



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE
NITRITO EN EQUINOS FINA SANGRE DE CARRERA (FSC) CON
DIFERENTE RENDIMIENTO**

Cristian Alexis Vega Cornejo

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: HÉCTOR ADARMES AHUMADA

Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias

SANTIAGO, CHILE

2015



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE
NITRITO EN EQUINOS FINA SANGRE DE CARRERA (FSC) CON
DIFERENTE RENDIMIENTO**

Cristian Alexis Vega Cornejo

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

Nota Final:

Profesor Guía: Héctor Adarmes Ahumada.

Firma:

Profesor Corrector: Marco Galleguillos Caamaño.

Firma:

Profesor Corrector: Ana María Ramírez Kamann.

Firma:

SANTIAGO, CHILE.
2015

INDICE DE CAPÍTULOS

PAG

1	INTRODUCCIÓN.
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.
7	OBJETIVOS.
8	MATERIAL Y MÉTODOS.
12	RESULTADOS.
16	DISCUSIÓN.
21	CONCLUSIONES.
22	BIBLIOGRAFÍA.
28	ANEXO

INDICE DE TABLAS

PAG

- 9 TABLA 1. Valores de referencia para variables hematológicas.
- 12 TABLA 2. Características generales de los ejemplares seleccionados para este estudio y sus valores hematológicos de los equinos (Media \pm DE).
- 12 TABLA 3. Concentración de nitrito plasmático [NO₂⁻] (μ M) en cada grupo de rendimiento y valor total. (Media \pm DE)
- 15 TABLA 4. Análisis de correlación de Spearman para la concentración plasmática de nitrito con las diferentes variables estudiadas.

INDICE DE FIGURAS

PAG

- 13 FIGURA 1. Concentración plasmática de nitrito en cada grupo en estudio (Media y DE).
- 14 FIGURA 2. Carreras corridas durante los últimos 6 meses en cada grupo en estudio (Media \pm DE).
- 14 FIGURA 3. Correlación de concentración plasmática de nitrito y volumen globular aglomerado (VGA).

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es un gas soluble sintetizado en diversas células a partir de L-arginina, a través de una reacción de oxidación catalizada por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS). Se sintetiza en el endotelio vascular, y posee una potente acción vasodilatadora, que permite mantener una respuesta vascular adecuada a las crecientes demandas de flujo de sangre durante el ejercicio. En la sangre es oxidado a nitrito, que permanece estable en el plasma sanguíneo. Al mismo tiempo, el nitrito puede ser reducido a óxido nítrico en condiciones de hipoxia.

El objetivo de este trabajo es describir la concentración plasmática de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en equinos FSC con diferente rendimiento hípico.

Se utilizaron tres grupos de equinos FSC con diferente rendimiento. La muestra de sangre se obtuvo en la mañana, en condición de ayuno y reposo. Luego se centrifugó para obtener el plasma, y la concentración de nitrito se determinó por la prueba de Griess. Los resultados se expresan como μM de nitrito, indicándose valor promedio \pm desviación estándar para cada grupo.

El mayor valor se obtuvo en el grupo intermedio ($226,96 \pm 28,17$), el cual difiere significativamente ($p < 0,05$) respecto al grupo de bajo rendimiento ($190,36 \pm 26,81$) y de alto rendimiento ($157,94 \pm 31,59$). Este resultado se explica debido a que los grupos de rendimiento bajo e intermedio tienen un régimen de competencia similar (14,1 y 12,0 promedio de carreras corridas en últimos 6 meses respectivamente), en tanto para el grupo de alto rendimiento este promedio es de 6,7. A su vez, en el presente estudio la concentración de nitrito se correlacionó positivamente con el valor del VGA ($\rho = 0,44$).

Estos hallazgos sugieren que la concentración de nitrito plasmática como indicador de actividad de NOS endotelial, no constituiría un biomarcador de rendimiento hípico en ejemplares con diferente régimen de training, pero podría representar una adaptación al ejercicio.

Palabras claves: Óxido Nítrico, Nitrito, Equino, Ejercicio.

ABSTRACT

Nitric Oxide (NO) is a soluble gas synthesized in various cells from L-arginine through a oxidation reaction catalyzed by NO synthase (NOS). Nitric Oxide is synthesized in the vascular endothelium, and has potent vasodilating action, which enables to maintain adequate vascular response to growing demands of blood flow during exercise. In blood is oxidized to nitrite, that remains stable in blood plasma. At the same time nitrite can be reduced to NO under hypoxia.

The objective of the study is to describe the plasma concentration of nitrite as a stable metabolite of nitric oxide in thoroughbreds with different performance.

Three groups of thoroughbreds with different performance were used. The blood sample was obtained in the morning, at fasting condition and rest. Then centrifuged to obtain plasma, and the concentration of nitrite was determined by the Griess assay. Results are expressed as μM of nitrite, indicating average value \pm standard deviation for each group.

The highest value was obtained in the intermediate group ($226,96 \pm 28,17$), which differed significantly ($p < 0,05$) compared to the low performance group ($190,36 \pm 26,81$) and high performance group ($157,94 \pm 31,59$). This result is explained because the low and intermediate groups have a similar competition regime (14,1 and 12,0 average of races in last 6 months, respectively), while for high performance group this average is 6,7. In turn, the nitrite concentration was positively correlated with PCV ($\rho = 0,44$).

These findings suggest that plasma nitrite concentration as an indicator of endothelial NOS activity, would not constitute a biomarker of performance in thoroughbreds with different training regime, but could represent an adaptation to exercise.

Keywords: Nitric Oxide, Nitrite, Equine, Exercise.

INTRODUCCIÓN

El caballo actual es el resultado de la evolución desde los animales de pastoreo, en los cuales la velocidad y resistencia fueron progresivamente modificadas por la cría selectiva por parte de los seres humanos, siendo adaptados a una gran variedad de usos, que en el caso de los Fina Sangre de Carrera (FSC), les permite correr a gran velocidad, alcanzando como máximo 64 kilómetros por hora en distancias entre 800 y 5.000 metros (Hinchcliff y Geor, 2008).

El ejercicio produce cambios coordinados en casi todos los sistemas del cuerpo, los cuales representan una respuesta compleja e integrada cuyo objetivo final es satisfacer la demanda energética de la contracción muscular. La producción de la energía necesaria para el ejercicio está vinculada a la oxidación de sustratos endógenos y un suministro adecuado de oxígeno (Hinchcliff y Geor, 2008). De modo que la coordinada función de los sistemas respiratorio, cardiovascular y muscular, proporciona cambios rápidos en el flujo de oxígeno desde los pulmones a las mitocondrias (Poole y Erickson, 2008).

Durante el ejercicio aumenta de forma notable la demanda de oxígeno a nivel muscular, aumentando entre 20 a 30 veces el flujo sanguíneo a nivel de capilares musculares, debido en parte a la producción local de sustancias vasoactivas que incluyen el óxido nítrico (NO) (Rivero y Piercy, 2008). Este es un potente vasodilatador que se transforma rápidamente en nitrito, un metabolito estable que juega un importante papel como biomarcador de la actividad endógena de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), cuya actividad es la síntesis de óxido nítrico (Kleinbongard *et al.*, 2003).

En la presente memoria de título se abordó la determinación de la concentración plasmática de nitrito como marcador biológico de la síntesis de óxido nítrico en equinos FSC en periodo de entrenamiento activo, con el fin de evaluar su asociación con rendimiento.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El óxido nítrico es un gas soluble sintetizado en diversas células de mamíferos a partir de L-arginina (Lauer *et al.*, 2002), a través de una reacción de oxidación catalizada por la familia de enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) (Bryan, 2006). Se han identificado hasta la fecha tres isoformas distintas: NOS neuronal (tipo I), NOS inducible (tipo II) y la NOS endotelial (tipo III) (Lauer *et al.*, 2002).

La síntesis de óxido nítrico es el resultado de una serie de reacciones de óxido/reducción, que incluyen oxígeno molecular y un gran número de coenzimas, las que se unen a sitios específicos en la enzima (Bruckdorfer, 2005). Estas coenzimas son tetrahidrobiopterina (H4B), nicotín adenín dinucleótido fosfato (NADPH), flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD). Además, NOS I y III son dependientes de Ca^{2+} y calmodulina (Lauer *et al.*, 2002). Ambas enzimas se expresan constitutivamente y producen óxido nítrico en bajas concentraciones. En tanto, NOS II produce grandes cantidades de óxido nítrico después de la inducción por estímulos externos, por ejemplo, lipopolisacárido bacteriano, alcanzando una actividad máxima después de 24 horas, y es activa a bajas concentraciones de calcio (Bruckdorfer, 2005).

Las tres isoformas catalizan la síntesis de óxido nítrico, pero se distinguen por sus diferencias estructurales, localizándose en tejidos específicos para las diversas funciones que el óxido nítrico tiene en el organismo. El foco inicial de investigación de óxido nítrico fue el endotelio, donde se encontró una actividad constitutiva de NOS. Además, el óxido nítrico tiene funciones más allá de su capacidad para causar vasodilatación de los vasos sanguíneos, ya que también actúa como neurotransmisor y como bactericida cuando se libera en grandes cantidades por los macrófagos activados (Bruckdorfer, 2005).

La NOS III o endotelial (eNOS) se encuentra en regiones de la membrana plasmática llamadas caveolas, que son estructuras que están asociadas a receptores para agentes que regulan la actividad de las células endoteliales. La activación fisiológica más importante de la NOS III se produce como resultado de la estimulación repetida del flujo pulsátil de la sangre sobre el endotelio. Pequeñas cantidades de óxido nítrico se producen en el endotelio de vasos sanguíneos de gran y mediano calibre, para dilatar las arterias (Bruckdorfer, 2005). Esta vasodilatación inducida por el endotelio, es necesaria para mantener una

respuesta vascular adecuada a las crecientes demandas de flujo de sangre durante el ejercicio (Rassaf *et al.*, 2007). Así, el óxido nítrico contribuye a la disminución de la resistencia vascular periférica que contrarresta el aumento del gasto cardiaco manteniendo la presión arterial dentro de los rangos fisiológicos (Poole y Erickson, 2008).

La activación de NOS III puede producirse por aumento del Ca^{+2} intracelular a través de procesos mediados por receptores asociados con ATP, bradiquinina y acetilcolina. El Ca^{+2} se une a la calmodulina y este complejo activa la enzima. Sin embargo, este requerimiento de Ca^{+2} se puede reducir si la enzima es modificada por fosforilación de sus residuos de serina, existiendo evidencia de que esta fosforilación es un mecanismo común para la activación de la NOS III. Así, en el endotelio se encuentran constantemente bajos niveles de óxido nítrico, pero no asociados al estímulo de agonistas como la acetilcolina, sino que se asocia al estrés normal de fricción generado por el flujo pulsátil de sangre vía proteína quinasa B (PKB), que fosforila directamente la NOS III. Este óxido nítrico endotelial difunde fácilmente a través de la membrana celular hacia el músculo liso y al lumen del vaso sanguíneo (Bruckdorfer, 2005).

El óxido nítrico difunde a través de las membranas celulares del músculo liso sin mediación de receptores específicos, y en el citosol se une a la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC), cuya actividad conduce a la formación de GMP cíclico (GMPc) a partir del nucleótido GTP (Bruckdorfer, 2005).

El GMPc activa la proteína quinasa G (PKG), la que inhibe la fosforilación de la cadena ligera de miosina, necesaria para su interacción con filamentos de actina y posterior contracción. La PKG fosforila los canales de K^{+} dependientes de Ca^{2+} (BKCa) y los receptores de inositol trifosfato (IP3R), disminuyendo así la concentración de Ca^{2+} citosólico necesario para activar la quinasa de la cadena ligera de miosina (QCLM). Además la PKG fosforila e inhibe la Rho quinasa, que en su forma activa inhibe la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (FCLM). De este modo, el óxido nítrico inhibe la interacción entre actina y miosina, y por ende la contracción, provocando vasodilatación, aumentando el flujo sanguíneo y disminuyendo la presión arterial (Bruckdorfer, 2005).

Además, Kleinbongard *et al.* (2006) demostraron que eritrocitos humanos expresan una NOS III activa y funcional, cuya actividad regula la deformidad del eritrocito e inhibe la activación plaquetaria, y contribuye al pool circulante de óxido nítrico y sus metabolitos.

El óxido nítrico tiene una vida media en sangre estimada entre 0,05-1.8 milisegundos (Kelm, 1999), siendo oxidado principalmente a nitrito y nitrato. Cuando el óxido nítrico reacciona con oxihemoglobina se produce principalmente nitrato y metahemoglobina (Lundberg y Weitzberg, 2010), por lo que los eritrocitos debido a su contenido de hemoglobina, podrían metabolizar en forma importante al óxido nítrico (Gladwin *et al.*, 2003). Además, el nitrito producido también es transformado rápidamente a nitrato en sangre entera. De esta forma la vida media de nitrito en la sangre humana es de unos 110 segundos (Kelm, 1999), mientras que la del nitrato es de 5 a 8 horas. Sin embargo, la concentración de nitrito en el plasma, luego de la separación de las células sanguíneas, es estable durante varias horas. Ambos, nitrito y nitrato se excretan a través de los riñones (Bryan, 2006).

Entre otras fuentes endógenas de nitrito en los mamíferos, además de la oxidación del óxido nítrico, se describe la reducción del nitrato contenido en la saliva por parte de bacterias comensales en el tracto digestivo y las fuentes nutricionales tales como la carne, vegetales y el agua de bebida (Bryan, 2006).

Por mucho tiempo se creyó que el nitrito era sólo un metabolito inerte de la vía del óxido nítrico, sin embargo ahora se acepta que representa un depósito estable capaz de reducirse a óxido nítrico y otras especies reactivas de nitrógeno durante la hipoxia, para mediar la señalización fisiológica (Lundberg *et al.*, 2008).

En este sentido, se han demostrado numerosas vías para la reducción de nitrito *in vivo*, muchos de los cuales implican enzimas y hemo-proteínas. Así, desoxihemoglobina en la sangre ha demostrado actuar como nitrito reductasa regulada alostéricamente (Lundberg y Weitzberg, 2010). Su capacidad de nitrito-reductasa se ha propuesto como mecanismo sensible a la hipoxia para regular el flujo de la microcirculación de la sangre (Larsen *et al.*, 2012). Por su parte, la xantina oxidasa (XO) también ha presentado capacidad para reducir nitrato y nitrito para formar óxido nítrico. También la aldehído oxidasa tiene capacidad para

reducir el nitrito, al igual que componentes de la cadena respiratoria mitocondrial durante la respiración (Lundberg y Weitzberg, 2010).

Las concentraciones de nitrito plasmático en varias especies de mamíferos, incluyendo a los seres humanos, se encuentran entre el rango de 100 – 600 nM (Kleinbongard *et al.*, 2003), mientras que las concentraciones de nitrato están entre el rango de 20-40 μ M (Lundberg y Weitzberg, 2010).

Para investigar el rol del óxido nítrico sobre la función cardiorrespiratoria en el ejercicio, se experimentó con 5 caballos sobre una cinta ergométrica, a cada uno se le administró con diferencia de 2 a 3 semanas y en orden aleatorio, un inhibidor de NOS, metil éster de NG-nitro-L-arginina (L-NAME) e infusión salina como control. En condiciones de reposo, posterior a administración de L-NAME se evidenció, respecto al control, una menor frecuencia cardíaca y un aumento en la presión arterial pulmonar y sistémica. Durante el ejercicio hubo una reducción en la tolerancia al ejercicio, en el gasto cardíaco, en el aporte de O₂ y de la conductancia vascular. Del mismo modo aumentó la extracción de O₂ respecto al control, pero compensatorio ante la disminución del aporte. Sin embargo, a la máxima velocidad, dicha extracción no fue suficiente para mantener el consumo de O₂ (Kindig *et al.*, 2000). En el mismo sentido Manohar *et al.* (2001), sometieron 7 FSC a dos pruebas físicas con diferencia de 7 días, previo a las cuales administraron en orden aleatorio L-NAME o solución salina como control. En condiciones de reposo, tras el tratamiento con L-NAME se evidenció hipertensión pulmonar y sistémica, además de bradicardia respecto al control. Por otro lado, el ejercicio produjo un aumento en la concentración de hemoglobina evidente en ambos grupos, pero que fue menor tras el tratamiento con L-NAME, y por ende también el contenido de O₂ arterial respecto al control.

Por otra parte, existen estudios sugerentes de que la concentración de nitrito en plasma puede estar relacionada a la capacidad física en humanos. En este sentido, Rassaf *et al.* (2007) determinaron en 55 individuos sanos la concentración de nitrito antes y después de una prueba física ergométrico con intensidad incremental. Se estableció que el ejercicio aumentó significativamente la concentración plasmática de nitrito en un 28,87%, lo que se correlacionó positivamente con la dilatación de la arteria braquial mediada por flujo y con la potencia máxima (P) alcanzada en la prueba. Al mismo tiempo determinaron que la

concentración plasmática de nitrito al final de la prueba constituye un predictor tanto de la duración del ejercicio como de la potencia máxima (P). Además, Dreissigacker *et al.* (2010) reportaron que al final de un ejercicio a una intensidad del 80% de la carga máxima, la concentración plasmática de nitrito se correlacionó positivamente con un mayor trabajo mecánico realizado (W) y con un mayor tiempo de ejercicio antes de alcanzar exhaustación. También se determinaron los niveles basales de nitrito en humanos altamente entrenados, encontrándose un promedio de 0,092 μM y una correlación con la capacidad para efectuar ejercicio según lo determinado por umbral anaeróbico lactato (Totzeck *et al.*, 2012).

Por otra parte, en individuos con enfermedad arterial periférica (EAP), con compromiso en el flujo sanguíneo a los tejidos periféricos, se determinó que un periodo de entrenamiento físico de tres meses aumentó los niveles de nitrito plasmático y al mismo tiempo redujo la presentación de claudicación, que es la típica sintomatología de EAP, durante una caminata sobre una cinta ergométrica. Al mismo tiempo los individuos aumentaron su tiempo máximo de marcha y el consumo máximo de oxígeno ($\text{VO}_{2\text{max}}$) (Allen *et al.*, 2010).

Adicionalmente, Poveda *et al.* (1997) reportaron una concentración de nitrito plasmático significativamente mayor en un grupo de atletas humanos altamente entrenados con respecto a un grupo control no entrenado. Similares efectos se evidenciaron en equinos; Marañón *et al.* (2009) determinaron los niveles de nitrato y nitrito en condición de reposo en equinos de competencia, tanto equitación y doma. Se encontró que los niveles plasmáticos de estos metabolitos eran superiores respecto a un grupo control de equinos ejercitados regularmente, pero no a nivel competitivo. Además, evaluaron el efecto del tipo de ejercicio sobre estos niveles plasmáticos, encontrando un aumento significativo en caballos de salto, pero no en caballos de doma.

Estos resultados proporcionan evidencia de un efecto favorable del nitrito en el ejercicio de resistencia de alta intensidad, y por esto se plantea en el presente trabajo determinar la concentración plasmática de nitrito en equinos FSC sometidos a condiciones de alta exigencia física.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración de nitrito en plasma sanguíneo en equinos Fina Sangre de Carrera (FSC) con diferente rendimiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la concentración plasmática de nitrito en equinos Fina Sangre de Carrera (FSC).
2. Comparar la concentración de nitrito entre grupos de equinos de distinto rendimiento.
3. Establecer la asociación entre la concentración de nitrito con variables hematológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se utilizaron 30 equinos (machos y hembras) Fina Sangre de Carrera del Club Hípico de Santiago, a los que se les extrajo sangre por sistema de vacío mediante venipuntura de la vena yugular con agujas de 18G por 1 pulgada, en 2 tubos estériles de 4 mL con anticoagulante EDTA por cada animal. Los animales que se utilizaron estaban dentro de un rango etario entre 3 y 7 años, en periodo de entrenamiento y competencia, pero con ausencia de ejercitación de alta intensidad durante los últimos 3 días. Con el fin de establecer estado de salud física de los equinos se determinaron variables hematológicas.

Determinación del volumen globular aglomerado

La determinación del volumen globular aglomerado (VGA) se realizó mediante el método de microhematocrito (Jain, 1986) utilizando una microcentrífuga modelo IEC Micro-MB, expresando los valores como porcentaje.

Determinación de proteínas plasmáticas y fibrinógeno.

La concentración de proteínas plasmáticas totales y fibrinógeno plasmático se realizó para descartar procesos de deshidratación o inflamatorios en curso, ya que la hiperproteinemia es provocada generalmente por un estado de deshidratación, mientras que el fibrinógeno, como proteína de fase aguda, es más importante como un sensible marcador de foco de inflamación (Mcgowan y Hodgson, 2014). Para esto se utilizaron dos tubos de microhematocrito por cada animal, con un primer tubo se determinó la concentración de proteínas plasmáticas totales mediante refractometría, depositando el plasma sobre la cámara de un refractómetro y leyendo directamente en la escala del mismo y expresando los datos en g/dL. Adicionalmente, con el segundo tubo se determinó concentración de fibrinógeno mediante el método de precipitación por calor (Jain, 1986), luego de la incubación a 56°C durante 3 minutos y posterior centrifugación por 1 minuto, tras lo cual se realizó la lectura directa en escala del refractómetro. Este segundo valor se resta del valor de la concentración plasmática total de proteínas, y así se obtiene la concentración de fibrinógeno plasmático, y el valor obtenido es también expresado en g/dl.

Para las variables hematológicas se utilizó como valores de referencia los datos de McGowan y Hodgson (2014) (Tabla1) con el objetivo de incorporar o descartar a los ejemplares en este estudio.

TABLA 1. Valores de referencia para variables hematológicas.

HEMATOCRITO O VGA (%)	32 - 48
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS (g/dL)	5,5 - 7,5
FIBRINÓGENO (g/dL)	< 0,4

(Modificada de McGowan y Hodgson, 2014)

Se conformaron 3 grupos de diferente rendimiento hípico, cada uno con 10 animales, el rendimiento fue definido según el índice de cada animal al momento de la obtención de la muestra. De este modo se determinó un grupo de bajo rendimiento con índice entre 1 y 10, un segundo grupo de rendimiento intermedio con índice entre 11 y 29, y un tercer grupo de alto rendimiento el cual consideró ejemplares de índice igual o superior a 30.

El índice se determina mediante una tabla única de hándicap establecida en el artículo número 2 del “Reglamento de hándicap” avalado por el artículo 58 del capítulo VII del Código de Carreras (Anón, 2012). Esta tabla determina los recargos y descargo por carrera corrida en los hipódromos de Santiago, de modo que el índice de un caballo refleja el rendimiento según sus actuaciones en el tiempo.

La tabla es la siguiente:

Caballo ganador sube entre 2 y 5 puntos su índice, de acuerdo a la diferencia con que aventaja al segundo lugar:

Ventaja perceptible a 1 pescuezo: 2 Puntos.

1/2 cuerpo a 2 cuerpos: 3 Puntos.

2 1/4 cuerpos a 3 3/4 cuerpos: 4 Puntos.

4 cuerpos o más: 5 Puntos.

Caballo que llegue segundo sube 2 puntos.

Caballo que llegue tercero sube 1 punto.

Caballo que llegue cuarto mantendrá su índice.

Caballo que no figure (quinto o posterior) baja un punto en el índice.

Los artículos número 3 y 4 del mismo reglamento establecen las condiciones en que varía el artículo número 2, que define las excepciones según el número de competidores y/o distancia en que se desarrolla la competencia.

A su vez el artículo 16 del mismo reglamento determina que el índice acumulativo máximo de un caballo será 56 y el mínimo 1.

Para cada ejemplar seleccionado para este estudio, se completó una ficha (Anexo 1) de acuerdo a la cual se rotuló cada tubo. Las muestras de sangre se obtuvieron en condición de ayuno, en animales sin signos de excitación ni nerviosismo y previo a cualquier tipo de entrenamiento de rutina. Recolectadas las muestras fueron inmediatamente centrifugadas a 1000 G durante 15 minutos, en una centrifuga Hermle Z230. Una vez obtenido el plasma, este fue alicuotado en tubos eppendorf de 2 mL, y almacenados a temperatura de -18°C, hasta su posterior transporte a temperatura de refrigeración, hacia el Laboratorio de Química y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Determinación de nitrito

Para determinar la concentración de nitrito en las muestras se utilizó la reacción de Griess según la metodología descrita por Miranda *et al.* (2001). Para ello las muestras se diluyeron con etanol en una relación de 1:7 para precipitar las proteínas, que se separarán mediante centrifugación a 1700 x g por 15 minutos y en algunos sobrenadantes se estableció la ausencia de proteínas en base al método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951). Para la reacción de Griess el sobrenadante se alicuotó en fracciones de 400 µL en tubos Eppendorf® a los que luego se les agregó 400 µL de agua destilada (en triplicado). Luego se agregó a cada tubo 400 µL de reactivo de Griess, el cual se preparó con una relación de 1:1 de solución N-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato (NEDD) 0,1% p/v en HCl al 5% y sulfanilamida (SULF) 2% p/v en HCl al 5%. La mezcla se homogenizó y se incubó a

temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyó su absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-120-01 marca Shimadzu®. Para determinar la concentración de nitrito de las muestras se utilizó una solución patrón de NaNO₂ 0,1 mM, con la cual se preparó una curva estándar en un rango de 0,001 y 0,02 μmoles. Se utilizó un blanco en que se reemplazará la muestra por agua destilada. Los datos son expresados como μM de nitrito.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa InfoStat/L (Di Rienzo *et al.*, 2014). Se realizó un análisis de varianza no paramétrico (prueba de Kruskal-Walis) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los grupos para las distintas variables analizadas, estableciéndose el nivel de significancia de $p < 0.05$. Al mismo tiempo, y al rechazar la hipótesis nula, esto significa establecer diferencias entre los grupos, InfoStat/L realiza un test *a posteriori* de comparación múltiple, con lo cual se identificaron los grupos que difieren significativamente.

Además se evaluó la asociación entre las distintas variables hematológicas obtenidas con la concentración de nitrito, y para esto se aplicó un análisis de correlación, utilizando la prueba de Spearman, estableciéndose el nivel de significancia de $p < 0.05$. Determinándose, según la tabla de valores críticos para correlación de Spearman, un valor crítico para la prueba igual a 0,362 (Ramsey, 1989).

RESULTADOS

Las características generales de los ejemplares seleccionados para este estudio y valores hematológicos se muestran como media \pm desviación estándar (DE) en la tabla 2.

TABLA 2. Características generales y valores hematológicos de los equinos (Media \pm DE).

	Media \pm DE
EDAD (años)	4,67 \pm 1,09
PESO (Kg)	458,13 \pm 28,75
INDICE	18,5 \pm 12,83
C.C.	10,93 \pm 4,40
VGA (%)	45,27 \pm 5,32
PPT (g/dL)	6,31 \pm 0,39
Fib. (g/dL)	0,23 \pm 0,11

C.C.; Media carreras corridas U°s 6 meses.

VGA; Volumen globular aglomerado.

PPT; Proteínas plasmáticas totales.

Fib; Fibrinógeno plasmático.

Como muestra la Tabla 3, la concentración plasmática media \pm DE de nitrito plasmático del total de animales fue 191,75 \pm 40,02 μ M. En el grupo de bajo rendimiento la concentración plasmática de nitrito fue de 190,36 \pm 26,81 μ M en el grupo de bajo rendimiento, en el intermedio fue 226,96 \pm 28,17 μ M, mientras que para el grupo de alto rendimiento fue 157,94 \pm 31,59 μ M.

TABLA 3. Concentración de nitrito plasmático [NO₂⁻] (μ M) en cada grupo de rendimiento y valor total. (Media \pm DE)

	BAJO	INTERMEDIO	ALTO	MEDIA TOTAL
[NO ₂ ⁻] (μ M)	190,36 \pm 26,81	226,96 \pm 28,17	157,94 \pm 31,59	191,75 \pm 40,02

El análisis de varianza de la concentración plasmática de nitrito determinó diferencias significativas entre los grupos ($p=0,0006$), ante lo cual y mediante el test de comparaciones múltiples se determinó que el grupo de rendimiento intermedio ($226,96 \mu\text{M}$) difiere significativamente respecto a los otros dos grupos: el de bajo ($190,36 \mu\text{M}$) y alto ($157,90 \mu\text{M}$) rendimiento, no difiriendo estos dos últimos grupos entre sí. (Figura 1)

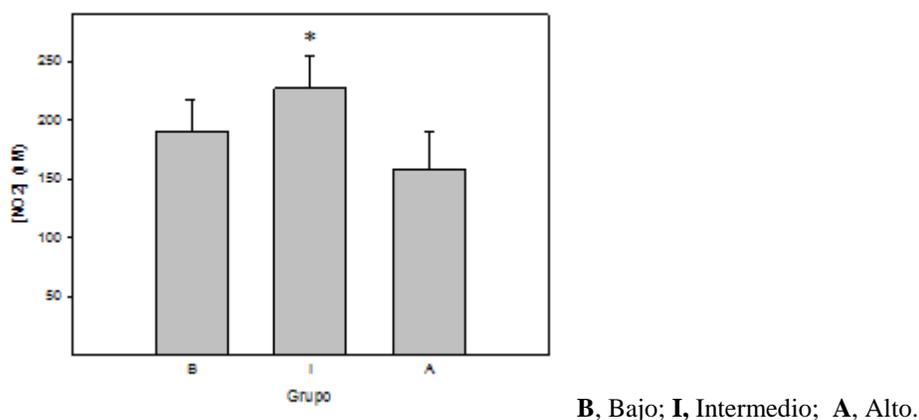
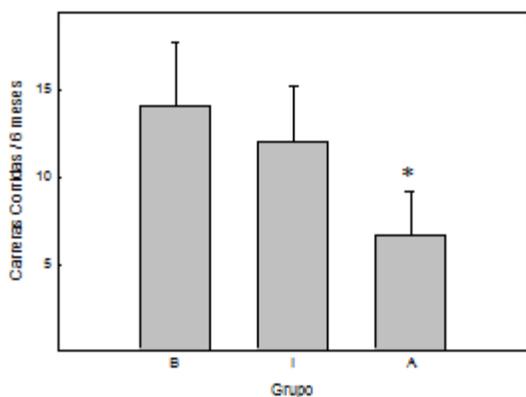


FIGURA 1. Concentración plasmática de nitrito en cada grupo en estudio (Media y DE). ($H=14,94$; $p=0,0006$).

La media \pm DE de concentración plasmática de nitrito según sexo determinó la mayor concentración de nitrito en el grupo de machos enteros $200,01 \pm 40,23 \mu\text{M}$, seguido por el grupo de machos castrados $193,42 \pm 59,01 \mu\text{M}$, y finalmente el valor menor en hembras con $182,12 \pm 31,73 \mu\text{M}$, sin encontrar diferencia significativa ($p=0,5710$) entre los grupos utilizando la variable sexo.

La media \pm DE de carreras corridas en los últimos seis meses, fue de $14,10 \pm 3,70$ en el grupo de bajo rendimiento, en el intermedio fue $12,00 \pm 3,20$, mientras que para el grupo de alto rendimiento fue $6,70 \pm 2,50$. Determinándose diferencias significativas entre los grupos ($p=0,0003$), y mediante test de comparaciones múltiples se estableció que la media de carreras corridas en el grupo de rendimiento alto ($6,70$) difiere significativamente respecto a los otros dos grupos: el de bajo ($14,10$) e intermedio ($12,00$) rendimiento, no difiriendo estos dos últimos grupos entre sí (Figura 2).



B, Bajo; I, Intermedio; A, Alto.

FIGURA 2. Carreras corridas durante los últimos 6 meses en cada grupo en estudio (Media \pm DE) (H=15,82; p=0,0003).

Por otro lado, mediante el análisis de correlación de Spearman, se estableció una asociación positiva entre la concentración plasmática de nitrito tanto con el VGA ($\rho = 0,44$) (Figura 3), como con la concentración de hemoglobina ($\rho = 0,44$) (Tabla 4). Sin embargo, mediante la misma prueba estadística se determinó que no existe asociación entre la concentración plasmática de nitrito con la edad ($\rho = 0,15$), el peso ($\rho = -0,12$), las carreras corridas en los últimos 6 meses ($\rho = 0,29$) ni proteínas plasmáticas ($\rho = 0,35$).

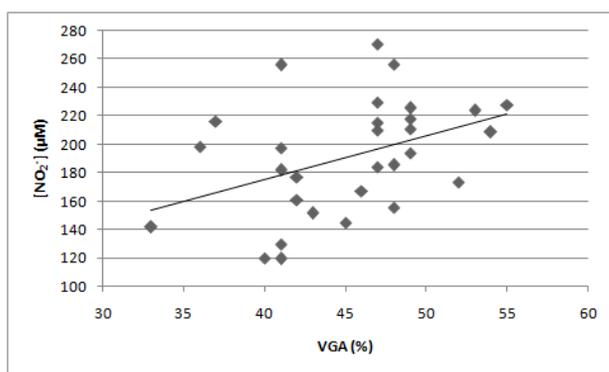


FIGURA 3. Correlación de concentración plasmática de nitrito y volumen globular aglomerado (VGA). (Rho de Spearman (ρ)=0,44; p=0,0148).

TABLA 4. Análisis de correlación de Spearman para la concentración plasmática de nitrito con las diferentes variables estudiadas.

	<i>rho</i>	<i>p</i>
VGA	0,44 (+)	0,01
EDAD	0,15	0,43
PESO	-0,12	0,54
C.C	0,29	0,12
PPT	0,35	0,06

VGA; Volumen globular aglomerado

C.C; Media carreras corridas U°s 6 meses

PPT; Proteínas plasmáticas totales

(+) **Estadísticamente Significativo.**

DISCUSIÓN

Respecto de los ejemplares utilizados en este trabajo, no se consideró edad ni sexo al clasificar a los equinos ya que el índice hándicap usado como parámetro de rendimiento se ampara en los artículos 175 y 176 del Código de Carreras, los cuales establecen que las carreras hándicap no estarán condicionadas en cuanto a la edad o sexo de sus participantes (Anón, 2005).

En este estudio se consideraron equinos en condición de ayuno al momento de tomar la muestra de sangre, lo que permite descartar un aumento en la concentración de nitrito posterior a la ingesta de grandes cantidades de nitrato contenido en vegetales (Lundberg *et al.*, 2004) como el heno de alfalfa que compone el plan típico de alimentación en estos equinos. El nitrato realiza una recirculación enterosalival y es reducido a nitrito por bacterias comensales en la cavidad oral, absorbiéndose desde el tracto digestivo hacia el torrente sanguíneo, produciéndose en humanos un aumento en la concentración nitrito plasmático a partir de los 15 minutos posterior a ingesta de nitrato (Lundberg y Govoni, 2004).

Por otro lado, las muestras de sangre una vez obtenidas fueron centrifugadas inmediatamente, ya que el óxido nítrico en el plasma sanguíneo se oxida casi completamente a nitrito y bajo esta forma permanece estable durante varias horas (Bryan, 2006).

Con el fin de descartar procesos inflamatorios y/o deshidratación se determinó la concentración de proteínas totales y fibrinógeno plasmático, de modo que valores sobre los de referencia (Tabla 1), sugerirían un proceso de deshidratación o inflamación (Mcgowan y Hodgson, 2014). Así, cuadros de hemoconcentración por deshidratación sobrestiman la concentración real de nitrito, mientras que los procesos inflamatorios agudos aumentan significativamente los valores de nitrito por actividad de la isoforma inducible de NOS (NOS II) (Crawford *et al.*, 2004).

Respecto de la concentración plasmática de nitrito se encontró un aumento significativo en el grupo de rendimiento intermedio ($226,96 \pm 27,9 \mu\text{M}$) respecto a los otros dos grupos, en tanto entre el grupo de rendimiento alto ($157,90 \pm 31,6 \mu\text{M}$) y rendimiento bajo ($190,36 \pm 26,8 \mu\text{M}$) no se evidenciaron diferencias significativas (Figura 1). Este resultado podría

estar condicionado por el régimen de competencia al cual es sometido cada grupo, que se refleja en el promedio de carreras corridas en los últimos seis meses, que es similar en los grupos de bajo rendimiento ($14,10 \pm 3,69$) y de rendimiento intermedio ($12,0 \pm 3,19$), y significativamente mayor respecto al grupo de alto rendimiento ($6,70 \pm 2,49$) (Figura 2). Este régimen de competencias de los grupos de rendimiento bajo e intermedio podría explicar la mayor concentración de nitrito, ya que la actividad física genera un estrés de fricción sobre el endotelio, siendo éste flujo pulsátil un importante estímulo para aumentar la biodisponibilidad de óxido nítrico (Green *et al.*, 2004) y por consiguiente la generación de nitrito. Bajo estas condiciones se podría suponer una mayor capacidad de perfusión tisular en el grupo intermedio respecto al bajo rendimiento, debido a la acción vasodilatadora descrita para el óxido nítrico en el endotelio del sistema cardiovascular. Esta comparación de la concentración plasmática de nitrito no es posible realizarla con el grupo de alto rendimiento debido a su régimen de menor cantidad de carreras respecto a los otros dos grupos. Sin embargo, Maiorana *et al.* (2003), proponen que el entrenamiento a largo plazo generaría una remodelación estructural, resultando en un mayor calibre de los vasos sanguíneos, de modo de estabilizar dicho estrés de fricción, así la respuesta de vasodilatación se generará con una menor producción de óxido nítrico, respecto a un vaso sanguíneo no adaptado. Por lo tanto, una menor concentración de nitrito en individuos entrenados podría implicar una mejor adaptación al ejercicio, como podría ocurrir en el grupo de alto rendimiento, lo que explicaría la menor concentración de nitrito plasmático en dicho grupo.

En el presente estudio, la comparación entre los grupos no arroja una asociación entre la concentración de nitrito plasmático en reposo con el rendimiento hípico de los equinos, como podría esperarse de acuerdo a los resultados de Totzeck *et al.* (2012) en que una mayor concentración de nitrito en reposo se asoció a una mayor capacidad aeróbica en humanos entrenados. Esta discordancia se podría explicar por la adaptación a un régimen distinto de exigencia física, que en el caso de los equinos FSC requiere de un mayor componente anaeróbico para el suministro energético (Gerard *et al.*, 2014). Esto se relacionaría con la descripción de Katz *et al.* (1996), quienes demostraron en humanos, que el efecto de la inhibición de la enzima NOS sobre la vasodilatación a nivel muscular es menor ante un ejercicio de alta intensidad que implica un mayor reclutamiento de fibras

glicolíticas. Del mismo modo, se evidenció en ratas, y ante la inhibición de NOS, una reducción significativa del flujo sanguíneo a músculos con un alto porcentaje de fibras oxidativas pero sin cambios hacia músculos con un mayor porcentaje de fibras glicolíticas (Hirai *et al.*, 1994). Esto hace suponer que el rol del óxido nítrico como vasodilatador destaca en importancia durante el ejercicio aeróbico.

Además, Marañón *et al.* (2009) encontraron una mayor concentración de nitrito plasmático en equinos entrenados a nivel competitivo con respecto a entrenados no competitivamente. Del mismo modo, Poveda *et al.* (1997), describieron una mayor concentración de nitrito en humanos entrenados respecto no entrenados, lo que coincide con los hallazgos en ratas de Sun *et al.* (1994) y Koller *et al.* (1995), que describen un aumento en la disponibilidad de óxido nítrico luego de someter a ratas a un periodo de entrenamiento de corto plazo, lo que evidencia una adaptación al ejercicio. Sin embargo, en el presente estudio dicha diferencia no se evidencia ya que considera sólo individuos altamente entrenados, pero con diferente rendimiento.

Diversos estudios que consideran la suplementación con nitrato previo a pruebas físicas han contribuido al entendimiento del rol del óxido nítrico durante el ejercicio, estos efectos biológicos del nitrato, el cual es relativamente inerte, se deben probablemente a su conversión a un anión bioactivo de nitrito (Bailey *et al.*, 2009), el que a su vez es potencialmente reducido a óxido nítrico especialmente en condiciones de hipoxia y acidosis, lo que constituiría un mecanismo fisiológico que permite la producción de óxido nítrico a bajas presiones de oxígeno, el cual es necesario para su síntesis vía enzimática (Shiva, 2013).

En este sentido, la suplementación con nitrato de sodio en la dieta de humanos eleva la concentración de nitrito en sangre, y mejora su rendimiento físico reduciendo el consumo de oxígeno durante ejercicio submaximal, pero sin acumulación de lactato (Larsen *et al.*, 2007). Además, Larsen *et al.* (2010) demostraron similares efectos durante ejercicio maximal, en que se redujo el consumo de oxígeno sin afectar el rendimiento, con una tendencia a aumentar el tiempo de ejercitación sin fatigarse. Al mismo tiempo, Bailey *et al.* (2009) demostraron los mismos efectos, pero mediante la suplementación con jugo de betarraga natural, y adicionalmente evidenciaron una mayor tolerancia al ejercicio de alta

intensidad. Estos resultados sugieren un metabolismo más eficiente después de la suplementación de nitrato. En este sentido, Larsen *et al.* (2011) mediante biopsia de músculo esquelético, demostraron que mitocondrias posterior a suplementación con nitrato de sodio presentan una mayor eficiencia en la fosforilación oxidativa post-ejercicio, la cual se correlacionó con la reducción en el consumo de oxígeno durante el ejercicio. A su vez, Bohuslavsky *et al.* (2005) evidenciaron una mayor eficiencia en el consumo de oxígeno a nivel mitocondrial *in vitro* al adicionar donantes de óxido nítrico.

Por otra parte, existe evidencia de efectos más específicos del óxido nítrico sobre la fisiología músculo esquelética, y en este sentido se describe que favorece el consumo de glucosa durante el ejercicio, probablemente mediando la traslocación del receptor GLUT-4 (Hoi Hong *et al.*, 2014). Además está implicado en la regulación de la función contráctil al modular el acoplamiento excitación-contracción, la autorregulación del flujo sanguíneo y la diferenciación de los miocitos. (Stamler y Meissner, 2001)

Estos efectos del óxido nítrico podrían explicar el impacto perjudicial sobre la capacidad física en equinos posterior a la inhibición inespecífica de las tres isoformas NOS evidenciado por Kindig *et al.* (2000) y Manohar *et al.* (2001), ya que así se afectó la síntesis de óxido nítrico por parte de las tres isoformas de NOS a la vez, lo que hace lógico pensar que el rol del óxido nítrico sobre la capacidad física va más allá del efecto vasodilatador ampliamente descrito, y su consecuente mayor aporte sanguíneo al sistema musculo-esquelético. Mientras que en el presente estudio la concentración plasmática de nitrito considera predominantemente la síntesis vascular de óxido nítrico, que según Kleinbongard *et al.* (2003) representa predominantemente la actividad de NOS III. De este modo no se consideran los efectos del óxido nítrico más allá del sistema vascular ya que en el tejido muscular predomina la isoforma neuronal (NOS I) (Grozdanovic, 2001), además los resultados de Lau *et al.* (2000) en ratas indican que la principal isoforma activada durante la contracción muscular es la neuronal NOS μ (nNOS μ), lo que podría explicar que la concentración plasmática de nitrito no necesariamente se correlacione con el rendimiento hípico de los equinos.

En el presente estudio se evidenció una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la concentración de nitrito y el hematocrito de cada equino. Este hallazgo puede estar

explicado por el descubrimiento de actividad de eNOS en eritrocito (Kleinbongard *et al.*, 2006) cuya actividad se ve favorecida por las condiciones de normoxia (Cortese-Krott y Kelm, 2012), condición dada en el presente estudio. De esta forma cobra relevancia el rol de los eritrocitos en el aporte al pool de óxido nítrico y sus metabolitos dentro del lecho vascular, situación paradójica ante su demostrada capacidad de interacción con hemoglobina, que genera un consumo de óxido nítrico por parte de eritrocitos, el cual se ve favorecido en condiciones de hipoxia (Han *et al.*, 2003), por lo que el eritrocito era considerado únicamente como un eliminador de óxido nítrico desde el sistema vascular (Gladwin *et al.*, 2003). Sin embargo, hoy se sabe que ambos procesos coexisten sin que se haya dilucidado su función y/o su mecanismo. En el presente estudio, la centrifugación inmediata luego de la obtención de la muestra permitió minimizar cualquiera variación en la biodisponibilidad de óxido nítrico en relación a los eritrocitos. En este mismo sentido, al descartar animales excitados o nerviosos se evitó una policitemia debido a contracción esplénica (Mcgowan y Hodgson, 2014) y así, al considerar solo animales tranquilos se minimizó el estrés de fricción sobre el endotelio, evitando una mayor síntesis de óxido nítrico.

La determinación de la concentración plasmática de nitrito se realizó según la metodología descrita por Miranda *et al.* 2001, en la cual se valida la modificación realizada en la reacción de Griess para su utilización en fluidos biológicos de acuerdo a los valores obtenidos con otras metodologías y a los reportes a la fecha para la concentración de nitrito en dichas muestras, sin embargo en la actualidad mediante pruebas de laboratorio más específicas y sensibles se reportan valores menores para la concentración de nitrito (Grau *et al.*, 2007), lo que podría explicar la mayor concentración reportada en el presente estudio respecto a la bibliografía actual, por lo que la información debe ser analizada a la luz de la metodología utilizada, y en el caso particular de la prueba de Griess, sus posibles interferentes como tioles libres u otros constituyentes plasmáticos. (Tsikas *et al.*, 1997)

CONCLUSIONES

La concentración plasmática de nitrito, como indicador de la actividad de NOS endotelial, no constituiría un biomarcador de rendimiento hípico en condiciones de reposo, y con diferente nivel de competencia y entrenamiento.

Existe correlación positiva entre la concentración plasmática de nitrito y el porcentaje de eritrocitos contenidos en la sangre.

La concentración plasmática de nitrito en reposo reflejaría la capacidad atlética de equinos sometidos a régimen similar de competencias.

BIBLIOGRAFÍA

ALLEN, J.; STABLER, T.; KENJALE, A.; HAM, K.; ROBBINS, J.; DUSCHA, B.; DOBROSIELSKI, D.; ANNEX, B. 2010. Plasma nitrite flux predicts exercise performance in peripheral arterial disease after 3 months of exercise training. *Free Radic. Biol. Med.* 49(6):1138–44.

ANÓN. 2005. Reglamento de carreras. Consejo Superior de la Hípica Nacional. [en línea] <http://www.consejosuperior.cl/sitio2005/codigo_carreras.php> [consulta: 13-07-15]

ANÓN. 2012. Reglamento de carreras. Club hípico de Santiago – Hipodromo chile. [en línea] <<http://www.osafweb.com.ar/downloads/clasico/Reglamento%20Carreras%20CLU%20HIPICO%20SANTIAGO%20e%20HIP%20CHILE.pdf>> [consulta: 20-08-2014]

BAILEY, S.; WINYARD, P.; VANHATALO, A.; BLACKWELL, J.; DIMENNA, F.; WILKERSON, D.; TARR, J.; BENJAMIN, N.; JONES, A. 2009. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 107(4):1144–1155.

BOHUSLAVS'KYI, A.; DMYTRIIEVA, A.; SAHACH, V. 2005. Effect of nitric oxide on the efficiency of oxygen consumption by the working skeletal muscle in fatigue. *Fiziol. Zh.* 51(1):33–42.

BRUCKDORFER, R. 2005. The basics about nitric oxide. *Mol. Aspects Med.* 26: 3-31.

BRYAN, N. 2006. Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review. *Free Radical Bio. Med.* 41:691-701.

CORTESE-KROTT, M.; KELM, M. 2014. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.* 2:251-258.

CRAWFORD, J.; CHACKO, B.; PRUITT, H.; PIKNOVA, B.; HOGG, N.; PATEL, R. 2004. Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease. *Blood.* 104(5):1375-82.

DI RIENZO, J.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

DREISSIGACKER, U.; WENDT, M.; WITTKER, T.; TSIKAS, D.; MAASSEN, N. 2010. Positive correlation between plasma nitrite and performance during high-intensive exercise but not oxidative stress in healthy men. *Nitric Oxide*. 23(2):128–35.

GERARD, M.; DE GRAAF-ROELFSEMA, E.; HODGSON, D.; VAN DER KOLK, J. 2014. Energetic Considerations of Exercise. **In:** *The Athletic Horse. Principles and practice of equine sports medicine*. 2^a ed. Elsevier Saunders. St. Louis, Missouri. USA.. pp.19-33.

GLADWIN, M.; LANCASTER, J.; FREEMAN, B.; SCHECHTER, A. 2003. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat. Med.* 9(5):496–500.

GRAU, M.; HENDGEN-COTTA, U.; BROUZOS, P.; DREXHAGE, C.; RASSAF, T.; LAUER, T.; DEJAM, A.; KELM, M.; KLEINBONGARD, P. 2007. Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. *Journal of Chromatography B*. 851(1-2):106-123.

GREEN, D.; MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R. 2004. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J. Physiol.* 561(1): 1–25.

GROZDANOVIC, Z. 2001. NO message from muscle. *Microsc. Res. Tech.* 55(3):148–153.

HAN, T.; QAMIRANI, E.; NELSON, A.; HYDUKE, D.; CHAUDHURI, G.; KUO, L.; LIAO, J. 2003. Regulation of nitric oxide consumption by hypoxic red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(21):12504-12509.

HINCHCLIFF, K.; GEOR, R. 2008. The horse as an athlete: a physiological overview. **In:** *Equine exercise physiology.. The science of exercise in the athletic horse*. 1^{era} ed. Saunders. Filadelfia, USA. pp. 2-11.

HIRAI, T.; VISNESKI, M.; KEARNS, K.; ZELIS, R.; MUSCH, T. 1994. Effects of NO synthase inhibition on the muscular blood flow response to treadmill exercise in rats. *J. Appl. Physiol.* 77(3):1288-93.

HOI HONG, Y.; BETIK, A.; MCCONELL, G. 2014. Role of nitric oxide in skeletal muscle glucose uptake during exercise. *Exp. Physiol.* 99(12):1569-1573.

JAIN, N. 1986. *Schalm's Veterinary Hematology*. 2^a ed. Lea & Febiger. Filadelfia, USA. 1221 p.

KATZ, S.; KRUM, H.; KAHN, T.; KNECHT, M. 1996. Exercise induced vasodilation in forearm circulation of normal subjects and patients with congestive heart failure: Role of endothelium-derived nitric oxide. *J. Am. Coll. Cardiol.* 28(3): 585–590.

KELM, M. 1999. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411:273-289.

KINDIG, C.; GALLATIN, L.; ERICKSON, H.; FEDDE, M.; POOLE, D. 2000. Cardiorespiratory impact of the nitrite oxide synthase inhibitor L-NAME in the exercising horse. *Resp. Physiol.* 120: 151-166.

KLEINBONGARD,P.; DEJAM, A.; LAUER,T.; RASSAF,T.; SCHINDLER,A.; PICKER,O.; SCHEEREN,T.; ODECKE,A.; SCHRADER,J.; SCHULZ, R.; HEUSCH,G.; SCHAUB,G.; BRYAN,N.; FEELISCH, M.; KELM,M. 2003. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radical Biol. Med.* 35: 790–796.

KLEINBONGARD, P.; SCHULZ, R.; RASSAF, T.; LAUER, T.; DEJAM, A.; JAX, T.; KUMARA, I.; GHARINI, P.; KABANOVA, S.; OZÜYAMAN, B.; SCHNÜRCH, H.; GÖDECKE, A.; WEBER, A.; ROBENEK, M.; ROBENEK, H.; BLOCH, W.; RÖSEN, P.; KELM, M. 2006. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood.* 107(7):2943-251.

KOLLER, A.; HUANG, A.; SUN, D.; KALEY, G. 1995. Exercise training augments flow-dependent dilation in rat skeletal muscle arterioles. *Circ. Res.* 76(4), 544–550.

LARSEN, F.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.; EKBLÖM, B. 2007. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. *Acta Physiol. (Oxf).* 191(1):59–66.

LARSEN, F.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.; EKBLÖM, B. 2010. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. *Free Radic Biol. Med.* 48(2):342–347.

- LARSEN, F.; SCHIFFER, T.; BORNIQUEL, S.; SAHLIN, K.; EKBLUM, B.; LUNDBERG, J.; WEITZBERG, E.** 2011. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. *Cell Metab.* 13(2):149–159.
- LARSEN, F.; SCHIFFER, T.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.** 2012. Regulation of mitochondrial function and energetic by reactive nitrogen oxides. *Free Radical Biol. Med.* 53: 1919-1928.
- LAU, K.; GRANGE, R.; ISOTANI, E.; SARELIUS, I.; KAMM, K.; HUANG, P.; STULL, J.** 2000. nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle. *Physiol. Genomic.* 2(1), 21–27.
- LAUER, T.; KLEINBONGARD, P.; KELM, M.** 2002. Indexes of NO Bioavailability in Human Blood. *News Physiol. Sci.* 17: 251-255.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-675.
- LUNDBERG, J.; WEITZBERG, E.; COLE, J.; BENJAMIN, N.** 2004. Nitrate, bacteria and human health. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(8):593-602.
- LUNDBERG, J.; GOVONI, M.** 2004 Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 37 (3): 395–400.
- LUNDBERG, J.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M.** 2008. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 7:156-67.
- LUNDBERG, J.; WEITZBERG, E.** 2010. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396: 39-45.
- MAIORANA, A.; O’DRISCOLL, G.; TAYLOR, R.; GREEN, D.** 2003. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med.* 33(14):1013–1015.
- MANOHAR, M.; GOETZ T.; HASSAN, A.** 2001. Nitric oxide synthase inhibition does not affect the exercise-induced arterial hypoxemia in Thoroughbred horses. *J. Appl. Physiol.* 91:1105-1112.

MARAÑÓN, G.; MUÑOZ-ESCASSI, B.; MANLEY, W.; GARCÍA, C.; LEÓN, R.; OLÁBARRI, B.; CAYADO, P.; DOMÍNGUEZ, C.; SÁNCHEZ DE LA MUELA, M.; SUAREZ, M.; VARA, E. 2009. Effect of Competition on Nitric Oxide, Carbon Monoxide, and Cyclic Guanosine Monophosphate Levels in Training Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 29: 627-632.

MCGOWAN, C.; HODGSON D. 2014. Hematology and Biochemistry. **In:** *The Athletic Horse. Principles and practice of equine sports medicine.* 2^a ed. Elsevier Saunders. St. Louis, Missouri. USA. pp.56-68.

MIRANDA, K.; ESPEY, M.; WINK, D. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide-Biol. Ch.* 5: 62 – 71.

POOLE, D.; ERICKSON, H. 2008. Cardiovascular function and oxygen transport: responses to exercise and training. **In:** Hinchcliff, K.; Geor, R.; Kaneps, A. *Equine exercise physiology. The science of exercise in the athletic horse.* 1^{era} ed. Saunders. Filadelfia, USA. pp. 212-244.

POVEDA, J.; Riestra, A.; SALAS, E.; CAGIGAS, M.; LÓPEZ-SOMOZA, C.; AMADO, J.; BERRAZUETA, J. 1997. Contribution of nitric oxide to exercise-induced changes in healthy volunteers: effects of acute exercise and long-term physical training. *Eur J. Clin. Invest.* 27(11):967–97.

RAMSEY, P. 1989. Critical values for Spearman's rank order correlation. *J. Educ. Stat.* 14(3):245–253.

RASSAF, T.; LAUER, T.; HEISS, C.; BALZER, J.; MANGOLD, S.; LEYENDECKER, T.; ROTTler, J.; DREXHAGE, C.; MEYER, C.; KELM, M. 2007. Nitric oxide synthase-derived plasma nitrite predicts exercise capacity. *Br. J. Sports Med.* 41(10):669–73.

RIVERO, J.; PIERCY, R. 2008. Muscle physiology: responses to exercise and training. **In:** Hinchcliff, K.; Geor, R.; Kaneps, A. *Equine exercise physiology. The science of exercise in the athletic horse.* 1^{era} ed. Saunders. Filadelfia, USA. pp. 30-80.

SHIVA, S. 2013. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biol.* 1(1): 40–44.

STAMLER, J.; MEISSNER, G. 2001. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 81(1):209-237.

SUN, D.; HUANG, A.; KOLLER, A.; KALEY, G. 1994. Short-term daily exercise activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats. *J. Appl. Physiol.* 76(5):2241–2247.

TOTZECK, M.; HENDGEN-COTTA, U.; RAMMOS, C.; FROMMKE, L.; KNACKSTEDT, C.; PREDEL, H.; KELM, M.; RASSAF, T. 2012. Higher endogenous nitrite levels are associated with superior exercise capacity in highly trained athletes. *Nitric Oxide.* 27: 75-81.

TSIKAS, D.; GUTZKI, F.; ROSSA, S.; BAUER, H.; NEUMANN, C.; DOCKENDORFF, K.; SANDMANN, J.; FROLICH, J. 1997. Measurement of Nitrite and Nitrate in Biological Fluids by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and by the Griess Assay: Problems with the Griess Assay—Solutions by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry.* 244(2):208-220.

ANEXO 1

**FICHA DE INDIVIDUALIZACIÓN
FINA SANGRE DE CARRERAS (CHS)**

Nº FICHA: _____

FECHA: _____

NOMBRE: _____

INDICE: _____

EDAD: _____ AÑOS

PESO: _____ KGS

SEXO: _____

CARRERAS DISPUTADAS ÚLTIMOS 6 MESES: _____

RESULTADOS	VALOR
[NO ₂ -] (µM)	
VGA (%)	
PPT (g/dL)	
Fib. (g/dL)	

NOTA: _____

