entre ambos grupos. Así, HTO, ALB, LA, Na y ANG fueron más elevados en el grupo DH en todos los tiempos estudiados (Figuras 20, 21, 22, 23 y 27). Otros parámetros mostraron valores superiores en el grupo DH en comparación con CRT en algunos tiempos de muestra, pero no en todos, como ocurrió

con K, Cl y ALD (Figuras 24 25 y 28). No se apreciaron diferencias entre grupos en la concentración de REN (Figura 26).

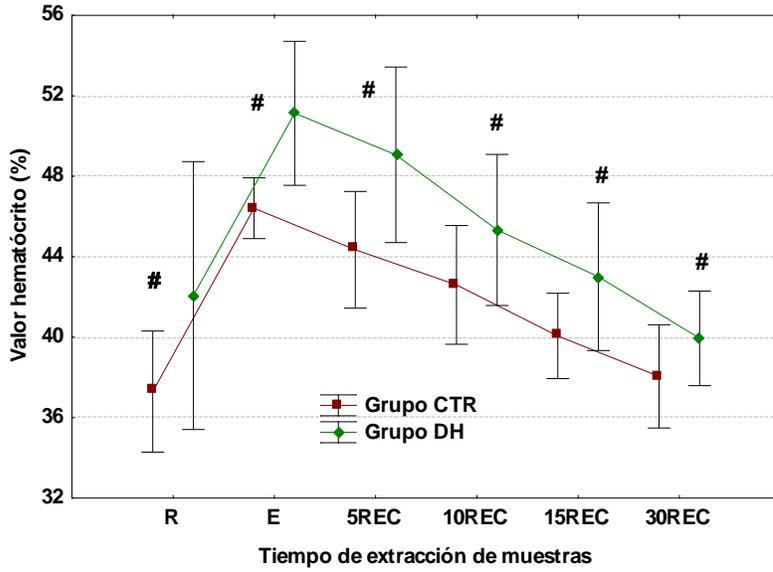


Figura 20. Valor hematócrito (%) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

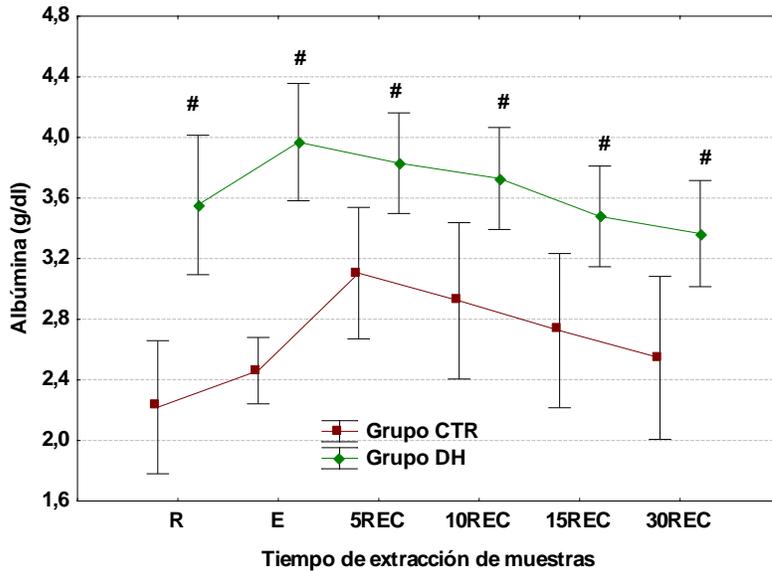


Figura 21. Concentración plasmática de albúmina (g/dl) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

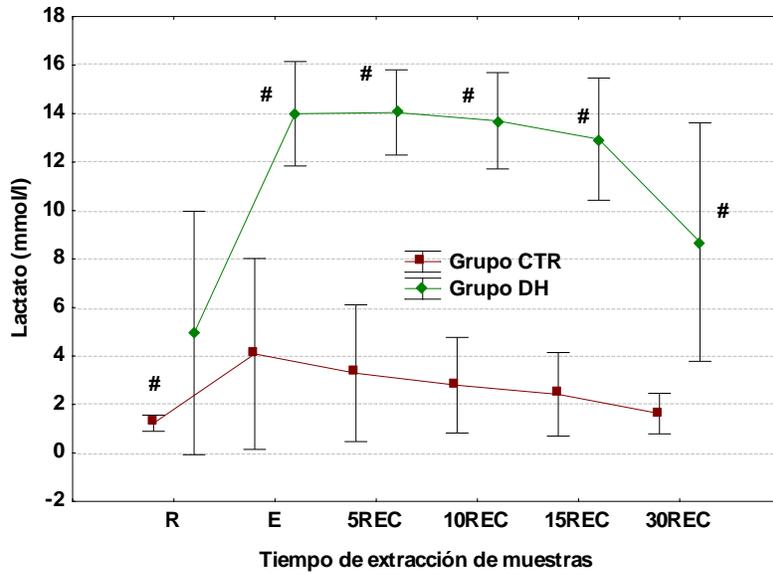


Figura 22. Concentración plasmática de lactato (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

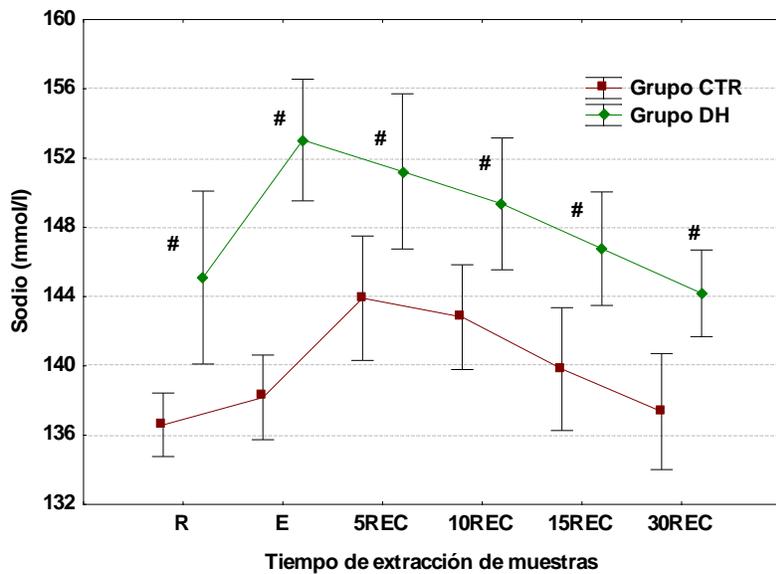


Figura 23. Concentración plasmática de sodio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

La concentración de K también fue más elevada en el grupo DH, excepto en el tiempo de muestreo 15REC, donde no se hallaron diferencias significativas (Figura 24).

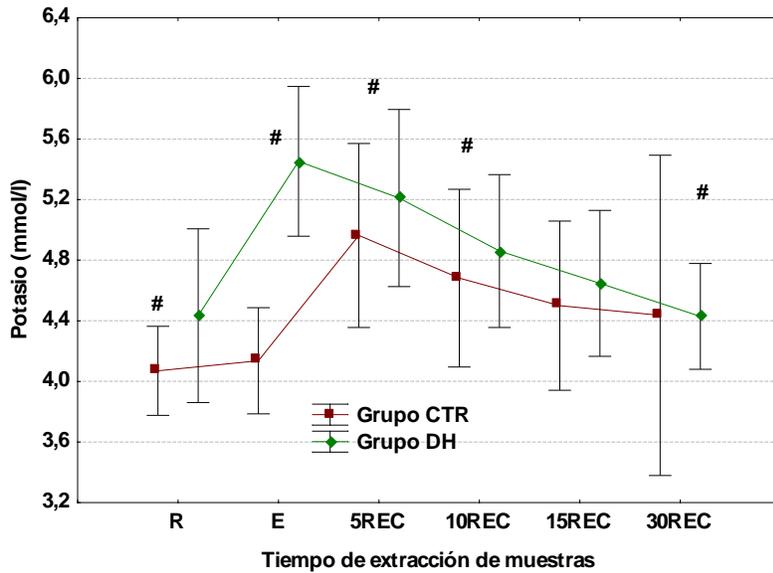


Figura 24. Concentración plasmática de potasio (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

También la concentración de Cl fue más alta en el grupo DH, con excepto del tiempo R, cuando no se apreciaron diferencias significativas (Figura 25).

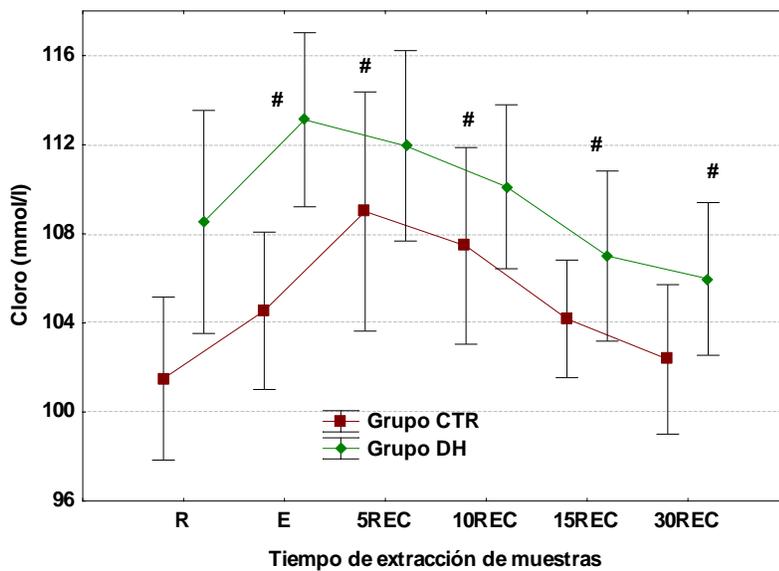


Figura 25. Concentración plasmática de cloro (mmol/l) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

La REN no fue diferente entre los dos grupos de caballos CTR y DH (Figura 26).

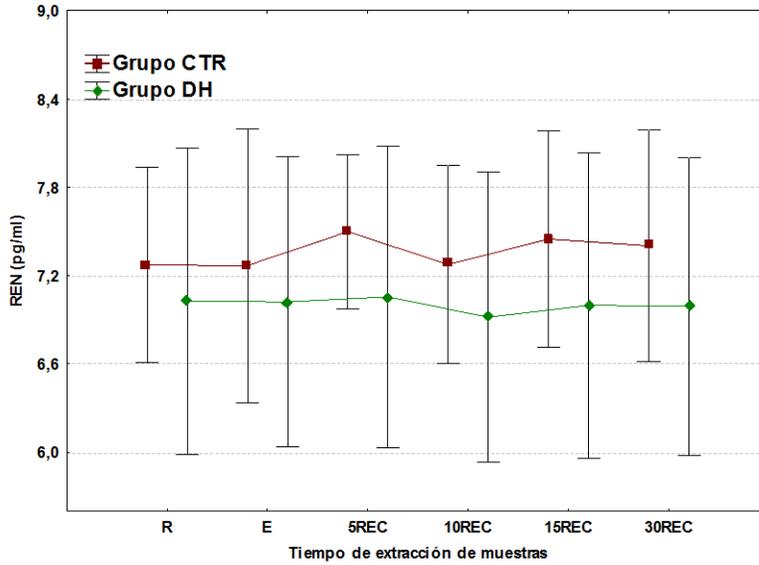


Figura 26. Concentración sérica de renina (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

Los valores de ANG también fueron superiores en el grupo DH en todos los tiempos de extracción de muestra (Figura 27).

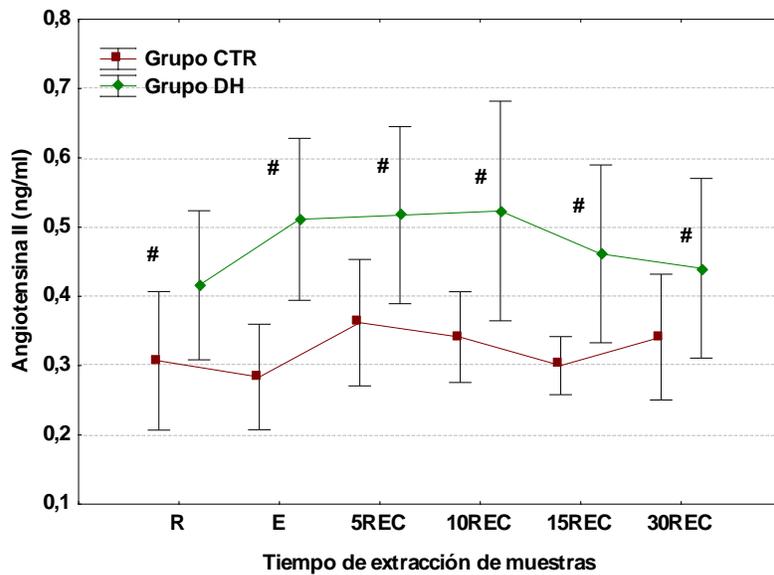


Figura 27. Concentración sérica de angiotensina (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

Finalmente y con respecto a la ALD, se ha encontrado que los caballos del grupo CTR tuvieron valores significativamente superiores en todos los tiempos, excepto en reposo (Figura 28).

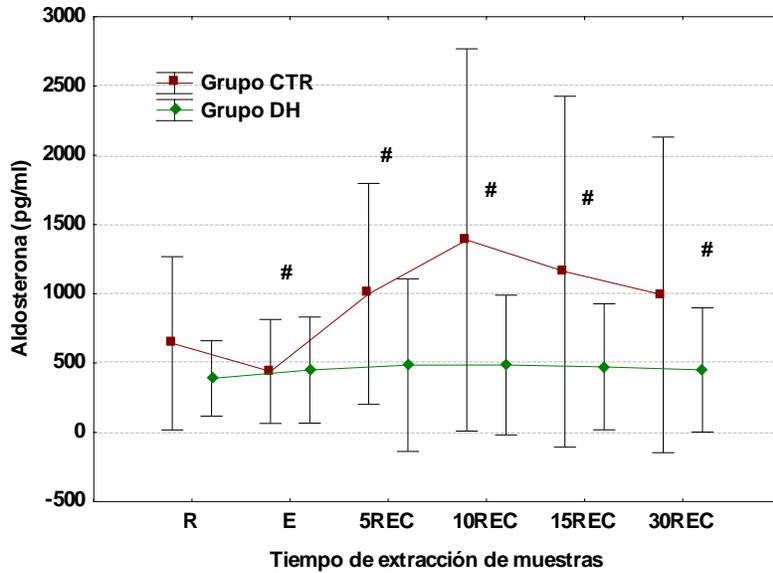


Figura 28. Concentración sérica de aldosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

Para evaluar si la magnitud de las variaciones inducidas por el ejercicio es similar en los 2 grupos, hemos calculado la diferencia entre los valores en reposo y en ejercicio. En general, el aumento experimentado por el ejercicio ha sido parecido en ambos grupos, con excepción de LA y ALD. El LA aumentó más intensamente en el grupo DH, mientras que la ALD se incrementó más en el grupo CTR (Figura 29).

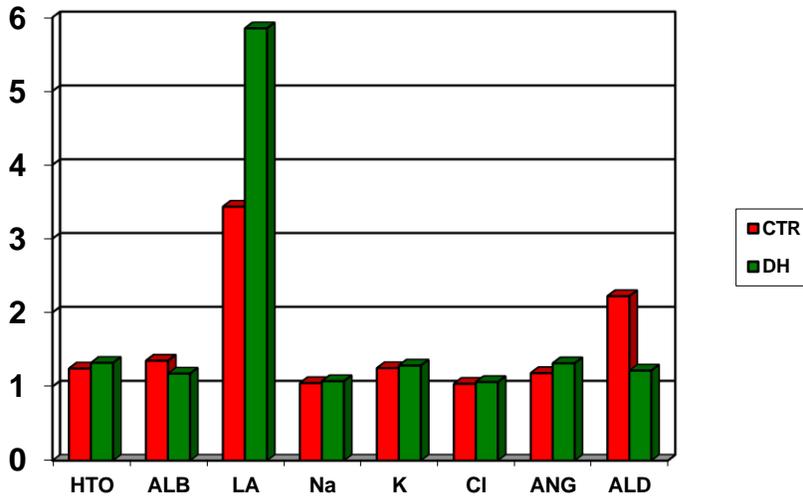


Figura 29. Variación inducida por el ejercicio en las variables estudiadas en los 2 grupos de caballos con diferente estado hídrico (variación expresada en veces de incremento desde los valores de reposo)

8.5.5. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Finalmente y para concluir el apartado de resultados, vamos a presentar los datos derivados del análisis de correlación, de forma individual para los dos grupos de caballos estudiados (CTR y DH) (Tablas 4 y 5 respectivamente).

Tabla 4. Resultados del análisis de correlación entre las variables estudiadas en los caballos del grupo CTR (valores significativos marcados en negrita), $P < 0,05$

	HTO	ALB	LA	Na	K	Cl	REN	ANG
ALB	0,690							
LA	0,580	0,350						
Na	0,480	0,610	0,380					
K	0,500	0,620	0,340	0,560				
Cl	0,380	0,490	0,110	0,550	0,540			
REN	0,120	0,100	0,050	0,120	0,030	0,110		
ANG	0,290	0,040	0,080	0,100	0,170	0,120	0,080	
ALD	0,230	-0,020	0,520	0,200	0,580	0,220	0,010	0,060

Tabla 5. Resultados del análisis de correlación entre las variables estudiadas en los caballos del grupo DH (valores significativos marcados en negrita), $P < 0,05$

	HTO	ALB	LA	Na	K	Cl	REN	ANG
ALB	0,500							
LA	0,630	0,360						
Na	0,630	0,420	0,690					
K	0,510	0,490	0,510	0,640				
Cl	0,550	0,410	0,420	0,550	0,550			
REN	0,230	0,320	0,120	0,100	0,210	0,120		
ANG	0,180	0,100	0,340	0,160	0,510	0,090	0,210	
ALD	0,100	0,140	0,090	0,170	0,600	0,013	0,310	0,110

8.6. DISCUSION

La discusión se ha dividido en dos grandes apartados. En primer lugar, se debatirá el efecto de la categoría de peso en los dos grupos de caballos con diferente estado hídrico (CTR y DH), así como la influencia del ejercicio. En segundo lugar, se explicarán las diferencias entre los grupos CTR y DH en los diversos tipos de toma de muestras.

8.6.1. EFECTO DE LA CATEGORÍA DE PESO Y DEL EJERCICIO

En una investigación previa, se ha demostrado que, a pesar de que los caballos pertenecían a tres categorías de peso diferentes y por tanto, arrastraron cargas de peso distintas, la respuesta al ejercicio fue similar (Muñoz *et al.*, 2011), y lo mismo ha ocurrido en este estudio. De hecho, solo se han encontrado diferencias en tres parámetros entre categorías de peso. Así, el HTO fue superior en la categoría I que en la II en el grupo DH y en la categoría III en comparación con la categoría II en el grupo CTR, en ambos casos en el tiempo E. La segunda variable en la que se apreciaron diferencias significativas asociadas al peso fue el LA. En R, la categoría I del grupo DH presentó valores superiores a la III. En el grupo CTR, el LA fue mayor en las categorías I que en la II y III en casi todos los tiempos de obtención de muestras. Finalmente, en el grupo CTR, las concentraciones séricas de ALD fueron superiores en la categoría I en comparación con las otras dos categorías.

Un valor superior del HTO puede estar asociado a tres circunstancias: 1) una liberación de mayor cantidad de glóbulos rojos desde el bazo; 2) a una mayor pérdida de fluidos intravasculares y 3) a una combinación de ambos procesos (Muñoz *et al.*, 2006b; 2010c; Robert *et al.*, 2010; Stefansdottir *et al.*, 2015). Los marcadores de estado hídrico (ALB, Na, K, Cl) no fueron diferentes entre las categorías de peso I y II. Por tanto, podría sugerirse que el mayor HTO en el grupo II sería un reflejo de una mayor movilización esplénica de hematíes. Esta movilización de hematíes más marcada podría tener dos orígenes: una necesidad metabólica de oxígeno superior o un estrés agudo mayor, con

liberación de catecolaminas. Como luego se va a comentar, los niveles de LA (representativos tanto de la intensidad metabólica como del grado de estrés) fueron superiores en la categoría I que en la II. Por tanto, no parece existir una justificación directa de estos resultados.

En relación a LA, una posible explicación de los valores superiores en los caballos I en reposo, en comparación con los caballos III, puede ser el temperamento de los animales y la distinta respuesta al estrés. Se sabe que el estrés estimula las rutas glucolíticas, dando lugar a una mayor producción de LA, de forma secundaria a una activación simpática (Krant y Madias, 2014; García-Álvarez *et al.*, 2014). Según esta hipótesis, los caballos de la categoría I tendrían un carácter más nervioso que los de categoría III. Hay que considerar que los animales de la categoría I pertenecían a razas ligeras, mientras que los caballos de la categoría III, por su mayor peso, pertenecían a razas más pesadas. Es bien conocido, que los caballos más pesados tienen un temperamento más tranquilo que los caballos de razas ligeras (Snow, 1983). Además del LA plasmático/sérico/sanguíneo, otros marcadores de estrés son la frecuencia cardiaca y las concentraciones circulantes de hormonas como catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y cortisol (Ayala *et al.*, 2012). En una investigación previa, se han determinado estos biomarcadores (Lucas, 2004). En dicha investigación, se encontró que, los caballos de la categoría I mostraban una FC en reposo superior a los de la categoría III ($39,83 \pm 7,124$ vs. $34,40 \pm 3,864$ lat/min, respectivamente). Sin embargo, las concentraciones de C fueron similares en los caballos de la categoría I ($105,3 \pm 32,09$ nmol/l) y III ($109,4 \pm 71,04$ nmol/l). Por otro lado, los caballos de la categoría III mostraron valores superiores de adrenalina en reposo ($467,6 \pm 289,6$ pg/ml en categoría I vs. $318,6 \pm 212,1$ pg/ml en categoría III) y además, se apreció una tendencia no significativa hacia concentraciones superiores de noradrenalina en este mismo grupo ($220,2 \pm 166,5$ pg/ml en categoría III vs. $182,4 \pm 164,7$ pg/ml en categoría I). Por tanto, si bien los caballos de la categoría I parecían de forma subjetiva, más nerviosos que los de otras categorías, las hormonas indicadoras de estrés no mostraron diferencias evidentes entre categorías. Por ello, habría que buscar otra justificación para la diferente

concentración de LA en reposo entre las tres categorías, aparte del estrés. La raza, podría haber condicionado en cierto modo estos resultados.

La limitada repercusión del peso de los animales, independientemente de su estado hídrico, en la respuesta al ejercicio, a pesar de arrastrar diferente peso (tanto en valores absolutos como en porcentaje de su peso corporal), no coincide con los resultados de Pérez et al. (1991; 1992). Estos autores observaron que, el peso del animal, la carga que arrastraban y la duración del ejercicio eran los tres principales determinantes de la respuesta hematológica, cardiovascular y metabólica al ejercicio de tiro.

8.6.2. DIFERENCIAS ENTRE LOS GRUPOS CTR Y DH

8.6.2.1. DIFERENCIAS ENTRE LOS GRUPOS CTR Y DH EN REPOSO

A pesar de que la restricción de comida y de agua se asocia a una pérdida de peso corporal, posiblemente debido tanto al descenso de agua corporal como al contenido digestivo, no siempre se producen variaciones en el HTO. Así, Parker *et al.* (2004) en toros observaron que el HTO no refleja el grado de deshidratación, si bien estos autores tampoco hallaron diferencias en la concentración de proteínas plasmáticas totales y ALB. El pool hídrico en rumiantes es dinámico, con movimientos libres desde la luz del tracto gastrointestinal hacia el fluido extracelular. Es decir, 90 h de privación de agua en toros dieron lugar a una movilización del tracto gastrointestinal para prevenir una reducción en el contenido total de agua corporal (Parker *et al.*, 2004). Estos resultados coinciden con los presentados para caballos (Haupt *et al.*, 2000) y ovinos de diversas razas (Igbokwe, 1993; Jaber *et al.*, 2004). No obstante, estos animales fueron sometidos tanto a restricción hídrica como de alimento, por lo que la ausencia de variaciones en la concentración de proteínas plasmáticas totales podría haber estado asociada a la restricción alimenticia. Haupt *et al.* (2000) también sugirieron que el HTO se habría mantenido a expensas de movimientos de fluidos desde el espacio intracelular e intersticial o bien desde el tracto gastrointestinal. Estos datos, observados tanto en toros como en caballos, no coinciden

con los que hemos encontrado en nuestra investigación. En nuestro caso, los caballos del grupo DH mostraron valores superiores de HTO que los CTR. Los motivos de estas diferencias entre estudios no se conocen bien, si bien podría estar asociado a la diversa capacidad de acumulación de agua en el reservorio gastrointestinal, según la dieta (Meyer y Coenen, 1989).

La deshidratación inducida por restricción en el consumo de agua da lugar a deshidratación hipertónica, con hipernatremia e hipercloremia. Esto se ha documentado en diversas especies como dromedarios (Ben Goumi *et al.*, 1993), perros (Zucker *et al.*, 1982; Thrasher *et al.*, 1984), toros (Parker *et al.*, 2004) y caballos (Gupta *et al.*, 1999) y coinciden con los resultados obtenidos en nuestra investigación. Con respecto al K, los datos presentados en la bibliografía varían. Así, se ha descrito una ausencia de variaciones en la calemia durante la deshidratación en seres humanos (Geelen *et al.*, 1984), caballos (Gupta *et al.*, 1999), toros (Rumsey y Bond, 1976) y un incremento de la calemia en gacelas adaptadas a zonas áridas (Mohamed *et al.*, 1988). En la presente investigación, hemos observado que los caballos DH tenían unos valores basales de K más elevados que los del grupo CTR. Se trata de un hallazgo no esperado, ya que la hipocalemia es una consecuencia común de la anorexia aguda o de la privación de comida en équidos (Muñoz *et al.*, 2003; 2006b; 2010c). Una posible explicación para estos resultados es que el efecto de la anorexia fue contrarrestado por la acción de la hemoconcentración por deshidratación y por la liberación del K desde las células debido al estrés del transporte hasta el lugar de la competición. Adicionalmente, la concentración de ALB superior en el grupo DH es compatible con deshidratación.

La respuesta del eje REN-ANG-ALD a la deshidratación en condiciones basales parece ser diferente según los autores consultados y según la especie estudiada. Una posible justificación sería la aplicación de diversos protocolos para inducir hipohidratación, tales como privación de agua, privación de comida y agua, calor, ejercicio en el calor, administración de diuréticos, combinación de varias de estas prácticas... Además, si bien el estrés hipovolémico agudo desencadena una activación del eje REN-ANG-ALD, junto con una secreción incrementada de AVP, una menor pérdida

de fluidos corporales resulta en patrones de secreción hormonal más inconsistentes (Espiner, 1987).

La deshidratación en dromedarios y en perros se ha asociado a una reducción del volumen plasmático, junto con una elevación de la AVP y de la actividad plasmática de la REN, sin variaciones significativas en la concentración de ALD (Thrasher *et al.*, 1984; Ben Goumi *et al.*, 1993). En seres humanos, la deshidratación inducida por la administración de diuréticos da lugar a un incremento de la actividad plasmática REN y de las concentraciones de ANG, ALD y AVP (Roy *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando la deshidratación se debió a la exposición al calor, la actividad plasmática REN aumentó, pero las concentraciones de ALD permanecieron invariables (Francesconi *et al.*, 1983; 1985).

En relación al caballo, Hollis *et al.* (2008) analizaron la respuesta endocrina a la hipovolemia en caballos adultos y potros durante una hospitalización, encontrando un patrón diferente según la edad. Así, los caballos adultos mostraron valores altos de ALD y AVP, que descendieron posteriormente tras una rehidratación intravenosa. Por el contrario, los potros deshidratados solo mostraron valores elevados de ALD, pero no de AVP e igualmente se apreció un descenso de ALD tras la rehidratación (Hollis *et al.*, 2008).

También se han observado modificaciones en el eje REN-ANG-ALD durante el ejercicio de resistencia. Muñoz *et al.* (2010c) describieron que las concentraciones de REN no se vieron afectadas de forma significativa por el ejercicio, mientras que las de ALD y AVP se incrementaron. Adicionalmente, los caballos con un grado de deshidratación más intensa, tuvieron valores superiores de ANG, ALD y AVP, si bien hubo una ausencia de diferencias significativas en la concentración de REN al comparar caballos euhidratados y deshidratados (Muñoz *et al.*, 2010c).

En la presente investigación, hemos hallado que las concentraciones séricas de REN no aparecen asociadas al estado hídrico del animal, ni en reposo, ni en respuesta al ejercicio de tiro y arrastre. Si bien este resultado podría estar asociado a la corta duración

del ejercicio realizado, en todos los casos menos de 5 minutos, hay que mencionar que tampoco hemos encontrado variaciones en este parámetro en caballos que compitieron sobre distancias de 90 km en un día y de 90 km/día durante dos días seguidos (Muñoz *et al.*, 2010c). Una explicación para estos resultados es que la mayoría de los autores determinan la actividad REN plasmática/sérica, no la concentración (McKeever *et al.*, 1991; 1992; Thrasher *et al.*, 1984; Ben Goumi *et al.*, 1993; Melin *et al.*, 1997; 2001; Roy *et al.*, 2001; Maresh *et al.*, 2004). La actividad REN plasmática determina la producción de ANG I. Sin embargo, existen otras investigaciones que han cuantificado la concentración de REN en lugar de su actividad y han descrito variaciones asociadas al estado hídrico. Por ejemplo, Sladek *et al.* (1981) y Di Nicolantonio y Mendelsohn (1986) describieron concentraciones REN incrementadas en ratas con deshidratación. En camellos durante un periodo de privación de agua de 8 a 10 días, se apreció un incremento leve de la concentración de REN (Finberg *et al.*, 1978).

Otro posible motivo de la falta de cambios significativos en la concentración de REN en nuestro estudio puede ser el mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por los niveles elevados de ANG o de AVP sobre la REN, como describieron Fagard *et al.* (1985). Las altas concentraciones de ANG o de AVP en nuestros caballos podrían haber actuado inhibiendo la síntesis y/o liberación de REN.

8.6.2.2. DIFERENCIAS ENTRE LOS GRUPOS CTR Y DH EN EJERCICIO Y RECUPERACIÓN

Como se esperaba, el ejercicio condicionó incrementos significativos de HTO, ALB, LA, Na, K, Cl y ANG en el grupo DH y de HTO, ALB, LA, Na y ALD en el grupo CTR. El incremento de ALB, Na, K y Cl se asocia a la deshidratación secundaria a la pérdida de fluidos debido a la evaporación sudorativa. En el caballo, la sudoración conlleva pérdidas importantes de Na, K y Cl, si la duración del ejercicio es moderada a prolongada (Dahlborn *et al.*, 1999; Kingston *et al.*, 1999; McCutcheon y Geor, 2000; 2010). En nuestro caso, observamos un incremento de Na, K y Cl asociado al ejercicio.

Posiblemente este se deba a que estos animales tuvieron una pérdida proporcional de agua superior a la de electrolitos, quizá relacionado con las condiciones ambientales, quizá en asociación con la reducida duración del ejercicio llevado a cabo.

El incremento experimentado por las concentraciones de ANG (grupo DH) y ALD (grupo CTR) es compatible con una activación del eje REN-ANG-ALD (McKeever *et al.*, 1991; 1992; 1993a,b; McKeever y Hinchcliff, 1995; Muñoz *et al.*, 2010a,b,c). Los 3 mecanismos principales implicados en la elevación de la REN durante un ejercicio y por tanto, en la activación del eje REN-ANG-ALD, son los siguientes: 1) Estimulación del nervio renal a través del sistema nervioso simpático; 2) Cambios en el flujo renal y en la presión en asociación con la función yuxtaglomerular; 3) Variaciones en las concentraciones de Na y Cl en el aparato yuxtaglomerular (McKeever *et al.*, 1991; 1992; McKeever y Hinchcliff, 1995; Muñoz *et al.*, 2010a). De esos tres factores, el primer activador del eje en ejercicio es el sistema nervioso simpático. Durante un ejercicio, existe una correlación entre la actividad REN y el incremento de la concentración de norepinefrina en la vena renal (Tidgren *et al.*, 1991). En un estudio simultáneo, hemos encontrado que el ejercicio de tiro y arrastre da lugar a una liberación incrementada de catecolaminas (Lucas, 2004; Muñoz *et al.*, 2008), si bien existe una ausencia de correlación significativa entre esta hormona y la REN. De igual modo, no hemos observado correlaciones significativas entre las concentraciones de Na y K y la REN en nuestra investigación. Además, a pesar del aumento de la natremia y de la calemia en nuestros caballos, no hemos detectado cambios significativos en la concentración sérica de REN.

Por otro lado, el incremento de ALD en respuesta al ejercicio se asume que está mediado por la liberación aumentada de ANG en respuesta a la activación del eje REN-ANG-ALD (Fagard *et al.*, 1985; Wade *et al.*, 1989; Wade and Freund, 1990; McKeever *et al.*, 1991; 1992; Muñoz *et al.*, 2007; 2010a). Los factores que determinan la liberación de ALD durante un ejercicio son: reducción de la natremia o incremento en las concentraciones sanguíneas de H, K, ACTH o incremento de la actividad REN (Melin *et al.*, 1980; Brandenberger *et al.*, 1989; Wade y Freund, 1990; McKeever y Hinchcliff,

1995; Richardson *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2010a,b). En la presente investigación, las concentraciones de Na se elevaron y por tanto, la reducción de la natremia no puede ser considerada como un estímulo primario para la liberación de ALD. Este dato coincide con lo descrito previamente para atletas equinos (McKeever *et al.*, 1991; 1992; McKeever y Hinchcliff, 1995; Muñoz *et al.*, 2010a,b). En segundo lugar, la calemia se incrementó en respuesta al ejercicio de tiro y arrastre y además, hemos encontrado una correlación positiva entre las concentraciones de K y ALD, si bien solo en el grupo CTR (Tablas 4 y 5). Adicionalmente, hemos visto que existen correlaciones positivas entre las concentraciones de LA y C y ANG y ALD (A. Muñoz, observaciones personales). En resumen, la activación del eje REN-ANG-ALD en los caballos de tiro y arrastre posiblemente se asoció a cambios en las concentraciones de K, al pH sanguíneo y la concentración de la ACTH, con una menor contribución de las concentraciones incrementadas de ALD.

Una interesante cuestión a elucidar es si las variaciones asociadas al ejercicio son de diferente magnitud si los individuos presentan un estado hídrico correcto o comprometido al inicio del ejercicio. Según Brandenberger *et al.* (1989) y Montain *et al.* (1997), el estado hídrico previo al ejercicio no influencia el grado de activación del eje REN-ANG-ALD cuando los individuos son sometidos a ejercicio físico en ausencia de rehidratación. Sin embargo, Francesconi *et al.* (1983) y Melin *et al.* (1997) encontraron que el incremento en la actividad REN plasmática y en las concentraciones de ANG y ALD son mayores en individuos que parten de un estado de hipohidratación-deshidratación. Del mismo modo, Melin *et al.* (1997) describieron que la hipohidratación produce incrementos progresivos de ALD en reposo y estas elevaciones persisten durante el ejercicio en condiciones de temperatura elevada. Más recientemente, Roy *et al.* (2001) encontraron resultados similares cuando el ejercicio se llevó a cabo tras 4 días de la administración de diuréticos. No conocemos la razón de estos resultados tan variados según los autores. Previamente, hemos observado que la respuesta de la AVP al ejercicio no es diferente entre caballos euhidratados y deshidratados (Muñoz *et al.*, 2011). Del mismo modo, en la presente investigación la mayor parte de los parámetros experimentó un incremento similar con el ejercicio en los grupos CTR y DH. Las únicas diferencias se

detectaron en la concentración de LA, que aumentó más intensamente en el grupo DH y en la concentración de ALD, que al contrario de lo esperado, experimentó una subida de mayor magnitud en el grupo CTR.

A pesar de que ninguno de los dos grupos (CTR y DH) tuvo acceso libre al agua o a la comida durante el periodo de recuperación, se observó un descenso significativo de las concentraciones de los marcadores del estado hídrico y de las hormonas del eje REN-ANG-ALD. Al inicio del ejercicio, existe un movimiento neto y rápido de fluidos desde el espacio intersticial y vasos linfáticos hacia el compartimento vascular, junto con una contracción esplénica. Estas circunstancias conllevan a un incremento inicial de la volemia. Seguidamente, se produce un descenso del volumen plasmático, debido a que el incremento de la presión arterial media y por tanto, de la presión hidrostática capilar que conllevan a una salida de agua desde el compartimento vascular (McKeever *et al.*, 1993a,b). Además de estos cambios hemodinámicos, se producen pérdidas de fluidos con la sudoración. Sin embargo, una vez que el ejercicio cesa, el equilibrio de las fuerzas de Starling desencadena un influjo de fluidos desde el compartimento extravascular hacia el intravascular (McKeever *et al.*, 1993a,b). Estas circunstancias fisiológicas pueden ser la explicación de la recuperación de las variables hídricas y electrolíticas en los 30 min posteriores al ejercicio, a pesar de que los animales no ingirieron agua ni comida durante este periodo.

8.7. CONCLUSIONES

Este primer estudio proporciona información sobre la regulación neurohormonal del estado hídrico y electrolítico en caballos que realizan ejercicios de tiro y arrastre, de corta duración (inferior a 5 min), con dos estados hidroelectrolíticos diferentes: con deshidratación hipertónica inducida por privación de agua y comida, y con euhidratación. Las principales conclusiones del estudio I son las siguientes:

Primera conclusión. Los caballos deshidratados y en comparación con los euhidratados, mostraron en reposo valores superiores de los biomarcadores de alteración hidroelectrolítica (valor hematócrito, concentración de albúmina, lactato, sodio, potasio y cloro) y de angiotensina II. Sin embargo, no existieron diferencias basales en las concentraciones de renina y aldosterona entre caballos con deshidratación y euhidratación.

Segunda conclusión. Tanto los caballos euhidratados como los deshidratados, experimentaron en respuesta al ejercicio de tiro y arrastre un incremento del valor hematócrito, concentraciones de albúmina, lactato y sodio. Por otro lado, el ejercicio condicionó una elevación significativa de angiotensina II en los caballos deshidratados y de aldosterona en los caballos euhidratados.

Tercera conclusión. A pesar de la diferencia de peso de los animales estudiados (menos de 350 kg, entre 351 y 450 kg y más de 450 kg), los cambios hidroelectrolíticos y de las concentraciones séricas de las hormonas implicadas en la regulación de la volemia y la presión sanguínea (renina, angiotensina II y aldosterona), durante el ejercicio, fueron similares entre las tres categorías de caballos.

Cuarta conclusión. A pesar de que ambos grupos de caballos iniciaron el ejercicio con un estado hídrico diferente (deshidratación vs. euhidratación), la respuesta a la prueba de tiro y arrastre fue de magnitud similar, con excepción de las concentraciones de lactato y aldosterona, que se elevaron más intensamente, en los caballos deshidratados y euhidratados, de forma respectiva.

8.8. RESUMEN

Concentraciones séricas de renina, angiotensina y aldosterona en caballos euhidratados y deshidratados durante un ejercicio de tiro y arrastre

Introducción. En atletas humanos, se ha confirmado que la deshidratación previa al ejercicio origina una mayor liberación de las hormonas encargadas del mantenimiento del estado hidroelectrolítico, como la aldosterona (ALD) y la arginina vasopresina. Esta respuesta no ha sido investigada en caballos de deporte. Por este motivo, la presente investigación analiza el efecto del estado hídrico antes del ejercicio sobre la respuesta hormonal a un ejercicio de tiro y arrastre en el caballo, comparando entre caballos euhidratados y con deshidratación hipertónica.

Objetivos. 1) Describir los cambios en las concentraciones de renina (REN), angiotensina (ANG) y ALD en caballos, en relación a la intensidad de ejercicio, estado hídrico y electrolítico; 2) Analizar si la respuesta de estas hormonas a un ejercicio difiere entre caballos euhidratados y deshidratados.

Hipótesis. 1) Las concentraciones séricas de REN, ANG y ALD serán superiores en caballos deshidratados; 2) Los caballos deshidratados experimentarán elevaciones más marcadas de estas hormonas durante y tras un ejercicio de tiro y arrastre.

Material y métodos. Se han estudiado 64 caballos machos, castrados y enteros, entrenados para tiro y arrastre y divididos en dos grupos según su estado hídrico: grupo control, CTR, euhidratados (n=11) y grupo deshidratado, DH, con deshidratación hipertónica por restricción de agua y comida (n=53). Además, según su peso corporal, los animales han sido divididos en tres categorías de peso: I (≤ 350 kg; n=3 para CTR; n=23 para DH), II (351-450 kg; n=3 para CTR; n=18 para DH) y III (≥ 451 kg; n=5 para CTR; n=12 para DH). Los animales recorrieron una pista de arena de playa de 60 m de longitud tirando un carruaje, cargado con 2, 2,25 y 2,5 veces su peso corporal para las categorías I, II y III. La pista de arena se dividió en cuatro áreas de 15 m, en cada una de las cuales el

animal hizo una parada obligatoria, que se incluyó como tiempo de carrera. El tiempo de ejercicio máximo permitido fue de 5 min. Se procedió a la extracción de sangre venosa en los siguientes tiempos: en reposo, antes del ejercicio (R), dentro de los 30 s iniciales tras concluir el ejercicio (E) y a los 5 (5REC), 10 (10REC), 15 (15REC) y 30 min (30REC) de recuperación. En la sangre venosa se midió el valor hematócrito (HTO), en plasma se cuantificaron las concentraciones de albúmina (ALB), Na, K, Cl, lactato (LA) y en suero, las concentraciones de renina (REN), angiotensina (ANG) y aldosterona (ALD).

Resultados. La diferencia de peso de los caballos (categorías I, II y III) apenas influyó los valores basales y la respuesta al ejercicio en los caballos estudiados. Los caballos de la categoría I presentaron concentraciones de LA superiores a los de la categoría III en reposo y valores HTO superiores a los de la categoría II en el tiempo E. En reposo, los caballos del grupo DH mostraron valores superiores a los del grupo CTR de HTO, ALB, LA, Na, K y ANG-II, sin existir diferencias en REN y ALD. El ejercicio de tiro y arrastre condición una elevación de HTO, ALB, LA y Na, tanto en los caballos deshidratados como en los euhidratados. Además, se observó un incremento con el ejercicio de K, Cl y ANG en los caballos deshidratados y de ALD en los caballos euhidratados. La elevación experimentada por los parámetros analizados fue de igual magnitud en los caballos de los grupos DH y CTR, con excepción del LA y de la concentración de ALD, que aumentaron más intensamente en los animales de los grupos DH y CTR, respectivamente.

Conclusión. Si bien la deshidratación hipertónica altera la concentración de las hormonas implicadas en la defensa del equilibrio hidro-electrolítico y de la presión sanguínea, el estado hídrico antes del ejercicio tiene una influencia muy limitada en la liberación de estas hormonas en caballos en respuesta a un ejercicio de tiro y arrastre de corta duración (inferior a 5 min).

PALABRAS CLAVE. Angiotensina. Aldosterona. Caballos. Deshidratación. Ejercicio. Renina.

8.9. SUMMARY

Serum renin, angiotensin and aldosterone concentrations in euhydrated and dehydrated horses during a pulling exercise

Background. It has been confirmed in human athletes that hypohydration- dehydration prior to the exercise leads to a greater rise in the hormones implied in the regulation of the hydration and electrolyte status, such as aldosterone (ALD) and arginine vasopressin. This fact has not been investigated in the sport horse yet. For that reason, the research reported here analyses the effect of the hydration status prior to exercise on the hormonal response to pulling exercises in horses, comparing between euhydrated and dehydrated horses.

Objectives. 1) To describe the changes in the concentrations of renin (REN), angiotensin (ANG) and ALD in horses in relation to exercise intensity, hydration and electrolyte status; 2) To analyze whether the response of these hormones to an exercise differs between euhydrated and dehydrated horses.

Hypothesis to test. 1) Serum concentrations of REN, ANG and ALD will be higher in dehydrated horses; 2) The dehydrated horses will experience a greater increase in response to exercise.

Material and methods. We studied a total of 64 male horses, stallions and geldings, trained for pulling exercises and divided into two groups according to the hydration status: control group (CTR, euhydrated; n=11) and dehydrated group (DH, with hypertonic dehydration after water and food privation; n=53). Further, according to their body weight (BW), the horses were divided into three BW categories: I (≤ 350 kg; n=3 for CTR; n=23 for DH), II (351-450 kg; n=3 for CTR; n=18 for DH) and III (≥ 451 kg; n=5 for CTR; n=12 for DH). The horses covered a 60 m track of sand beach pulling a carriage loaded with 2, 2.25 and 2.5 times their BW for the categories I, II and III respectively. The sand track was divided into four areas of 15 m each, where the animals had a

compulsory stop, which was included in the time of exercise. The maximal time of exercise allowed was of 5 min. We extracted blood samples in the following times: at rest, before the exercise, within the first 30 s after finishing the exercise and at 5, 10, 15 and 30 min of recuperation. The following parameters were measured: microhematocrit (HTO) in whole blood, albumin (ALB), Na, K, Cl plasma concentrations and serum concentrations of renin (REN), angiotensin (ANG) and aldosterone (ALD).

Results. BW of the horses (categories I, II and III) exerted a minor influence in the studied parameters. Horses of category I presented higher resting serum LA concentrations than those of category III and in addition, the horses of category I showed a higher exercise HTO than this of horses of category II. In resting conditions, horses of group DH had higher HTO, ALB, LA, Na, K, Cl and ANG values than the horses of group CTR, without significant differences in REN and ALD between groups. After exercise, both DH and CTR horses underwent an increase in HTO, ALB, LA and Na. Furthermore, K, Cl and ANG in group DH and ALD in group CTR rose with exercise. The increase experienced by the studied parameters in both groups of horses was of the same magnitude, with the exception of LA and ALD concentrations, that showed a greater rise in horses of group DH and CTR respectively.

Conclusion. Even though the hypertonic dehydration altered resting concentrations of the hormones implied in the acute and chronic defence of the hydration and electrolyte status and of the blood pressure, the hydration status prior to the exercise has a limited influence in the release of these hormones in response to a pulling exercise of short duration (less than 5 min) in horses.

KEY WORDS. Angiotensin. Aldosterone. Dehydration. Exercise. Horses. Renin

8.10. BIBLIOGRAFÍA

- ART T, DESMECHT D, AMORY H, DELOGNE O, BUCHET M, LEROY P, LEKEUX P (1990). A field study of post-exercise values of blood biochemical constituents in jumping horses: relationships with score, individual and event. *J. Vet. Med. A.* 37, 231-239.
- ATLAS SA (2007). The renin-angiotensin-aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J. Manag. Care Pharm.* 14, S9-S20.
- AYALA I, MARTOS NF, SILVAN G, GUTIERREZ-PANIZO C, CLAVEL JG, ILLERA JC (2012). Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Res. Vet. Sci.* 93(1), 103-107.
- BARTON MH, WILLIAMSON L, JACKS S, NORTON N (2003). Body weight, hematologic findings, and serum and plasma biochemical findings of horses competing in a 48-, 83- or 159-km endurance ride under similar terrain and weather conditions. *Am. J. Vet. Res.* 64, 746-753.
- BAYLY WM, KINGSTON J, BROWN JA, KEEGAN RD, GREENE SA, SIDES RH (2006). Changes in arterial, mixed venous and intraerythrocyte concentrations of ions on supramaximally exercising horses. *Equine Vet. J.* 36, 294-297.
- BEN GOUMI M, RIAD F, GIRY J, DE LA FARGE F, SAFWATE A, DAVICCO MJ, BARLET JP (1993). Hormonal control of water and sodium in plasma and urine of camels during dehydration and rehydration. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89(3), 378-386.
- BOLLAG WB (2014). Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Comp. Physiol.* 4(3), 1017-1055.
- BOUZEGRHANE F, THIBAUT G (2002). Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts?. *Cardiovasc. Res.* 53(2), 304-312.
- BRANDENBERGER G, CANDAS V, FOLLENIUS M, KAHN JM (1989). The influence of the initial state of hydration on endocrine responses to exercise in the heat. *Eur. J. Appl. Physiol.* 58, 674-769.
- BREWSTER UC, SETARO JF, PERAZELLA MA (2003). The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and

cardiovascular disease status. *Am. J. Med. Sci.* 326, 15-26.

BROWN NJ (2013). Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* 9(8), 459-469.

CARLSON GP, JONES JH (1999). Effects of furosemide on electrolyte and acid-base balance during exercise. *Equine Vet. J.* 30, 370-374.

CLARKE LL, ROBERTS MC, GRUBB BR, ARGENZIO RA (1992). Short-term effect of aldosterone on Na-Cl transport across equine colon. *Am. J. Physiol.* 262 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 31), pp. 939-946.

CLAYBAUGH JR, PENDERGAST DR, DAVIS JE, AKIBA C, PAZIK M, HONG SK (1986). Fluid conservation in athletes: responses to water intake, supine posture, and immersion. *J. Appl. Physiol.* 61, 7-15.

CONVERTINO VA (1991). Blood volume: its adaptation to endurance training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23, 1338-1348.

COOLEY JL, HINCHCLIFF KW, MCKEEVER KH, LAMB DR, MUIR WW 3rd (1994). Effect of furosemide on plasma atrial natriuretic peptide and aldosterone concentrations and renin activity in running horses. *Am. J. Vet. Res.* 55, 273-277.

DAHLBORN K, JANSSON A, NYMAN S, MORGAN K, HOLM L, RIDDERSTRALE Y (1999). Sweat production and localisation of carbonic anhydrase in the equine sweat gland during exercise at two ambient temperatures. *Equine Vet. J.* 30, 398-403.

DI NICOLANTONIO R, MENDELSON FA (1986). Plasma renin and angiotensin in dehydrated and rehydrated rats. *Am. J. Physiol.* 250(5 Pt2), R898-R901.

DOUMAS BT, WATSON WA, BIGGS HG (1971). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chem. Acta* 31(1), 87-96.

ECKER GL, LINDINGER MI (1995). Water and ion losses during the cross-country phase of eventing. *Equine Vet. J.* 20, 111-119.

ESPINER EA (1987). The effect of stress on salt and water balance. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1(2), 375-390.

FAGARD R, GRAUWELS R, GROESENEKEN D, LIJNEN P, STAESSEN J, VANKEES L, AMERY A (1985). Plasma levels of renin, angiotensin II and 6-ketoprostaglandin F1 alpha in endurance athletes. *J. Appl. Physiol.* 59(3), 947-952.

FIELDING CL, MAGDESIAN KG, RHODES DH, MEIER CA, HIGGINS JC

- (2009). Clinical and biochemical abnormalities in endurance horses eliminated from competition for medical complications and requiring emergency medical treatment: 30 cases (2005-2006). *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* 19(5), 473-478.
- FINBERG JP, YAGIL R, BERLYNE GM (1978). Response of the renin-angiotensin system in the camel to acute dehydration. *J. Appl. Physiol. Respir. Exerc. Physiol.* 44(6), 926-930.
- FRANCESCONI RP, SAWKA MN, PANDOLF KB (1983). Hypohydration and heat acclimation: plasma renin and aldosterone during exercise. *J. Appl. Physiol. Resp. Environm. Exerc. Physiol.* 55(6), 1790-1794.
- FRANCESCONI RP, SAWKA MN, PANDOLF KB, HUBBARD RW, YOUNG AJ, MUZA S (1985). Plasma hormonal responses at graded hypohydration levels during exercise-heat stress. *J. Appl. Physiol.* 59(6), 1855-1860.
- GARCÍA-ÁLVAREZ M, MARIK P, BELLOMO R (2014). Stress hyperlactacidemia: present understanding and controversy. *Lancet Diab. Endocrinol.* 2(4), 339-347.
- GEELEN G, KEIL LC, KRAUIK SE *et al.* (1984). Inhibition of plasma vasopressin after drinking in dehydrated humans. *Am. J. Physiol.* 249, R968-R971.
- GÓMEZ-DÍEZ M, MUÑOZ A, CABALLERO JM, RIBER C, CASTEJÓN F, SERRANO-RODRIGUEZ JM (2014). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of enalapril and its active metabolite, enalaprilat, at four different doses in healthy horses. *Res. Vet. Sci.* 97(1), 105-110.
- GROENENDYK S, ENGLISH PB, ABETZ I (1988). External balance of water and electrolytes in the horse. *Equine Vet. J.* 20, 189-193.
- GUPTA AK, MAMTA YP, YADOU MP (1999). Effect of feed deprivation on biochemical indices in equids. *J. Equine Sci.* 10, 33-38.
- GUTHRIE SP, CECIL SG, DARDEN EA (1982). Dynamics of renin and aldosterone in the thoroughbred horse. *Gen. Compar. Endocrinol.* 48, 296-299.
- GUTHRIE SP, CECIL SG, KOTCHEN TA (1980). Renin, aldosterone and cortisol in the thoroughbred horse. *J. Endocrinol.* 85, 49-53.
- HARRIS P, SNOW DH (1988). The effects of high intensity exercise on the plasma concentration of lactate, potassium and other electrolytes. *Equine Vet. J.* 20(2), 109-113.

- HARRIS P, SNOW DH (1992). Plasma potassium and lactate concentrations in thoroughbred horses during exercise of varying intensity. *Equine Vet. J.* 24(3), 220-225.
- HASSER EM, CUNNINGHAM JT, SULLIVAN MJ, CURTIS KS, BLAINE EH, HAY M (2000). Area postrema and sympathetic nervous system effects of vasopressin and angiotensin II. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27(5-6), 431-436.
- HESS TM, KRONFELD DS, CARTER RA, TREIBER KH, BYRD BM, STANIAR WB, SMITH LT, GAY LA, HARRIS PA (2006). Does usefulness of potassium supplementation depend on speed?. *Equine Vet. J.* 36, 74-79.
- HESS TM, KRONFELD DS, WILLIAMS CA, WALDRON JN, GRAHAM-THIERS PM, GREIWE-CRANDELL K, LOPES MA, HARRIS PA (2005). Effects of oral potassium supplementation on acid-base status and plasma ion concentrations of horses during endurance exercise. *Am. J. Vet. Res.* 66(3), 466-473.
- HESSELKILDE EZ, ALMIND MC, PETERSEN J, FLEHOJ M, PRESTEGAARD KF, BUHL R (2014). Cardiac arrhythmias and electrolyte disturbances in colic horses. *Acta Vet. Scand.* 56(1), 58.
- HOLLIS AR, BOSTON RC, CORLEY KT (2008). Plasma aldosterone, vasopressin and atrial natriuretic peptide in hypovolaemia: a preliminary comparative study of neonatal and mature horses. *Equine Vet. J.* 40(1), 64-69.
- HOUPT KA, EGGESTRON A, KUNKLE K, HOUPT TR (2000). Effect of water restriction on equine behaviour and physiology. *Equine Vet. J.* 32(4), 341-344.
- HUANG LL, NIKOLIC-PATERSON DJ, MA FY, TESCH GH (2012). Aldosterone induces kidney fibroblast proliferation via activation of growth factor receptors and P13k/MAPK signalling. *Nephron Exp. Nephrol.* 120(4), e115-122.
- HYYPÄ S, SAASTAMOINEN M, PÖSÖ AR (1996). Restoration of water and electrolyte balance in horses after repeated exercise in hot and humid conditions. *Equine Vet. J.* 22, 108-112.
- IGBOKWE IO (1993). Haemoconcentration in Yankasa sheep exposed to prolonged water deprivation. *Small Rum. Res.* 12(1), 99-105.
- JABER LS, HABRE A, RAWDA N, ABI SAID M, BARBOUR EK, HAMADELL SH (2004). The effect of water restriction on

- certain physiological parameters in Awassi sheep. *Small Rum. Res.* 54(1), 115-120.
- JANSSON A, JOHANNISSON A, KVART C (2010). Plasma aldosterone concentration and cardiovascular response to low sodium intake in horses in training. *Equine Vet. J.* 38, 329-334.
- KINGSTON JK, McCUTCHEON LJ, GEOR RJ (1999). Comparison of three methods for estimation of exercise-related ion losses in sweat of horses. *Am. J. Vet. Res.* 60(10), 1248-1254.
- KOKKONEN UM, PÖSÖ AR, HYYPPÄ S, HUTTUNEN P, LEPPALUOTO J (2002). Exercise-induced changes in atrial peptides in relation to neuroendocrine responses and fluid balance in the horse. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 49, 149-159.
- KRANT JA, MADIAS NE (2014). Lactic acidosis. *N Engl. J. Med.* 371(24), 2309-2319.
- LUCAS RG (2004). Adaptación sistémica al ejercicio físico en caballos de tiro y arrastre. Tesis Doctoral. Universidad Cardenal Herrera-CEU, Valencia.
- LUMBERS ER (1999). Angiotensin and aldosterone. *Regul. Pept.* 80, 91-100.
- MANSMANN RA, CARLSON GP, WHITE II NA, WILDE DW (1974). Synchronous diaphragmatic flutter in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165(3), 265-270.
- MARESH CM, GABAREE-BOULANT CL, ARMSTRONG LE, JUDELSON DA, HOFFMAN JR, CASTELLANI JW, KENEFICK RW, BERGERON MF, CASA DJ (2004). Effect of hydration status on thirst, drinking and related hormonal responses during low-intensity exercise in the heat. *J. Appl. Physiol.* 97(1), 39-44.
- MARTÍNEZ A, SCAGLIONE MCM, LUNEBURG CF, HERNANDEZ EA, ARANEDA OV, GONZALEZ MSL, ESTRADA NH, WHITE AO (2000). Cambios sanguíneos y sudorales en equinos sometidos a carreras de velocidad. *Av. Cienc. Vet.* 15, 19-30.
- MASRI M, FREESTONE JF, WOLHEIMER KJ, SHOEMAKER K (1990). Alterations in plasma volume, plasma constituents, renin activity and aldosterone induced by maximal exercise in the horse. *Equine Vet. J.* 9, 72-77.
- McCUTCHEON LJ, GEOR RJ (2000). Influence of training on sweating responses during submaximal exercise in horses. *J. Appl. Physiol.* 89(6), 2463-2471.
- McCUTCHEON LJ, GEOR RJ (2010). Effects of short-term training on thermoregulatory and sweat responses during

exercise in hot conditions. *Equine Vet. J.* 42(38), 135-141.

McGOWAN C (2008). Clinical pathology in the racing horse: the role of clinical pathology in assessment, fitness and performance in the racehorses. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* 24, 405-421.

MCKEEVER KH (1998). Effect of exercise on fluid balance and renal function in horses. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* 14, 23-44.

MCKEEVER KH (2002). The endocrine system and the challenge of exercise. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* 18, 321-353.

McKEEVER KH, GORDON MB (2004). Endocrine alterations in the equine athlete. En: *Equine Sports Medicine and Surgery. Basic and clinical sciences of the equine athlete* (Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, Eds). Saunders Co., Philadelphia, pp. 798-814.

MCKEEVER KH, HINCHCLIFF KW (1995). Neuroendocrine control of blood volume, blood pressure, and cardiovascular function in horses. *Equine Vet. J.* 18, 77-81.

MCKEEVER KH, HINCHCLIFF KW, COOLEY JL, LAMB DR (1993a). Furosemide magnifies the exercise-induced

elevation of plasma vasopressin concentration in horses. *Res. Vet. Sci.* 55, 101-105.

MCKEEVER KH, HINCHCLIFF KW, REED SM, ROBERTSON JT (1993b). Role of decreased plasma volume in hematocrit alterations during incremental treadmill exercise in horses. *Am. J. Physiol.* 265(2 Pt. 2), R404-R408.

MCKEEVER KH, HINCHCLIFF KW, SCHMALL LM, MUIR WW 3RD (1992). Changes in plasma renin activity, aldosterone, and vasopressin during incremental exercise in horses. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1290-1293.

MCKEEVER KH, HINCHCLIFF KW, SCHMALL LM, REED SM, LAMB DR, MUIR WW 3RD (1991). Tubular renal function in horses during submaximal exercise. *Am. J. Physiol.* 261, R553-R560.

MELIN B, ECLACHE JP, GEELEN G, ANNAT G, ALLEVARD AM, JARSAILLON E, ZEBIDI A, LEGROS JJ, GHARIB C (1980). Plasma AVP, neurophysin, renin activity, and aldosterone during submaximal exercise performed until exhaustion in trained and untrained men. *Eur. J. Appl. Occup. Physiol.* 44(2), 141-145.

MELIN B, JIMENEZ C, SAVOUREY G, BITTEL J, COTTET-EMARD JM, PEQUIGNOT JM, ALLEVAREL AM, GHARIB C (1997). Effects of hydration state

on hormonal and renal responses during moderate exercise in the heat. *Eur. J. Appl. Physiol.* 76(4), 320-327.

MELIN B, KOULMANN N, JIMENEZ C, SAVOUREY G, LAUNAY JC, COTTET-EMARD JM, PEQUIGNOT JM, ALLEVARD AM, GHARIB C (2001). Comparison of passive heat or exercise-induced dehydration on renal water and electrolyte excretion: the hormonal involvement. *Eur. J. Appl. Physiol.* 85(3-4), 250-258.

MESSER NT (1995). The use of laboratory test in equine practice. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* 11, 340-350.

MEYER H, COENEN M (1989). Influence of exercise on the water and electrolyte content of the alimentary tract. En: *Proceedings of the 11th Meeting of the Equine Nutrition Physiology Symposium*, pp. 3-7.

MEYER ND, BAYLY MW, SIDES RH, WARDROP KJ, SLINKER BK (2010). Changes in arterial, mixed venous and intraerythrocytic ion concentrations during prolonged exercise. *Equine Vet. J.* 38, 185-190.

MICHAUX JM, GIRAUD C, FRANCOIS B, DEMONCEAU T (1987). Measurement of blood aldosterone as an indicator of water and electrolyte equilibrium in the horse. En: *Quoi*

de neuf en matiere d'études et de recherches sur the cheval?, 13^a Journé d'étude, pp. 122-144.

MOGIELNICKI A, KRAMKOWSKI K, HERMANOWICZ JM, LESZCZYNSKA A, PRZYBOROWSKI K, BUCZKO W (2014). Angiotensin-(1-9) enhances stasis-induced venous thrombosis in the rat because of the impairment of fibrinolysis. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 15(1), 13-21.

MOHAMED SM, ALI BH, HASSAN T (1988). Some effects of water deprivation on dorcas gazelle (*Gazella dorcas*) in the Sudan. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 90(2), 225-228.

MONTAIN SJ, LAIRD JE, LATZKA WA, SAWKA MN (1997). Aldosterone and vasopressin responses in the heat: hydration level and exercise intensity effects. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29(5), 661-668.

MULLEN KR, KRAUS MS, DIVERS TJ (2014). ECG of the month: atrial fibrillation due to hypokalemia in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 244(6), 657-659.

MUÑOZ A, CUESTA I, RIBER C, GATA J, TRIGO P, CASTEJÓN FM (2006a). Trot asymmetry in relation to physical performance and metabolism in equine endurance rides. *Equine Vet. J.* 36, 50-54.

MUÑOZ A, ESGUEVA M, GÓMEZ-DÍEZ M, SERRANO-CABALLERO JM, CASTEJÓN-RIBER C, SERRANO-RODRIGUEZ JM (2016). Modulation of acute transient exercise-induced hypertension after oral administration of four angiotensin-converting enzyme inhibitors in normotensive horses. *Vet. J.* Epub ahead of print (doi: 10.1016/j.tvjl.2015.10.036).

MUÑOZ A, RIBER C, SATUÉ K, LUCAS RG, BENITO M (2003). Relationship between systemic adaptation to physical effort and plasma potassium in untrained and trained Andalusian and Angloarabian horses. *J. Equine Sci.* 14, 13-22.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN FM (2010a). Clinical applications of the renin-angiotensin-aldosterone-vasopressin axis in the horse and future directions for research. *J. Equine Vet. Sci.* 30(11), 607-616.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN FM (2010b). Muscle damage, hydration, electrolyte balance and vasopressin concentrations in successful and exhausted endurance horses. *Polish J. Vet. Sci.* 13(2), 373-379.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN FM, LUCAS RG, PALACIO J (2011). The effects of hypertonic dehydration

changes on renal function and arginine vasopressin in the horse during pulling exercises. *Vet. J.* 189, 83-88.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN-RIBER C, CASTEJÓN FM (2010c). Dehydration, electrolyte imbalances and renin-angiotensin-aldosterone-vasopressin axis in successful and unsuccessful endurance horses. *Equine Vet. J.* 38, 83-90.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, REQUENA F, CASTEJON-RIBER C, CASTEJÓN FM (2007). Concentraciones séricas de aldosterona en caballos con diferente rendimiento deportivo. *Rec. Vet.* II(8), 1-11.

MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, SATUÉ K, CASTEJÓN F (2008). Serum epinephrine, norepinephrine and cortisol in horses during pulling exercises of different loads. *Proceedings of the Annual Meeting of the European Society of Veterinary Clinical Pathology Society*, 10thEd, Barcelona, pp. 164-165.

MUÑOZ A, TRIGO P, SATUÉ K (2006b). Perfiles hematológicos y bioquímicos aplicados al caballo de deporte. Cambios con el ejercicio y el entrenamiento. *Equinus* 14, 39-51.

- MUTLU GM, FACTOR P (2004). Role of vasopressin in the management of septic shock. *Intensive Care Med.* 30, 1276-1291.
- NOSTELL K, FUNKQUIST P, NYMAN G, ESSEN-GUSTAVSSON B, CONNYSSON M, MUHONEN S, JANSSON A (2006). The physiological responses to simulated race tests on a track and on a treadmill in Standardbred trotters. *Equine Vet. J.* 36, 123-127.
- NYMAN S, JANSSON A, LINDHOLM A, DAHLBORN K (2002). Water intake and fluid shifts in horses: effects of hydration status during two exercise tests. *Equine Vet. J.* 34(2), 133-142.
- OÖPIK V, TIMPMANN S, HACKNEY AC, KADAK K, MEDIJAINEN L, KARELSON K (2010). Ingestion of sodium citrate suppresses aldosterone level in blood at rest and during exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 35(3), 278-285.
- OTTE M, SPIER A (2009). The renin-angiotensin-aldosterone system: approaches to cardiac and renal therapy. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 31, E1-E7.
- PARKER AJ, HAMLIN GP, COLEMAN CJ, FITZ PATRICK LA (2004). Excess cortisol interferes with a principal mechanism of resistance to dehydration in *Bos Taurus* steers. *J. Anim. Sci.* 82(4), 1037-1045.
- PEREZ IL, RECABARREN S, ISLAS A, CARDENAS H, MORA G, CANDIA B, IBAFIEZ M, HETZ E (1991). Cambios hematológicos y en los niveles de cortisol del caballo mestizo de tiro en respuesta a la tracción de carga. *Agro-Ciencia* 7, 23-31.
- PEREZ R, RECABARREN S, VALDÉS P, HETZ E (1992). Biochemical and physiological parameters and estimated work output in draught horses during pulling loads for long periods. *Vet. Res. Comm.* 16, 231-246.
- PORZIONATO A, MACCHI V, RUCINSKI M, MALENDOWICZ LK, DE CARO R (2010). Natriuretic peptides in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 280, 1-39.
- RICHARDSON A, WATT P, MAXWELL N (2009). The effect of hypohydration severity on the physiological, psychological and renal hormonal responses to hypoxic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 106(1), 123-130.
- ROBERT C, GOACHET AG, FRAIPONT A, VOTION DM, VAN ERCK E, LECLERC JL (2010). Hydration and electrolyte balance in horses during an endurance season. *Equine Vet. J.* 38, 98-104.
- ROSE RJ (1982). Hematological changes associated with endurance exercise. *Vet. Rec.* 110, 175-177.

- ROY BD, GREEN HJ, BURNETT M (2001). Prolonged exercise following diuretic-induced hypohydration effects on fluid and electrolyte hormones. *Horm. Metab. Res.* 33, 540-547.
- RUMSEY TS, BOND J (1976). Cardiorespiratory patterns, rectal temperature, serum electrolytes and packed cell volume in beef cattle deprived of feed and water. *J. Anim. Sci.* 42, 1227-1238.
- SCHOTT HC 2ND, BOHART GU, EBERHART SW (2002). Potassium and lactate uptake by noncontracting tissue during strenuous exercise. *Equine Vet. J.* 34, 532-538.
- SCHOTT HC 2nd, MARLIN DJ, GEOR RJ, HOLBROOK TC, DEATON CM, VINCENT T, DACRE K, SCHROTER RC, JOSE-CUNILLERAS C, CORNELISSE CJ (2006). Changes in selected physiological and laboratory measurements in elite horses competing in a 160 km endurance ride. *Equine Vet. J.* 36, 37-42.
- SCHOTT HC 2nd, McGLADE SK, MOLANDER HA, LEROUX AJ, HINES MT (1997). Body weight, fluid, electrolyte, and hormonal changes in horses competing in 50- and 100-mile endurance rides. *Am. J. Vet. Res.* 58(3), 303-309.
- SEALEY JE, LARAGH JH (1990). The integrated regulation of electrolyte balance and blood pressure by the renin system. En: *The regulation of sodium and chloride balance* (Seldin DW, Giebisch G, Eds.), Raven Press, pp. 37-42.
- SEGERVÄRD H, LAKKISTO P, FORSTEN H, IMMONEN K, KOSONEN R, PALOJOKI E, KANKURI E, HARJULA A, LAINE M, TIKKANEN I (2015). Effects of angiotensin II blockade on cardiomyocyte regeneration after myocardial infarction in rats. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 16(1), 92-102.
- SHIMOJO N, NAKA K, NAKALIMA C, YOSHIKAMA C, OKUDA K, OKADA K (1989). Test-strip method for measuring lactate in whole blood. *Clin. Chem.* 35(9), 1992-1994.
- SISSON DD (2004). Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.* 34, 1105-1126.
- SLADEK CD, McNEILL TH, GREGG CM, BLAIR ML, BAGGS RB (1981). Vasopressin and renin response to dehydration in aged rats. *Neurobiol. Aging* 2(4), 293-302.
- SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN MM (1999). The role of

metabolic profiles in sports horses. *World Equine Vet. Rev.* 4, 3-21.

SMITH CA, WAGNER PC (1985). Electrolyte imbalances and metabolic disturbances in endurance horses. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 7(10), S575-S585.

SNEDDON JC (1993). Physiological effects of hypertonic dehydration on body fluid pools in arid-adapted mammals. How do Arab-based horses compare?. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 104(2), 201-213.

SNEDDON JC, VAN DER WALT J, MITCHELL G, HAMMER S, TALJAARD JJ (1993). Effects of dehydration and rehydration on plasma vasopressin and aldosterone in horses. *Physiol. Behav.* 54(2), 223-228.

SNOW DH (1983). Physiological factors affecting resting haematology. En: *Equine Exercise Physiology* (Snow DH, Persson SGB, Rose RJ, Eds). Cambridge, Granta Editions, pp. 318-323.

SNOW DH, KERR MG, NIMMO MA, ABBOTT EM (1982). Alterations in blood, sweat, urine and muscle composition during prolonged exercise in the horse. *Vet. Rec.* 110, 377-384.

SPARKS MA, STEGBAUER J, CHEN D, GOMEZ JA, GRIFFITHS RC, AZAD HA,

HERRERA M, GURLEY SB, COFFMAN TM (2015). Vascular type 1A angiotensin II receptors control BP by regulating renal blood flow and urinary sodium excretion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26(12), 2953-2962.

STEFANSDOTTIR GJ, RAGNARSSON S, GUNNARSSON V, ROEPSTORFF L, JANSSON A (2015). A comparison of the physiological response to tölt and trot in the Iceland horse. *J. Anim. Sci.* 93(8), 3862-3870.

STOCKHAM SL (1995). Interpretation of equine serum biochemical profile results. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* 11(3), 345-350.

TAKAYANAGI T, KAWAI T, FORRESTER SJ, OBAMA T, TSUJI T, FUKUDA Y, ELLIOTT KJ, TILLEY DG, DAVISSON RL, PARK JY, EGUCHI S (2015). Role of epidermal growth factor receptor and endoplasmic reticulum stress in vascular remodeling induced by angiotensin II. *Hypertension* 65(6), 1349-1355.

THORNTON JR (1985). Hormonal responses to exercise and training. En: *Equine exercise physiology* (Rose RJ, Ed.). Saunders Co., Philadelphia, pp. 447-496.

THRASHER TN, WADE CE, KEIL LC, RAMSAY DJ (1984). Sodium balance and aldosterone during dehydration and

rehydration in the dog. *Am. J. Physiol.* 247(1 Pt. 2), R76-R83.

TIDGREN B, HJEMDAHL P, THEODORSSON E, NUSSBERGER J (1991). Renal neurohormonal and vascular responses to dynamic exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 70(5), 2279-2286.

TOFÉ E, MUÑOZ A, CASTEJÓN F, TRIGO P, CASTEJÓN-RIBER C, GÓMEZ-DÍEZ M, RIBER C (2013). Behaviour of the renin angiotensin aldosterone axis during exercise in euhydrated and dehydrated horses. *Res. Vet. Sci.* 95, 615-622.

VERDONK K, DANSER AH, VAN ESCH JH (2012). Angiotensin II type 2 receptor agonists: where should they be applied?. *Expert Opin. Investig. Drug* 21(4), 501-513.

VIU J, JOSE-CUNILLERAS E, ARMENGOU L, CESARINI C, TARANCON I, RIOS J, MONREAL L (2010). Acid-base imbalances during a 120 km endurance race compared by traditional and simplified strong ion difference methods. *Equine Vet. J.* 38, 76-82.

WADE CE, FREUND BJ (1990). Hormonal control of blood volume during and following exercise. En: *Perspective in exercise science and sports medicine*. Vol. 3. Fluid homeostasis during exercise (Gisolfi CV,

Lamb DR, Eds.). Carmel IN: Benchmark Press, 207-245.

WADE CE, FREUND BJ, CLAYBAUGH JR (1989). Fluid and electrolyte homeostasis during and following exercise: hormonal and non-hormonal factors. En: *Hormonal regulation of fluid and electrolytes* (Claybaugh JR, Wade CE, Eds.). New York: Plenum, 1-44.

WEBER KT (2001). Aldosterone in congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 345, 1689-1697.

WILLIAMS B, BASCHIERA F, LACY PS, BOTHA J, PRESCOTT MF, BRUNEL P (2013). Blood pressure and plasma renin activity responses to different strategies to inhibit the renin-angiotensin-aldosterone system during exercise. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 14(1), 56-66.

WILLIAMSON LH, ANDREWS FM, MAYKUTH PL, WHITE SL, GREEN EM (1996). Biochemical changes in three-day event horses at the beginning, middle and end of phase C and after phase D. *Equine Vet. J.* 22, 92-98.

WILLMORE JH, COSTILL DL (1994). Hormonal regulation of exercise. En: *Physiology of sport and exercise* (Willmore JH, Costill DL, Eds.), Human Kinetics, Champaign, IL, pp. 122-143.

WINTOUR EM, MORITZ K, BUTKUS A,
BAIRD R, ALBISTON A, TENNIS N
(1999). Ontogeny and regulation of the AT1
and AT2 receptors in the ovine fetal adrenal
gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 157, 161-170.

WONG DM, VO DT, ALCOTT CJ,
PETERSON AD, BROCKUS CW, HSU WH
(2008). Plasma vasopressin concentrations in
healthy foals from birth to 3 months of age. *J.
Vet. Intern. Med.* 22, 1259-1261.

ZAMBRASKI EJ (1990). Renal regulation of
fluid homeostasis during exercise. En:
*Perspectives in exercise science and sports
medicine. Vol 3, Fluid homeostasis during
exercise* (Gisolfi CV, Lamb DR, Eds.).
Carmel, IN: Benchmark, 245-280.

ZAMBRASKI EJ, TUCKER MS, LAKAS
CS GRASSL SM, SCANES CG. (1984).
Mechanism of renin release in exercising
dogs. *J. Appl. Physiol.* 61, 7-15

ZUCKER A, GLEASON SD, SCHNEIDER
EG (1982). Renal and endocrine response to
water deprivation in dogs. *Am. J. Physiol.*
242(3). R296-R302.



9. ESTUDIO II

**Testosterona, cortisol y cociente
testosterona/cortisol en caballos con
diferente estado hídrico durante un
ejercicio de tiro y arrastre**

9.1. INTRODUCTION

El estudio de las modificaciones experimentadas por las concentraciones sanguíneas de las hormonas implicadas en una actividad física es importante en la valoración de la respuesta adaptativa al ejercicio, al entrenamiento o a un tipo de competición determinada. La medición de las concentraciones de cortisol (C) y testosterona (T), así como el ratio testosterona/cortisol (T/C) se introdujo hace muchos años en medicina humana, para el estudio y prevención del ‘*over-reaching*’ y del sobreentrenamiento (Banfi y Dolci, 2006). El concepto de ‘*over-reaching*’ hace referencia a la realización de una actividad con una intensidad y duración suficientes para producir alguna lesión en el organismo, si bien se trata de un proceso reversible y que desaparece con el descanso. Por otro lado, el sobreentrenamiento es un síndrome bien categorizado en medicina humana (Angeli *et al.*, 2004; Cosca y Navazio, 2007; Kellman, 2010; Winsley y Matos, 2001). En caballos de deporte, si bien este síndrome no está tan estudiado, existe también información publicada al respecto (Hamlin *et al.*, 2002; Golland *et al.*, 2003; De Graaf-Roelfsema *et al.*, 2007; Rivero *et al.*, 2008; Te Pas *et al.*, 2013), si bien parece ser que en el caballo podrían existir dos síndromes de sobreentrenamiento diferentes, con predominio simpático y parasimpático, como ocurre en caballos de velocidad y de resistencia, de modo respectivo (Flaminio *et al.*, 1996).

Se considera que la concentración de T es un indicador de anabolismo, mientras que la concentración de C es un marcador de catabolismo. Por ello, la relación entre ambas hormonas, o cociente o ratio T/C se ha utilizado como un indicador del equilibrio hormonal anabólico-catabólico (Banfi *et al.*, 1993). Las variaciones del cociente T/C se han utilizado para el seguimiento deportivo en atletas humanos y para evitar sobreentrenamiento (Urhausen *et al.*, 1995; Banfi y Dolci, 2006; Gomes *et al.*, 2013;Gaviglio y Cook, 2014; Gaviglio *et al.*, 2015; Hayes *et al.*, 2015). El incremento de las concentraciones endógenas de T se ha asociado de forma positiva con el rendimiento deportivo en atletas humanos, particularmente en ejercicios explosivos (Cardinale y

Stone, 2006; Crewther *et al.*, 2009). Asimismo, la concentración de C se ha empleado para la valoración del rendimiento y comportamiento competitivo (Elias, 1981; Salvadora *et al.*, 1999). No obstante, la relación entre ambas hormonas o cociente T/C y el rendimiento adecuado en competición no está clara en personas (Booth *et al.*, 1989; González-Bono *et al.*, 1999).

Algunos estudios han confirmado que diferentes protocolos de ejercicio de resistencia resultan en aumentos agudos de T y C (Lac y Berthon, 2000; Elloumi *et al.*, 2003; Maresh *et al.*, 2006; Fry y Lohnes, 2010; Gaviglio *et al.*, 2015; Hayes *et al.*, 2015). Esta respuesta es variable, dando lugar a elevaciones o descensos del ratio T/C, en función de interacciones complejas entre diversas características del programa de entrenamiento, tales como intensidad, volumen, duración, periodos de descanso... y de las peculiaridades de cada individuo, como edad, sexo, nivel de entrenamiento, nutrición... (Volek *et al.*, 1997; Lac y Berthon, 2000; Elloumi *et al.*, 2003; Gaviglio *et al.*, 2015).

En el caballo, se ha estudiado la respuesta de las concentraciones de C a diferentes tipos de ejercicio, tales como ejercicios de resistencia (Snow y Rose, 1981; Jensen-Waern *et al.*, 1999; Janczarek *et al.*, 2013), salto de obstáculos (Cayado *et al.*, 2006; Cravana *et al.*, 2010), doma y ejercicios de diferente duración e intensidad (Desmecht *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1999; Cayado *et al.* 2006). Por el contrario, el efecto del ejercicio en las concentraciones circulantes de T no se ha estudiado en profundidad en el caballo. La mayor parte de las investigaciones sobre T en esta especie se han realizado con la finalidad de detectar de la administración de anabolizantes esteroides como técnica de dopaje (Soma *et al.*, 2008; 2012; Declodt *et al.*, 2015; Knych *et al.*, 2015) o en el ámbito de la reproducción (Knobbe *et al.*, 2011; Claes *et al.*, 2013; Dierks *et al.*, 2015). No obstante, en el año 1999, Golland *et al.* documentaron que las concentraciones de T se incrementaban significativamente tras un ejercicio máximo en machos Standardbred castrados. Años más tarde, Leleu y Haentjens (2010), encontraron que no existían diferencias significativas en las concentraciones de T entre caballos Standardbred con y sin sobreentrenamiento.

Por otro lado, se sabe que el estado hídrico es un determinante del éxito deportivo y dicho estado es capaz de alterar la respuesta endocrina al ejercicio en seres humanos (Roy *et al.*, 2001a,b) y en caballos (Kokkonen *et al.*, 2002). De hecho, se ha confirmado que la hipohidratación o deshidratación tiene efectos detrimentales sobre las adaptaciones hormonales durante el ejercicio, dando lugar a un incremento de las concentraciones de noradrenalina y C, una atenuación de la respuesta de la concentración de T al ejercicio y alteraciones importantes en el metabolismo de los glúcidos y lípidos (Hoffman *et al.*, 1994; Maresh *et al.*, 2006; Judelson *et al.*, 2008).

En este capítulo, se analizarán los cambios que experimentan las concentraciones de T y C y en el ratio T/C en caballos machos enteros, euhidratados y deshidratados tras un ejercicio de fuerza de tiro y arrastre y durante los 30 minutos iniciales de recuperación. Además, se comparará entre animales con diferente peso corporal y que arrastraron cargas distintas.

9.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

En este segundo estudio, se determinarán las concentraciones de T y de C en caballos de tiro enteros, antes, inmediatamente después de un ejercicio de tiro y arrastre y a diferentes tiempos durante los 30 minutos iniciales de una recuperación pasiva. Además, se calculará el cociente o ratio T/C en los diversos tiempos de muestra y finalmente, se comparará la respuesta de estas hormonas y de su ratio en dos grupos de animales con estado hídrico diferente, euhidratados y con deshidratación hipertónica. Los objetivos que se persiguen son los siguientes:

Primer objetivo. Analizar los cambios con el ejercicio y durante la recuperación en las concentraciones sanguíneas de testosterona (T) y cortisol (C), así como su cociente (T/C) en caballos machos enteros, entrenados para competiciones de tiro y arrastre, como indicadores de anabolismo y catabolismo de forma respectiva.

Segundo objetivo. Evaluar si, las modificaciones con el ejercicio de las citadas hormonas y de su cociente difieren en función del estado hídrico del animal.

Con ello se pretende profundizar en el conocimiento de la respuesta neuroendocrina al ejercicio de dos hormonas relacionadas con la movilización energética y analizar si dicha respuesta se ve modificada por un estado de hipohidratación antes del ejercicio en caballos, comprobando si dichas variaciones son similares a las descritas para la especie humana.

Las hipótesis que se han propuesto en este segundo estudio son las siguientes:

Primera hipótesis: Que el grupo de caballos que presenta deshidratación hipertónica, en comparación con los caballos con euhidratación, tendrán valores de C superiores e inferiores de T y ratio T/C en reposo, antes del ejercicio.

Segunda hipótesis. Que los caballos con mayor peso corporal y con deshidratación hipertónica experimentarán incrementos más intensos de C y descensos más marcados de T que los caballos con euhidratación.

9.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

9.3.1. RESPUESTA DE LA TESTOSTERONA AL EJERCICIO

La testosterona (T) o 17-hidroxi-4-andosteno-3-1, es una potente hormona anabólica, que ejerce sus efectos a través de receptores intracelulares, los cuales, al unirse a la T, actúan como reguladores de la actividad génica. Entre sus funciones principales, se encuentran la estimulación de la síntesis proteica (Florini, 1970) y la captación intramuscular de aminoácidos (Baulieu y Robel, 1970), incrementando por tanto la masa muscular y la fuerza (Grandys *et al.*, 2008; Sattler *et al.*, 2009). Además, la T posee efectos muy significativos sobre la producción de hematíes y sobre el hueso (Zitzmann y Niechslag, 2001). Los lugares principales de producción son los testículos en machos enteros y los ovarios y corteza adrenal en las hembras. Las células de Leydig, que poseen la mayor capacidad de producción de T, solo se encuentran en testículos y de ahí que las concentraciones circulantes de T sean 10 veces superiores en hombres que en mujeres. La T se sintetiza a partir del colesterol, a través de una serie de conversiones, catalizadas por enzimas específicas (Conley y Bird, 1997). Además, algunos de los productos intermediarios de estas rutas, tales como la progesterona, la dihidroepiandrosterona (DHEA) y la androstenodiona, poseen sus propias funciones biológicas.

En el caballo entero, los esteroides androgénicos incluyen la androstenodiona, dihidrotestosterona, DHEA, androstanediol y T, siendo ésta última la predominante (Ganjam *et al.*, 1973; Soma *et al.*, 2008; 2011). La forma más usual de medición es el radio-inmunoensayo, si bien no es tan específico como la medición directa mediante cromatografía líquida- espectrofotometría de masas, debido a la reacción cruzada con otros esteroides (Silberzahan *et al.*, 1988; Soma *et al.*, 2011).

En caballos enteros, con edades comprendidas entre 27 meses y 15 años, se han descrito concentraciones medias de T de 2000 pg/ml, medidas mediante radio-inmunoensayo (Inoue *et al.*, 1993; Soma *et al.*, 2008; 2011). Previamente, Cox *et al.*

(1973) describieron concentraciones comprendidas entre 65 y 1600 pg/ml en machos intactos y de $15,3 \pm 4,9$ pg/ml en machos castrados.

Por otro lado, se ha mostrado que los niveles basales de T presentan variaciones estacionales, con las concentraciones más bajas en el mes de enero (200 ± 100 pg/ml) y las más elevadas en abril (1400 ± 300 pg/ml) (Kirkpatrick *et al.*, 1977; Aurich *et al.*, 2003). Igualmente, se han observado variaciones diurnas, con las concentraciones más bajas a las 18:00 h (Ganjam y Kenney, 1975). Los valores basales normales de T en machos enteros se obtienen a partir de los 16 meses de edad, si bien parece existir un incremento asociado a la edad (Johnson *et al.*, 1991; Inoue *et al.*, 1993; Soma *et al.*, 2008; 2011).

No obstante, hay que tener en cuenta que existen notables variaciones individuales en la concentración de T, así como a lo largo del año, siguiendo un patrón general de aumento de tamaño testicular y de las concentraciones de T cuando los caballos se encuentran expuestos a hembras y durante la época de cubrición (McDonell y Murray, 1995).

El efecto del ejercicio sobre las concentraciones de T en el caballo no ha sido analizado en profundidad. Golland *et al.* (1999) observaron un incremento de T en machos castrados en respuesta a un ejercicio máximo. Además, describieron que el ejercicio altera las concentraciones basales de T durante 26-32 h post-ejercicio. Más recientemente, Soma *et al.* (2011) documentaron que los caballos trotones Standardbred presentan niveles basales de T inferiores a los Pura Sangre Inglés, ambos machos enteros. Según estos autores, estos resultados se asocian a la mayor intensidad de competición, y una carga aeróbica superior durante el ejercicio en trotones. De hecho, los niveles inferiores de T se hallaron en los caballos de un hipódromo que competían con mayor frecuencia, cada 7-10 días. Parece ser, por tanto, que un entrenamiento intenso, con competiciones continuadas, podría reducir las concentraciones de T en caballos, de igual forma a lo descrito para seres humanos (Soma *et al.*, 2011).

En personas, la información sobre este tema es mucho más amplia. Así, se ha analizado el efecto del ejercicio, de la competición deportiva y del entrenamiento sobre la

liberación de esta hormona. Se dispone de datos sobre las concentraciones de T durante y tras diversos tipos de competiciones, tales como ciclismo (Hoogeveen y Zonderland, 1996), maratón (Maron *et al.*, 1977; Fahrner *et al.*, 1995; Lac y Berthon, 2000; Daly *et al.*, 2005), levantamiento de peso (Passelergue *et al.*, 1995; Passelergue y Lac, 1999; Crewther y Christian, 2010), judo (Papacosta *et al.*, 2015), triatlón (Urhausen *et al.*, 1987a), remo (Urhausen *et al.*, 1987b), rugby (Cunniffe *et al.*, 2010; Crewther *et al.*, 2013), tenis (Gomes *et al.*, 2013), baloncesto (Ponce-González *et al.*, 2015), entre otras.

En ejercicios de intensidad creciente, realizados en cinta rodante y a intensidades de 30, 45, 60, 75 y 90% del consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}), se ha observado un incremento de los niveles plasmáticos de T, de forma proporcional a la intensidad de esfuerzo, con un pico máximo al final del ejercicio. Sin embargo, este aumento fue proporcionalmente igual en magnitud a la reducción del volumen plasmático, lo cual inicialmente reduce la importancia de este hallazgo (Wilkerson *et al.*, 1980).

Se ha documentado que los atletas humanos entrenados para resistencia presentan concentraciones basales inferiores de T en comparación con personas sedentarias de la misma edad y sexo (Wheeler *et al.*, 1984; 1991; Hackney *et al.*, 1989; 1997; 1998).

9.3.2. RESPUESTA DEL CORTISOL AL EJERCICIO

El principal glucocorticoide secretado por la glándula adrenal es el cortisol (C), si bien también se detectan concentraciones bajas de cortisona, corticosterona y deoxicorticosterona en plasma (Dickson, 1970; Thornton, 1985; Wilmore y Costill, 1994). Thornton (1985) encontró que las concentraciones de deoxicorticosterona eran muy reducidas en équidos. Las concentraciones de C, cortisona y corticosterona aparecen en una relación 16:8:0,5 en el plasma, por lo que la mayoría de las investigaciones se han centrado en el C (Dickson, 1970; Thornton, 1985). Esta hormona experimenta variaciones diurnas, con las concentraciones superiores al inicio de la mañana, entre las 6:00 y 11:00 hrs y concentraciones inferiores al final de la tarde y noche (Flisinska-

Bojanowska *et al.*, 1991; 1992; Irvine y Alexander, 1994). En yeguas Pura Raza Española se han descrito valores basales comprendidos entre 36 y 81 nmol/l (Satué *et al.*, 2007). Más recientemente, se han presentado medias comprendidas entre $59,32 \pm 16,18$ y $85,39 \pm 14,31$ ng/ml en potros Pura Raza Españoles con edades inferiores al año (Muñoz *et al.*, 2012).

Los glucocorticoides se han considerado como hormonas de estrés, si bien existen muchas situaciones normales, no categorizadas como estrés, que dan lugar a liberación de C. De hecho, la magnitud de la liberación de esta hormona no debe ser usada para valorar si una alteración fisiológica puede ser clasificada como una mera perturbación o como un agente estresante más peligroso. No obstante, se han documentado concentraciones elevadas en caballos con patologías, fundamentalmente de origen agudo (Ayala *et al.*, 2001). Por el contrario, en los últimos años, se ha defendido que, los potros neonatos con sepsis muestran un cierto grado de insuficiencia adrenal, con el consiguiente descenso en las concentraciones circulantes de C, a pesar de presentar una elevación de ACTH (Hurcombe *et al.*, 2008; Hart *et al.*, 2011). Por tanto, la liberación de C permite a un individuo tolerar y adaptarse a diversos retos homeostáticos, que se producen de forma diaria (Irvine y Alexander, 1994). Asimismo, se ha documentado que el C se eleva en respuesta a un estrés térmico, de modo que podría ser un índice muy sensible del grado de tolerancia al calor (Williams *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista del ejercicio y para conseguir o mantener la homeostasis interna, los efectos funcionales del C se pueden resumir en dos grandes categorías: movilización de los sustratos energéticos y modulación de la respuesta inmune. El C actúa en la movilización de los sustratos energéticos al favorecer la gluconeogénesis y la lipólisis de los ácidos grasos libres (Wilson *et al.*, 1991; Keadle *et al.*, 1993; Horohov *et al.*, 1999; Marc *et al.*, 2000; Cayado *et al.*, 2006; Malinowski *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, reduce la utilización de glucosa por parte de algunos tejidos, con el consiguiente efecto de ahorro, quedando disponible este sustrato para su consumo en el sistema nervioso central (Irvine y Alexander, 1994; McKeever y Gordon, 2004; Hyyppä, 2005).

Se podría especular que esta acción retrasaría el inicio de la fatiga central que se produce en el ejercicio de resistencia, cuando los niveles de glucosa en sangre descienden.

Por otro lado, el C también da lugar a un incremento en el catabolismo proteico, con la liberación de aminoácidos, que quedan disponibles para el ejercicio. Los aminoácidos durante una actividad física, si bien pueden metabolizarse como fuente energética, su principal función es actuar en la reparación de tejidos y en la síntesis de enzimas que intervienen en diversas vías metabólicas celulares (Cayado *et al.*, 2006; Malinowski *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2007).

El segundo grupo de funciones del C en el ejercicio es la modulación de la función inmune, actuando como agente anti-inflamatorio y suprimiendo la respuesta inmune (Wong *et al.*, 1992; Cayado *et al.*, 2006; Malinowski *et al.*, 2006). De forma teórica, estas acciones son beneficiosas durante un entrenamiento. Se necesita una sobrecarga ligera en intensidad, duración o resistencia durante un entrenamiento para estimular la respuesta adaptativa. Las disrupciones leves de la función y estructura celular muscular resultan en remodelación, con captación de substratos y deposición, aumentando la capacidad funcional celular. La supresión de la respuesta inmune originada por el C proporciona un ambiente permisivo que tolera ciclos controlados de lesión muscular, necesarios para la remodelación asociada al entrenamiento (Malinowski *et al.*, 2006; Leleu y Haentjens, 2010; Schmidt *et al.*, 2010).

Numerosos estudios han confirmado que el C se eleva en respuesta a diversos tipos de ejercicios y competiciones en el caballo, tales como ejercicios de trekking (Medica *et al.*, 2010), resistencia (Snow y Rose, 1981; Rose *et al.*, 1983; Robson *et al.*, 2003; Janczarek *et al.*, 2013), salto de obstáculos (Cayado *et al.*, 2006; Cravana *et al.*, 2010), doma clásica (Cayado *et al.*, 2006), reining (Casella *et al.*, 2015), en respuesta a un ejercicio programado (Marc *et al.*, 2000) o comparando diversos tipos de actividades físicas (Desmecht *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1999). El grado de liberación del C durante el ejercicio está condicionado en mayor grado por la duración del ejercicio que por su intensidad. Por ejemplo, Linden *et al.* (1991) encontraron concentraciones muy elevadas de C tras pruebas de resistencia, mientras que el incremento fue leve a moderado tras

pruebas de salto de obstáculos, cross-country, carreras de velocidad al galope y al trote. Adicionalmente, durante un ejercicio breve de intensidad máxima, el C no parece estar relacionado con la intensidad de trabajo ni tampoco con la acumulación sanguínea de lactato. Los valores máximos se han observado dentro de los 5 a 30 min iniciales tras concluir el ejercicio máximo (Jiménez *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1999).

Por otro lado, un incremento excesivo en las concentraciones post-ejercicio de C puede indicar que el esfuerzo realizado ha sido demasiado intenso (Marc *et al.*, 2000; Hamlin *et al.*, 2002; Leleu y Haentjens, 2010). Igualmente, una recuperación prolongada de las concentraciones de C o bien unos niveles inapropiadamente elevados o reducidos, se consideran marcadores de sobreentrenamiento o de una adaptación incorrecta al entrenamiento en el caballo (Marc *et al.*, 2000; Hamlin *et al.*, 2002; Leleu y Haentjens, 2010). Como se ha citado con anterioridad, el C posee un efecto permisivo beneficioso para la adaptación al entrenamiento, al reducir la respuesta inflamatoria e inmune al ejercicio intenso (Rossdale *et al.*, 1982; Horohov *et al.*, 1999). De hecho, se han llevado a cabo investigaciones que han medido las concentraciones de C durante un periodo de tiempo prolongado, tras el ejercicio (Toutain *et al.*, 1995; Lassourd *et al.*, 1996; Popot *et al.*, 1997). Estos experimentados demostraron que el ejercicio provoca un aumento de hasta 6 veces la secreción de C por parte de las glándulas adrenales y un incremento de 2-3 veces en las concentraciones circulantes de C. De igual modo, las concentraciones de C en orina también se elevan, hasta 3 veces sobre los niveles basales (Ralston *et al.*, 1988; Hagedorn y Schulz, 1997; Popot *et al.*, 1997). Las concentraciones urinarias de C recuperan sus valores de reposo a las 10 hrs post-ejercicio (Toutain *et al.*, 1995; Lassourd *et al.*, 1996; Popot *et al.*, 1997). Los autores también han descrito un incremento muy significativo en el aclaramiento hepático del C.

Finalmente, parece ser que el entrenamiento podría afectar la respuesta del C al ejercicio, de modo que los caballos entrenados alcanzarían antes el pico o concentración máxima de C y tendrían una eliminación post-esfuerzo más rápida (Cayado *et al.*, 2006; Malinowski *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2010). De forma general, las concentraciones máximas de C se alcanzan a los 30 min de concluir el ejercicio (Desmetch *et al.*, 1996;

Kurosawa *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1999; Cayado *et al.*, 2006; Malinowski *et al.*, 2006). En la tabla 6 se presentan las concentraciones de C descritas por varios autores en ejercicios de diversa intensidad.

Tabla 6. Concentraciones de cortisol descritas por varios autores en caballos tras diferentes tipos de ejercicio

Autores	Tipo de ejercicio	Reposo	Tras ejercicio
Kurosawa <i>et al.</i>, 1998	Incremental en cinta rodante, hasta la fatiga	36,5±8,6 ng/ml	47,1±7,7 ng/ml
Snow y Rose, 1981	Resistencia, 80 km	176±15 nmol/l	440±12 nmol/l
Desmetch <i>et al.</i>, 1996	Resistencia, 44 km	99,1±13,2 nmol/dl	250 nmol/dl

9.3.3. COCIENTE TESTOSTERONA/CORTISOL (T/C) EN EL EJERCICIO

El cociente T/C es considerado como un marcador del grado de estrés asociado al ejercicio (Adlercreutz *et al.*, 1986; Kraemer *et al.*, 1992; 1998; Gomes *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Papacosta *et al.*, 2015; Mohr *et al.*, 2016). La variación de este cociente con el ejercicio no está clara en atletas humanos, posiblemente debido a la influencia de numerosos factores que determinan la evolución de ambas hormonas, T y C. Dentro de estos factores, hay que considerar la cantidad de masa muscular que interviene en el ejercicio (Ahtlainen *et al.*, 2003), su intensidad y volumen (Ahtlainen *et al.*, 2003), presencia o ausencia de periodos de reposo, edad y experiencia de entrenamiento y competición (Kraemer *et al.*, 1992; 1998; Fry y Lohnes, 2010).

Se ha sugerido que, aquellos ejercicios que requieren la intervención de una gran masa muscular, a intensidad elevada, inducen un incremento de las concentraciones de T, superior al aumento de C, de modo que el cociente T/C se eleva (Kraemer *et al.*, 1998; McCall *et al.*, 1999; Fry y Lohnes, 2010). Por el contrario, los ejercicios de larga duración inducen un incremento más pronunciado de C, cuyas concentraciones aumentan

en función del producto intensidad x duración. La concentración de T, si bien se eleva al inicio de la competición, se produce posteriormente un descenso, si la duración del ejercicio o de la competición, supera las 3 h. De este modo, una competición o una sesión de ejercicio de duración superior a las 3 h, resulta en un descenso del cociente T/C (Guglielmi *et al.*, 1984). No obstante, también se ha descrito que el inicio de la reducción de las concentraciones de T se produce a partir de la 1:30 h de maratón (Jensen *et al.*, 1991) y en otros casos, incluso desde el comienzo de la competición (Lac y Berthon, 2000). El descenso del cociente T/C refleja un estado anabólico durante e inmediatamente tras la carrera. También se ha presentado un descenso del cociente T/C en ultramaratón (Kupchak *et al.*, 2014) y tras competiciones sobre 5000 m (Li *et al.*, 2015),

Por otro lado, se suele encontrar un aumento de este cociente durante el periodo de recuperación, posiblemente como reflejo de los intentos de restauración de la homeostasis alterada durante el ejercicio. De este modo, Lac y Berthon (2000) observaron un aumento de T y una reducción de C, con una elevación del cociente T/C durante los días posteriores a una maratón, sugiriendo una tendencia anabólica (Lac y Berthon, 2000). Igualmente, Elloumi *et al.* (2003) observaron que la elevación del cociente T/C persistía durante 5 días tras una competición de rugby. Este resultado les llevo a concluir que no se debería competir antes de 7 días tras una competición previa, por una recuperación incompleta. Por tanto, este cociente también se puede utilizar para evaluar el grado de estrés de un atleta durante la temporada de competición (Filaire *et al.*, 2001; Doan *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2013; Papacosta *et al.*, 2015) y su grado de recuperación tras cada sesión de entrenamiento o competición (Bobbert *et al.*, 2012; Kupchak *et al.*, 2014; Wahl *et al.*, 2013; Mohr *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que la manipulación farmacológica de los niveles circulantes de C daba lugar a descensos en la concentración de T circulante (Bambino y Hsueh, 1981; Comming *et al.*, 1983). Con esta premisa, varios autores han intentado describir las fluctuaciones de la concentración de T durante diversos tipos de ejercicios físicos. De este modo, Brownlee *et al.* (2005) encontraron una correlación negativa entre T y C en las muestras obtenidas durante el periodo de recuperación, pero no en las muestras de

reposo. Este hallazgo de una relación negativa entre ambas hormonas cuando el C está elevado (se determinaron concentraciones de hasta un 160% superiores a las basales), sugeriría que se necesita lograr un nivel crítico de C para que interfiere con los niveles de T (Brownlee *et al.*, 2005; Daly *et al.*, 2005). Si bien esta correlación inversa entre T y C se había descrito previamente (Opstad, 1992; Hoogeveen y Zonderland, 1996; Nindl *et al.*, 2001), estas investigaciones se basaron en un número muy limitado de muestras o bien se describió una relación en una base observacional, sin estudio estadístico.

Si bien se han propuesto diversas hipótesis para explicar estos datos, el mecanismo fisiopatológico no se ha aclarado completamente. Cumming *et al.* (1983) examinaron la respuesta de la hormona luteinizante (LH), prolactina y T total tras la administración de C. Encontraron que, mientras que la T descendió, no hubo cambios en la LH o en la prolactina, lo cual parece indicar que el efecto del C sobre la producción de T fue a nivel testicular y no en los componentes regulatorios endocrinos centrales, es decir, en el eje hipotalámico-hipofisario. No obstante, estos autores no midieron la frecuencia o la amplitud de pulso, de forma que la influencia de un componente central no pudo ser completamente descartada como hipótesis (Cumming *et al.*, 1983). Cumming *et al.* (1983) especularon que el C altera el proceso de esteroidogénesis testicular en las células de Leydig, quizá por inhibición enzimática. Varios modelos experimentales previos soportan esta conjetura. Bambino y Hsueh (1981) encontraron un efecto inhibitorio directo de dosis farmacológicas de C infundidas, sobre la actividad del receptor LH y sobre el contenido testicular en ratas. De forma específica, estos autores propusieron que niveles altos de C alterarían la unión de la LH en los testículos y el proceso de esteroidogénesis. Posteriormente, estos mismos autores indicaron que quizá, la producción testicular de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) y la actividad de la enzima 17- α -hidrolasa se vieron suprimidas por el C (Welsh *et al.*, 1982). Igualmente, otros investigadores han llegado a la misma conclusión, es decir, la actividad enzimática de la esteroidogénesis para la síntesis de T dentro del testículo se altera (Hackney y Dobridge, 2003).

Curiosamente, la correlación entre la T y el C se hace positiva en las muestras en recuperación (Lac y Berthon, 2000; Elloumi *et al.*, 2003; Brownlee *et al.*, 2005; Daly *et al.*, 2005). La explicación fisiológica es incierta, si bien existen varias posibilidades para estos resultados. En primer lugar, es posible que un incremento de T libre sea el resultado de un aumento de la contribución adrenal a la T circulante. En respuesta a un estrés físico, la glándula adrenal se vería estimulada para la producción de C. El C y la T se sintetizan en la misma cascada de reacciones en la glándula adrenal (Kroboth *et al.*, 1999). Por este motivo, cuando la glándula adrenal se encuentra estimulada para producir C, posiblemente sintetice T de forma simultánea, con un aumento paralelo de ambas hormonas.

En segundo lugar, la T puede ser transportada en sangre unida a una globulina y a otras proteínas transportadoras, como es la ALB, mientras que el C es transportado por la globulina de unión al C. Debido a que el C y la T son producidos a partir de un mismo precursor, son hormonas muy similares estructuralmente. Por tanto, existe una posibilidad de que una elevación del C sanguíneo cause una disociación de la T de sus proteínas transportadoras, al competir por las zonas de unión (Rossner, 1990; Obminiski y Stupnicki, 1996; Brownlee *et al.*, 2005; Daly *et al.*, 2005).

9.3.4. INFLUENCIA DEL ESTADO HÍDRICO SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE TESTOSTERONA, CORTISOL Y COCIENTE T/C

El estado hídrico, determinante del rendimiento deportivo, también puede modular y alterar la respuesta endocrina al ejercicio (Francesconi *et al.*, 1984; Kraemer y Ratamess, 2005; Maresh *et al.*, 2006; Judelson *et al.*, 2008). En atletas humanos, se ha analizado el efecto de la euhidratación y la hipohidratación- deshidratación sobre las concentraciones de T, C y ratio T/C, bajo la premisa de que, si la deshidratación ejerce una influencia perjudicial sobre la respuesta hormonal, el equilibrio hídrico adquiere una gran relevancia en aquellas poblaciones que están sometidas a una hipohidratación

crónica, tales como atletas que entrenan, compiten o realizan ejercicios en condiciones calurosas o individuos geriátricos (Judelson *et al.*, 2008).

En relación a las concentraciones de T, diversos autores han documentado una ausencia de cambios en esta hormona en estados de hipohidratación, tanto durante ejercicios de baja intensidad (Hoffman *et al.*, 1994; Kenefick *et al.*, 1998; Jürimäe y Jürimäe, 2001), como durante ejercicios a intensidades altas (Mareš *et al.*, 2006). De igual modo, Judelson *et al.* (2008) tampoco evidenciaron diferencias entre individuos deshidratados y euhidratados en las concentraciones de T durante ejercicios de resistencia. Sin embargo, estos autores observaron que el área de la concentración de T bajo la curva era inferior en estados de deshidratación. En base a estos datos, sugirieron que, la hipohidratación atenúa el incremento inducido por el ejercicio de resistencia en la concentración de T. Además, esta reducción en T se produjo junto con un incremento de los niveles de catecolaminas. Se ha documentado que las catecolaminas estimulan la síntesis y liberación de T (Hoffman *et al.*, 1994; Fenske 1997). En resumen, la deshidratación podría haber limitado este efecto y haber modulado la respuesta de la T al ejercicio, al estimular la secreción de insulina o de C, hormonas que se asocian a una reducción en la secreción y síntesis de T (Judelson *et al.*, 2008).

Las concentraciones de C se ven afectadas por el estado hídrico previo al ejercicio (Francesconi, 1988; Melin *et al.*, 1988), por la ingestión de agua u otros fluidos durante el ejercicio (Francesconi *et al.*, 1978; Francis, 1979; Brandenberger *et al.*, 1986) y por el nivel de deshidratación alcanzado durante una actividad física (Francesconi *et al.*, 1985; Melin *et al.*, 1988; Hoffman *et al.*, 1994). De este modo, se ha demostrado que la ingestión de agua durante el ejercicio limita el incremento de C, en comparación con la restricción de agua (Francesconi *et al.*, 1978; Brandenberger *et al.*, 1986; 1989). Sin embargo, Hoffman *et al.* (1994) no hallaron diferencias en las concentraciones basales de C en individuos deshidratados y euhidratados. Según estos autores, los individuos aptos físicamente y bien entrenados, toleran mejor el ejercicio en el calor y el grado de deshidratación, sin desencadenar una respuesta de los glucocorticoides, al contrario que los individuos menos entrenados. No obstante, esta respuesta del C al estado de

hidratación antes y durante el ejercicio parece venir condicionada por el tipo de actividad realizada. Hoffman *et al.* (1997) describieron un descenso de los niveles sanguíneos de C tras un ejercicio de corta duración y alta intensidad. Maresh *et al.* (2006) no encontraron diferencias en la respuesta del C al ejercicio en sujetos con diferente estado hídrico. Maresh *et al.* (2006) hipotetizaron que, el descenso de C a consecuencia de un ejercicio intenso y de corta duración, se ve contrarrestado por la exacerbación de la liberación de C por la deshidratación. Como consecuencia de estas acciones antagónicas, no se detectarían variaciones en las concentraciones de C. Por el contrario, en ausencia de esta inhibición, los niveles sanguíneos de C se habrían visto afectados significativamente por la deshidratación.

En definitiva, en atletas humanos, se acepta que la deshidratación antes y durante el ejercicio estimula la liberación de hormonas catabólicas, fundamentalmente en respuesta al aumento de la temperatura corporal y por la mayor demanda cardiovascular resultante del descenso del volumen plasmático (Roy *et al.*, 2001a,b; Mitchell *et al.*, 2002; Judelson *et al.*, 2008).

En animales, si bien no se ha analizado aún la influencia del estado hídrico en las concentraciones de C en ejercicio, sí se ha descrito una liberación incrementada de esta hormona en individuos en varias situaciones de deshidratación, tales como en ovejas y vacas con restricción de agua durante el transporte (Hogan *et al.*, 2007) y en caballos durante un transporte de larga duración (Friend, 2000). Asimismo, se ha descrito el mecanismo de interferencia entre el C y la deshidratación en vacuno (Parker *et al.*, 2004).

El valor inferior del ratio T/C en individuos deshidratados en comparación con euhidratados indica un mayor estímulo catabólico cuando el ejercicio se inicia en condiciones de hipohidratación (Maresh *et al.*, 2006). Este resultado es muy interesante desde un punto de vista práctico. Si bien, una exposición temporal a deshidratación incrementa el catabolismo, una exposición crónica puede resultar en una mayor degradación proteica, reducción de masa muscular y en definitiva, pérdida de fuerza de contracción muscular (Maresh *et al.*, 2006).

9.4. MATERIAL Y MÉTODOS

9.4.1. CABALLOS

En el segundo estudio, se han introducido un total de 54 machos enteros, adultos (edad media: $8,431 \pm 3,256$ años, rango: 4-16 años), que competían de forma habitual en competiciones de tiro y arrastre. De igual modo al estudio I, estos caballos se han clasificado en 2 grupos, según su estado hídrico, grupo con deshidratación hipertónica, DH, formado por 45 animales y grupo control, CTR, euhidratados, constituido por 9 caballos. Además, en función del peso corporal del animal y la carga que arrastran, se han considerado tres categorías: I (peso inferior o igual a 350 kg), II (peso comprendido entre 351 y 450 kg) y III (peso superior o igual de 451 kg). Para más información sobre los mecanismos de deshidratación de estos caballos, las categorías de peso y la carga que arrastra cada categoría, consultar en los apartados 6.1, 6.2 y 6.3.

Ninguno de los caballos había recibido tratamiento con corticoides durante los 3 meses previos al estudio. Por otro lado, se considera dopaje la administración de anabolizantes andrógenos en estos caballos, si bien en estas competiciones, no siempre se lleva a cabo un control anti-dopaje.

9.4.2. COMPETICIONES DE TIRO Y ARRASTRE, GRUPO DH

Las competiciones de tiro y arrastre en las que participaron los caballos se han descrito previamente (consultar apartado 6.2.). En la tabla 7 se muestran las características de los animales del grupo DH en este segundo estudio.

Tabla 7. Valores medios (\pm DS) y valores mínimos y máximos (entre paréntesis) de la edad, peso, carga arrastrada y tiempo de ejercicio de los caballos del grupo DH

	Categoría I	Categoría II	Categoría III
N	22	15	8
Edad (años)	8,412 \pm 3,026 (4-14)	8,909 \pm 3,83 (4-16)	8,167 \pm 3,534 (5-13)
Peso (kg)	287,6 \pm 39,6 (194-344)	401,6 \pm 26,73 (360-440)	515,5 \pm 45,71 (460-590)
Carga (kg)	587,9 \pm 87,60 (435-750)	915,6 \pm 141,7 (675-1090)	1093,3 \pm 99,79 (920-1190)
Tiempo de ejercicio (min)	1,064 \pm 1,199 (0,360-5,000)	1,632 \pm 1,031 (0,400-4,080)	0,953 \pm 0,534 (0,430-4,480)

9.4.3. EJERCICIO EN EL GRUPO CONTROL, CTR

El ejercicio realizado por el grupo control ha sido descrito en el apartado 6.3. Con respecto a la distribución de peso en los animales de este grupo, se realizó del siguiente modo: I, n=3; II, n=3 y III, n=3. Las características de estos animales se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Valores medios (\pm DS) y valores mínimos y máximos (entre paréntesis) de la edad, peso, carga arrastrada y tiempo de ejercicio de los caballos del grupo CTR

	Categoría I	Categoría II	Categoría III
N	3	3	3
Edad (años)	12,33 \pm 1,283 (10-14)	8,333 \pm 0,485 (7-9)	7,540 \pm 1,940 (6-9)
Peso (kg)	283,3 \pm 33,95 (260-330)	396,7 \pm 37,89 (350-440)	599,0 \pm 56,45 (490-710)
Carga (kg)	545,5 \pm 100,3 (520-660)	870,6 \pm 122,8 (787,5-900)	1323 \pm 145,7 (1275-1820)
Tiempo de ejercicio (min)	1,210 \pm 0,897 (0,380-3,450)	1,345 \pm 0,998 (0,430-4,320)	1,630 \pm 0,788 (0,470-4,987)

9.4.4. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS

El protocolo experimental, tanto en cuanto a los tiempos de extracción de muestras y procedimiento se ha detallado previamente (apartado 6.4.)

9.4.5. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

En este capítulo, se han medido las concentraciones de albúmina (ALB, g/dl), testosterona (T, pg/ml) y cortisol (C, ng/ml). La concentración de ALB fue medida en plasma heparinizado, con técnicas espectrofotométricas²², usando reactivos específicos²³, según el método del verde de bromocresol (Doumas *et al.*, 1971).

La concentración de T se ha cuantificado en suero, mediante un ELISA de competición, sin extracción previa de la muestra. El límite de detección fue de 30 pg/ml. Los porcentajes de recuperación de esta técnica fueron de 95%, a concentraciones elevadas de T y de 98%, a concentraciones bajas de T. Los coeficientes intra-análisis fueron de 4,5 y 6,9% para concentraciones altas y bajas de T. Esta técnica ha sido utilizada previamente y está validada para caballos (Munro y Lasley, 1988; Carneiro *et al.*, 1998; Illera *et al.*, 2003).

La concentración de cortisol (C) se ha cuantificado en suero, mediante un ELISA de competición, usando el anticuerpo policlonal C97²⁴. Este procedimiento presenta una elevada especificidad para el C (porcentaje de recuperación de concentraciones conocidas del 95%). Tiene reactividad cruzada con la prednisolona (15,71%), prednisona (18,9%), cortisona (10,8%), corticosterona (6,4%), 11-deoxicortisol (40,31%), 21-deoxicortisol (5,31%) y dexametasona (<0,1%). La sensibilidad de esta técnica fue de 30 pg/ml. Los coeficientes de variación intra-análisis e inter-análisis quedaron comprendidos entre 3,7-6,63% y 3,92-9,93%, respectivamente.

²²Espectrofotómetro RAL®, modelo Clima M5-15, Sant Joan Desó, Barcelona, España

²³Reactivos RAL®, Sant Joan Desó, Barcelona, España

²⁴Anticuerpo policlonal C97, Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

9.4.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO

A lo largo de este estudio, los datos se presentan como media \pm desviación estándar, DS. La normalidad de las variables analizadas se comprobó mediante un test de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de la varianza con un test de Levene. Seguidamente, se efectuó un test multivariante, considerando tres factores: grupo de caballos (DH y CTR), categoría de peso (I, II y III) y tiempo de toma de muestras (R, E, 5REC, 10REC, 15REC y 30REC).

Las diferencias entre las tres categorías de peso (I, II y III) dentro de cada grupo (DH y CTR) y las diferencias entre grupos para cada categoría de peso se evaluaron mediante un análisis ANOVA para muestras independientes. El efecto del tiempo de toma de muestra se analizó mediante un test ANOVA para muestras repetidas. Seguidamente, se llevó a cabo un test de comparación (post-hoc comparison of means) para determinar entre qué tiempos de extracción de muestras estas diferencias eran significativas. Finalmente, se efectuó un análisis de correlación entre las diversas variables analizadas, mediante una correlación lineal (Pearson product-moment correlation). Debido a que en personas, se ha demostrado que la correlación entre los niveles de T y C es diferente durante el ejercicio y durante la recuperación (Lac y Berthon, 2000; Mäestu *et al.*, 2005; Cunniffe *et al.*, 2010; Betts *et al.*, 2011), el análisis de correlación se ha realizado, de forma independiente, con los valores del tiempo E y con todos los valores de la recuperación (tiempos 5REC, 10REC, 15REC y 30REC).

El nivel de significación se estableció a nivel de $p < 0,05$. El estudio estadístico se ha realizado con el programa estadístico²⁵.

²⁵Statistica for Windows, v. 10.0, Statsoft®, USA

9.5. RESULTADOS

Siguiendo el mismo esquema establecido para la sección de resultados del estudio I, hemos considerado cuatro grandes apartados: 1) Resultados del análisis multivariante; 2) Resultados de las diferencias según la categoría de peso (I, II y III) para los dos grupos (DH y CTR), en los diferentes tiempos de toma de muestras (R, E, 5REC, 10REC, 15REC y 30REC); 3) Análisis comparativo entre los dos grupos de caballos con diferente estado hídrico (DH y CTR); 4) Análisis de correlación entre T y C en reposo, ejercicio y recuperación.

9.5.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIANTE

La tabla 9 recopila los resultados derivados del análisis multivariante. Las concentraciones de ALB y de C se vieron influidas por los tres factores analizados. Sin embargo, la concentración de T solo se halló afectada por el grupo de caballos (DH y CTR), mientras que el cociente T/C se vio influenciada por la categoría de peso (I, II y III).

Tabla 9. Resultados del análisis multivariante (valores *F* y probabilidad *p*) y de los efectos de los tres factores principales (grupo de caballo, categoría de peso y tiempo de extracción de las muestras sanguíneas). $P < 0,05$

	Grupo caballo²⁶	Categoría de peso²⁷	Tiempo de extracción de muestras²⁸
ALB	F= 354,7 p= 0,000	F= 5,12 p= 0,007	F= 20,64 p= 0,000
T	F= 9,585 p= 0,023	F= 1,291 p= 0,252	F= 0,202 p= 0,961
C	F= 201,9 p= 0,000	F= 4,336 p= 0,014	F= 11,91 p= 0,000
RatioT/C	F= 0,048 p= 0,827	F= 3,268 p= 0,041	F= 0,553 p= 0,736

9.5.2. EFECTO DE LA CATEGORÍA DE PESO Y DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS EN EL GRUPO DH

No se apreciaron diferencias significativas en la concentración de ALB al comparar las tres categorías de peso en el grupo DH, en ninguno de los tiempos de toma de muestras (Figura 30). Por el contrario, sí existieron diferencias en las concentraciones de T, C y cociente T/C. Las diferencias en cuanto a T y al cociente T/C han sido variadas en relación a la categoría de peso. En los tiempos R, E, 5REC y 15REC, la categoría de peso I presentó concentraciones más elevadas de T. En los tiempos 10REC y 30REC, los valores más altos se obtuvieron en la categoría I, seguidos por la categoría III y finalmente, la categoría II (Figuras 31). La concentración de C fue diferente entre categorías de peso en las muestras tomadas en E, con medias superiores en los caballos de los grupos I y II (Figura 32). En las tres categorías, se apreció un incremento progresivo de C, alcanzándose los valores superiores a los 30REC.

En cuando al efecto del ejercicio, la ALB y el C se vieron modificados de forma significativa en las tres categorías de peso, como se presenta en las figuras 30 y 32.

²⁶ DH vs. CRT

²⁷ I, II y III

²⁸ R, E, 5REC, 10REC, 15REC y 30REC

En las tres categorías de peso, el ejercicio condicionó un incremento de los niveles séricos de T, si bien solo se alcanzó la significación estadística en las categorías de peso I y III (Figura 31).

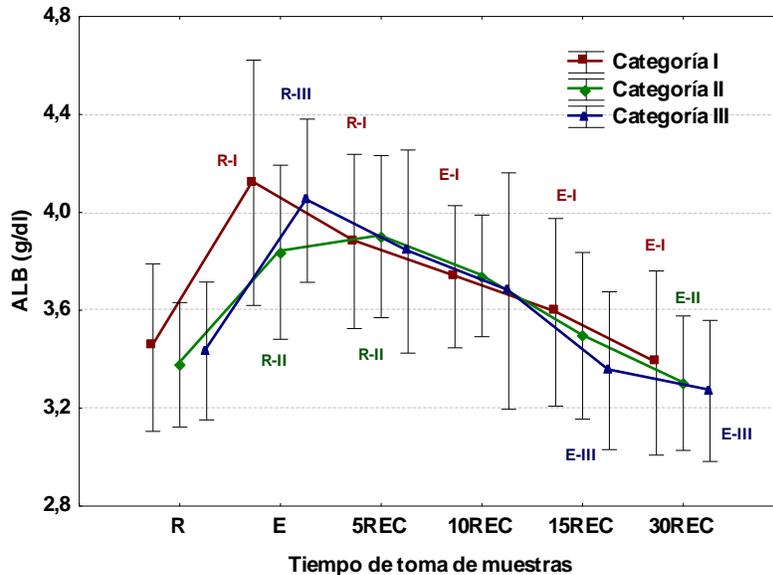


Figura 30. Concentración plasmática de albúmina (g/dl) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo; E: diferencias con ejercicio). $P < 0,05$.

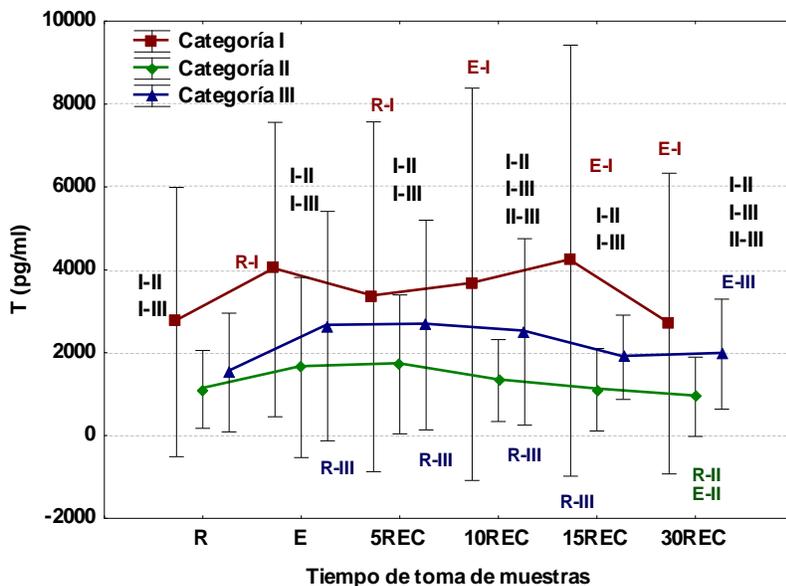


Figura 31. Concentración sérica de testosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo; E: diferencias con ejercicio) (Se indican en negrita las diferencias entre categorías de peso) $P < 0,05$.

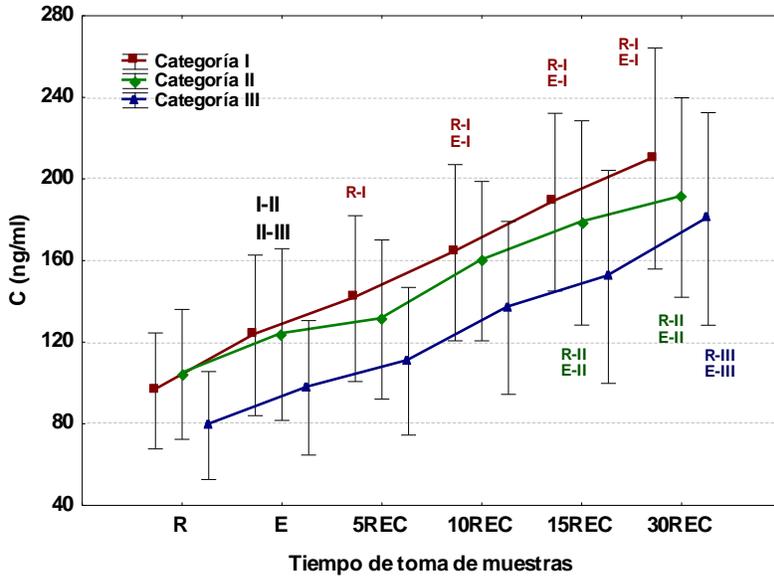


Figura 32. Concentración sérica de cortisol (mg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo; E: diferencias con ejercicio) (Se indican en negrita las diferencias entre categorías de peso) $P < 0,05$.

Los cambios en el cociente T/C, así como las diferencias entre las tres categorías de peso para el grupo de caballos DH, se muestran en la figura 33. En la categoría III, se produjo un incremento de este cociente en los tiempos E y 5REC, mientras que en las otras categorías, aunque se elevó este ratio, no se alcanzó la significación estadística. En cuanto a las diferencias entre categorías, en R, la categoría I mostró medias significativamente superiores a las otras dos categorías. En los otros tiempos de toma de muestras, la categoría II presentó valores inferiores (Figura 33).

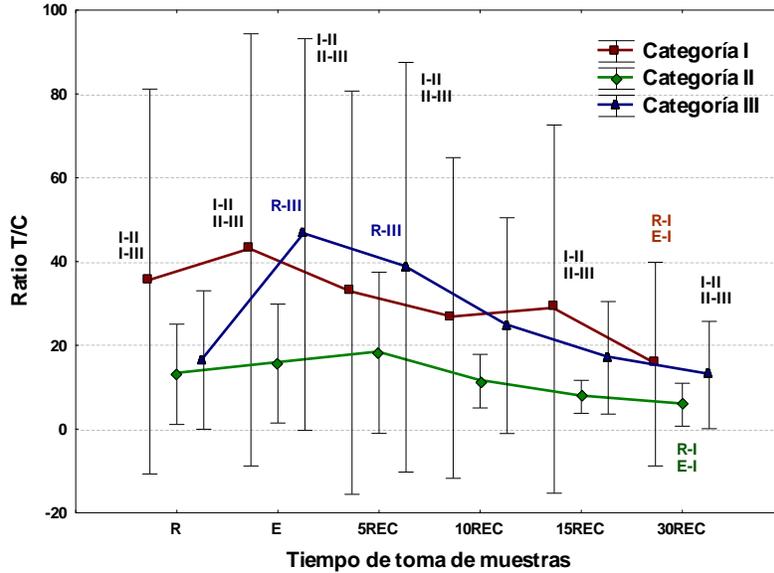


Figura 33. Cociente T/C en caballos de tiro y arrastre del grupo DH durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo; E: diferencias con ejercicio) (Se indican en negrita las diferencias entre categorías de peso) $P < 0,05$.

9.5.3. EFECTO DE LA CATEGORÍA DE PESO Y DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS EN EL GRUPO CRT

No se han observado diferencias significativas en la concentración de ALB al comparar las tres categorías de peso en el grupo CTR. Por el contrario, el ejercicio sí afectó a este parámetro, como se presenta en la figura 34. En las tres categorías de peso, el ejercicio condicionó una elevación significativa de la ALB, con descensos posteriores durante la recuperación (Figura 34).

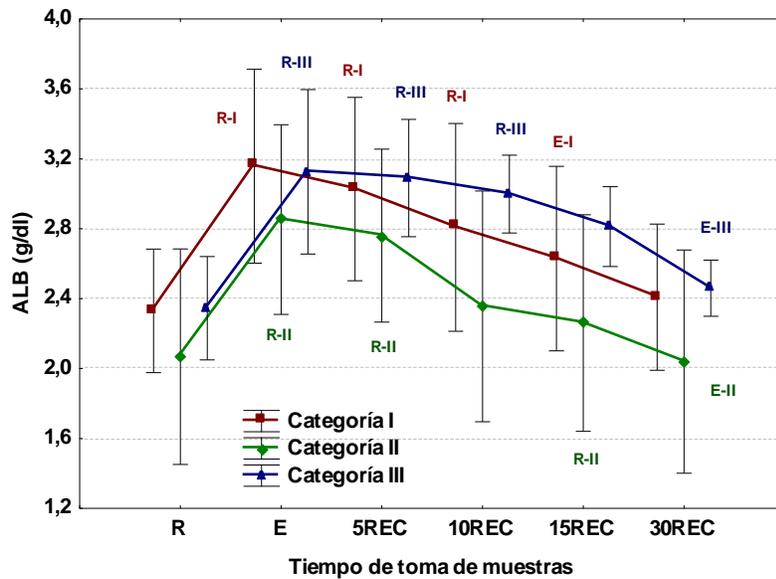


Figura 34. Concentración plasmática de albúmina (g/dl) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo; E: diferencias con ejercicio). $P < 0,05$.

Las concentraciones séricas de T del grupo CTR para las tres categorías de peso se presentan en la figura 35. El ejercicio indujo un incremento en las categorías I y III, sin bien esta elevación no fue significativa en la categoría III. En la categoría II, se detectó una tendencia no significativa hacia el descenso de los niveles de T. Durante la recuperación, la evolución de esta hormona fue variable. Por otro lado, la categoría I de peso mostró niveles superiores de T a las categorías II y III, en los tiempos R y E. La categoría II presentó valores inferiores a las otras dos categorías en los tiempos E, 10REC y 15REC (Figura 35).

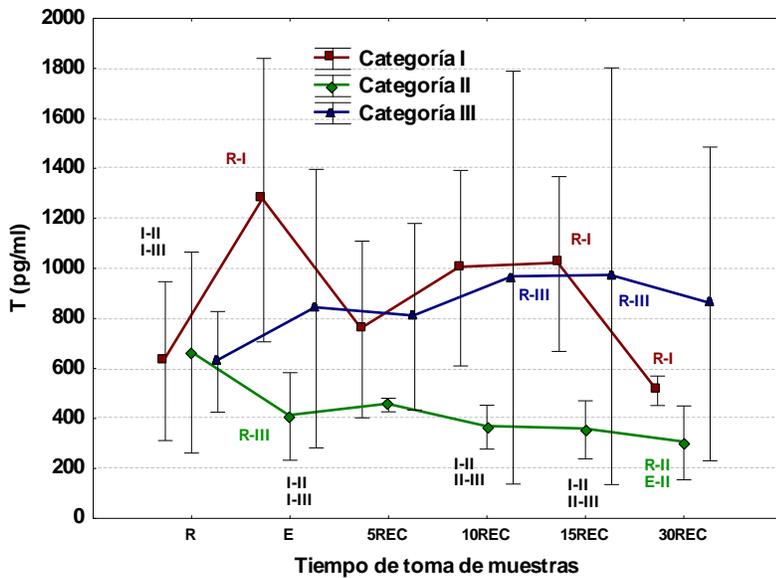


Figura 35. Concentración sérica de testosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo; E: diferencias con ejercicio) (Se indican en negrita las diferencias entre categorías de peso) $P < 0,05$.

La categoría II de peso mostró una concentración de C superior tras el ejercicio. En todas las categorías, se apreció un incremento progresivo de las concentraciones séricas de C a lo largo de los diversos tiempos de toma de muestra, con los valores máximos en el tiempo 30REC (Figura 36).

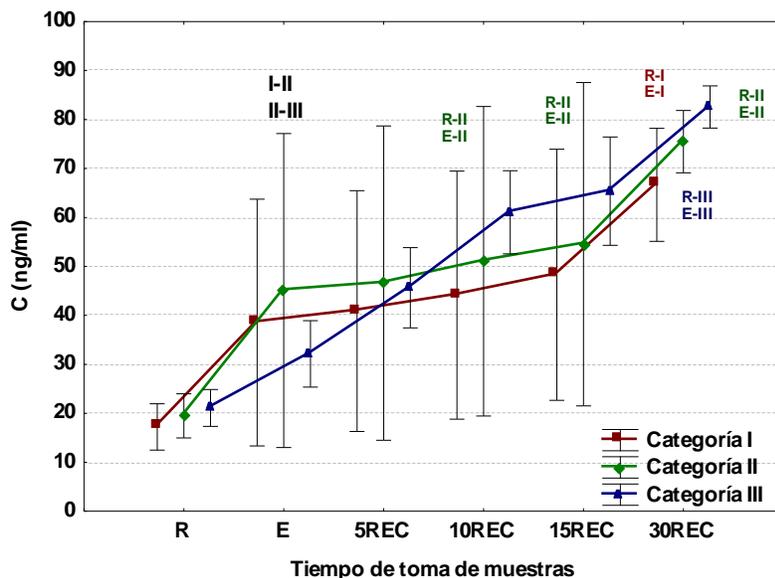


Figura 36. Concentración sérica de cortisol (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo; E: diferencias con ejercicio) (Se indican en negrita las diferencias entre categorías de peso) $P < 0,05$.

Los valores del cociente T/C en el grupo de caballos CTR se presentan en la figura 37. Se observó una reducción significativa de este cociente desde los valores de reposo tras el ejercicio en la categoría II. En cuanto a la categoría I, el descenso durante la recuperación fue más progresivo, hallándose los valores más bajos para este cociente en el tiempo 30REC. En las otras categorías, la reducción del cociente durante la recuperación fue inferior. En el tiempo R, la categoría I tuvo valores de T/C más elevados que la categoría II. En los tiempos E, 5REC, 10REC y 15REC, la categoría II presentó las medias más bajas (Figura 37).

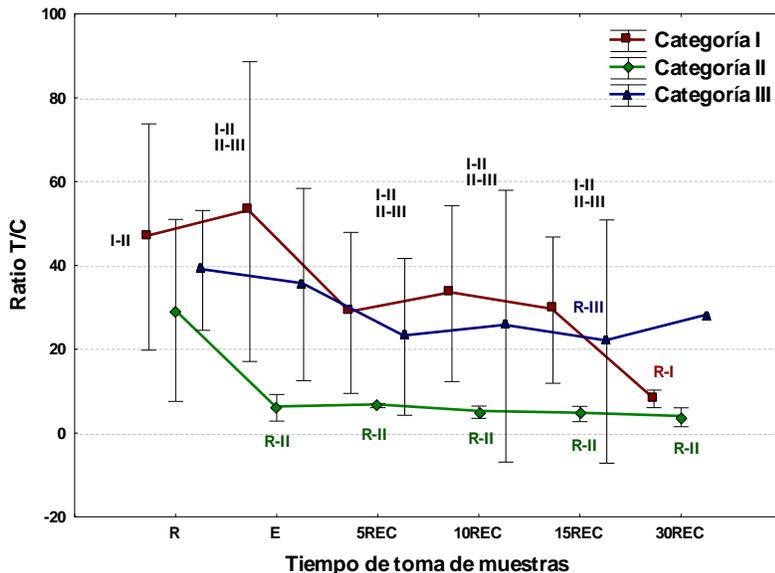


Figura 37. Cociente T/C en caballos de tiro y arrastre del grupo CTR durante una competición, en función de la categoría de peso (R: diferencias con reposo; E: diferencias con ejercicio) (Se indican en negrita las diferencias entre categorías de peso) $P < 0,05$.

9.5.4. DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS DH Y CTR

Debido a que las concentraciones de ALB no fueron diferentes entre categorías de peso, para ninguno de los dos grupos de caballos con diferente estado hídrico (DH y CRT), los datos de las categorías I, II y III se presentan conjuntamente. En la figura 38, se observan los valores de ALB en caballos DH y CTR. Como se puede observar, la concentración de ALB fue significativamente superior para los caballos DH en todos los tiempos de toma de muestra.

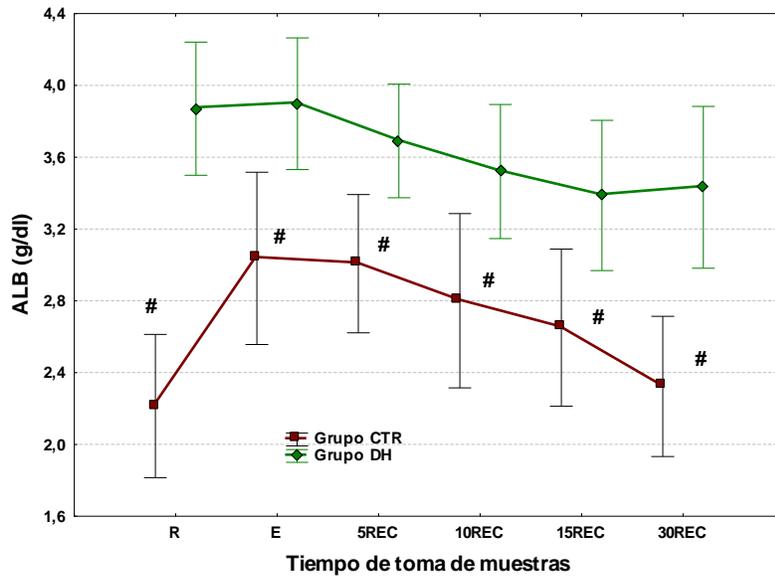


Figura 38. Concentración plasmática de albúmina (g/dl) en caballos de tiro y arrastre de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

Como la categoría de peso influyó los niveles séricos de T y C, tanto en el grupo DH como en el CTR, se ha optado por evaluar las diferencias entre los dos grupos de estado hídrico de forma independiente para cada categoría de peso.

Las figuras 39, 40 y 41 muestran las concentraciones de T para las tres categorías de peso. En las tres categorías de peso, se ha encontrado que los niveles séricos de T fueron superiores en el grupo DH en comparación con el grupo CTR, en la mayoría de los tiempos de extracción de muestras sanguíneas. Cuando no se ha alcanzado la significación estadística, se apreció una tendencia hacia valores más altos en el grupo DH.

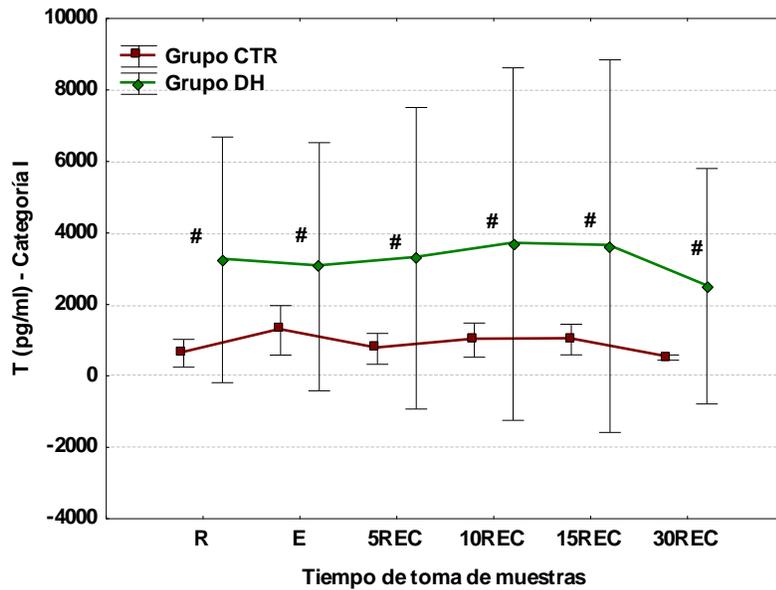


Figura 39. Concentración sérica de testosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso I, de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

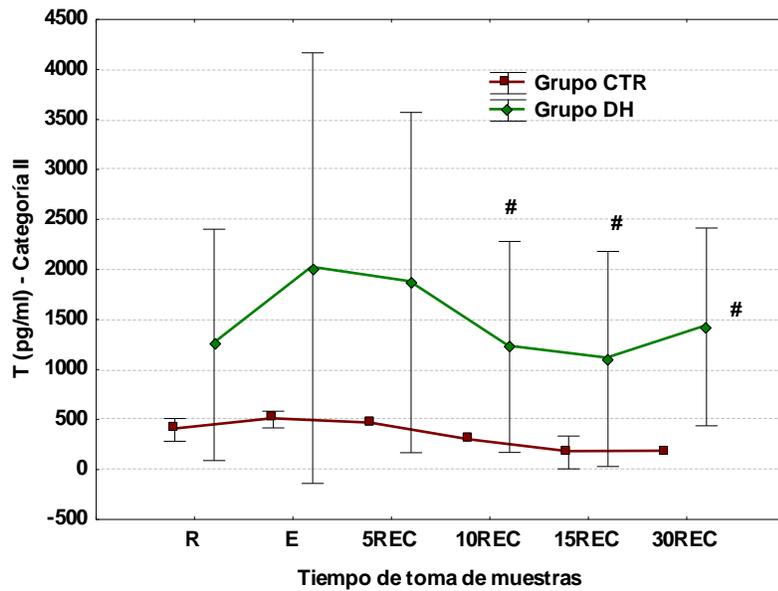


Figura 40. Concentración sérica de testosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso II, de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

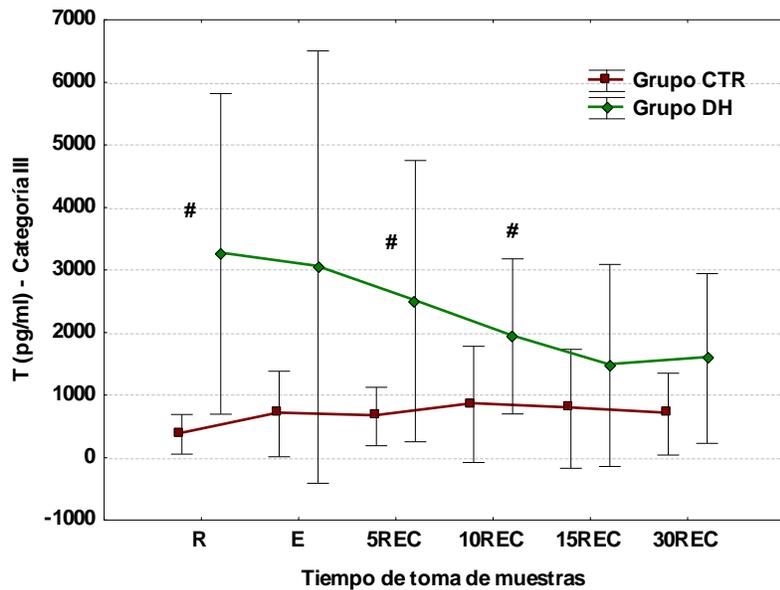


Figura 41. Concentración sérica de testosterona (pg/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso III, de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

En general, los caballos del grupo DH presentaron niveles superiores de C en casi todos los tiempos de toma de muestra. En aquellos casos en los que no se ha alcanzado la significación estadística, se ha detectado una tendencia hacia los valores más altos en el grupo DH (Figuras 42, 43 y 44).

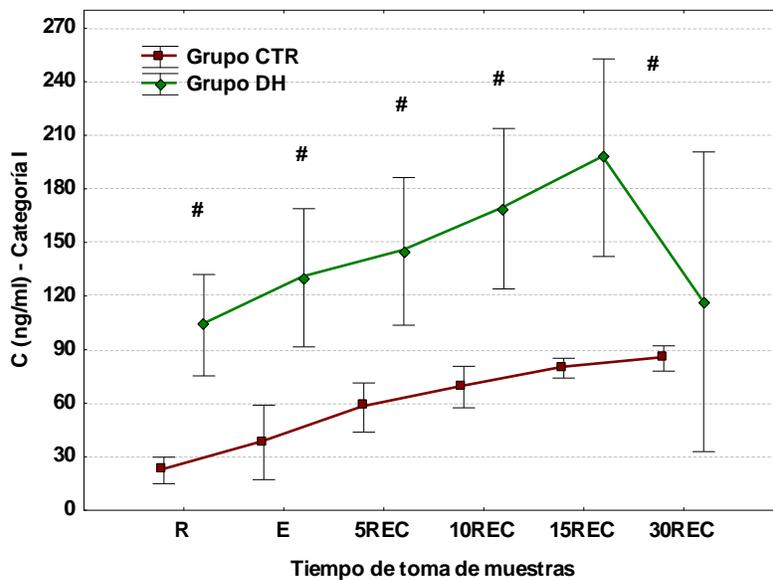


Figura 42. Concentración sérica de cortisol (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso I, de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

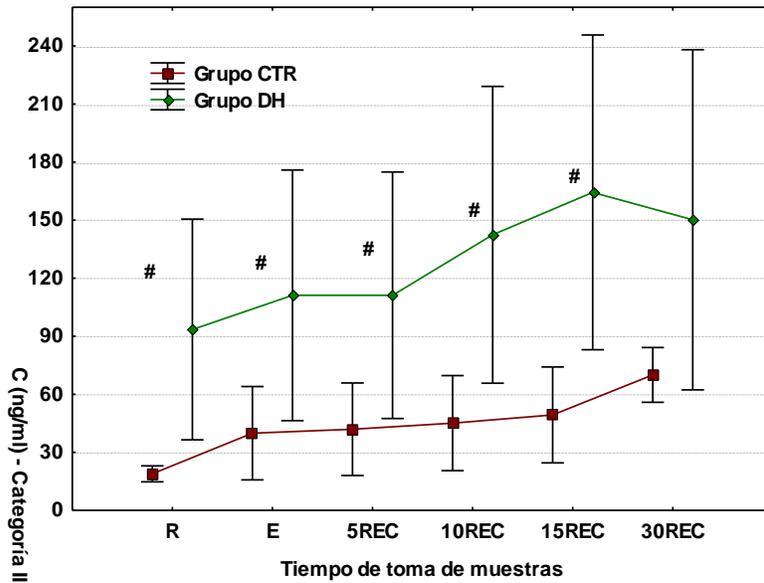


Figura 43. Concentración sérica de cortisol (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso II, de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

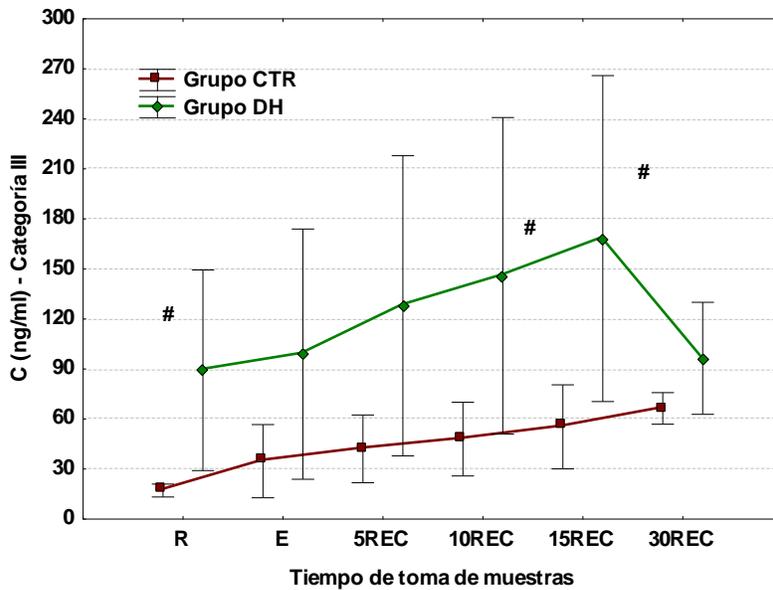


Figura 44. Concentración sérica de cortisol (ng/ml) en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso III, de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

En las figuras 45, 46 y 47 se muestran los valores medios del cociente T/C para los grupos CTR y DH, en las tres categorías de peso de modo respectivo. No se han encontrado diferencias significativas entre los dos grupos con diferente estado hídrico, para las categorías de peso I y III (Figuras 45 y 47). Sin embargo, en la categoría II, se ha observado que, en los tiempos E, 15REC y 30REC, los caballos del grupo DH presentaban valores superiores del ratio T/C en comparación con los caballos del grupo CTR (Figura 46).

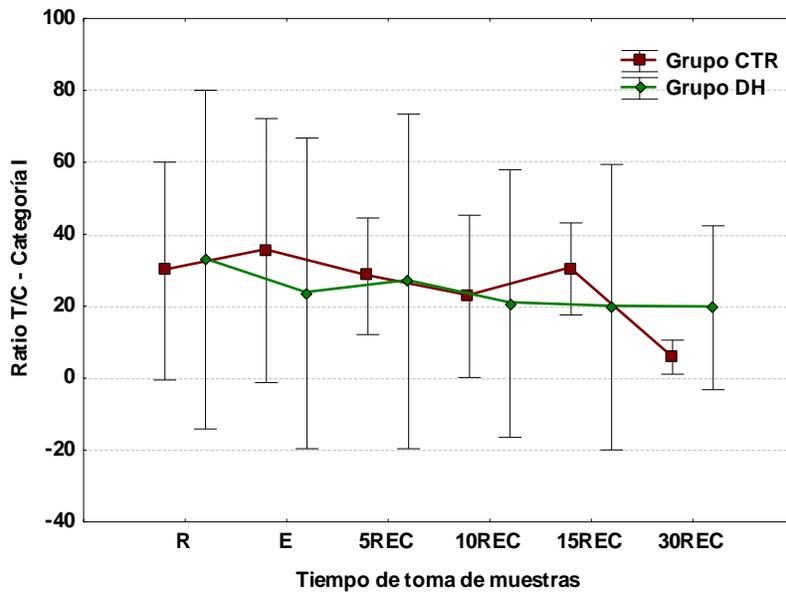


Figura 45. Ratio testosterona cortisol en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso I, de los grupos CTR y DH durante una competición

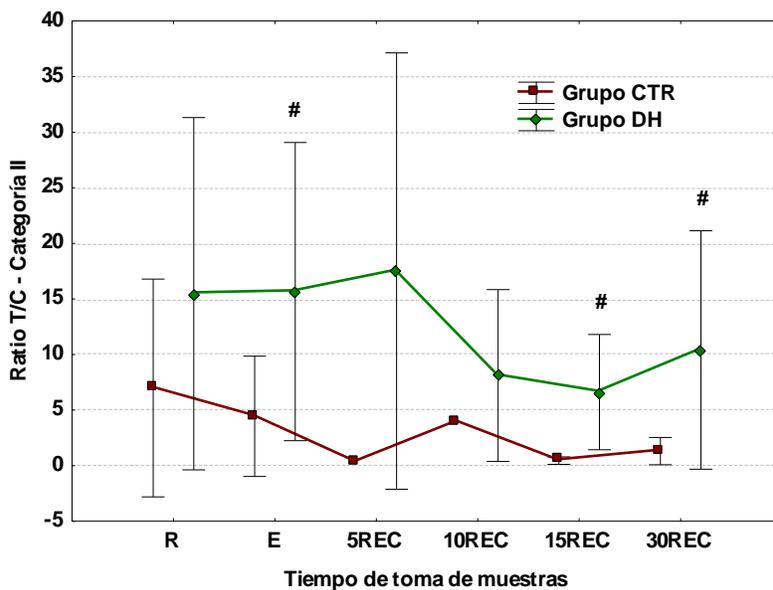


Figura 46. Ratio testosterona cortisol en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso II, de los grupos CTR y DH durante una competición (#: diferencias entre grupos). $P < 0,05$.

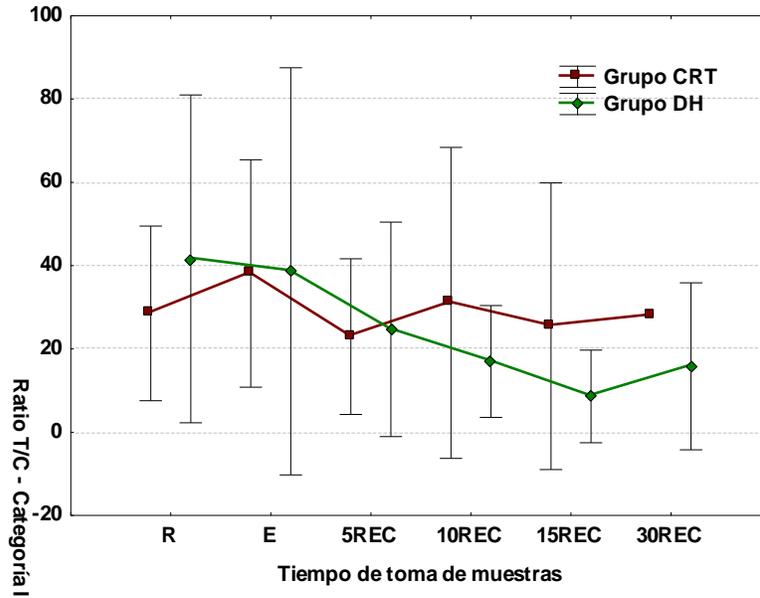


Figura 47. Ratio testosterona cortisol en caballos de tiro y arrastre de la categoría de peso III, de los grupos CTR y DH durante una competición

Para analizar si las concentraciones de C y de T se han modificado de forma diferente con el ejercicio en cada categoría de peso y en los dos grupos de estado hídrico, se han comparado las concentraciones en tiempo E con las obtenidas en tiempo R. En la figura 48, se observa que, el grupo CTR experimentó un incremento más marcado que el grupo DH, para las 3 categorías en peso, en las concentraciones de C. Además, el ejercicio indujo una elevación más intensa de C en la categoría III de peso que en la categoría I en el grupo CTR (figura 48).

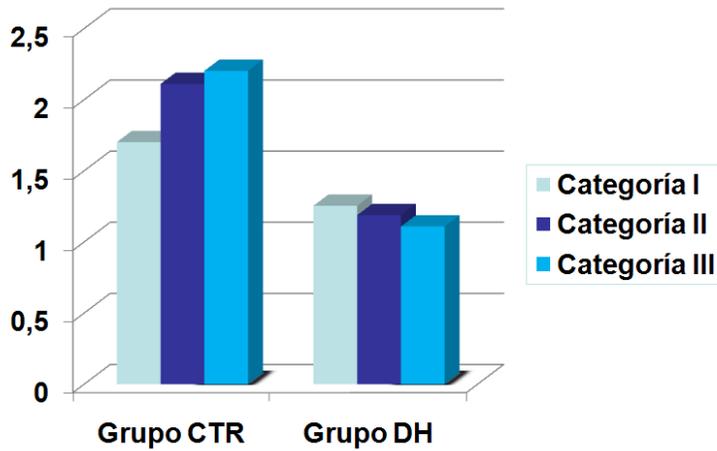


Figura 48. Variación inducida por el ejercicio en la concentración sérica de cortisol en dos grupos de caballos con diferente estado hídrico y pertenecientes a tres categorías de peso (Variación expresada en veces de incremento desde el reposo)

De igual modo, al comparar las concentraciones séricas de C obtenidas en los tiempos 30REC y E, se ha encontrado que el aumento ha sido más evidente en el grupo de caballos euhidratados y fundamentalmente en la categoría III (Figura 49).

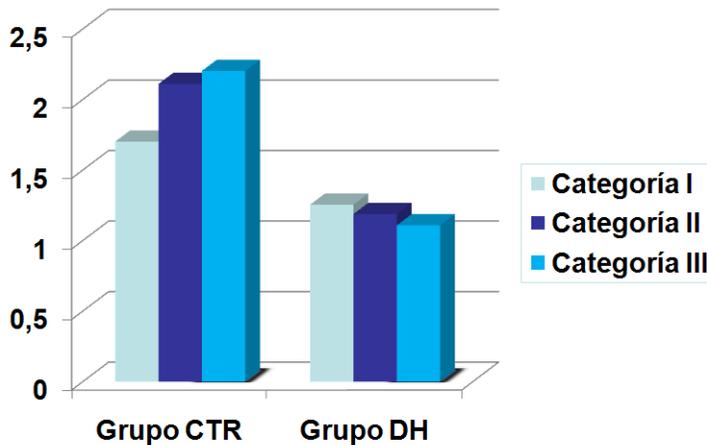


Figura 49. Cambios durante la recuperación, en comparación con el ejercicio en la concentración sérica de cortisol en dos grupos de caballos con diferente estado hídrico y pertenecientes a tres categorías de peso (Variación expresada en veces de incremento desde el ejercicio)

La evolución de las concentraciones de T se presenta en la figura 50. Los caballos del grupo CTR, de las categorías I y III, experimentaron un incremento de los niveles

séricos de T. En cuanto a los caballos del grupo DH, en todas las categorías se apreció una elevación de la T (Figura 50).

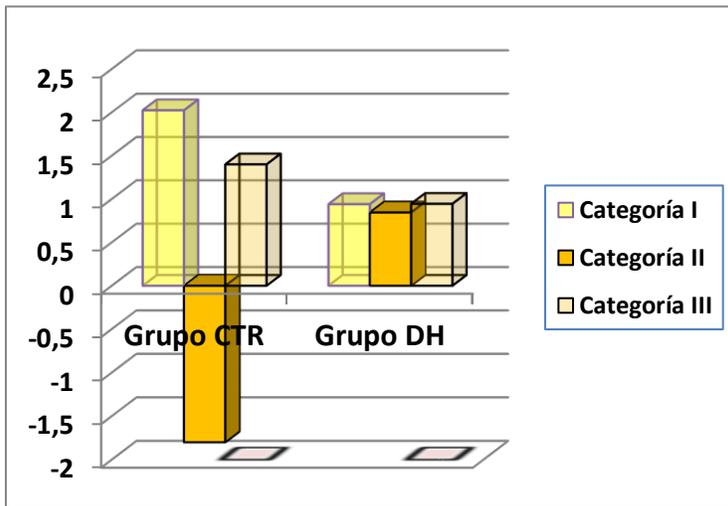


Figura 50. Variación inducida por el ejercicio en la concentración sérica de testosterona en dos grupos de caballos con diferente estado hídrico y pertenecientes a tres categorías de peso (Variación expresada en veces de incremento desde el reposo)

9.5.5. CORRELACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE TESTOSTERONA Y CORTISOL DURANTE EL EJERCICIO Y LA RECUPERACIÓN

En las tablas 10 y 11 se presentan los coeficientes de correlación entre las variables estudiadas en el tiempo E (tabla 10) y en los diversos tiempos de recuperación tras el ejercicio (tabla 11). Se han incluido todos los datos juntos, sin considerar la categoría de peso ni el estado hídrico del animal. También se ha incluido el tiempo de ejercicio.

Tabla 10. Coeficientes de correlación entre el peso, el tiempo de ejercicio y las concentraciones de albúmina, testosterona, cortisol y ratio T/Cen caballos durante el ejercicio de tiro y arrastre

	Tiempo de ejercicio	ALB	T	C	T/C ratio
Peso	0,620*	-0,370	-0,460	-0,370	-0,280
Tiempo de ejercicio		0,390	-0,260	-0,430	-0,140
ALB			0,280	0,590*	0,110
T				-0,080	0,930*
C					-0,570*

Tabla 11. Coeficientes de correlación entre el peso, el tiempo de ejercicio y las concentraciones de albúmina, testosterona, cortisol y ratio T/Cen caballos durante la recuperación tras un ejercicio de tiro y arrastre

	Tiempo de ejercicio	ALB	T	C	T/C ratio
Peso	0,680 *	-0,320	-0,650*	-0,310	-0,320
Tiempo de ejercicio		0,650*	0,230	0,660*	-0,150
ALB			0,160	0,680*	0,050
T				0,050	0,900*
C					-0,640*

9.6. DISCUSIÓN

La T es una hormona anabólica, mientras que el C desempeña funciones catabólicas. Por este motivo, la relación entre ambas hormonas, cociente o ratio T/C se ha utilizado en atletas humanos para evaluar la intensidad metabólica del ejercicio (Kindermann *et al.*, 1982; Fry *et al.*, 1991; 1998; Urhausen *et al.*, 1995; Hoffman *et al.*, 1997; Volek *et al.*, 1997; Jürimäe y Jürimäe, 2001; Elloumi *et al.*, 2003; McGuigan *et al.*, 2004; Viru y Viru, 2004; Kraemer y Ratamess, 2005). Por otro lado, el estado hídrico influencia la respuesta neuroendocrina al ejercicio, y concretamente, se ha confirmado que los individuos euhidratados y deshidratados muestran cambios diferentes en las concentraciones de T, C y en el ratio T/C (Hoffman *et al.*, 1994; 1997; Castellani *et al.*, 1998; Maresh *et al.*, 2006; Judelson *et al.*, 2008; Yeargin *et al.*, 2010). Hasta este momento, no se dispone de información sobre este tema en el caballo. Por este motivo, la presente investigación ha sido diseñada, en primer lugar, para analizar las variaciones experimentadas por las concentraciones de T y C y el ratio T/C con el ejercicio y en segundo lugar, para evaluar si, del mismo modo que ocurre en personas, el estado hídrico modifica la respuesta de estas hormonas y la respuesta anabólica/catabólica al ejercicio.

Los principales resultados de esta investigación han sido los siguientes: 1) Tanto en el grupo CTR como en el DH, y en las tres categorías de peso, se ha observado un incremento progresivo de las concentraciones séricas de C, con los niveles más elevados en el tiempo 30REC; 2) La categoría I de peso, tanto en los animales CTR como DH, mostró valores más elevados de T, tras al ejercicio; 3) La concentración sérica de T se incrementó con el ejercicio en la categoría I de peso, en los dos grupos con estado hídrico diferente; 4) La categoría II de peso, en los grupos CTR y DH, mostró los valores más bajos del ratio T/C; 5) El ejercicio indujo cambios diferentes en el ratio T/C en función de la categoría de peso y del estado hídrico; 6) El incremento experimentado por las concentraciones de C con el ejercicio y en la recuperación, en comparación con los valores basales, fue superior en el grupo CTR que en el grupo DH, para las tres categorías de peso; 7) El aumento asociado al ejercicio en las concentraciones de T fue mayor en el

grupo CTR que en el grupo DH, en las categorías de peso I y III; 8) Un tiempo de ejercicio más prolongado se asoció a una deshidratación más intensa (concentraciones de ALB superiores) y a un peso corporal superior; 9) El ratio T/C dependió en mayor grado de las concentraciones de T que de las concentraciones de C, como se evidenció con el análisis de correlación.

9.6.1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO II

Esta investigación presenta una serie de limitaciones, básicamente asociadas al protocolo experimental, al haberse obtenido las muestras sanguíneas en competiciones deportivas y no en un ambiente laboratorio, y por tanto, controlado. A esto hay que unir que, para proceder al estudio, era un requisito imprescindible la aprobación, escrita o verbal, por parte del propietario, para la inclusión del caballo en la investigación.

Se sabe que las concentraciones de T muestran variaciones estacionales en caballos enteros, con niveles más bajos en el mes de enero y más elevados en el mes de abril, al menos en Estados Unidos (Kirkpatrick *et al.*, 1977; Aurich *et al.*, 2003). En este estudio, las muestras se tomaron durante los meses de marzo a julio, que son los meses en los cuales se realizan las competiciones de tiro y arrastre. No se conoce como podría afectar este hecho a las concentraciones de T. En segundo lugar, se han detectado variaciones diurnas, con concentraciones más bajas a las 18.00 h (Ganjam y Kenney, 1975; Clay *et al.*, 1988; Stout, 2005; Dhakal *et al.*, 2011). Las competiciones se realizan durante todo el día, por lo que podría haber existido una influencia de los ritmos diurnos sobre la concentración de esta hormona, circunstancia que no se ha podido controlar, ya que las competiciones se realizan tanto por la mañana como por la tarde. Debido a que, como se ha mencionado antes, era obligatoria la aceptación del propietario en la participación de la investigación, ha sido imposible seleccionar solamente aquellos caballos que compitieron en una determinada franja horaria. En tercer lugar, con respecto a la T, los niveles basales se alcanzan a los 16 meses de edad, si bien pueden existir pequeños incrementos asociados a la edad (Johnson *et al.*, 1991; Inoue *et al.*, 1993; Soma

et al., 2008; 2011). En este estudio, solo se han incluido animales adultos, con edades superiores a los 4 años y enteros, por lo que parcialmente esta circunstancia se ha podido controlar. En cuarto lugar, hay que tener en cuenta que no se realiza control anti-dopaje en estos animales, por lo que no fue posible descartar completamente la administración fraudulenta de anabolizantes para incrementar la fuerza del caballo (Snow *et al.*, 1982a,b; Hyypä, 2001; Soma *et al.*, 2007). Finalmente, se ha confirmado que la actividad reproductora del semental influencia las concentraciones de T (McDonell y Murray, 1995; Stout, 2005). Todos los caballos incluidos en este estudio eran machos enteros, y no se conoce si estos animales eran usados como sementales o no.

Al igual que ocurre con la T, las concentraciones circulantes de C también muestran ritmos circadianos en el caballo. Los niveles más elevados en sangre se encuentran por la mañana, entre las 6:00 y 11:00 hrs y los más bajos al final de la tarde y noche (Evans *et al.*, 1977; Toutain *et al.*, 1988; Irvine y Alexander, 1994). No se ha efectuado ninguna diferenciación entre los caballos que compitieron por la mañana y por la tarde. A pesar de la extensa información sobre las variaciones de las concentraciones de C en respuesta al ejercicio y al entrenamiento en el caballo, raramente se menciona en estas investigaciones la franja horario en la que se llevó a cabo el estudio (Desmetch *etal.*, 1996; Nagata *et al.*, 1999; Marc *et al.*, 2000; Cayado *et al.*, 2006; Malinowski *et al.*, 2006; Cravana *et al.*, 2010; Medica *et al.*, 2010; Janczarek *et al.*, 2013; Von Lewinski *etal.*, 2013; Pazzola *et al.*, 2015; Casella *et al.*, 2015).

9.6.2. RESPUESTA DE LAS CONCENTRACIONES DE TESTOSTERONA AL EJERCICIO Y TIRO Y ARRASTRE

No se conocen con profundidad los cambios en las concentraciones séricas de T en respuesta a ejercicios de diferente intensidad y duración en caballos. El primero, y en conocimiento de los autores, el único estudio que evalúa las variaciones de la T con el ejercicio fue realizado por Golland *et al.* (1999). En esta investigación, se observó un incremento de las concentraciones de T tras un ejercicio en cinta rodante, consistente en

cargas de esfuerzo de 2 min de duración a velocidades correspondientes a 30, 50, 70 y 100% el consumo máximo de oxígeno ($VO_{2\text{máx}}$). Estos datos, no obstante, provienen de machos castrados y por otro lado, Golland *et al.* (1999) cuestionaron si la elevación de T tenía la suficiente magnitud para ejercer algún efecto anabólico u otra acción biológica en estos animales.

A pesar de esta falta de información, la determinación de los cambios en las concentraciones circulantes de T en machos enteros tiene una gran relevancia fisiológica. Por un lado, un aumento regular de estas concentraciones durante las sesiones diarias de ejercicio ejercería un efecto anabólico muscular, más intenso en machos enteros que en castrados o en hembras. Por otro lado, la administración de esteroides anabolizantes está prohibida en Europa en caballos de deporte, por su potencial efecto sobre el rendimiento deportivo. En personas, se ha documentado que estos compuestos resultan en un incremento de la masa muscular y un descenso de la cantidad de grasa corporal, potenciando el rendimiento deportivo asociado a una mejor funcionalidad muscular (Bhasin *et al.*, 1996; Myhal y Lamb, 2002). Por el contrario, la mayoría de los estudios llevados a cabo en caballos sanos han llegado a la conclusión de que estos compuestos no incrementan el peso corporal ni promueven el desarrollo muscular (Skelton *et al.*, 1989; Snow *et al.*, 1982a,b; Thornton *et al.*, 1991). Sin embargo, la administración de nandrolona incrementa el área seccional de las fibras tipo I, el porcentaje de fibras tipo IIA (Hyypä *et al.*, 1997), aumenta el volumen sanguíneo y la actividad de las enzimas citrato sintasa (CS) y 3-hidroxi-acil coenzima A deshidrogenasa (HAD) (Hyypä *et al.*, 1995). Estas últimas son enzimas vitales para la transducción de energía en el músculo, de modo que el metabolismo muscular se vería favorecido por la administración de estos compuestos.

A la hora de evaluar si un caballo entero ha recibido de forma fraudulenta una administración de estos compuestos, habría que conocer previamente si el ejercicio provoca un aumento de los niveles circulantes de T. También sería importante conocer durante cuánto tiempo estas concentraciones permanecen elevadas tras el ejercicio. No obstante, estos no son los objetivos de la presente investigación y requerirían diseños

experimentales diferentes. Por otro lado, primero habría que establecer, de forma precisa, las variaciones fisiológicas asociadas a la edad, temporada reproductiva, estación y mes del año y cambios diurnos en la liberación de T. Este objetivo, sin embargo, parece muy complicado de conseguir, debido al extendido uso de los anabolizantes, derivados sintéticos de la T, en caballos de deporte.

En personas, por el contrario, se ha analizado profusamente cómo afecta el ejercicio agudo y crónico o entrenamiento a las concentraciones de T, si bien los estudios han mostrado resultados contradictorios. De este modo, las concentraciones de T aumentan tras una sesión de ejercicio intenso (Kraemer *et al.*, 1992; McMurray *et al.*, 1995; Pullinen *et al.*, 2002) o de resistencia (Jensen *et al.*, 1991; Hackeny *et al.*, 1995). Por el contrario, en respuesta a un ejercicio prolongado, los niveles de T parecen declinar (Keizer *et al.*, 1989; Lac y Berthon, 2000). Otros autores, sin embargo, no han encontrado cambios en las concentraciones de T tras un ejercicio de resistencia (Virus *et al.*, 2001; Smilios *et al.*, 2003). En muchos casos, estos resultados contradictorios se han atribuido a diferencias en el tipo de ejercicio, en su intensidad, en su volumen o bien en el estado de entrenamiento del sujeto (Tremblay *et al.*, 2003).

En nuestro estudio, en la mayoría de las categorías de peso y en los grupos de caballos con diferente estado hídrico, se ha hallado un aumento con el ejercicio. Según Tremblay *et al.* (2003), en atletas humanos, los ejercicios máximos de corta duración incrementan las concentraciones sanguíneas de T, mientras que los ejercicios submáximos prolongados reducen dichas concentraciones. Esta idea apoya nuestros resultados, ya que los caballos de esta investigación fueron sometidos a un ejercicio submáximo, como indicaron los valores de FC y la acumulación de LA en sangre (Muñoz *et al.*, 2011; Tofé *et al.*, 2013), pero de corta duración, inferior a 5 minutos. No sabemos si, un ejercicio de más larga duración, habría dado lugar a un descenso de los niveles séricos de T.

Por el contrario, la categoría de peso II, en el grupo CTR, mostró un descenso significativo. No se puede proponer una explicación de porqué esta categoría de peso del

grupo CTR se comportó de forma diferente al resto de los animales. Se ha demostrado en personas que los ejercicios que implican una mayor intervención muscular dan lugar a una liberación incrementada de T. En la presente investigación, no se ha evaluado el desarrollo muscular en los caballos estudiados, si bien el mayor peso corporal correspondió a la categoría III de peso, no a la II. Por supuesto, esto no implica que la cantidad de masa muscular sea superior en los animales de mayor peso. Indistintamente de estas ideas, hay que tener en cuenta que este grupo estuvo integrado solamente por 3 animales. Sí hay que destacar las grandes variaciones en las concentraciones interindividuales de T, que podrían haber limitado la obtención de resultados con una mayor significación estadística. La gran variación individual en la concentración de T en caballos ya ha sido descrita por otros autores (Soma *et al.*, 2008; 2011).

9.6.3. RESPUESTA DE LAS CONCENTRACIONES DE CORTISOL AL EJERCICIO DE TIRO Y ARRASTRE

La elevación de las concentraciones de C en respuesta a diversos tipos de ejercicio es una respuesta fisiológica bien documentada en caballos (Snow y Rose, 1981; Rose *et al.*, 1983; Desmecht *et al.*, 1996; Lassourd *et al.*, 1996; Golland *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 1999; Marc *et al.*, 2000; Cayado *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2007; Cravana *et al.*, 2010; Medica *et al.*, 2010; Kedzierski *et al.*, 2014; Casella *et al.*, 2015; Pazzola *et al.*, 2015). Este aumento refleja las importantes funciones fisiológicas del C durante el ejercicio, entre las que destacan una activación de los procesos catabólicos y una acción anti-anabólica. Quizá la función más relevante es el incremento del pool de aminoácidos libres, de manera que los aminoácidos de cadena ramificada pueden ser utilizados como sustrato oxidativo. Por otro lado, estos aminoácidos libres quedan disponibles para la resíntesis proteica (Viru y Viru, 2004).

Si bien el ejercicio de intensidad creciente, así como los ejercicios máximos – submáximos de duración corta incrementan las concentraciones de C en sangre, los aumentos máximos se producen con los ejercicios de mayor duración (Snow y Rose,

1981; Rose *et al.*, 1983; Desmecht *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1999; Cayado *et al.*, 2006; Casella *et al.*, 2015). En atletas humanos se ha demostrado que, mientras mayor es la intensidad y la duración del ejercicio, más intensa es la elevación de los niveles circulantes de C (Port, 1991; Urhausen *et al.*, 1987a,b; Lac y Berthon, 2000). Por otro lado, la respuesta adrenal parece ser más marcada en respuesta a ejercicios intermitentes anaerobios en comparación con ejercicios continuos aerobios (Vanhelder *et al.*, 1985; Jensen *et al.*, 1991). La importante elevación de los niveles de C en la presente investigación, de forma independiente de la categoría de peso y del estado hídrico puede ser un reflejo de las características de intermitencia y metabolismo mixto, de las competiciones de tiro y arrastre.

En la presente investigación, todas las categorías de peso y tanto los caballos euhidratados como los deshidratados, experimentaron un aumento significativo de C en respuesta al ejercicio de tiro y arrastre, si bien las concentraciones más elevadas se produjeron durante la recuperación, con los valores máximos a los 30 minutos. En este momento, se obtuvieron concentraciones de C de hasta más de 4 veces las basales. Estos resultados reflejarían que, durante la recuperación tras un ejercicio de tiro y arrastre de corta duración, existe una tendencia metabólica catabólica. La duración de esta respuesta catabólica no se conoce, ya que solo se tomaron muestras de sangre hasta los 30 min post-esfuerzo. Esta respuesta al ejercicio ha sido considerada como una de las causas implicadas en la pérdida de peso en atletas humanos durante una temporada deportiva, particularmente en ejercicios de fuerza, a pesar de un control nutricional apropiado (McMurray *et al.*, 1991; Roemmich y Sinning, 1997; Elloumi *et al.*, 2003; Mäestu *et al.*, 2010; Mettler *et al.*, 2010; Irfan, 2015). Debido a que no se ha llevado a cabo un estudio longitudinal sobre el peso de estos animales durante la temporada competitiva, no se puede analizar si, el aumento del catabolismo tras la competición, podría afectar de alguna forma al peso del animal o a su desarrollo muscular.

9.6.4. RESPUESTA DEL RATIO T/C AL EJERCICIO DE TIRO Y ARRASTRE

En base a los resultados de los que se dispone para atletas humanos, en esta investigación, se esperaba encontrar un incremento del cociente T/C. Ello se debe a que, en personas, se ha indicado que, todos aquellos ejercicios que requieren una intervención de una gran masa muscular, a intensidad submáxima- máxima, desencadenan una elevación de las concentraciones de T superior a la que experimentan las concentraciones de C. La consecuencia de ello, por tanto, es un aumento del cociente T/C (Kraemer *et al.*, 1998; McCall *et al.*, 1999; Fry y Lohnes, 2010; Grandys *et al.*, 2012; Wahl *et al.*, 2014; Doma *et al.*, 2015). Y este es el resultado que se ha encontrado en nuestra investigación. Los caballos de las categorías de peso I y III, pertenecientes al grupo DH, experimentaron un aumento, significativo o no (con tendencia hacia el incremento no significativo) en el cociente T/C. Este dato indica una tendencia metabólica anabólica en respuesta a un ejercicio de tiro y arrastre, si bien hay que matizar que, según el diseño de nuestra investigación, dicho resultado no tiene porqué resultar en un metabolismo anabólico a lo largo de la temporada de competiciones. Sin embargo, hay que reseñar que este cociente descendió en las categorías de peso II y III del grupo CTR.

9.6.5. INFLUENCIA DEL ESTADO HÍDRICO EN LA RESPUESTA DE LAS CONCENTRACIONES DE CORTISOL, TESTOSTERONA Y RATIO T/C EN CABALLOS DURANTE UN EJERCICIO DE TIRO Y ARRASTRE

El presente estudio ha confirmado que el estado hídrico del caballo (euhidratación vs. deshidratación) afecta a las concentraciones de ALB, T y C, de modo que los animales deshidratados mostraron en casi todos los tiempos de toma de muestras, valores superiores a los animales euhidratados. El aumento simultáneo de T y C hizo que las modificaciones en el ratio entre ambas hormonas fuera variable. Por otro lado, resulta interesante que el incremento de C, tanto durante el ejercicio como en la posterior

recuperación, y el aumento de T, fue más intenso en el grupo CTR o euhidratado en comparación con el grupo DH.

Las concentraciones de T fueron superiores en caballos del grupo DH en comparación con el CTR, para las tres categorías de peso. En personas, numerosas investigaciones no han encontrado diferencias de esta hormona en función del estado hídrico, independientemente de las características de intensidad y duración del ejercicio (Hoffman *et al.*, 1994; Kenefick *et al.*, 1998; Jürimäe y Jürimäe, 2001; Maresh *et al.*, 2006; Judelson *et al.*, 2008). En nuestro conocimiento, no se ha analizado la influencia de la deshidratación en las concentraciones de catecolaminas en el caballo. Sí se ha estudiado el efecto de la hipovolemia en otras hormonas como ALD, AVP y PAN en caballos adultos y potros (Hollis *et al.*, 2008). Sin embargo, en atletas humanos, se ha documentado que la deshidratación incrementa la liberación de catecolaminas (Castellani *et al.*, 1998; Moquin y Mazzeo, 2000). Si esto ocurriera también en el caballo, la elevación de las concentraciones de catecolaminas en el grupo DH podría ser un factor a considerar en los niveles superiores de T en este grupo. Se sabe que las catecolaminas promueven la síntesis y liberación de T (Hoffman *et al.*, 1994; 1997; Fenske, 1997; Pullinen *et al.*, 1998; Derbré *et al.*, 2010). Las concentraciones superiores de T en el grupo DH podrían, en parte, deberse a la deshidratación y hemoconcentración. Sin embargo, se ha observado que no existe una correlación entre las concentraciones de ALB y de T, tanto durante el ejercicio como en la recuperación. Por otro lado, y de forma similar a lo que ocurrió con el C, se ha encontrado que, el aumento de T desde los niveles basales fue más intenso en los caballos del grupo CTR. En este grupo, de hecho, las tres categorías de peso experimentaron una elevación de T con el ejercicio, mientras que en los caballos del grupo DH se apreció, incluso, un descenso leve de esta hormona.

Se ha visto que, los animales deshidratados, muestran concentraciones más elevadas de C. Este hecho, en parte debido a la hemoconcentración, también se asocia a la liberación de C en respuesta al estrés que induce el descenso de volemia. Esta circunstancia se ha descrito en toros (Parker *et al.*, 2004), ovejas, cabras y corderos (Hogan *et al.*, 2007; Krawczel *et al.*, 2007), cerdos (Brown *et al.*, 1999), camellos (Ali *et*

al., 2013) y caballos (Friend, 2000; Stull y Rodiek, 2000). Todos estos estudios se han llevado a cabo durante el transporte. Independientemente del estímulo que causa estrés (transporte vs. ejercicio), y considerando nuestros resultados, parece ser que, los animales deshidratados muestran una liberación incrementada de C, como hemos observado en nuestra investigación. No obstante, también tenemos que matizar que, los animales del grupo DH estaban en una situación de competición real, mientras que los caballos del grupo CTR, se sometieron a una situación simulada de competición. Este ambiente diferente podría haber causado también un menor grado de estrés en el caballo y en el propietario. De hecho, recientemente, se ha confirmado que el grado de estrés evaluado a partir de la variabilidad de la FC, es más intenso en caballos que se ejercitan en presencia de público (Von Lewinski *et al.*, 2013). No obstante, en esta investigación, no se hallaron diferencias significativas en la concentración de C al comparar cuando el animal hacía ejercicio en presencia o en ausencia de público.

La respuesta del C al ejercicio en euhidratación y deshidratación se ha analizado extensamente en atletas humanos. La mayoría de los autores admite que la deshidratación favorece el catabolismo, al incrementar la temperatura corporal. A esto hay que unir que el descenso de la volemia conduce a una mayor demanda cardiovascular y en definitiva, a un estado catabólico más intenso (Roy *et al.*, 2001a,b; Mitchell *et al.*, 2002; Judelson *et al.*, 2008). De hecho, la ingestión de agua u otras bebidas de rehidratación durante el ejercicio limita el aumento de las concentraciones circulantes de C (Francesconi *et al.*, 1978; 1985; Francis, 1979; Brandenberger *et al.*, 1986; 1989; Melin *et al.*, 1988). Estas adaptaciones a la deshidratación, en base a los resultados derivados de la presente investigación, también parecen producirse en caballos durante el ejercicio. Sin embargo, considerando los valores basales, la elevación experimentada por las concentraciones de C no fue más intensa en los caballos DH. Por el contrario, esta elevación fue mayor en el grupo CTR. No disponemos de ninguna justificación para estos datos. Por otro lado, se ha encontrado una correlación positiva entre ALB y C, tanto durante el ejercicio como en la recuperación, datos que enfatizan la influencia de la deshidratación en los niveles séricos de C.

El estado hídrico de los caballos previo a la competición no pareció ser un determinante importante del cociente T/C, si bien en la categoría II, este cociente mostró valores superiores en los animales DH. Quizá este resultado esté asociado a que el estado hídrico estuvo más correlacionado con las concentraciones de C que con las de T, como mostró el análisis de correlación. En personas, por el contrario, Maresh *et al.* (2006) encontraron un ratio T/C inferior en estados de hipohidratación frente a euhidratación, resultados que no coinciden con los hallados en esta investigación en caballos.

En resumen, en el presente estudio, se ha encontrado que, independientemente de la categoría de peso, el ejercicio de tiro y arrastre condiciona una elevación de C, que se hace aún más evidente durante los primeros 30 minutos de recuperación. Por otro lado, la categoría I de peso, tanto en animales euhidratados como deshidratados, mostró niveles más elevados de T. El efecto del ejercicio de tiro y arrastre sobre la T fue variado, ya que si bien algunas categorías de peso experimentaron un incremento, en otros casos no hubo variaciones e incluso hubo un ligero descenso. Finalmente, cuando los caballos compiten en un estado de deshidratación, las concentraciones absolutas de T y de C se incrementan, si bien el aumento relativo a las concentraciones basales es más marcado en los caballos euhidratados. Esta investigación proporciona información sobre la relación entre hormonas catabólicas y anabólicas en respuesta a un ejercicio de gran base muscular, como es el tiro y arrastre, y en relación al estado hídrico del animal.

9.7. CONCLUSIONES

Este segundo estudio proporciona información sobre el efecto del ejercicio de tiro y arrastre en caballos, considerando el peso del animal, la carga arrastrada y el estado hídrico previo a dicho ejercicio. Se han analizado dos hormonas con importantes funciones metabólicas, la T y el C, con capacidades anabólica y catabólica respectivamente, así como la relación entre ellas (cociente o ratio T/C).

Las principales conclusiones del estudio II son las siguientes:

Primera conclusión. El ejercicio de tiro y arrastre en caballos machos enteros, indujo variaciones de diferente magnitud y dirección en las concentraciones circulantes de testosterona, observándose aumentos, descensos e incluso ausencia de cambios significativos según la categoría de peso.

Segunda conclusión. Si bien el ejercicio de tiro y arrastre, independientemente del peso del animal, de la carga arrastrada y de la duración del ejercicio, desencadenó una elevación de las concentraciones séricas de cortisol, este aumento fue más evidente durante la recuperación, observándose los valores máximos a los 30 minutos de haber concluido el ejercicio, reflejando la naturaleza catabólica de este tipo de actividad física.

Tercera conclusión. Tanto en un estado de euhidratación como de deshidratación, los caballos de menor peso corporal, inferior a 350 kg, tuvieron concentraciones superiores de testosterona.

Cuarta conclusión. Los animales deshidratados, en los diversos tiempos de toma de muestra, presentaron concentraciones superiores de testosterona y de cortisol en comparación con los euhidratados. Sin embargo, en comparación con los valores basales, la elevación inducida por el ejercicio en ambas hormonas fue más intensa en el grupo de caballos euhidratados.

Quinta conclusión. El estado hídrico no fue un factor determinante importante del cociente testosterona/cortisol en caballos de diferente peso corporal durante un ejercicio de tiro y arrastre.

9.8. RESUMEN

Testosterona, cortisol y cociente testosterona/cortisol en caballos con diferente estado hídrico durante un ejercicio de tiro y arrastre

Introducción. La testosterona (T) es una hormona con funciones anabólicas, mientras que el cortisol (C) presenta una acción catabólica, fundamentalmente a nivel muscular. Por ello, el cociente entre ambas hormonas (T/C) es un marcador de intensidad metabólica, reflejando un predominio catabólico o anabólico durante un ejercicio o durante la temporada de competiciones. La respuesta neuroendocrina depende del estado hídrico, encontrándose diferencias significativas cuando los individuos inician el ejercicio en condiciones de euhidratación, hipohidratación e hiperhidratación.

Objetivos. 1) Evaluar la respuesta de las concentraciones séricas de T y de C y del ratio T/C en caballos adultos, enteros, en respuesta a un ejercicio de tiro y arrastre; 2) Analizar la respuesta de estas hormonas en grupos de caballos con diferente peso, tirando de cargas distintas y que han iniciado el ejercicio con diferente estado hídrico.

Hipótesis. 1) Que el ejercicio de tiro y arrastre dará lugar a incrementos de T y C, siendo más evidente en aumento de T en los caballos más pesados; 2) Que los caballos deshidratados presentarán valores superiores de T y C en reposo, durante y tras el ejercicio, mostrando un incremento más marcado de estas hormonas que los caballos euhidratados.

Material y métodos. Se han estudiado 54 caballos machos, enteros, entrenados para tiro y arrastre, y divididos en dos grupos según su estado hídrico: control, CTR, euhidratados (n=9) y deshidratado, DH, con deshidratación hipertónica por restricción de agua y comida (n=45). Según su peso corporal, los animales han sido divididos en tres categorías: I (≤ 350 kg; n=3 para CTR; n=22 para DH), II (351-450 kg; n=3 para CTR; n=15 para DH) y III (≥ 451 kg; n=3 para CTR; n=8 para DH). Los animales cubrieron una

pista de arena de playa de 60 m de longitud tirando un carruaje, cargados con 2, 2,25 y 2,5 veces su peso corporal para las tres categorías respectivamente. La pista de arena se dividió en cuatro áreas de 15 m, en cada una de las cuales el animal hizo una parada obligatoria, que se incluyó como tiempo de carrera. Se extrajo sangre venosa en los siguientes tiempos: en reposo, antes del ejercicio (R), dentro de los 30 s iniciales tras la finalización del mismo (E) y a los 5 (5REC), 10 (10REC), 15 (15REC) y 30 min (30REC) de recuperación. Se analizaron los siguientes parámetros: albúmina (ALB), testosterona (T), cortisol (C) y cociente o ratio T/C.

Resultados. El ejercicio de tiro y arrastra condicionó un incremento de las concentraciones de T en las categorías de peso I y III, en los grupos DH y CTR. En la categoría II del grupo CTR, sin embargo, se apreció un descenso no significativo de la T. En cuanto al C, se halló una elevación progresiva, en las tres categorías de peso, y en los dos grupos con estado hídrico diferente, hallándose los valores más altos en el tiempo 30REC. El ratio T/C aumentó con el ejercicio en la categoría III en el grupo DH y descendió en la categoría II del grupo CTR. En cuanto al efecto de la categoría de peso, los animales de la categoría I del grupo DH y de las categorías I y III en el grupo CTR, tuvieron valores superiores de T. En relación al estado hídrico, se ha encontrado que, los animales del grupo DH, independientemente de la categoría de peso, tuvieron concentraciones superiores de T y de C en la mayoría de los tiempos de toma de muestra. Sin embargo, si se considera la elevación experimentada por estas hormonas durante el ejercicio o en la recuperación, en relación a los valores basales, el aumento fue más marcado para el C, en el grupo CTR que en el grupo DH, para las tres categorías de peso y para la T, también en el grupo CTR que en el DH, pero solo para las categorías I y III. Finalmente, el ratio T/C no fue diferente entre caballos CTR y DH para las categorías I y III, mientras que en la categoría II, los caballos DH tuvieron cocientes T/C más altos.

Conclusiones. El ejercicio de tiro y arrastre, independientemente del estado hídrico previo a la competición, de la carga que el animal desplaza y de la duración del ejercicio, representa una situación de estrés, con liberación de C, que perdura durante los primeros 30 minutos de recuperación. Los caballos de menor peso tuvieron concentraciones

superiores de T. Un estado hídrico comprometido se asoció a concentraciones más altas de T y C. A pesar de la elevación de estas hormonas, no se detectó un descenso del cociente T/C, que supondría un estado metabólico catabólico.

PALABRAS CLAVE. Caballos. Cortisol. Deshidratación. Ejercicio. Metabolismo. Testosterona.

9.9. SUMMARY

Testosterone, cortisol and testosterone/cortisol ratio in euhydrated and dehydrated horses during pulling exercises

Introduction. Testosterone (T) and cortisol (C) are metabolic hormones, with anabolic and catabolic functions respectively. T/C ratio is a marker of metabolic intensity and a reflex of the catabolic-anabolic balance during an exercise or a competitive session. The neuroendocrine response to exercise is partly determined by the hydration status prior to the exercise, and significant hormonal differences are found when individuals compete in euhydration, hypo o dehydration and hyperhydration.

Objectives. 1) To evaluate the changes in serum concentrations of C, T and T/C ratio in male horses in response to a pulling exercise; 2) To analyze the response of these hormones in horses with different hydration status, different body weight and pulling different load.

Hypothesis to check. 1) Pulling exercises would lead to increased serum concentrations of T and C, being T increase more evident in the heaviest horses (category III); 2) Dehydrated horses would have higher T and C concentrations, at rest, during exercise and recovery, and they would show a more marked increase in these concentrations compared to group CTR.

Material and methods. A total of 54 male horses, trained for pulling competitions, were studied. They were divided into two groups with different hydration status: group control or euhydrated (CTR; n=9) and dehydrated (DH; n=45), with hypertonic dehydration induced by water and food restriction prior to the exercise. According to their body weight, the animals were further classified into three categories: I (≤ 350 kg), II (351-450 kg) and III (≥ 451 kg). The animals covered a beach track 60 m long pulling a carriage, loaded with 2, 2.25 and 2.5-fold their body weight for the three categories respectively.

The track was divided into three sections of 20 m each, where the animal must perform a compulsory stop, included in the exercise time. Venous blood samples were withdrawn before exercise, at rest (time R), immediately after exercise (E) and at 5, 10, 15 and 30 min of a passive recovery (5REC, 10REC, 15REC and 30REC). Plasma concentrations of albumin (ALB) and serum concentrations of T and C were measured. The T/C ratio was further calculated.

Results. Pulling exercises led to increased serum T concentrations in categories I and III in the groups DH and CTR. In the category II of CTR group, however, a non significant decrease in serum T was observed. A progressive increase in serum C concentrations was found during the study, for the three body weight categories and in the two groups of horses with different hydration status, reaching the highest values at time 30REC. T/C ratio rose with exercise in category III of group DH and decreased in category II of group CTR. Regarding body weight categories, animals of category I in group DH and animals of categories I and III in group CTR, had higher serum T concentrations. In relation to hydric status, it was found that nevertheless of body weight category, horses of group DH showed higher serum T and C concentrations in most of the sampling times. However, the increase experienced by these hormones during exercise and/or recuperation compared to resting values, was higher in group CTR than in group DH. T/C ratio did not differ between horses CTR and DH in the three body weight categories, whereas in category I, DH horses had T/C ratio higher.

Conclusions. Pulling exercises, nevertheless of hydration status prior to the competition, load pulled and exercise duration, represented a stressful situation for the horse, leading to an increased release of C, with the highest values at time 30REC. The less heavy horses had higher serum T concentrations. A compromised hydration status was associated with higher serum T and C concentrations. Despite the elevation of the serum concentrations of both hormones, T/C ratio did not change, and therefore, a catabolic status was not found in these animals.

KEY WORDS. Cortisol. Dehydration. Exercise. Horses. Metabolismo. Testosterone.

9.10. BIBLIOGRAFÍA

- ADLERCREWTZ H, HÄRKÖNEN M, KUOPPASALMI K, NÄVEN H, HUHTANIEMI I, TIKKANEN H, REMES K, DESSYPRIS A, KARVONEN J (1987). Effect of training on plasma anabolic and catabolic steroid hormones and their response during physical exercise. *Int. J. Sports Med.* 7, Suppl. 1, 27-28.
- AHTLAINEN JP, PAKARINEN A, KRAEMER WJ, HÄKKINEN K (2003). Acute hormonal and neuromuscular responses and recovery to forced vs maximum repetitions multiple resistance exercises. *Int. J. Sports Med.* 24(6), 410-415.
- ALI MZ, KAZZAM E, AMIR N, NYBERG F, ADEM A (2013). Effects of Dehydration and blockade of angiotensin II AT1 receptor on stress hormones and anti-oxidants in the one-humped camel. *BMC Vet. Res.* Nov 19, 9:232. Doi:10.1186/1746-6148-9-232.
- ANGELI A, MINETTO M, DOVIO A, PACCOTTI P (2004). The overtraining syndrome in athletes: a stress-related disorder. *J. Endocrinol. Invest.* 27(6), 603-612.
- AURICH JE, KRANSKI S, PRVIZI N, AURICH C (2003). Somatostatin treatment affects testicular function in stallions. *Theriogenology* 60, 163-174.
- AYALA I, MARTOS NF, SILVAN G, GUTIERREZ-PANIZO C, CLAVEL JG, ILLERA JC (2011). Cortisol, adrenocorticotropic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Res. Vet. Sci.* En prensa.
- BAMBINO TH, HSUEH AJ (1981). Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology* 108(6), 2142-2148.
- BANFI G, DOLCI A (2006). Free testosterone/ cortisol ratio in soccer: usefulness of a categorization of values. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 46(4), 611-616.
- BANFI G, MARINELLO M, ROI GS, AGAPE V (1993). Usefulness of free testosterone/cortisol ratio during a season of elite speed skating athletes. *Int. J. Sports Med.* 14, 373-379.
- BAULIEU E, ROBEL P (1970). Catabolism of testosterone and androstenedione. En: *The androgens of the testis* (Eik-Nes K, Ed.). New York, Dekker, pp. 50-70.

BETTS JA, BEELEN M, STOKES KA, SARIS WHM, VAN LOON LJC (2011). Endocrine responses during overnight recovery from exercise: impact of nutrition and relationships with muscle protein synthesis. *Int. J. Sports Nutr. Exerc. Metab.* 21(5), 398-409.

BHASIN S, STORER TW, BERMAN N (1996). The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N. Engl. J. Med.* 335, 1-7.

BOBBERT T, MAI K, BRECHTEL L, SCHULTE HM, WEGER B, PFEIFFER AF, SPRANGER J, DIEDERICK S (2012). Leptin and endocrine parameters in marathon runners. *Int. J. Sports Med.* 33(3), 244-248.

BOOTH A, SHELLEY G, MAZUR Z, THARP E, KITTOCK R (1989). Testosterone, and winning and losing in human competition. *Horm. Behav.* 23, 556-571.

BRANDENBERGER G, CANDAS V, FOLLENIUS M, KAHN JM (1989). The influence of the initial state of hydration on endocrine responses to exercise in the heat. *Eur. J. Appl. Physiol.* 58, 674-769.

BRANDENBERGER G, CANDAS V, FOLLENIUS M, LIBERT JP, KAHN JM (1986). Vascular fluid shifts and endocrine responses to exercise in the heat. *Eur. J. Appl. Physiol.* 55, 123-129.

BROWN SN, KNOWLES TG, EDWARDS JE, WARRIS PD (1999). Behavioural and physiological responses of pigs followed by six hours recovery in lairage. *Vet. Rec.* 145(16), 421-426.

BROWNLIE KK, MOORE AW, HACKNEY AC (2005). Relationship between circulating cortisol and testosterone: influence of physical exercise. *J. Sports Sci. Med.* 4(1), 76-83.

CARDINALE M, STONE MH (2006). Is testosterone influencing explosive performance?. *J. Strength Cond. Res.* 20, 103-107.

CARNEIRO GF, LIU LKM, ILLERA JC, MUNRO CJ (1998). Enzyme immunoassay for the measurement of strone sulphate in cryptorchidism, stallions and donkeys. *Am. Assoc. Equine Pract. Proceedings* 4, pp. 3-4.

CASELLA S, VAZZANA I, GUIDICE E, FAZIO F, PICCIONE G (2015). Relationship between serum cortisol levels and some physiological parameters following reining training session in horse. *Anim. Sci. J.* Ahead of print. Doi: 10.1111/asj.12478.

CASTELLANI JW, MARESH CM, ARMSTRONG LE, KENEFICK RW, RIEBE D, ECHEGARAY M, KAROUVAS S, CASTRACONE VD (1998). Endocrine responses during exercise-heat stress: effects

- of prior isotonic and hypotonic intravenous dehydration. *Eur. J. Appl. Occup. Physiol.* 77(3), 242-248.
- CAYADO P, MUÑOZ-ESCASSI B, DOMÍNGUEZ C, MANLEY W, OLABARRI B, SÁNCHEZ DE LA MUELA N, CASTEJÓN F, MARAÑÓN G, VARA E (2006). Hormone response to training and competition in athletic horses. *Equine Vet. J.* 36, 274-278.
- CLAES A, BALL BA, CORBIN CJ, CONLEY AJ (2013). Age and season affect serum testosterone concentrations in cryptorchid stallions. *Vet. Rec.* 173(3), 168. Doi:10.1136/vr.101706.
- CLAY CM, SQUIRES EL, AMANN RP, NETT TM (1988). Influences of season and artificial photoperiod on stallions: luteinizing hormone follicle-stimulating hormone and testosterone. *J. Anim. Sci.* 66(5), 1246-1255.
- CONLEY AJ, BIRD IM (1997). The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol. Reprod.* 56, 789-799.
- COSCA DD, NAVATIO F (2007). Common problems in endurance athletes. *Am. Fam. Physician* 76(2), 237-244.
- COX JE, WILLIAMS JH, ROWE PH, SMITH JA (1973). Testosterone in normal, cryptorchid and castrated male horses. *Equine Vet. J.* 5, 85-90.
- CRAVANA C, MEDICA P, PRESTOPINO M, FAZIO E, FERLAZZO A (2010). Effects of competitive and noncompetitive showjumping on total and free iodothyronines, β -endorphin, ACTH and cortisol levels in horses. *Equine Vet. J.* 38, 179-184.
- CREWETHER BT, CHRISTIAN C (2010). Relationships between salivary testosterone and cortisol concentrations and training performance in Olympic weightlifters. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 50(3), 371-375.
- CREWETHER BT, LOWE T, WEATHERBY RP, GILL N, KEOGH J (2009). Neuromuscular performance of elite rugby union players and relations with salivary hormones. *J. Strength Cond. Res.* 23, 2046-2053.
- CREWETHER BT, SANCTUARY CE, KILDUFF LP, CARRUTHERS JS, GAVIGLIO CM, COOK CJ (2013). The workout responses of salivary free testosterone and cortisol concentrations and their association with the subsequent competition outcomes in professional rugby

league. *J. Strength Cond. Res.* 27(2), 471-476.

CUMMING DC, QUIGLEY ME, YEN SS (1983). Acute suppression of circulating testosterone levels by cortisol in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57(3), 671-673.

CUNNIFFE B, HORE AJ, WHITCOMBE DM, JONES KP, BAKER JS, DAVIES B (2010). Time course of changes in immunoendocrine markers following an international rugby game. *Eur. J. Appl. Physiol.* 108, 113-122.

DALY W, SEEGER CA, RUBIN DA, DOBRIDGE JD, HACKNEY AC (2005). Relationship between stress hormones and testosterone with prolonged endurance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 93, 375-380.

DE GRAAF-ROELFSEMA E, KEIZER MA, VAN BREDA E, WIJNBERG ID, VAN DER KOLK JH (2007). Hormonal responses to an acute exercise, training and overtraining. A review with emphasis on the horse. *Vet. Q.* 29(3), 82-201.

DECLOEDT A, BAILLY-CHOURIBERRY L, VANDEN BUSSCHE J, GARCIA P, POPOT MA, BONNAIRE Y, VANHAECKE L (2015). A validated UHPLC-MS/MS method to quantify low levels of anabolic-androgenic steroids naturally present in urine

of untreated horses. *Anal. Bioanal. Chem.* 407(15), 4385-4396.

DERBRÉ F, VINCENT S, MAITEL B, JACOB C, DELAMARCHE P, DELAMARCHE AM ZIUHAL H (2010). Androgen responses to sprint exercise in young men. *Int. J. Sports Med.* 31(5), 291-297.

DESMECHT D, LINDEN A, AMORY H, ART T, LEKEUX P (1996). Relationship of plasma lactate production to cortisol release following completion of different types of sporting events in horses. *Vet. Res. Commun.* 20(4), 371-379.

DHAKAL P, TSUNADA N, NAKAI R, KITAURA T, HARADA T, ITO M, NAGAOKA K, TOISHI Y, TANIYAMA H, GEN W, TAYA K (2011). Annual changes in day-length, temperature, and circulating reproductive hormones in thoroughbred stallions and geldings. *J. Equine Sci.* 22(2), 29-36.

DICKSON WM (1970). *Endocrine glands*. En: *Duke's physiology of domestic animals* (Swenson MJ, Ed.). Ithaca, NY: Cornell University Press, pp. 1189-1252.

DIERKS C, SIEME H, PIECHOTTA M, LEHNER S, MERKT JC, UPHAUS H, KLUG E, DISTL O (2015). Elevated testosterone levels in a racing horse due to an

- XY testicular disorder of sexual development. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 128(7-8), 335-339.
- DOAN BK, NEWTON RV, KRAEMER WJ, KWON YH, SCHEET TP (2007). Salivary cortisol, testosterone, and T/C ratio responses during a 30-h golf competition. Int. J. Sports Med. 28, 470-479.
- DOMA K, SCHUMANN M, SINCLAIR WH, LEICHT AS, DEAKIN GB, HÄKKINEN K (2015). The repeated bout effect of typical lower body strength training sessions on sub-maximal running performance and hormonal response. Eur. J. Appl. Physiol. 115(8), 1789-1799.
- DOUMAS BT, WATSON WA, BIGGS HG (1971). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin. Chem. Acta 31(1), 87-96.
- ELIAS M (1981). Serum cortisol, testosterone, and testosterone-binding globulin responses to competitive fighting in human males. Aggressive Behav. 7, 215-224.
- ELLOUMI M, MASO F, MICHAUX O, ROBERT A, LAC G (2003). Behaviour of saliva cortisol (C), testosterone (T) and T/C ratio during a rugby match and during the post-competition recovery days. Eur. J. Appl. Physiol. 90, 23-28.
- EVANS JW, WINGET CM, POLLAK EJ (1977). Rhythmic cortisol secretion in the equine: analysis and physiological mechanisms. Biol. Rhythms Res. 8(2), 111-121.
- FAHRNER CL, HACKNEY AC (1998). Effects of endurance exercise on free testosterone concentration and the binding affinity of sex hormone binding globulin. Int. J. Sports Med. 19, 12-15.
- FENSKE M (1997). Role of the cortisol in the ACTH-induced suppression of testicular steroidogenesis in guinea pigs. J. Endocrinol. 154, 407-414.
- FILAIRE E, BERNAIN X, SAGNOL M, LAC G (2001). Preliminary results on mood state, salivary testosterone:cortisol ratio and team performance in a professional soccer team. Eur. J. Appl. Physiol. 86(2), 179-184.
- FLAMINIO MJ, GAUGHAN EM, GILLESPIE JR (1996). Exercise intolerance in endurance horses. Vet. Clin. North Am.: Equine Pract. 12(3), 565-580.
- FLISINSKA-BOJANOWSKA A, GILL J, GRZELKOWSKA K (1992). Diurnal changes in cortisol level, neutrophilic number and lysozyme activity in foals during the first 13 weeks of life and in their lactating mothers. Zentralbl. Veterinarmed. A, 39(9), 641-647.

- FLISINSKA-BOJANOWSKA A, KOMOSA M, GILL J (1991). Influence of pregnancy on diurnal and seasonal changes in cortisol, T3 and T4 levels in the mare blood. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 98(1), 23-30.
- FLORINI J (1970). Effects of testosterone on qualitative pattern of protein synthesis in skeletal muscle. *Biochemistry* 9, 909-912.
- FRANCESCONI RP (1988). Endocrinological responses to exercise in stressful environments. En: *Exercise and sport science reviews* (Pandorf KB, Ed.). MacMillan, New York, pp. 255-284.
- FRANCESCONI RP, MAHER JT, MASON JW, BYNUM GD (1978). Hormonal responses of sedentary and exercising men to recurrent heat exposure. *Aviat. Space Environm. Med.* 49, 1102-1106.
- FRANCESCONI RP, SAWKA MN, PANDOFF KB (1984). Hypohydration and acclimation: effects on hormone responses to exercise/ heat stress. *Aviat. Space Environ. Med.* 55, 365-369.
- FRANCIS KT (1979). Effect of water and electrolyte replacement during exercise in the heat on biochemical indices of stress and performance. *Aviat. Space Environm. Med.* 50, 115-119.
- FRIEND TH (2000). Dehydration, stress and water consumption of horses during long-distance commercial transport. *J. Anim. Sci.* 78(10), 2568-2680.
- FRY AC, KRAEMER WJ, RAMSEY LT (1998). Pituitary-adrenal-gonadal responses to high intensity resistance exercise overtraining. *J. Appl. Physiol.* (1985), 85(6), 2352-2359.
- FRY AC, LOHNES CA (2010). Acute testosterone and cortisol responses to high power resistance exercise. *Fiziol. Cheloveka* 36(4), 102-106.
- FRY RW, MORTON AR, GARCIA-WEBB P, KEAST D (1991). Monitoring exercise stress by changes in metabolic and hormonal responses over a 24-h period. *Eur. J. Appl. Physiol.* 63(3-4), 228-234.
- GANJAM VK, KENNEY RM (1975). Androgens and oestrogens in normal and cryptorchid stallions. *J. Reprod. Fertil.* 23, 67-73.
- GANJAM VL, MURPHY BE, CHAN TH, CURRIE PA (1973). Mass spectrometric identification of testosterone, androstenediones, dehydroepiandrosterone, dihydrotestosterone, and androstenediol in human peripheral plasma. *J. Steroid Biochem.* 4, 443-450.

- GAVIGLIO CH, OSBORNE M, KELLY VG, KILDUFF LP, COOK CJ (2015). Salivary testosterone and cortisol response to four different rugby training exercise protocols. *Eur. J. Sports Sci.* 15(6), 497-504.
- GAVIGLIO CM, COOK GJ (2014). Relationship between midweek training measures of testosterone and cortisol concentrations and game outcome in professional rugby union matches. *J. Strength Cond. Res.* 28(12), 3447-3452.
- GOLLAND LC, EVANS DL, MCGOWAN CM, HODGSON DR, ROSE RJ (2003). The effects of overtraining on blood volumes in standardbred racehorses. *Vet. J.* 165(3), 228-233.
- GOLLAND LC, EVANS DL, STONE GM, TYLER-McGOWAN CM, HODGSON DR, ROSE RJ (1999). Maximal exercise transiently disrupts hormonal secretory pattern in Standardbred geldings. *Equine Vet. J.* 30, 581-585.
- GOMES RV, MOREIRA A, LODO L, NOSAKA K, COUTTS AJ, AOKI MS (2013). Monitoring training loads, stress, immune-endocrine responses and performance in tennis players. *Biol. Sport* 30(3), 173-180.
- GONZÁLEZ-BONO E, SALVADORA A, SERRANO MA, RICARTE J (1999). Testosterone, cortisol, and mood in a sports team competition. *Horm. Behav.* 35, 55-62.
- GORDON ME, MCKEEVER KH, BETROS CL, MANSO FILHO HC (2007). Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin and cortisol in horses. *Vet. J.* 173(3), 530-540.
- GRANDYS M, MAJERCZAK J, DUDA K, ZAPART-BUKOWSKA J, SZTEFKO K, ZOLADZ JA (2008). The effect of endurance training on muscle strength in young, healthy men in relation to hormonal status. *J. Physiol. Pharmacol.* 59(7), 89-103.
- GRANDYS M, MAJERCZAK J, KARASINSKI J, KULPA J, ZOLADZ JA (2012). Skeletal muscle myosin heavy chain isoform content in relation to gonadal hormones and catabolic-anabolic balance in trained and untrained men. *J. Strength Cond. Res.* 26(12), 3236-3239.
- GUGLIELMI C, PAOLINI AR, CONCONI F (1984). Variations of serum testosterone concentrations after physical exercises at different duration. *Int. J. Sports Med.* 5, 246-249.
- HACKENY AC, PREMO MC, McMURRAY RG (1995). Influence of aerobic versus anaerobic exercise on the

relationship between reproductive hormones in men. *J. Sports Sci.* 13, 305-311.

HACKNEY AC, FAHRNER CL, GULLEDGE TP (1998). Basal reproductive hormonal profiles are altered in endurance trained men. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 38(2), 138-141.

HACKNEY AC, FAHRNER CL, STUPNICKI R (1997). Reproductive hormonal responses to maximal exercise in endurance-trained men with low resting testosterone levels. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 105(5), 291-295.

HACKNEY AC, SHARP RL, RUNYAN WS, NESS RJ (1989). Relationship of resting prolactin and testosterone in males during intense training. *Br. J. Sports Med.* 23(3), 194.

HACKNEY AC, SZCZEPANOWSKA E, VIRU AM (2003). Basal testicular testosterone production in endurance-trained men is suppressed. *Eur. J. Appl. Physiol.* 89(2), 198-201.

HAGEDORN HW, SCHULZ R (1997). Cortisol levels in blood and urine of trotting horses. *Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr.* 110(11-12), 456-460.

HAMLIN MJ, SHEARMAN JP, HOPKINS WG (2002). Changes in physiological

parameters in overtrained Standardbred racehorses. *Equine Vet. J.* 34(4), 383-388.

HART KA, BARTON MH, FERGUSON DC, BERGHAUS R, SLOVIS NM, HEUSNER GL, HURLEY DJ (2011). Serum free cortisol fraction in healthy and septic neonatal foals. *J. Vet. Intern. Med.* 25(2), 345-355.

HAYES LD, GRACE FM, BAKER JS, SCULTHORPE N (2015). Exercise-induced responses in salivary testosterone, cortisol and their ratios in men: a meta-analysis. *Sports Med.* 45(5), 713-726.

HOFFMAN JR, FALK B, RADOM-ISAAC S, WEINSTEIN Y, MAGAZANIK A, WANG Y, YARUM Y (1997). The effect of environmental temperature on testosterone and cortisol responses to thigh intensity, intermittent exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 75, 83-87.

HOFFMAN JR, MARESH CM, ARMSTRONG LE, GABAREE CL, BERGERON MF, KENEFICK RW, CASTELLANI JW, AHLQUIST LE, WARD A (1994). Effects of hydration state on plasma testosterone, cortisol and catecholamine concentrations before and during mild exercise at elevated temperature. *Eur. J. Appl. Physiol.* 69, 294-300.

- HOGAN JP, PETHERICK JC, PHILLIPS CJ (2007). The physiological and metabolic impacts on sheep and cattle of feed and water deprivation before and during transport. *Nutr. Res. Vet.* 20(1), 17-28.
- HOLLIS AR, BOSTON RC, CORLEY KT (2008). Plasma aldosterone, vasopressin and atrial natriuretic peptide in hypovolaemia: a preliminary comparative study of neonatal and mature horses. *Equine Vet. J.* 40(1), 64-69.
- HOOGEVEEN AR, ZONDERLAND ML (1996). Relationship between testosterone, cortisol and performance in professional cyclists. *Int. J. Sport Med.* 17, 423-428.
- HOROHOV DW, DIMOCK AN, GUIRNALDA PD, FOLSOM RW, MCKEEVER KH, MALINOWSKI K (1999). Effect of exercise on the immune response of young and old horses. *Am. J. Vet. Res.* 60, 643-647.
- HURCOMBE SD, TORIBIO RE, SLOVIS N, KOHN CW, REFSAL K, SAVILLE W, MUDGE MC (2008). Blood arginine vasopressin, adrenocorticotropin hormone, and cortisol concentrations at admission in septic and critically ill foals and their association with survival. *J. Vet. Intern. Med.* 22(3), 639-647.
- HYYPPÄ S (2001). Effects of nandrolone treatment on recovery in horses after strenuous physical exercise. *J. Vet. Med. A Physiol. Clin. Med.* 48(6), 343-352.
- HYYPPÄ S (2005). Endocrinal responses in exercising horses. *Livestock Prod. Sci.* 92, 113-121.
- HYYPPÄ S, KARVONEN U, RÄSÄNEN LA, PERSSON SGB, PÖSÖ AR. Androgen receptors and skeletal muscle composition in trotters treated with nandrolone laurate. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 44, 481-491.
- HYYPPÄ S, RÄSÄNEN LA, PERSSON SGB, PÖSÖ AR (1995). Exercise performance indices in normal and anabolic steroid treated trotters. *Equine Vet. J.* 18, 443-447.
- ILLERA JC, SILVÁN G, MUNRO CJ, LORENZO PL, ILLERA MJ, LIU IK, ILLERA M (2003). Amplified androstenedione enzyme immunoassay for the diagnosis of cryptorchidism in the male horse: comparison with testosterone and estrone sulphate methods. *J. Steroids Biochem. Mol. Biol.* 84(2-3), 377-382.
- INOUE J, CERBITO WA, OGURI N, MATSUZAWA T, SATO K (1993). Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions. *Int. J. Andrology* 16, 155-158.

- INOUE J, CERBITO WA, OGURI N, MATSUZAWA T, SATO K (1993). Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions. *Int. J. Androl.* 16(2), 155-158.
- IRFAN Y (2015). Associations among dehydration, testosterone and stress hormones in terms of body weight loss before competition. *Am. J. Med. Sci.* 350(2), 103-108.
- IRVINE CH, ALEXANDER SL (1994). Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11(2), 227-238.
- JANCZAREK I, BEREZNOWSKI A, STRZELEC K (2013). The influence of selected factors and sport results of endurance horses on their saliva cortisol concentration. *Pol. J. Vet. Sci.* 16(3), 533-541.
- JENSEN J, OFTEBRO H, BREIGAN B, JOHANSSON A, OHLIN K, MEEN HD, STROMME SB, DAHL HA (1991). Comparison of changes in testosterone concentrations after strength and endurance exercise in well trained men. *Eur. J. Appl. Physiol.* 63, 467-471.
- JENSEN-WAERN M, LINDBERG A, JOHANNISSON A, GRÖNDAHL G, LINDGREN JA, ESSÉN-GUSTAVSSON B (1999). The effects of an endurance ride on metabolism and neutrophils function. *Equine Vet. J.* 30, 605-609.
- JIMÉNEZ M, HINCHCLIFF KW, FARRIS JW (1998). Catecholamine and cortisol responses of horses to increment exertion. *Vet. Res. Comm.* 22, 107-118.
- JOHNSON L, VARNER DD, THOMPSON DL JR (1991). Effect of age and season on the establishment of spermatogenesis in the horse. *J. Reprod. Fertil.* 44, 87-97.
- JUDELSON DA, MARESH CM, YAMAMOTO LM, FARRELL MJ, ARMSTRONG LE, KRAEMER WJ, VOLEK JS, SPIERING BA, CASA DJ, ANDERSON JM (2008). Effect of hydration state on resistance exercise-induced endocrine markers of anabolism, catabolism and metabolism. *J. Appl. Physiol.* 105, 816-824.
- JÜRIMÄE J, JÜRIMÄE T (2001). Responses of blood hormones to the maximal rowing ergometer test in college rowers. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 41(1), 73-77.
- KEADLE TL, POUCIAU SS, MELROSE PA (1993). Acute exercise stress modulates equine immune function. *J. Equine Vet. Sci.* 13, 226-231.
- KEDZIERSKI W, CYWINSKA A, STIZELEC K, KOWALIK S (2014).

Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session. *Anim. Sci. J.* 85(3), 313-317.

KEIZER H, JANSSEN GM, MENHEERE P, KRANENBURG G (1989). Changes in basal plasma testosterone, cortisol and dehydroepiandrosterone sulphate in previously untrained males and females preparing for a marathon. *Int. J. Sports Med.* 10(3), S139-S145.

KELLMAN M (2010). Preventing overtraining in athletes in high-intensity sports and stress/recovery monitoring. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 2, 95-102.

KENEFICK RW, MARESH CM, ARMSTRONG LE, CASTELLANI JW, WHITTLESY M, HOFFMAN JR, BERGERON MF (1998). Plasma testosterone and cortisol responses to training- intensity exercise in mild and hot environment. *Int. J. Sports Med.* 19(3), 177-181.

KINDERMANN W, SCHNABEL A, SCHMITT KM, BIRO G, CASSENS J, WEBER F (1982). Catecholamines, growth hormone, cortisol, insulin, and sex hormones in anaerobic and aerobic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 49(3), 388-389.

KIRKPATRICH JF, WIESNER L, KENNEY RM, GANJAM VK, TURNER JW (1977).

Seasonal variations in plasma androgens and testosterone in the North American wild horse. *J. Endocrinol.* 72(2), 237-238.

KNOBBE MG, MAENHOUDT C, TURNER RM, McDONNELL SM (2011). Physical, behavioral, endocrinologic, and cytogenetic evaluation of two Standardbred racehorses competing as mares with an intersex condition and high posttrace serum testosterone concentrations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 238(6), 751-754.

KNYCH HK, ARTHUR RM, STANELY SD, McKERNIE DS (2015). Dehydroepiandrosterone (DHEA) following administration as part of a nutritional supplement to exercised horses. *Drug. Test Anal.* 7(1), 39-47.

KOKKONEN UM, PÖSO AR, HYYPPÄ S, HUTTUNEN P, LEPPÄLUOTO J (2002). Exercise-induced changes in atrial peptides in relation to neuroendocrine responses and fluid balance in the horse. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. A* 49(3), 144-150.

KRAEMER WJ, FRY AC, WARREN BJ (1992). Acute hormonal responses in elite junior weightlifters. *Int. J. Sports Med.* 13(2), 103-107.

KRAEMER WJ, RATAMESS NA (2005). Hormonal responses and adaptations to

resistance exercise and training. *Sports Med.* 25, 339-361.

KRAEMER WJ, STARON RS, HAGEMAN FC, HIKIDA RS, FRY AC, GORDON SE, NINDL BC, GOTHSAK LA, VOLEK JS, MARX JO, NEWTON RU, HÄKKINEN K (1998). The effects of short-term resistance training on endocrine function in men and women. *Eur. J. Appl. Physiol.* 78(1), 69-76.

KRAWCZEL PD, FRIEND TH, CALDWELL DJ, ARCHER G, AMEISS K (2007). Effects of continuous versus intermittent transport on plasma constituents and antibody response to lambs. *J. Anim. Sci.* 85(2), 468-476.

KROBOTH PD, SALEK FS, PITTENGER AL, FABIAN TJ, FRYE RF (1999). DHEA and DHEA-S: a review. *J. Clin. Pharmacol.* 39(4), 327-348.

KUPCHAK BR, KRAEMER WJ, HOFFMAN MD, PHINNEY SD, VOLEK JS (2014). The impact of an ultramarathon on hormonal and biochemical parameters in men. *Wilderness Environm. Med.* 25(3), 278-288.

KUROSAWA M, NAGATA SI, TAKEDA F, MIMA F, HIRAGA A, KAI M, TAYA K (1998). Plasma catecholamine, adrenocorticotropin and cortisol responses to exhaustive incremental treadmill exercise of

the thoroughbred horse. *J. Equine Sci.* 9(1), 9-18.

LAC G, BERTHON P (2000). Changes in cortisol and testosterone levels and T/C ratio during an endurance competition and recovery. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 40, 139-144.

LASSOURD V, GAYRARD V, LAROUTE V (1996). Cortisol disposition and production rate in horses during rest and exercise. *Am. J. Physiol.* 271, R25-R33.

LELEU C, HAENTJENS F (2010). Morphological, haemato-biochemical and endocrine changes in young Standardbreds and maladaptation to early training. *Equine Vet. J.* 42(38), 171-178.

LI CY, HSU GS, SUZUKI K, KO MH, FANG SH (2015). Salivary immune factors, cortisol and testosterone responses in athletes of a competitive 5,000 m race. *Chin. J. Physiol.* 58(4), 263-269.

LINDEN A, ART T, AMORY H, DESMECHT D, LEKEUX P (1991). Effects of 5 different exercises, transportation and ACTH administration on plasma cortisol concentration in sport horses. En: *Equine Exercise Physiology 3* (Persson SGB, Lindholm A, Jeffcott LB, Eds.), ICEEP Publications, Davis, CA, USA, pp. 391-396.

- MÄESTU J, ELLIAKIM A, JÜRIMÄE J, VALTER I, JÜRIMAE T (2010). Anabolic and catabolic hormones and energy balance of the male bodybuilders during the preparation for the competition. *J. Strength Cond. Res.* 24(4), 1074-1081.
- MÄESTU J, JÜRIMÄE J, JÜRIMÄE T (2005). Hormonal responses to maximal rowing before and after heavy increase in training volume in highly trained male rowers. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 45(1), 121-126.
- MALINOWSKI K, SHOCK EJ, ROCHELLE P, KEARNS CF, GUIRNALDA PD, MCKEEVER KH (2006). Plasma β -endorphin, cortisol and immune responses to acute exercise are altered by age and exercise training in horses. *Equine Vet. J.* 36, 267-273.
- MARC M, PRAVIZI N, ELLENDORFF F, KALLWEIT E, ELSAESSER F (2000). Plasma cortisol and ACTH concentrations in the warmblood horse in response to a standardized treadmill exercise test as physiological markers for evaluation of training status. *J. Anim. Sci.* 78, 1936-1946.
- MARESH CM, WHITTLESEY MJ, ARMSTRONG LE, YAMAMOTO LM, JUDELSON DA, FISH KE, CASA DJ, KAVOURAS SA, CASTRACANE VD (2006). Effect of hydration state on testosterone and cortisol responses to training-intensity exercise in collegiate runners. *Int. J. Sports Med.* 27, 765-770.
- MARON MB, HORWATH SM, WILKERSON JE (1977). Blood biochemical alterations during recovery from competitive marathon running. *Eur. J. Appl. Physiol.* 36, 231-238.
- McCALL GE, BYRNES WC, FLECK SS (1999). Acute and chronic hormonal responses to resistance training designed to promote muscle hypertrophy. *Can. J. Appl. Physiol.* 24(1), 96-107.
- MCGUIGAN MR, EGAN AD, FOSTER C (2004). Salivary cortisol responses and perceived exertion during high intensity and low intensity bouts of resistance exercise. *J. Sports Sci. Med.* 3(1), 8-15.
- MCKEEVER KH, GORDON MB (2004). Endocrine alterations in the equine athlete. En: *Equine Sports Medicine and Surgery. Basic and clinical sciences of the equine athlete* (Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ, Eds). Saunders Co., Philadelphia, pp. 798-814.
- McMURRAY RG, EUBANK TK, HACKNEY AC (1995). Nocturnal hormonal responses to resistance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 72, 121-126.

- McMURRAY RG, PROCTOR CR, WILSON WL (1991). Effect of caloric deficit and dietary manipulation on aerobic and anaerobic exercise. *Int. J. Sports Med.* 12, 167-172.
- McMURRAY SM, MURRAY SC (1995). Bachelor and harem stallions behavior and endocrinology. En: *Equine reproduction VI, Biology of reproduction monograph, series 1*, 35-148.
- MEDICA P, GIACOPPO E, FAZIO E, AVENI F, PELLIZZOTTO R, FERLAZO A (2010). Cortisol and haematological variables of horses during a two day trekking event: effects of preliminary transport. *Equine Vet. J.* 38, 167-170.
- MELIN B, CURÉ M, PEQUIGNOT JM, BITTEL J (1988). Body temperature and plasma prolactin and norepinephrine relationships during exercise in a warm environment: effect of dehydration. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 58(1-2), 146-151.
- METTLER S, MITCHELL M, TIPTON KD (2010). Increased protein intake reduces lean body mass loss during weight loss in athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 42(2), 326-337.
- MITCHELL JB, DUGAS JP, McFARLIN BK, NELSON MJ (2002). Effect of exercise, heat stress, and hydration on immune cell number and function. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34, 1941-1950.
- MOHR M, DRAGANIDIS D, CHATZINIKOLAOU A, BARBERO-ALVAREZ JC, CASTAGNA C, DOUROUDOS I, AVLONITI A, MARGELI A, PAPASSOTIRIOUR I, FLOURIS AD, JAMURTAS AZ, KRUSTOP P, FATOUROS IG (2016). Muscle damage, inflammatory, immune and performance responses to three football games in 1 week in competitive male players. *Eur. J. Appl. Physiol.* 116(1), 179-193.
- MOQUIN A, MAZZEO RS (2000). Effect of mild dehydration on the lactate threshold in women. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32(2), 396-402.
- MUNRO CJ, LASLEY BL (1988). Non-radiometric methods for immunoassay of steroid hormones. *Prog. Clin. Biol. Res.* 285, 289-329.
- MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN FM (2012). Age- and gender-related variations in hematology, clinical biochemistry and hormones in Spanish fillies and colts. *Res. Vet. Sci.* En prensa.
- MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN FM, LUCAS RG, PALACIO J (2011). The effects of hypertonic dehydration changes on renal function and arginine

vasopressin in the horse during pulling exercises. *Vet. J.* 189(1), 83-88.

MYHAL M, LAMB DR (2002). Hormones as performance-enhancing drugs. En: *Contemporary endocrinology: sports endocrinology* (Warren MP, Constantini W, Eds.). Humana Press, pp. 429-471.

NAGATA S, TAKEDA F, KUROSAWA M, MIMA K, KIRAGA A, KAI M, TAYA K (1999). Plasma adrenocorticotropin, cortisol and catecholamines responses to various exercises. *Equine Vet. J.* 30, 570-574.

NINDL BC, KRAEMER WJ, DEEVER DR, PETERS JL, MARX JO, HECKMAN JT, LOOMIS GA (2001). LH secretion and testosterone concentrations are blunted after resistance exercise in men. *J. Appl. Physiol.* (1985), 91(3), 1251-1258.

OBSKORN Z, STUPNICKI R (1996). Effect of temperature and pH on the magnitude of the free fraction of cortisol in serum. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104(4), 350-352.

OPSTAD PK (1992). Androgenic hormones during prolonged physical stress, sleep and energy deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74(5), 1176-1183.

PAPACOSTA E, NASSIS GP, GLEESON M (2015). Salivary hormones and anxiety in

winners and losers of an international judo competition. *J. Sports Sci.* 19, 1-7.

PARKER AJ, HAMLIN GP, COLEMAN CJ, FITZ PATRICK LA (2004). Excess cortisol interferes with a principal mechanism of resistance to dehydration in *Bos Taurus* steers. *J. Anim. Sci.* 82(4), 1037-1045.

PASSELERGUE P, LAC G (1999). Saliva cortisol, testosterone, and T/C ratio variations during a wrestling competition and during the post-competitive recovery period. *Int. J. Sports Med.* 20, 109-113.

PASSELERGUE P, ROBERT A, LAC G (1995). Salivary cortisol and testosterone variations during an official and a simulated weight-lifting competition. *Int. J. Sport Med.* 16, 298-303.

PAZZOLA M, PIRA E, SEDDA G, VACCA GM, COCCO R, SECHI S, BONELLI P, NICOLOSSI P (2015). Responses of hematological parameters, beta-endorphin, cortisol, reactive oxygen metabolites, and biological antioxidant potential in horses participating in a traditional tournament. *J. Anim. Sci.* 93(4), 1573-1580.

PONCE-GONZALEZ JG, OLMEDILLAS H, CALLEJA-GONZALEZ J, GUERRA B, SANCHIS-MAYSI J (2015). Physical fitness, adiposity and testosterone concentrations are associated with playing position in

professional basketballers. *Nutr. Hosp.* 31(6), 2624-2632.

POPOT MA, HOUGHTON E, GINN A, JONES M, TEALE M, SAMUELS T, LASSOURD V, DUNNETT N, COWAN DA, BONNAIRE Y, TOUTAIN PL (1997). Cortisol concentrations in post competition horse urine: a French and British survey. *Equine Vet. J.* 29(3), 226-229.

PORT K (1991). Serum and saliva cortisol responses and blood lactate accumulation during incremental exercise testing. *Int. J. Sports Med.* 12(5), 490-494.

PULLINEN T, MERO A, HUTTUNEN P, PAKARINEN A, KOMI PV (2002). Resistance exercise-induced hormonal responses in men, women and pubescent boys. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34, 806-813.

PULLINEN T, MERO A, MacDONAL E, PAKARINEN A, KOMI PV (1998). Plasma catecholamine and serum testosterone responses to four units of resistance exercise in young and adult male athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 77, 413-420.

RALSTON J; STENHOUSE AM, STENHOUSE NS, BUCK GJ, LUCKS SF, REYNOLDSON JA, BOLTON JR (1988). Cortisol concentrations in blood and urine of horses. *Aust. Vet. J.* 65(1), 1-5.

RIVERO JL, VAN BREDA E, ROGERS CW, LINDNER A, VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN MM (2008). Unexplained underperformance syndrome in sport horses: classification, potential causes and recognition. *Equine Vet. J.* 40, 611-618.

ROBSON PJ, ALSTON TD, MYBURGH KH (2003). Prolonged suppression of the innate immune system in the horse following an 80 Km endurance race. *Equine Vet. J.* 35(2), 133-137.

ROEMMICH JN, SINNING WE (1997). Weight loss and wrestling training: effects on growth-related hormones. *J. Appl. Physiol.* 82(6), 1760-1764.

ROSE RJ, HODGSON DR, SAMPSON D, CHAN W (1983). Changes in plasma biochemistry in horses competing in a 160 Km endurance ride. *Aust. Vet. J.* 60(4), 101-105.

ROSSDALE PD, BURGUEZ PN, CASH RS (1982). Changes in blood neutrophils/lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse. *Equine Vet. J.* 14, 293-298.

ROY BD, GREEN HJ, BURNETT M (2001a). Prolonged exercise following diuretic-induced hypohydration effects on

- fluid and electrolyte hormones. *Horm. Metab. Res.* 33, 540-547.
- ROY BD, GREEN HJ, GRANT SM, TARNOPOLSKY MA (2001b). Acute plasma volume expansion in the untrained alters the hormonal response to prolonged moderate-intensity exercise. *Horm. Metab. Res.* 33, 238-245.
- SALVADORA A, SUAY F, MARTINEZ-SANCHIS S, SIMON VM, BRAIN PF (1999). Correlating testosterone and fighting in male participants in judo contests. *Physiol. Behav.* 68, 205-209.
- SATTLER FR, CASTANEDA-SCEPPA C, BINDER EF, SCHROEDER ET, WANG Y, BHASIN S, KAWAKUBO M, STEWART Y, YARASHESKI KW, ULLOOR J, COLLETTI P, ROUBENOFF R, AZEN SP (2009). Testosterone and growth hormone improve body composition and muscle performance in older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94(6), 1991-2001.
- SATUÉ K, DOMINGO R, MUÑOZ A (2007). Serum cortisol concentrations in Spanish mares during pregnancy. *Ippologia* 18(3), 21-25.
- SCHMIDT A, AURICH J, MÖSTL E, MÜLLER J, AURICH C (2010). Changes in cortisol release and heart rate and heart rate variability during the initial training of 3-year-old sport horses. *Horm. Behav.* 58(4), 628-636.
- SILBERZAHN P, BOUHAMIDI R, ZWAIN I, GAILLARD JL, MARTIN B (1988). Testosterone blood content is regulated by testicular aromatization-conjugation in the stallions. *Steroids* 52(4), 353-354.
- SKELTON KV, McMENIMAN MP, DOWSETT KF (1989). The effects of anabolic steroids on nitrogen metabolism in young horses. En: *Proceedings of the 11th Equine Nutrition and Physiology Symposium*, pp. 114-115.
- SMILIOS I, PILIANIDIS T, KARAMOUZIS M, TOKMAKIDIS SP (2003). Hormonal responses after various resistance exercise protocols. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35, 644-654.
- SNOW DH, MUNRO CD, NIMMO MA (1982a). Effects of nandrolone phenylpropionate in the horse. (1) resting animal. *Equine Vet. J.* 14, 219-223.
- SNOW DH, MUNRO CD, NIMMO MA (1982b). Effects of nandrolone phenylpropionate in the horse: (2) general effects in animals undergoing training. *Equine Vet. J.* 14, 224-228.

SNOW DH, ROSE RJ (1981). Hormonal changes associated with long distance exercise. *Equine Vet. J.* 13(3), 195-197.

SOMA LR, UBOH CE, GOAN F, McDONNELL S, PACK J (2007). Pharmacokinetics of boldenone and stanozol and the results of quantification of anabolic and androgenic steroids in race horses and nonrace horses. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30(2), 101-108.

SOMA LR, UBOTH CE, GUAN F, MCDONNELL S (2008). Plasma concentrations of testosterone and 19-nortestosterone (nandrolone) in the nonracing intact male horse by liquid chromatography-mass spectrophotometry. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 31, 587-590.

SOMA LR, UBOTH CE, YOU Y, GUAN F, MCDONNELL S (2011). Plasma concentrations of testosterone and nandrolone in racing and nonracing intact male horses. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 35(2), 133-138.

STOUT TA (2005). Modulating reproductive activity in stallions: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 89(1-4), 93-103.

STULL CL, RODIEK AU (2000). Physiological responses of horses to 24 hours of transportation using a commercial van during summer conditions. *J. Anim. Sci.* 78(6), 1452-1466.

TE PAS MF, WIJNBERG ID, HOEKMAN AJ, DE GRAAF-ROELFSEMA E, KEIZER HA, VAN BREDA E, DUCRO B, VAN DER KOLK JH (2013). Skeletal muscle transcriptome profiles related to different training intensities and detraining in Standardbred horses: a search for overtraining biomarkers. *Vet. J.* 197(3), 717-723.

THORNTON JR (1985). Hormonal responses to exercise and training. En: *Equine Exercise Physiology* (Rose RJ, Ed.). Philadelphia, PA Saunders, pp. 477-496.

THORNTON JR, DOWSETT KF, MANN R, BODERO DAV (1991). Influence of anabolic steroids in the response to training in 2-year-old horses. En: *Equine Exercise Physiology 3* (Persson SGB, Lindholm A, Jeffcott LB, Eds.). Granta Editions, Davis, Ca, USA, pp. 503-508.

TOFÉ E, MUÑOZ A, CASTEJÓN F, TRIGO P, CASTEJÓN-RIBER C, GÓMEZ-DÍEZ M, RIBER C (2013). Behaviour of the renin angiotensin aldosterone axis during exercise in euhydrated and dehydrated horses. *Res. Vet. Sci.* 95, 615-622.

TOUTAIN PL, LASSOURD V, POPOT MA, LAROUTE V, ALUINERIE M, BONNAIRE Y (1995). Urinary cortisol excretion in the resting and exercising horse. *Equine Vet. J.* 18, 457-462.

- TOUTAIN PL, OUKESSOU M, AUTEFAGE A, ALVINERIE M (1988). Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses. *Domest. Animal Endocrinol.* 5(1), 55-59.
- TREMBLAY MS, COPELAND JL, VAN HELDER WV (2003). Effects of training status and exercise mode on endogenous steroid hormones in men. *J. Appl. Physiol.* 96, 531-539.
- URHAUSEN A, GABRIEL H, KINDERMANN W (1995). Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med.* 20(4), 251-276.
- URHAUSEN A, KINDERMANN W (1987a). Behaviour of testosterone, sex hormone binding globulin (SHBG), and cortisol before and after triathlon competition. *Int. J. Sports Med.* 8, 305-308.
- URHAUSEN A, KULLMER T, KINDERMANN W (1987b). A 7-week follow-up of the behaviour of testosterone and cortisol during the competition period in rowers. *Eur. J. Appl. Physiol.* 56, 528-533.
- VANHELDER WP, RADOMSKI MW, GOODE RC, CASEY K (1985). Hormonal and metabolic responses to three types of exercise of equal duration and external work output. *Eur. J. Appl. Physiol. Comp. Physiol.* 54(4), 337-342.
- VIRU A, VIRU M (2004). Cortisol- essential adaptation hormone in exercise. *Int. J. Sports Med.* 25(6), 461-464.
- VIRU AM, HACKNEY AC, VÄLJA E, KARELSON K, JANSON T, VIRU M (2001). Influence of prolonged continuous exercise on hormone responses to subsequent exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 85, 578-585.
- VOLEK JS, KRAEMER WJ, BUSH JA, INCLEDON T, BOETES M (1997). Testosterone and cortisol in relationship to dietary nutrients and resistance exercise. *J. Appl. Physiol.* 82(1), 49-54.
- VON LEWINSKI M, BIAU S, ERBER R, ILLE N, AURICH J, FAURE J-M, MÖSTL E, AURICH C (2013). Cortisol release, heart rate and heart rate variability in the horse and its rider: different responses to training and performance. *Vet. J.* 197, 229-232.
- WAHL P, MATHES S, ACHTZEHN S, BLOCH W, MESTER J (2014). Active vs. passive recovery during high-intensity training influences hormonal response. *Int. J. Sports Med.* 35(7), 583-589.
- WAHL P, MATHES S, KÖHLER K, ACHTZEHN S, BLOCK W, MESTER J (2013). Acute metabolic, hormonal, and psychological responses to different

endurance training protocols. *Horm. Metab. Res.* 45(11), 827-833.

WELSH TH Jr, BAMBINO TH, HSUEH AJ (1982). Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. *Biol. Reprod.* 27(5), 1138-1146.

WHEELER GD, SINGH M, PIERCE WD, EPLING WF, CUMMING DC (1991). Endurance training decreases serum testosterone levels in men without changes in luteinizing hormone pulsatile release. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72(2), 422-425.

WHEELER GD, WALL SR, BELCASTRO AN, CUMMING DC (1984). Reduced serum testosterone and prolactin levels in male distance runners. *J. Am. Med. Assoc.* 252(4), 514-516.

WILKERSON JE, HORVATH SM, GUTIN B (1980). Plasma testosterone during treadmill exercise. *J. Appl. Physiol.* 49(2), 249-253.

WILLIAMS RJ, MARLIN DJ, SMITH N, HARRIS RC, HARESIGN W, DAVIS MOREL MC (2002). Effects of cool and hot environmental conditions on neuroendocrine responses of horses to treadmill exercise. *Vet. J.* 164, 54-63.

WILMORE JH, COSTILL DL (1994). Hormonal regulation of exercise. En: *Physiology of sport and exercise*. Champaign, IL, Human Kinetics, pp. 142-143.

WILSON DW, KINGERY S, SNOW DH (1991). The effect of training on adrenocortical function in thoroughbred racehorses. En: *Equine Exercise Physiology 3* (Persson SGB, Lindholm A, Jeffcott LB, Eds.). ICEEP Publications, Davis, CA, USA, p. 482-489.

WINSLEY R, MATOS N (2011). Overtraining and elite young athletes. *Med. Sports Sci.* 56, 97-105.

WONG CW, SMITH SE, THONG YH, OPDEBEECK JP, THORNTON JR (1992). Effects of exercise stress on various immune functions in horses. *Am. J. Vet. Res.* 53(8), 1414-1417.

YEARGIN SW, CASA DJ, JUDELSON DA, McDERMOTT BP, GANIO MS, LEE EC, LOPEZ RM, STEARNS RL, ANDERSON JM, ARMSTRONG LE, KRAEMER WJ, MARESH CM (2010). Thermoregulatory responses and hydration practices in heat-acclimatized adolescents during preseason high school football. *J. Athl. Train.* 45(2), 136-146.

ZIETZMANN M, NIESCHLAG E (2001). Testosterone levels in healthy men and the

relation to behavioural and physical characteristics: facts and constructs. Eur. J. Endocrinol. 144(3), 183-197.



10. CONCLUSIONES

GENERALES

Mediante esta investigación pretendíamos conocer con más profundidad la regulación neurohormonal del estado hídrico y electrolítico en caballos que realizan ejercicios de tiro y arrastre, de corta duración, comparando dos estados hidroelectrolíticos diferentes (deshidratación hipertónica y euhidratación). Así mismo, se ha estudiado el efecto del ejercicio, considerando el peso del animal y la carga arrastrada. Para ello, se han determinado las concentraciones de las siguientes hormonas: REN, ANG, ALD, T y C, así como el ratio entre estas dos últimas (cociente T/C), en relación al tiempo de ejercicio y a marcadores laboratoriales de estado hídrico.

Las principales conclusiones de este estudio son las siguientes:

Primera conclusión. Los caballos deshidratados, en comparación con los euhidratados, mostraron en reposo valores superiores de los biomarcadores de deshidratación (valor hematócrito, concentraciones de albúmina, lactato, sodio, potasio, cloro) y de las hormonas angiotensina II, testosterona y cortisol. Sin embargo, no han existido diferencias en las concentraciones de renina y aldosterona entre caballos con deshidratación hipertónica y euhidratación.

Segunda conclusión. El ejercicio de tiro y arrastre, independientemente del estado hídrico previo a la competición, condicionó elevaciones del valor hematócrito, concentración de albúmina, lactato, sodio y cortisol. Por otro lado, este tipo de ejercicio dio lugar a un incremento de angiotensina II en los caballos deshidratados y de aldosterona en los caballos euhidratados. Las variaciones en las concentraciones de T variaron según la categoría de peso.

Tercera conclusión. A pesar de la diferencia de peso de los animales estudiados (menos de 350 kg, entre 351 y 450 kg y más de 450 kg), los cambios hidroelectrolíticos y de las concentraciones séricas de las hormonas implicadas en la regulación de la volemia y la presión sanguínea (renina, angiotensina II y aldosterona), durante el ejercicio, fueron similares entre las tres categorías de caballos. Además, e independientemente del estado hídrico, los caballos de la categoría de peso I, tuvieron concentraciones superiores de testosterona.

Cuarta conclusión. Los animales deshidratados, en la mayoría de los tiempos de muestra, tuvieron valores hematocritos más elevados, así como concentraciones significativamente superiores de albúmina, lactato, sodio, potasio, cloro, angiotensina II, testosterona y cortisol. Por tanto, el estado hídrico condiciona los valores absolutos de los biomarcadores de hidratación y de las hormonas implicadas en la regulación hidroelectrolítica y el equilibrio anabólico-catabólico del ejercicio. Por el contrario, el estado hídrico no fue un factor determinante importante del cociente testosterona/cortisol.

Quinta conclusión. En relación a los valores basales, sin embargo, el incremento experimentado por el valor hematocrito y por las concentraciones de albúmina, sodio, potasio, cloro y angiotensina, ha sido similar en caballos euhidratados y deshidratados. El grupo control mostró una elevación más intensa de aldosterona, cortisol y testosterona, si bien esta última solo en las categorías de peso I y III. Por el contrario, las concentraciones de lactato se incrementaron en mayor grado en los caballos deshidratados.



11. RESUMEN GENERAL

**Efecto del ejercicio de tiro sobre el eje renina-angiotensina-aldosterona y cociente
cortisol/testosterona en caballos euhidratados y deshidratados**

Introducción. El estado hídrico previo al inicio de un ejercicio (hiperhidratación-deshidratación o hipohidratación y euhidratación) modifica la respuesta neurohumoral. En personas, la deshidratación origina una liberación incrementada de las hormonas implicadas en el mantenimiento de la volemia y del estado hidroelectrolítico, tales como la renina (REN), angiotensina (ANG) y aldosterona (ALD). La testosterona (T) es una hormona anabólica, mientras que el cortisol (C) es una hormona de estrés, con funciones catabólicas. El cociente T/C es un reflejo de la intensidad anabólica/catabólica de un ejercicio y en atletas humanos, se ve afectada por el estado hídrico.

Objetivos. 1) Describir las variaciones en las concentraciones de REN, ANG, ALD, T, C y ratio T/C en caballos durante un ejercicio de tiro y arrastre, en relación con otros marcadores de equilibrio hidroelectrolítico y en función de la carga arrastrada; 2) Analizar si la respuesta de estas hormonas al ejercicio difiere entre animales con deshidratación hipertónica y euhidratados;

Hipótesis: 1) Que las concentraciones de REN, ANG, ALD, T, C serán más elevadas en los caballos deshidratados que en los euhidratados; 2) Que el ejercicio de tiro y arrastre, particularmente en los animales de mayor peso corporal, inducirá una mayor activación del eje REN, ANG, ALD y una liberación superior de T; 3) Que los animales deshidratados experimentarán un incremento más intenso de estas hormonas en respuesta al ejercicio.

Material y métodos. Se han llevado a cabo dos estudios simultáneos. En el estudio I, se han analizado los siguientes parámetros: valor hematocrito (HTO), albúmina (ALB), sodio (Na), potasio (K), cloro (Cl), lactato (LA) y concentraciones séricas de REN, ANG y ALD y en el estudio II, se han determinado las concentraciones de ALB, T, C y ratio T/C. En el estudio I, se han incluido 64 caballos machos, enteros y castrados, divididos en

dos grupos según su estado hídrico: grupo control o euhidratado (CTR, n=11) y grupo deshidratado (DH; n=53), con deshidratación hipertónica inducida por restricción de agua y comida. Además, según su peso corporal, los animales se han dividido en 3 categorías de peso: I (≤ 350 kg; n=3 para grupo CTR; n=23 para DH), II (351-450 kg; n=3 para CTR; n=18 para DH) y III (≥ 451 kg; n=5 para CTR; n=12 para DH). En el estudio II, se han incluido los mismos animales, con excepción de la categoría de peso III para el grupo CTR, que solo está constituida por 3 animales, en lugar de 5, al descartar a los machos castrados, debido a la medición de T. Todos los animales, realizaron un ejercicio consistente en recorrer una pista de arena de playa de 60 m de longitud, tirando de un carruaje, con 2, 2,25 y 2,5 veces su peso corporal para las tres categorías de peso. La pista de arena se dividió en cuatro áreas de 15 m, en cada una de las cuales, el animal hizo una parada obligatoria, de duración decidida por el acompañante, y que se incluyó como tiempo de carrera. Los animales eran eliminados si se superan los 5 min de duración. En los dos estudios, se tomaron muestras de sangre en los siguientes tiempos: en reposo, antes del ejercicio (R), dentro del primer minuto tras finalizar el ejercicio (E) y a los 5, 10, 15 y 30 minutos de una recuperación pasiva (5REC, 10REC, 15REC y 30REC).

Resultados. Estudio I. La diferencia de peso de los caballos tuvo una influencia mínima en los valores basales y en la respuesta al ejercicio. En reposo, los caballos DH tuvieron valores superiores de HTO, ALB, LA, Na, K y ANG en comparación con los CTR. El ejercicio condicionó una elevación de HTO, ALB, LA y Na, tanto en los caballos CTR como en los DH. Se encontró un incremento de ANG en los caballos DH y de ALD en los caballos CTR. La elevación con el ejercicio experimentada por los parámetros analizados fue de magnitud similar en los grupos CTR y DH, con excepción del LA (incrementó más en DH) y ALD (aumentó más en CTR). Estudio II. El ejercicio dio lugar a un aumento de T en las categorías I y III de los grupos CTR y DH, así como un descenso en la categoría II del grupo CTR. El C mostró un aumento progresivo en las tres categorías y en los dos grupos de estado hídrico, con los valores máximos en el tiempo 30REC. El ratio T/C aumentó en la categoría III del grupo DH, descendió en la categoría II del grupo CTR y no varió en los otros casos. Los animales DH, independientemente de la categoría de peso, tuvieron valores superiores de T y C, en la mayoría de los tiempos

de extracción de muestras. Sin embargo, si se consideran los cambios experimentados por estas hormonas durante el ejercicio o en la recuperación, en relación a los valores basales, el aumento del C fue más marcado en el grupo CTR que en el DH, para las tres categorías de peso. Las variaciones de la concentración de T fueron superiores en las categorías de peso I y III del grupo CTR que en el grupo DH. El ratio T/C fue estadísticamente igual entre caballos CTR y DH en las categorías I y III, mientras que en la categoría II, los caballos DH presentaron cocientes T/C mayores.

Conclusiones. La deshidratación hipertónica altera la concentración de las hormonas implicadas en la regulación del equilibrio hidro-electrolítico, de la presión sanguínea y del metabolismo. Sin embargo, el estado hídrico previo al ejercicio tiene una acción mínima sobre la magnitud de estos cambios en respuesta a un ejercicio de tiro y arrastre de corta duración (inferior a 5 min).

Relevancia. Se ha demostrado que la respuesta neurohumoral, determinada en base a las concentraciones circulantes de las hormonas REN, ANG, ALD, T y C, se ve afectada por el ejercicio cuando el animal empieza el mismo en estado de euhidratación o de deshidratación.

PALABRAS CLAVE. Angiotensina. Aldosterona. Caballos. Cortisol. Ejercicio. Renina. Testosterona



12. MAIN SUMMARY

**Effect of pulling exercise on the renin-angiotensin-aldosterone axis and in the
testosterone/cortisol ratio in euhydrated and dehydrated horses**

Introduction. Hydration status prior to exercise (hyperhydration- dehydration or hypohydration) modifies neurohumoral response to subsequent exercise. In human beings, dehydration elicits an increased release of hormones involved in the maintenance of volemia and hydric and electrolyte balance, such as renin (REN), angiotensin II (ANG) and aldosterone (ALD). Cortisol (C) is a stress hormone with catabolic functions, whereas testosterone (T) has anabolic actions. Therefore, T/C ratio reflexes anabolic/catabolic balance during or after an exercise and in humans, it changes according to hydration.

Objectives: 1) To describe changes in REN, ANG, ALD, T and C concentrations and T/C ratio in horses during a pulling exercise, in relation to other biomarkers of hydration and the load pulled; 2) To analyze whether the response of these hormones is different between euhydrated animals compared to those with hypertonic dehydration.

Hypothesis. 1) REN, ANG, ALD, T and C concentrations would be higher in dehydrated than in euhydrated horses; 2) Pulling exercise in horses, particularly in the heaviest animals, would lead to a greater activation of the REN, ANG and ALD axis and a greater release of T; 3) Dehydrated animals would show a greater increase of circulating concentrations of these hormones in response to exercise.

Material and methods. Two simultaneous studies have been performed. In the study I, the following parameters have been measured: packed cell volume (PCV), albumin (ALB), sodium (Na), potassium (K), chloride (Cl), lactate (LA), REN, ANG and ALD. In the study II, the concentrations of ALB, T and C were measured and the ratio T/C was calculated. Sixty-four male (both intact and castrated) were included in the study I, divided into two groups according to their hydration previously to the exercise: control group or euhydrated (CTR; n=11) and dehydrated group (DH; n=53), with hypertonic

dehydrated induced by water and food restriction. In addition, according to their body weight, horses were divided into three body weight categories: I (≤ 350 kg; n=3 for CTR; n=23 for DH), II (351-450 kg; n=3 for CTR; n=18 for DH) and III (≥ 451 kg; n=5 for CTR; n=12 for DH). The same animals were included in the study II, with the exception of two animals of the category III of group CTR, which were excluded because they were geldings. All the animals carried out an exercise consisting in covering a sand beach track 60 m long, pulling a carriage loaded with 2, 2.25 or 2.5 times their body weight, for the three categories respectively. The track was divided into three sections of 20 m each, where the animals have compulsory stop. The duration of the stop is selected by the accompanier person, but it is included in the time of exercise and the animal is eliminated from competition if a total duration of 5 min is exceeded. In both studies, blood samples were taken at rest, before exercise (R), within the first minute after exercise (E), and at 5, 10, 15 and 30 min of a passive recovery (5REC, 10REC, 15REC and 30REC).

Results. Study I. The different body weight of the horse has a minor influence on the resting values and in the response to exercise. In resting conditions, DH horses exhibited higher PCV, ALB, LA, Na, K, Cl and ANG-II levels compared to CTH horses. Exercise led to an increase in PCV, ALB, LA and Na, both in CTR and DH groups. An increase in ANG in DH horses and ALD in CTR horses was found in response to exercise. The rise with the exercise presented by the studied parameters was of similar magnitude in the groups CTR and DH, with the exception of LA (greater increase in DH) and ALD (greater increase in CTR). Study II. C concentrations presented a progressive increase in the three body weight categories and in the two groups of horses with different hydration, achieving the highest values at time 30REC. Serum T concentrations rose with exercise in categories I and III of group CTR and DH, but experienced a reduction in category II of group CTR. T/C ratio increased in category III of group DH, decreased in category II of group CTR and it did not change in the other cases. DH horses, nevertheless of body weight category and in most of the sampling times, had higher T and C values. However, if we consider the changes underwent by these hormones during exercise or recuperation compared to resting values, the increase of C concentrations was more marked in the group CTR than in the group DH, for the three body weight categories. The variations in

serum T concentrations were more marked in categories I and III of group CTR than in group DH. Significant differences in the T/C ratio between CTR and DH in categories I and III were not found, whereas horses DH of category II had higher T/C ratios.

Conclusions. The hypertonic dehydration alters the circulating concentrations of the hormones implied in the regulation of hydration, electrolyte balance, blood pressure and metabolism. However, hydration status prior to the exercise exerts a minor effect on the magnitude of these changes in response to a pulling exercise of short duration (shorter than 5 min).

Relevance. It has been demonstrated that the neurohumoral response to exercise, determined in based of the circulating concentrations of REN, ANG, ALD, T and C differs when the horse begins the exercise with euhydration or dehydration.

KEY WORDS. Angiotensin. Aldosterone. Cortisol. Exercise. Horses. Renin. Testosterone.



13. ARTÍCULO DERIVADO DE LA TESIS (indicios de calidad)

**TOFÉ E, MUÑOZ A, CASTEJÓN F, TRIGO P, CASTEJÓN-
RIBER C, GÓMEZ-DÍEZ M, RIBER C (2013).** Behaviour of
the renin angiotensin aldosterone axis during exercise in
euhydrated and dehydrated horses. *Research in Veterinary Science*
95, 615-622.