

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**



TESIS DOCTORAL

**Determinación de intervalos de referencia de parámetros
hematológicos, bioquímicos y de estrés oxidativo en caballos
residentes en centros hípicos en la zona central de España**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Aránzazu Buendía Andrés

Directores

**Fátima Cruz-López
Lucas Domínguez Rodríguez**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Doctorado en Veterinaria

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)



TESIS DOCTORAL

DETERMINACIÓN DE INTERVALOS DE REFERENCIA DE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS Y DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CABALLOS RESIDENTES EN CENTROS HÍPICOS EN LA
ZONA CENTRAL DE ESPAÑA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

ARÁNZAZU BUENDÍA ANDRÉS

DIRECTORES

FÁTIMA CRUZ-LÓPEZ
LUCAS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ

A mi familia por su comprensión, paciencia y apoyo incondicional, en especial a mis dos hijos por darme fuerzas para seguir adelante. A mi directora Fátima por no dejarme tirar la toalla.



Esta Tesis ha sido realizada en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, VISAVET – UCM.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi directora Fátima Cruz, por haber hecho esta tesis posible. No tengo palabras para agradecerte la confianza que has depositado en mí todos estos años, por adaptar el trabajo una y mil veces a horarios y plazos imposibles. Por ser una optimista incansable y no perder la esperanza de que este trabajo saldría adelante, aunque yo la perdiese... no te haces una idea de cuánto he aprendido y de cómo me alegro de que se cruzasen nuestros caminos...gracias.

Agradecer a mi director Lucas Domínguez el todo el apoyo recibido. El fruto de este trabajo no habría sido posible sin su respaldo y su ayuda a lo largo de estos años. Me siento muy afortunada de trabajar al lado de un profesional de su talla, al que admiro y respeto.

A los que fueron y son parte del equipo de laboratorio del Servicio SEVISEQ, Kelly, Eliazar, Abel y Paloma por su colaboración durante el análisis de las muestras, gracias por enseñarme y por toda la ayuda prestada y por saber escuchar en los momentos difíciles cuando las cosas no salen como uno espera.

A los veterinarios clínicos de équidos Mónica, Iván, Chimeno, Carlos, Patricia, Juan...y propietarios de caballos que amablemente accedieron a prestar las muestras de sus caballos para la realización de este trabajo. Valoro sinceramente el tiempo que emplearon para rellenar el cuestionario, elemento muy importante sin el cual no habría podido desarrollarse este estudio.

A VISAVET, por incluirme en su pequeña gran familia de doctorandos y haberme facilitado sus instalaciones, equipamiento y kits para la realización de los análisis. A Beatriz Romero por ser la primera persona que conocí en VISAVET, ¡gracias por abrirme la puerta y hacer las presentaciones! Aquí ha concluido mi tesis, pero me llevo muchísimo más, gracias a las magníficas personas que hubo y hay en este centro. A Marisa, Kendy, Pili, Julio y Andrés por vuestra paciencia para ayudarme

e ilustrarme en el análisis estadístico y por hacerme hueco en vuestra apretada agenda. A Sergio, Carlos y Javi por ayudarme con las fotos, figuras y maquetación en tiempo récord.

Y como no, quería agradecer a mi familia su apoyo y comprensión todos estos años en los que “...mi tesis” era la coletilla que terminaba todas mis frases. Mi vida entera ha cambiado desde que comencé y es mi familia la que ha hecho posible que ahora escriba estas líneas.

A mis padres Mila y Luis por escucharme y apoyarme siempre de forma incondicional y ponérmelo todo más fácil, cuidando de mis mellizos mientras yo pasaba horas y horas en el laboratorio, primero analizando, después escribiendo...no se puede pedir más.

A Jorge, mi amigo, marido y compañero de viaje, por su cariño y respaldo en los buenos y malos momentos y por su paciencia durante las interminables horas que he dedicado a este trabajo.

A mis padres políticos por su ayuda en innumerables tardes cuidando de los niños para darme tiempo, ese bien tan escaso cuando eres madre...

A mi hermana y amigos, por estar ahí siempre, aunque yo este “desaparecida”, gracias por saber escucharme y por vuestro apoyo todos estos años.

Y por último, pero no menos importante, a mis hijos, Martina y Alex por ser el motor que me impulsa a levantarme cada día y conseguir mis objetivos, ser hoy vuestro modelo a seguir es para mí un orgullo.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	1
LISTA DE TABLAS	5
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	11
SUMMARY	15
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. SITUACIÓN DEMOGRÁFICA DEL CABALLO EN ESPAÑA.....	21
1.2. HERRAMIENTAS PARA EL DIAGNÓSTICO EN CLÍNICA EQUINA	23
1.3. TÉCNICAS DE BIOPATOLOGÍA	23
1.3.1. Hematología	24
1.3.1.1. Métodos automatizados de análisis hematológico	24
1.3.1.2. Serie roja.....	29
1.3.1.3. Serie blanca	32
1.3.1.4. Frotis sanguíneo	35
1.3.2. Bioquímica	38
1.3.2.1. Técnicas de bioquímica clínica	38
1.3.2.2. Enzimas.....	41
1.3.2.3. Función renal.....	44
1.3.2.4. Proteínas.....	45
1.3.2.5. Calcio y fósforo	46
1.3.2.6. Lípidos.....	48
1.3.3. Equilibrio oxidante/antioxidante	49
1.3.3.1. Ácido úrico.....	51
1.3.3.2. Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico	51
1.3.3.3. Estado antioxidante total	52
1.3.3.4. 8-hidroxi-2-deoxiguanosina	52
1.4. INTERVALOS DE REFERENCIA: EVOLUCIÓN HISTÓRICA	53
1.5. INFLUENCIA DE FACTORES DE DIVERSA ÍNDOLE SOBRE LOS VALORES DE HEMATOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y ESTRÉS OXIDATIVO OBJETO DE ESTUDIO	60
1.5.1. Hematología	60
1.5.1.1. Influencia de caracteres fenotípicos	60
1.5.1.2. Influencia del ejercicio y entrenamiento	61
1.5.1.3. Influencia del muestreo y manejo de las muestras.....	62

1.5.1.4.	Influencia de factores medioambientales y atmosféricos.....	62
1.5.2.	Bioquímica	63
1.5.2.1.	Influencia de caracteres fenotípicos	63
1.5.2.2.	Influencia del ejercicio y entrenamiento	64
1.5.2.3.	Influencia del muestreo y manejo de las muestras	64
1.5.2.4.	Influencia de factores medioambientales y atmosféricos.....	65
1.5.3.	Estrés oxidativo	66
1.5.3.1.	Influencia de caracteres fenotípicos	66
1.5.3.2.	Influencia del ejercicio y entrenamiento	66
1.5.3.3.	Influencia del muestreo y manejo de las muestras	66
1.5.3.4.	Influencia de factores medioambientales y atmosféricos.....	67
2.	INTERÉS Y OBJETIVOS	71
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	75
3.1.	MATERIALES.....	75
3.1.1.	Lugar de estudio	75
3.1.2.	Población objeto de estudio	77
3.1.2.1.	Estimación del tamaño muestral	78
3.1.2.2.	Recopilación de datos de la población.....	79
3.2.	MÉTODOS	80
3.2.1.	Muestreo	80
3.2.2.	Análisis hematológico de las muestras	81
3.2.3.	Análisis bioquímico de las muestras	83
3.2.4.	Análisis de estrés oxidativo de las muestras	87
3.2.5.	Análisis estadístico de las muestras	95
3.2.5.1.	Análisis comparativo de dos métodos de determinación de intervalos de referencia	96
3.2.5.2.	Análisis comparativo de los valores de referencia obtenidos con la bibliografía	100
3.2.5.3.	Análisis estadístico de los factores asociados.....	101
4.	RESULTADOS	105
4.1.	CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DE ESTUDIO	105
4.2.	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	106
4.2.1.	Tamaño muestral de la población de estudio	106
4.2.2.	Datos recopilados de los caballos incluidos en el estudio	107
4.3.	RESULTADOS DEL ANÁLISIS LABORATORIAL E INTERVALOS DE REFERENCIA OBTENIDOS MEDIANTE DOS METODOLOGÍAS.....	117

4.3.1.	Método clásico: Reference Value Advisor	117
4.3.2.	Método alternativo: @RISK	122
4.3.3.	Comparación de los intervalos de referencia estimados con la bibliografía ..	129
4.4.	ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS	131
4.4.1.	Análisis univariable.....	132
4.4.2.	Análisis multivariable	138
5.	DISCUSIÓN	151
5.1.	REPRESENTACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CABALLOS RESIDENTES EN CENTROS HÍPICOS EN ZONA CENTRAL DE ESPAÑA	151
5.1.1.	Datos recopilados de los caballos incluidos en el estudio	152
5.2.	VALORES DEL ANÁLISIS LABORATORIAL E INTERVALOS DE REFERENCIA.....	155
5.2.1.	Comparación de dos metodologías para la determinación de intervalos de referencia	155
5.2.2.	Comparación de los intervalos de referencia del análisis hematológico con la bibliografía.....	157
5.2.3.	Comparación de los intervalos de referencia del análisis bioquímico con la bibliografía.....	158
5.2.4.	Comparación de los intervalos de referencia de los marcadores de estrés oxidativo con la bibliografía	162
5.3.	ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS	163
5.3.1.	Análisis univariable.....	163
5.3.2.	Análisis multivariable	166
6.	FUTURO TRABAJO.....	175
7.	CONCLUSIONES	179
8.	ANEXOS.....	183
9.	BIBLIOGRAFÍA	230

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

GR	Glóbulos rojos
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematocrito
HCM	Hemoglobina corpuscular media
VCM	Volumen corpuscular medio
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
RDW	Amplitud de distribución eritrocitaria
GB	Glóbulos blancos
NEU%	Porcentaje de neutrófilos
LIN%	Porcentaje de linfocitos
EO%	Porcentaje de eosinófilos
MON%	Porcentaje de monocitos
BAS%	Porcentaje de basófilos
NEU	Recuento de neutrófilos
LIN	Recuento de linfocitos
EO	Recuento de eosinófilos
MON	Recuento de monocitos
BAS	Recuento de basófilos
PLQ	Plaquetas
VPM	Volumen plaquetar medio
U	Urea
Cr	Creatinina
PT	Proteínas totales
ALB	Albúmina
GLOB	Globulinas
ALB/GLOB	Cociente albúmina globulinas
AST	Aspartato aminotransferasa
GGT	Gamma glutamiltransferasa

ALP	Fosfatasa alcalina
BT	Bilirrubina total
BD	Bilirrubina directa
BI	Bilirrubina indirecta
CK	Creatina quinasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
Ca	Calcio
P	Fósforo
Ca/P	Cociente calcio fósforo
TG	Triglicéridos
CT	Colesterol total
Fib	Fibrinógeno
AU	Ácido úrico
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TAS	Estado antioxidante total
8-OHdG	8-hidroxi-2-deoxiguanosina
WNV	West Nile Virus o Virus del Oeste del Nilo
IR	Intervalo de referencia
IC	Intervalo de confianza
PRE	Pura Raza Español
PSI	Pura Sangre Inglés
CDE	Caballo de Deporte Español
KWPN	Caballo holandés de sangre caliente
PSL	Pura Sangre Lusitano
SF	Silla Francés
Há	Hispano árabe
Prá	Pura raza árabe
Ahá	Anglo hispano árabe
LSS	Lauril sulfato de sodio
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
LDL	Low-density lipoproteins

HDL	High-density lipoproteins
VLDL	Very low-density lipoproteins
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
SOD	Superóxido dismutasa
GPx	Glutation peroxidasa
MDA	Malondialdéhido
TBA	Ácido tiobarbitúrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
TAC	Capacidad antioxidante total
TAA	Actividad antioxidante total
TAOP	Poder antioxidante total
ADN	Ácido desoxirribonucléico
IFCC	Federación Internacional de Química Clínica
ICSH	Comité Internacional para la Estandarización en Hematología
CLSI	Instituto para los Estándares Clínicos y Laboratoriales
ASVCP	Sociedad Americana de Patología Clínica Veterinaria
QALS	Comité de Estándares de Laboratorio y Control de Calidad
SOPs	Procedimientos operativos de trabajo
SINTRAN	Sistema Integral de Trazabilidad Animal
FHE	Federación Hípica Española
SEVISEQ	Servicio de Vigilancia Sanitaria Equina
VISAVET	Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria
UCM	Universidad Complutense de Madrid
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
ADP	Adenosina difosfato
NADPH	Forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADP ⁺	Forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADH	Forma reducida de dinucleótido de nicotinamida y adenina
NAD ⁺	Forma oxidada de dinucleótido de nicotinamida y adenina
DEA	Dietanolamina
SDS	Sulfato dodecil sódico
ABTS ⁺	Forma oxidada de 1,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina-sulfonato
ABTS	Forma reducida de 1,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina-sulfonato
AIC	Criterio de Información de Akaike
BIC	Criterio de Información Bayesiano

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Intervalos de referencia de valores del hemograma en équidos publicados en la bibliografía.

Tabla 2. Intervalos de referencia de parámetros bioquímicos en équidos publicados en la bibliografía.

Tabla 3. Intervalos de referencia de marcadores de estrés oxidativo en équidos publicados en la bibliografía.

Tabla 4. Clasificación climática de Köppen.

Tabla 5. Diluciones de MDA para la preparación de los estándares colorimétricos.

Tabla 6. Criterios de inclusión de la población objeto de estudio.

Tabla 7. Ejemplo de tabla de resultados de la herramienta Reference Value Advisor.

Tabla 8. Intervalos de referencia del análisis hematológico, calculados mediante la herramienta Reference Value Advisor.

Tabla 9. Intervalos de referencia del análisis bioquímico, calculados mediante la herramienta Reference Value Advisor.

Tabla 10. Intervalos de referencia del análisis de marcadores de estrés oxidativo, calculados mediante la herramienta Reference Value Advisor.

Tabla 11. Intervalos de referencia del análisis hematológico, calculados mediante la herramienta @RISK.

Tabla 12. Intervalos de referencia del análisis bioquímico, calculados mediante la herramienta @RISK.

Tabla 13. Intervalos de referencia de análisis de marcadores de estrés oxidativo calculados mediante la herramienta @RISK.

Tabla 14. Comparación de los intervalos de referencia estimados del análisis hematológico con la bibliografía.

Tabla 15. Comparación de los intervalos de referencia estimados del análisis bioquímico con la bibliografía.

Tabla 16. Comparación de los intervalos de referencia estimados del análisis de estrés oxidativo con la bibliografía.

Tabla 17. Datos del cuestionario, con sus respectivas categorías y codificación asignadas, incluyendo número de observaciones sobre el total de animales y su expresión en porcentaje. Los datos sin información asociada se contabilizaron aparte y no fueron codificados.

Tabla 18. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con el recuento de GB ($\times 10^3/\mu\text{l}$), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 118).

Tabla 19. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con el recuento de GR ($\times 10^6/\mu\text{l}$), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 112).

Tabla 20. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con el Hct (%), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 117).
*Variable recodificada a Estación fría (otoño e invierno) y Estación templada (primavera).

Tabla 21. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la Hb (g/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 102).

Tabla 22. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la U (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 103).

Tabla 23. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la Cr (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 116).

Tabla 24. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con las PT (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 103).

Tabla 25. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la AST (UI/L), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 115).

Tabla 26. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la GGT (UI/L), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 103).

Tabla 27. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la ALP (UI/L), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 114).

Tabla 28. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la BT (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 100).

Tabla 29. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la LDH (UI/L), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 105).

Tabla 30. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con Ca (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 103).

Tabla 31. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con P (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 116).

Tabla 32. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con los TG (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 100).

Tabla 33. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con el Fib (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 116).

Tabla 34. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con TBARS (μM), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 117).

Tabla 35. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con el AU (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 118).

Tabla 36. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con 8-OHdG (ng/ml), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 116).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representación esquemática del método de dispersión de la luz para el análisis celular.
- Figura 2. Representación esquemática del método de impedancia eléctrica en el análisis hematológico.
- Figura 3. Representación esquemática de los componentes del espectrofotómetro.
- Figura 4. Mapa de España según la clasificación climática de Köppen-Geiger (1981-2010).
- Figura 5. Analizador hematológico URIT 2900Vet, utilizado en el estudio.
- Figura 6. Sistema de bandejas del analizador automático compacto de química clínica TC220.
- Figura 7. TBARS Assay kit utilizado en el estudio.
- Figura 8. Ejemplo de curva estándar colorimétrica de MDA.
- Figura 9. Total Antioxidant Status kit utilizado en el estudio.
- Figura 10. ELISA de competición Highly sensitive 8-OHdG Check utilizado en el estudio.
- Figura 11. Gráfico de la absorbancia de los estándares de 8-OHdG a 450 nm *versus* el logaritmo de su concentración en ng/ml.
- Figura 12. Área constituida por los Centro Hípicos muestreados en el presente trabajo.
- Figura 13. Gráfico sectorial de proporciones de la estación de muestreo de la población de referencia.
- Figura 14. Gráfico sectorial de proporciones del momento del día del muestreo de la población de referencia.
- Figura 15. Gráfico sectorial de proporciones de la raza de la población de referencia.
- Figura 16. Gráfico sectorial de proporciones del sexo de la población de referencia.
- Figura 17. Gráfico sectorial de proporciones de la vacunación de la población de referencia.
- Figura 18. Gráfico sectorial de proporciones de la desparasitación de la población de referencia.
- Figura 19. Gráfico sectorial de proporciones de la condición corporal de la población de referencia.
- Figura 20. Gráfico sectorial de proporciones del alojamiento de la población de referencia.
- Figura 21. Gráfico sectorial de proporciones del alimento concentrado de la población de referencia.

Figura 22. Gráfico sectorial de proporciones del forraje de la población de referencia.

Figura 23. Gráfico sectorial de proporciones del suplemento de la población de referencia.

Figura 24. Gráfico sectorial de proporciones de la regularidad del ejercicio de la población de referencia.

Figura 25. Gráfico sectorial de proporciones de la intensidad del ejercicio de la población de referencia.

Figura 26. Gráfico sectorial de proporciones de la duración del ejercicio de la población de referencia.

Figura 27. Gráfico sectorial de proporciones de la disciplina de la población de referencia.

Figura 28. Gráfico sectorial de proporciones de la historia de enfermedades en el último mes de la población de referencia.

Figura 29. Gráfico sectorial de proporciones de la historia de transporte en el último mes de la población de referencia.

Figura 30. Gráfico sectorial de proporciones de la historia de medicación en los últimos siete días de la población de referencia.

Figura 31. Distribuciones con mejor ajuste para cada variable del hemograma.

Figura 32. Distribuciones con mejor ajuste para cada variable del análisis bioquímico.

Figura 33. Distribuciones con mejor ajuste para cada variable del análisis de marcadores de estrés oxidativo.

RESUMEN

En la actualidad, una de las principales áreas del sector equino en España es la del uso del caballo para actividades de ocio y competición, que por lo general se realizan en centros hípicos¹. El veterinario clínico de équidos desempeña un papel fundamental en la vigilancia de la salud de estos caballos, y una de las herramientas más frecuentemente utilizadas para su consecución es la realización de análisis hematológicos y bioquímicos². Además, el creciente interés en los últimos años acerca del equilibrio oxidante-antioxidante y sus mecanismos de respuesta en diferentes escenarios en el caballo, hace que los marcadores de estrés oxidativo sean también objeto de estudio³.

Para la correcta interpretación de estos análisis son necesarios los intervalos de referencia, definidos como el rango de valores de una variable en una población con un estado de salud definido⁴. Hasta la fecha, la población equina residente en centros hípicos en España no contaba con unos intervalos de referencia establecidos; es por ello que el principal objetivo del presente trabajo fue la determinación, mediante dos métodos diferentes, de los intervalos de referencia de parámetros de hematología, bioquímica y estrés oxidativo, en esta población.

Entre los meses de enero y noviembre de 2017, se tomaron muestras de sangre de 138 animales, que constituyeron la población de referencia cumpliendo los criterios de inclusión recogidos en un cuestionario realizado previo al muestreo. Se analizaron veinte parámetros hematológicos, veinte parámetros bioquímicos y cuatro marcadores de estrés oxidativo - ácido úrico (AU), sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), estado antioxidante total (TAS) y 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) –.

En la comparación de los intervalos de referencia calculados mediante la herramienta tradicional (Reference Value Advisor) y la herramienta alternativa (@RISK), se observó que los intervalos determinados por @RISK fueron en general más acotados, presumiblemente por el mejor ajuste

de las líneas de distribución a los datos, lo cual reduce la probabilidad de la obtención de resultados falsos negativos.

En comparación con la bibliografía, en los intervalos de referencia de hematología determinados se encontraron diferencias atribuibles al tipo de raza y al analizador, por lo que es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia para caballos de sangre caliente, templada y fría. En el análisis bioquímico, las diferencias encontradas en las enzimas musculares fueron debidas a la distribución característica de los datos de estas variables, los reactivos empleados en su determinación y la actividad física desarrollada por el caballo en centros hípicas, mientras que en la gamma-glutamilttransferasa (GGT), el límite superior del intervalo de referencia fue acusadamente más bajo que la mayoría de límites publicados. Por tanto, es importante que las enzimas sean comparadas con intervalos de referencia específicos para cada laboratorio y cada población según su actividad física. Respecto a los intervalos de referencia de los marcadores de estrés oxidativo, las diferencias en TBARS fueron atribuidas al método analítico, mientras que en TAS, el intervalo más amplio se asoció al tipo de entrenamiento y al temperamento de los animales que constituyeron la población de estudio. En este trabajo se establece por primera vez el intervalo de referencia de 8-OHdG sérica en el caballo sano, pudiendo esto servir de base para futuros estudios de este marcador en situaciones de desequilibrio oxidante-antioxidante en equinos.

En el análisis univariable se encontraron múltiples asociaciones entre los factores fisiológicos estudiados, siendo el sexo, la raza, el tipo de alojamiento y entrenamiento y la disciplina, los factores que mostraron asociaciones más diferenciadas. En el hemograma se observó una proporcionalidad entre eritrocitos, leucocitos y plaquetas, dando lugar a ratios que están siendo utilizados en otras especies como marcadores de inflamación. En cuanto a las asociaciones entre las variables bioquímicas, en la mayoría se relacionó con su metabolismo, si bien en algunas asociaciones no se halló justificación posible, quedando la incógnita de si fueron fruto del azar o si

quizás puedan ser explicadas en futuros estudios. Se observó una asociación directamente proporcional encontrada entre TAS y 8-OHdG en animales sanos, al contrario que lo observado en los estudios publicados cuya población muestral poseía alguna patología.

Para evaluar y simplificar la compleja red de asociaciones entre las variables analíticas y los factores fisiológicos se llevó a cabo un análisis multivariable. Los parámetros de la serie roja mostraron una estrecha relación con la edad y el sexo, asociaciones ampliamente documentadas en la bibliografía. La relación hallada entre los leucocitos, la estación del año y el nivel de entrenamiento podría ayudar a una mejor comprensión del comportamiento de este parámetro en animales sanos. Los factores más influyentes sobre las variables del análisis bioquímico fueron la estación, la edad, el ejercicio y la disciplina. Estas asociaciones muestran la importancia que tiene la actividad física desempeñada sobre los valores analíticos en el caballo, dato que debería ser tenido en cuenta por los veterinarios para la correcta interpretación de los análisis clínicos. El ácido úrico fue el único marcador de estrés oxidativo que mostró asociación significativa con el ejercicio, posiblemente fruto de su relación con el metabolismo muscular de tipo anaerobio. No se obtuvieron asociaciones significativas en el resto de marcadores de estrés oxidativo, resultado esperable al haberse obtenido de una población libre de enfermedad o alteración, donde no sería previsible encontrar un desequilibrio oxidante-antioxidante.

Como conclusión, los intervalos de referencia determinados por un laboratorio a partir de una población de caballos concreta no deberían extrapolarse al resto de la cabaña equina, ya que las variables analíticas pueden verse afectadas por multitud de factores individuales y biológicos⁵. Dada la importancia de los intervalos de referencia en la clínica equina como herramienta diagnóstica, estos deberían establecerse en cada laboratorio principalmente por el tipo de raza y la actividad física.

SUMMARY

Currently, one of the main areas of the equine sector in Spain is the use of the horse for pleasure and sports competition purposes, usually carried out at equestrian centres¹. The equine veterinary clinician develops an essential role in the health surveillance of these horses and one of the most frequent tools for this purpose is the completion of hematology and biochemistry analysis². Moreover, a growing interest in the last years about the oxidant-antioxidant balance and their mechanisms of response in different scenarios in the horse, has made that the oxidative stress markers have also been aim of intense study³.

For the correct interpretation of these analysis, reference intervals, defined as the range of values of an analyte from a population with a defined health status, are necessary⁴. To date, the equine population living in equestrian centres at central Spain did not have defined reference intervals; therefore, the main aim of the present study was the determination, by two different methods of reference intervals for the hematology, biochemistry and oxidative stress parameters in this population.

Between january and november of 2017, blood samples were withdrawn from 138 animals, which comprised the reference population by fulfilling the inclusion criteria gathered in a questionnaire that was completed before sampling. Twenty hematology parameters, twenty bioquemistry parameters and four oxidative stress markers – uric acid (UA), tiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total antioxidant status (TAS), and 8-hydroxi-2-deoxyguanosine (8OHdG) - , were analyzed.

The comparison among the interval references calculated by the traditional tool (Reference Value Advisor) and the alternative tool (@RISK), turned out in more delimited reference intervals with @RISK, presumably for the better distribution lines adjustment to the data, which reduces the odds of false negative results.

In comparison with the bibliography, the differences found in the determined hematology reference intervals were attributable to the type of blood and the analyzer; consequently, it would be advisable that each laboratory establishes its own reference intervals for hot, warm and cold-blooded horses. In the biochemical analysis, the differences found in the muscular enzymes were due to the characteristic distribution of these variables, the reagents used for their determination and the physical activity carried out by the horse in equestrian centres, while for the gamma-glutamyltransferase (GGT), the reference interval superior limit was markedly lower than the majority of intervals published. The enzymes should therefore be compared with specific reference intervals for each laboratory and each population according to its physical activity. Regarding the reference intervals of the markers of oxidative stress, differences in TBARS were attributable to the analytical method, while in TAS the wider interval were associated to the type of training and temperament of the animals from the study population. In this work, the reference interval for the horse serum 8-OHdG was first established, which may serve as a base for future studies of this marker in oxidant-antioxidant imbalance events in horses.

In the univariate analysis multiple associations were found among physiological factors, being sex, breed, housing, training and discipline the factors with more distinctive associations. In the hemogram, a proportionality between erythrocytes, leucocytes and platelets was observed, leading to ratios that are being used in other species as inflammatory markers. Regarding the associations among biochemical parameters, most of them were related to their metabolism, although no explanation was found for some of the associations, being unknown if those associations were aleatory or if they could be explained in future studies. A directly proportional association was observed between TAS and 8-OHdG in healthy animals, which is opposed to previous published studies whose sample population had some pathology.

In order to evaluate and simplify the complex net of associations between analytes and physiological factors, a multivariate analysis was performed. The red cells parameters showed a

close relation with age and sex, which were widely covered in the bibliography. The relationship found between leucocytes, season and training level could help to a better understanding of the behaviour of this analyte in healthy animals. The most influencing factors over biochemical analytes were the season, age, exercise and discipline. These associations show the relevance of physical activity over analytical values in the horse, fact that should be taken into account by the equine veterinary clinicians for the correct interpretation of the clinical analysis. Uric acid was the only oxidative stress marker that showed a significant association with exercise, possibly from its relationship with the anaerobic muscle metabolism. No significant associations were obtained from the rest of the oxidative stress markers, which could be explained for the fact that they were obtained from a free-of-disease population, where oxidant-antioxidant imbalances would be unlikely.

To conclude, reference intervals determined by a laboratory from a defined horse population should not be extrapolated to the rest of the equine livestock, since the analytes could be affected by multiple individual and biological factors⁵. Due to the importance in the equine clinic as a diagnostic tool, reference intervals for horses should be established in each laboratory by type of blood and physical activity.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SITUACIÓN DEMOGRÁFICA DEL CABALLO EN ESPAÑA

La relación entre el hombre y el caballo ha ido evolucionando a lo largo de la historia en función de las necesidades del ser humano, siendo a partir de los años 70 cuando la utilización del equino ha sufrido los cambios más relevantes¹. La actividad ecuestre presenta en la actualidad grandes diferencias entre países, siendo en los países con mayor desarrollo humano donde existe un incremento más acentuado en la demanda y por consiguiente en la oferta de la actividad ecuestre¹. Un estudio sobre el sector ecuestre y la economía (2005-2013) clasifica a España por encima de la media del PIB y de la media del desarrollo humano, en comparación con el resto del mundo⁶. Este estudio señala además que, en España, la tradición ligada al caballo (tauromaquia, fiestas populares, etc.), tiene un fuerte peso en el impacto económico del sector ecuestre. La demanda en nuestro país, tanto de las actividades ligadas a las raíces socioculturales, como las relacionadas con actividades de ocio y disciplinas ecuestres, se encuentra motivada por el bienestar o la realización personal del consumidor¹.

En la actualidad, el caballo es utilizado principalmente con fines de ocio y deportivos. Los centros hípicos son lugares de estabulación y disfrute del caballo, donde el caballo adulto es utilizado para actividades de ocio y/o competición⁶.

En 2012, el impacto económico del sector ecuestre en España fue de 5.300 millones de euros (0,51% del PIB español). Este sector emplea a más de 61.000 personas. El impacto económico directo es de 3.375 millones de euros, siendo la fase de explotación o utilización del caballo adulto con fines diversos, la de mayor impacto, con 1.697 millones de euros, implicando 481.539 caballos⁶.

España cuenta con 189.452 explotaciones (2020)⁷ y 638.312 caballos censados (Sistema Integral de Trazabilidad Animal, SINTRAN, 2021, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación). En la zona

central de España - Madrid, Castilla la Mancha, Castilla y León y Extremadura -, la distribución del censo de caballos, es del 3, 4, 11 y 6% respectivamente, siendo el 85% de los caballos Pura Raza Español (PRE) (2020)⁷. La concentración de caballos por persona en estas comunidades es de 0,003, 0,011, 0,028 y 0,038 (2020) respectivamente⁷. La distribución de explotaciones de equinos en estas comunidades es del 1, 4, 10 y 10% respectivamente y la concentración de explotaciones por kilómetro cuadrado es de 0,32 en Madrid, de 0,09 en Castilla la Mancha, 0,20 en Castilla y León y 0,43 en Extremadura (2020)⁷.

En España en 2020, según la Real Federación Hípica Española (FHE), había 797 centros hípicos federados (66 en la CAM, 16 en Castilla la Mancha, 45 en Castilla y León y 16 en Extremadura) y 159 no federados (dato estimado en base al principio de que los clubes no federados suponen un 20% de los clubes federados)^{6,8}.

El coste del mantenimiento mensual del caballo (suma de la manutención, los herrajes, el veterinario, el mozo y la amortización del material) es de entre 360 y 860 euros, según el tipo de centro hípico o finca privada. El impacto económico total que tiene la estabulación de caballos en centro hípicos es de 39 millones de euros mensuales. En suma, el impacto total derivado de los centros hípicos en España en 2012 fue de 622 millones de euros⁶.

Estos datos ponen de manifiesto la relevancia del caballo como elemento de disfrute tanto en actividades de aprendizaje, como de ocio y deporte. El cuidado de estos animales y la vigilancia de su salud es por tanto de suma importancia para el buen funcionamiento del sector⁶.

1.2. HERRAMIENTAS PARA EL DIAGNÓSTICO EN CLÍNICA EQUINA

La historia clínica, el examen físico y las técnicas complementarias de diagnóstico son los tres fundamentos básicos de la evaluación médica, tanto en medicina humana como en veterinaria. Por tanto, a la formación inherente del veterinario, debe añadirse la adecuada recopilación de la historia, la correcta realización del examen físico del paciente y la decisión de qué pruebas complementarias elegir para ayudar en el diagnóstico de cada caso. En líneas generales, dentro de la investigación clínica, siempre se va a comparar lo observado en el paciente con lo considerado como fisiológico para esa especie animal, siendo normalmente los hallazgos que se encuentran fuera del rango fisiológico, los indicadores de alteración o enfermedad².

Entre los análisis que pueden realizarse a partir de una muestra de sangre, existen pruebas cualitativas en las que el resultado indica si el paciente padece o no una determinada enfermedad (por ejemplo, técnicas de diagnóstico molecular, como una PCR), y existen pruebas cuantitativas, como muchas de las técnicas de biopatología, que proporcionan un resultado numérico cuya interpretación se ve influenciada por numerosos factores, requiriendo una serie de conocimientos mínimos².

1.3. TÉCNICAS DE BIOPATOLOGÍA

La biopatología es la ciencia que se ocupa de la realización de los análisis clínicos en muestras biológicas, así como de la interpretación de los resultados. Para dicha interpretación, es necesario conocer el intervalo de referencia fisiológico de cada parámetro evaluado, teniendo en cuenta que el intervalo de referencia puede variar según la especie animal e incluso según la población dentro de cada especie. Las técnicas de biopatología constituyen una importante

herramienta de diagnóstico en clínica equina. La más utilizada es la hematología, frecuentemente acompañada de la determinación de proteínas totales, la cual nos aporta información valiosa acerca del estado de hidratación e inflamación/infección del paciente, entre otros datos. El análisis bioquímico de las muestras suele realizarse en forma de paneles de analitos, más que variables individuales, que van a ser indicadores de la funcionalidad de diferentes aparatos y sistemas orgánicos⁹. Más recientemente, se ha observado un auge en la investigación referente al equilibrio oxidante/antioxidante en equinos, tanto en el ámbito de la fisiología del ejercicio como dentro del estudio de determinadas patologías¹⁰.

Para la obtención de resultados analíticos fiables es importante que el laboratorio tenga establecido un sistema de control de calidad sobre todas las fases de la realización del análisis, desde la fase preanalítica (envío y manejo de las muestras), la fase analítica (procedimientos analíticos, formación del personal y mantenimiento de los equipos) y la fase post analítica donde los resultados son comparados con valores de referencia que idealmente deberían proceder de una población representativa para las muestras dadas⁹.

1.3.1. Hematología

La hematología se define como la disciplina encargada del estudio de la sangre y de los órganos que la producen¹¹.

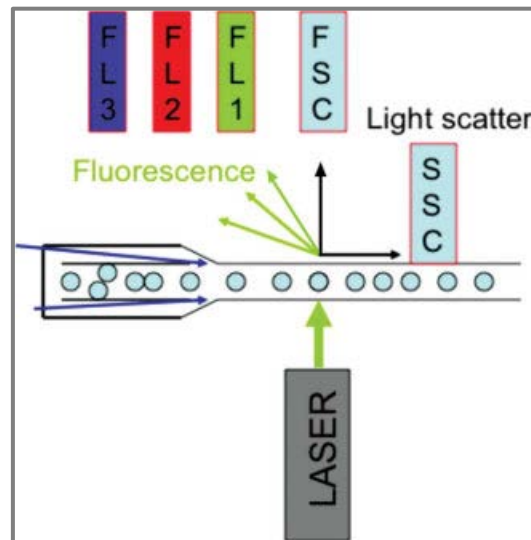
1.3.1.1. Métodos automatizados de análisis hematológico

En la década de los 50 se diseñaron los primeros contadores hematológicos semiautomatizados, en los que se preparaba de manera previa al análisis una dilución de sangre de forma manual. Fue a finales de los 60, cuando se diseñó el primer contador automático de células¹².

Los equipos utilizados para la realización de análisis hematológicos pueden utilizar una o varias de las siguientes tecnologías:

- Métodos basados en la dispersión de la luz: En 1953, Crosland-Taylor describe el primer contador de dispersión de luz, en el que una delgada corriente de células, a su paso por un foco de luz, generaba fenómenos de difracción, refracción y reflexión, que eran captados por sensores ópticos y medidos por fotómetros, obteniendo así la información sobre su concentración, tamaño y morfología (Figura 1)¹³⁻¹⁵. Los primeros instrumentos utilizaban lámparas de mercurio y halógenas, que han sido en su mayoría reemplazadas por el láser¹⁶. Este método por sí solo no es válido para la diferenciación de los tipos de leucocitos debido a que refracción de la luz producida por los gránulos interfiere en la interpretación del tamaño¹⁵. Fue añadiendo una tinción con peroxidasa y midiendo de forma simultánea la dispersión y absorción de luz de los leucocitos cuando se consiguió diferenciar entre linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. La adición de otro canal para la medición de basófilos dio lugar a los analizadores multicanal¹⁵. Otros avances, como la diferenciación de los diferentes ángulos de dispersión, aportaron información sobre determinadas características de la célula, como el volumen celular, la granularidad, o la superficie celular¹⁶.

Figura 1. Representación esquemática del método de dispersión de la luz para el análisis celular. La luz que atraviesa las células - FSC, forward scatter - y la luz desviada 90° - SSC, side scatter -, son recogidas por detectores. Ambos haces de luz, se corresponden con el tamaño y estructura celular respectivamente. La tinción de componentes celulares es recogida por detectores de fluorescencia - FL1, FL2 y FL3 -.



Fuente: Walton RM. Equine clinical pathology. John Wiley & Sons; 2013.

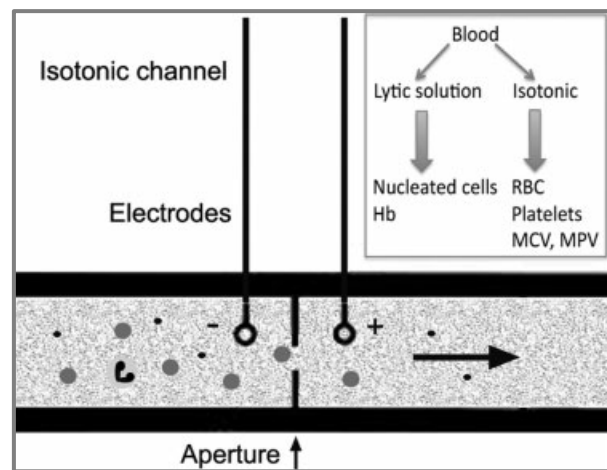
- Método basado en la impedancia eléctrica o principio de Coulter: En 1956, Wallace H. Coulter describió el primer contador basado en la capacidad aislante de las células sanguíneas. En este método, las células son diluidas en una solución salina sometida a una corriente eléctrica; al pasar por una apertura situada entre los dos electrodos generan interrupciones momentáneas de la corriente o, lo que es lo mismo, aumentos transitorios de la impedancia (Figura 2)^{14,15}. La amplitud de estos cambios en la conducción es proporcional al tamaño celular y el número de interrupciones equivale al número de células¹⁷. De este modo, este método sirve para diferenciar glóbulos rojos, plaquetas y calcular la distribución del volumen eritrocitario y plaquetario^{16,18}. Inicialmente, sólo linfocitos y granulocitos eran diferenciados por su volumen; posteriormente esta tecnología se ha combinado con otras técnicas para contabilizar y diferenciar los glóbulos blancos:

- El uso de agentes lisantes del citoplasma, que permiten medir el núcleo celular¹⁶. Estos sistemas no distinguen adecuadamente entre células mononucleares y

polimorfonucleares. Posteriormente comenzaron a utilizarse lisantes más suaves para mantener en lo posible la estructura del leucocito¹⁵.

- Análisis por radiofrecuencia, donde una corriente alterna de alta frecuencia determina cada tipo celular en función de la densidad de sus componentes. Puede combinarse con el método de corriente directa que mide el tamaño celular.

Figura 2. Representación esquemática del método de impedancia eléctrica en el análisis hematológico. La sangre es dirigida a dos cámaras. Una cámara usa una solución de lisis para el conteo de leucocitos (*nucleated cells*) y la medición de la concentración de hemoglobina (Hb). La segunda cámara contiene una solución isotónica y una pequeña apertura a través de la cual se cuentan eritrocitos (RBC) y plaquetas (*platelets*) y se estima su volumen medio (MCV, MPV).



Fuente: Walton RM. Equine clinical pathology. John Wiley & Sons; 2013.

Ambas técnicas miden el tamaño celular, que va a estar directamente relacionado con la intensidad del impulso. Para la medición de las células de forma precisa, sin embargo, es necesario añadir a estos instrumentos un sistema de flujo laminar envolvente, donde las células circulan en una fina corriente, además de establecer umbrales para cada tipo celular. Así, estos sistemas son capaces de discriminar eritrocitos, plaquetas y leucocitos totales y realizar su recuento, siempre y cuando se parta de un volumen conocido de sangre homogeneizada y diluida y las células sean contabilizadas una sola vez¹⁵. Ejemplos de instrumentos de hematología utilizados en medicina veterinaria con estas tecnologías son los siguientes:

- Los analizadores ADVIA 120® y ADVIA 2120® combinan las técnicas de citometría de flujo y dispersión de la luz para la determinación de glóbulos rojos y plaquetas, realizando un análisis bidimensional de cada tipo celular. La tinción con peroxidasa y la basolobularidad permiten el contaje dual de la serie blanca. Según el modelo, cuenta con diferentes métodos colorimétricos para la determinación de hemoglobina. Su diseño compacto, la doble metodología utilizada en la mayoría de parámetros, el control automático de los reactivos que contiene y el pequeño volumen de muestra requerido para el análisis entre otras características, hace que estos equipos sean extensamente utilizados en veterinaria¹⁹.
- Los analizadores SYSMEX XT-2000iV® y Cell-Dyn®3500® están basados en la tecnología óptica y de impedancia. Las tecnologías de fluorescencia, enfoque hidrodinámico y citometría de flujo permiten diferenciar las poblaciones de leucocitos, eritrocitos y plaquetas. Con los datos de volumen y el recuento se determina el hematocrito. La hemoglobina es determinada mediante el método de lauril sulfato de sodio, libre de cianuro. El recuento diferencial se realiza por la combinación de las dispersiones lateral y frontal y la fluorescencia de los ácidos nucleicos^{20,21}.
- El analizador URIT-2900Vet Plus©, específico para medicina veterinaria, es capaz de analizar la sangre de multitud de especies animales. Proporciona la medición de 21 parámetros y la diferenciación de tres poblaciones de leucocitos. Utiliza la impedancia eléctrica para el contaje y diferenciación de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas y la colorimetría fotoeléctrica para la determinación de hemoglobina²².

- Método basado en la centrifugación: descrito a principios de los 80, está fundamentado en las diferencias de peso específico de cada tipo de célula sanguínea. Mediante este sistema puede diferenciarse el valor hematocrito, número de plaquetas y número de leucocitos, diferenciando entre granulocitos y agranulocitos^{14,23}. Esto se consigue llenado de sangre un capilar de microhematocrito que contiene un flotador cilíndrico móvil, el cual, al centrifugar, va a suspenderse a nivel de la costra flogística, consiguiendo la expansión de los diferentes estratos celulares del

mismo (plaquetas, agranulocitos y granulocitos)²⁴. El interior del tubo esta tapizado con naranja de acrinidina, que emite diferente fluorescencia según el tipo celular²⁵. La medición de las bandas se realiza mediante un micrómetro electrónico²³. El QBC Autoread® es un ejemplo de esta tecnología.

El recuento completo de células sanguíneas (CBC por sus siglas en inglés, '*complete blood cell count*') está constituido por el número de eritrocitos, plaquetas y leucocitos por unidad de volumen en sangre periférica/venosa²⁶. Es la principal herramienta de evaluación de células rojas, células blancas y plaquetas. Esta evaluación debe incluir tanto datos numéricos como una valoración morfológica de cada tipo celular²⁷.

1.3.1.2. Serie roja

El término eritrón hace referencia a los glóbulos rojos circulantes y a sus precursores en la médula ósea. En los mamíferos, los glóbulos rojos (también denominados eritrocitos, células rojas sanguíneas o hematíes) son células desprovistas de núcleo y organelas. Están compuestos por una membrana formada principalmente por una bicapa de fosfolípidos en cuyo citosol se encuentra la hemoglobina, formada por un complejo hierro-porfirina-proteína. Esta ocupa un papel central en la principal función de los eritrocitos de captación, transporte y liberación de oxígeno a los tejidos.

En el caballo, el eritrocito tiene una morfología discoide bicóncava, con una leve o ausente palidez central. Mide 5-6 μm de diámetro y tiene una vida media de 140-155 días. Los eritrocitos equinos tienen varias particularidades si se comparan con otras especies: tienen una mayor velocidad de sedimentación que otras especies, debido a la baja carga de su membrana, lo cual predispone a su agregación en forma típica de pilas de monedas¹⁶; otra particularidad en los équidos es la alta capacidad del bazo para almacenar sangre en reposo (9L), que puede ser liberada a la circulación en respuesta al estrés o al ejercicio^{28,29}. Además, en el caballo no se observan signos de regeneración por parte de la médula ósea en sangre periférica con presencia de reticulocitos

(eritrocitos inmaduros que aún contienen algunas organelas en su interior), como sí se observa en otras especies^{28,30}.

El eritrograma se compone de los siguientes elementos:

-Recuento de glóbulos rojos (GR, $10^6/\mu\text{L}$): es la concentración de eritrocitos en sangre venosa periférica. Este recuento suele estar correlacionado con el valor de hematocrito y de hemoglobina¹⁸. En caballos, la eritrocitosis suele asociarse a contracción esplénica o a deshidratación. La anemia puede resultar por pérdida de GR (hemólisis o hemorragia) o por fallo en la producción⁹.

-El hematocrito (Hct, %) es el porcentaje de volumen sanguíneo ocupado por GR. Puede ser determinado a partir del recuento de GR y el volumen corpuscular medio, mediante la siguiente fórmula¹⁴:

$$\text{Hct (\%)} = \text{VCM (fL)} \times \text{GR (10}^6/\mu\text{L)} / 10$$

También puede ser calculado mediante la centrifugación de un capilar de microhematocrito²⁷.

-Hemoglobina (Hb, g/dL), mide la concentración de hemoglobina en gramos por decilitro o litro de plasma. En una dilución de sangre, la Hb es liberada por la adición de un agente lisante celular. De forma clásica, la medición de la Hb se ha realizado mediante la conversión a cianometahemoglobina, pero este método tiene los inconvenientes de ser una reacción lenta y de necesitar reactivos con cianuro. Otros métodos libres de cianuro que utilizan lauril sulfato de sodio (LSS) han resultado eficaces además de ser más seguros¹². La concentración de Hb se determina mediante espectrofotometría a una determinada longitud de onda, donde una mayor absorbancia de la luz equivale a una mayor cantidad de Hb¹⁸. Exceptuando a los camélidos, en los mamíferos el valor de Hb, equivale generalmente a 1/3 del valor del Hct¹⁴.

El incremento o disminución de los GR, Hct y Hb suele ser proporcional, ya que todos son indicadores de la concentración de GR en la sangre²⁷.

-Volumen corpuscular medio (VCM, fL). Al realizar el conteo de GR, los analizadores determinan la distribución del volumen celular, cuya media resultante es el volumen medio de los GR medido en femtolitros⁶. Un aumento de este o macrocitosis, puede ser indicador (aunque no en todos los casos), de una respuesta regenerativa. La microcitosis en el caballo, puede ser fisiológica o asociada a la edad¹⁴.

-La hemoglobina corpuscular media (HCM, pg), indica el contenido de Hb en los GR y se calcula a partir de la concentración de Hb y el recuento de GR, mediante la siguiente fórmula¹⁴:

$$\text{HCM (pg)} = \text{Hb (g/dL)} \times 10 / \text{GR (10}^6/\mu\text{L)}$$

Poco utilizado en veterinaria, sirve para evaluar si la cantidad de hemoglobina en células macrocíticas hipocrómicas es normal⁴⁴.

-La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM, g/dL), proporciona el valor de la concentración de Hb en relación al Hct y se determina con estas dos variables mediante la siguiente fórmula¹⁸:

$$\text{CHCM (g/dL)} = [\text{Hb (g/dL)} / \text{Hct (\%)}] \times 100$$

Su disminución indica hipocromía de los GR. La hiperchromía no es posible y puede deberse a un falso incremento de la Hb (por lipemia) o disminución del recuento de GR (por aglutinación o hemólisis)^{14,44}.

-La amplitud de distribución eritrocitaria (RDW, %), es el coeficiente de variación del volumen eritrocitario¹⁴. Se obtiene a partir de la curva de distribución de tamaño de los GR, mediante el cociente de la desviación estándar de la mayoría de los GR y el volumen corpuscular medio¹⁸:

$$\text{RDW (\%)} = \text{SD (fL)} / \text{VCM (fL)}$$

La administración de anabolizantes, hemorragias y/o hemólisis pueden dar lugar a incrementos en el RDW. El histograma de la distribución eritrocitaria, generado por algunos analizadores, puede aportar información valiosa sobre la presencia de subpoblaciones de GR macro y microcíticos¹⁴.

-El recuento de plaquetas (PLQ, $10^3/\mu\text{l}$) se realiza mediante la misma técnica que el recuento de GR según el analizador, bien al mismo tiempo o por separado. La diferencia de tamaño entre los GR y las PLQ en el caballo (5-6 y 2,5-3,5 μm de diámetro respectivamente), hace que los analizadores diferencien fácilmente estos dos tipos celulares³¹. No obstante, la formación de agregados plaquetarios es una causa muy frecuente de obtención de concentraciones de PLQ bajas, por lo que una disminución en el recuento de PLQ debe ser siempre confirmada en el frotis¹⁸. Puede observarse trombocitosis en situaciones de inflamación crónica, o hemorragia leve principalmente. Procesos inmunomediados, endotoxemia y alteraciones de la médula ósea entre otras, dan lugar a trombocitopenia.

-El volumen plaquetar medio (VPM, fL), al igual que el volumen eritrocitario medio, es el valor medio de la curva de distribución de los diferentes tamaños plaquetarios. Las PLQ en el caballo son de menor tamaño que en el perro o el gato, con un volumen plaquetar medio de 6,6 fL³¹.

-Los reticulocitos en el caballo son detectados muy rara vez en sangre, debido a que su maduración tiene lugar en la médula ósea¹⁶.

1.3.1.3. Serie blanca

El recuento total, recuento diferencial y análisis morfológico de los glóbulos blancos se engloban dentro del término leukon³².

-El recuento total de leucocitos (GB, $10^3/\mu\text{l}$) es generado por el contaje en un analizador automático, aunque este recuento puede hacerse de forma manual²⁷. Las dos causas principales

de leucocitosis en el caballo sano son: (1) leucocitosis fisiológica, con neutrofilia y/o linfocitosis, como consecuencia de la activación del eje simpático-adrenal (ejercicio intenso, excitación, miedo), con la consiguiente contracción esplénica y movimiento del conjunto marginal de neutrófilos y/o linfocitos; (2) leucocitosis por estrés, con neutrofilia, linfopenia y eosinopenia, asociada a glucocorticoides³².

-En el recuento diferencial de GB pueden distinguirse los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), y las células mononucleadas (linfocitos y monocitos). Todos ellos son producidos en la médula ósea a excepción de los linfocitos, sintetizados en tejido linfoide²⁷.

-Los neutrófilos (NEU, $10^3/\mu\text{l}$), son el tipo leucocitario más abundante en la sangre equina con una vida media en sangre de 10,5 horas y posterior migración a tejidos³³, donde son funcionales durante 1-2 días para después ser fagocitados³². Es una célula redondeada de 10-15 μm de diámetro³², en la que pueden observarse distintas morfologías, que van a indicar diferentes estadios¹⁴:

- Neutrófilos inmaduros o neutrófilos en banda, con un núcleo no segmentado en forma de “U” o “S”¹⁴, su presencia en sangre está asociada a inflamación severa²⁷.
- Neutrófilos maduros o segmentados, con un núcleo de entre tres y cinco segmentaciones y citoplasma de incoloro a rosa pálido¹⁴. Con más de cinco segmentaciones se consideran neutrófilos hipersegmentados, que son propios de situaciones de inflamación subaguda de varios días de duración y rara vez se observan en el caballo sano³².
- Neutrófilos tóxicos, asociados a inflamación aguda severa o infección bacteriana sistémica³² que resulta en un incremento de la neutropoyesis, dando como resultado NEU funcionales con uno o más de los siguientes cambios tóxicos: citoplasma basofílico, cuerpos de Döhle (agregados de retículo endoplásmico, que forman inclusiones azul-grisáceo en el citoplasma), citoplasma vacuolizado

(producto de la endotoxemia), tamaño gigante y núcleo con cromatina menos condensada y más segmentado o en forma de "donut"¹⁴.

El incremento de NEU en sangre o neutrofilia ($>6,0 \times 10^3/\mu\text{l}$), suele darse por inflamación y/o infección de origen variable, efecto de corticosteroides o por estímulo adrenérgico. El descenso o neutropenia ($<3,0 \times 10^3/\mu\text{l}$), puede ser provocado por inflamación aguda severa, septicemia, endotoxemia y otras causas, como la administración exógena de corticoesteroides o el hiperadrenocorticismos²⁷.

-Los linfocitos (LIN, $10^3/\mu\text{l}$), son el segundo leucocito más numeroso, siendo la proporción NEU/LIN en el caballo sano de 1,5 a 1. Es el leucocito más pequeño, con 7-9 μm de diámetro. Circula en sangre durante una media de 30 horas³², en su forma madura, con un núcleo redondeado de cromatina densa y un fino borde citoplasma basófilo¹⁴. Los LIN reactivos son de mayor tamaño, con núcleo similar y un citoplasma aumentado, marcadamente basófilo. Los LIN granulares muestran unos gránulos eosinofílicos en el citoplasma. Ambos son observados en situaciones de estimulación antigénica¹⁴.

La linfocitosis en el caballo ($>5,0 \times 10^3/\mu\text{l}$), es producida en mayor medida por el efecto mediado por la adrenalina, por estímulo antigénico crónico y de forma ocasional por neoplasia de origen linfoide²⁷. La linfopenia ($<2,0 \times 10^3/\mu\text{l}$), suele darse en respuesta al efecto de corticosteroides, infección por *Anaplasma*, estadios iniciales de infección vírica e inmunodeficiencias³².

-Los eosinófilos (EO, $10^3/\mu\text{l}$), en el caballo cuentan con núcleo segmentado y unos característicos gránulos eosinofílicos de mayor tamaño que en otras especies domésticas, lo que les confiere su morfología característica¹⁴. Su vida media en sangre es de 2 a 12 horas. La eosinofilia ($>0,8 \times 10^3/\mu\text{l}$), indica un problema parasitario o puede ser secundaria a la estimulación de mastocitos. La eosinopenia es difícil de evaluar debido a los valores fisiológicos de por sí bajos en equinos³².

-La presencia de monocitos (MON, $10^3/\mu\text{l}$), en sangre es mucho menos numerosa (<10%). Es el leucocito de mayor tamaño, con un núcleo lobulado, y citoplasma abundante azul-grisáceo con o sin vacuolas, cuya membrana puede deformarse hacia el exterior, dando proyecciones finas o *pseudopodia*^{14,34}. Su vida media en sangre es de 8,4 horas³². Las monocitosis ($>1,0 \times 10^3/\mu\text{l}$), se dan en respuesta a procesos con destrucción celular (necrosis, hemólisis) y enfermedades supurativas crónicas³⁵, así como en la fase de recuperación de enfermedades víricas y leucemias^{36,37}. La monocitopenia no es clínicamente relevante en el caballo¹⁶.

-Los basófilos (BAS, $10^3/\mu\text{l}$), rara vez son detectados en sangre en el caballo. Constan de un citoplasma con gránulos basofílicos y núcleo segmentado¹⁴. Procesos de hipersensibilidad o alergia, hiperlipemia y enfermedades inflamatorias o neoplásicas, pueden dar lugar a un incremento transitorio de BAS en sangre³².

1.3.1.4. Frotis sanguíneo

El frotis sanguíneo es una parte esencial en la evaluación de las células sanguíneas. Aporta información acerca de la morfología de GR y PLQ, así como el recuento diferencial y estructura de los GB. Para ello, es importante el empleo de una buena técnica para la creación de una monocapa de células sanguíneas uniformemente distribuida. En el método del portaobjetos o preparación en cuña, una pequeña gota de sangre depositada en el borde del portaobjetos es arrastrada por el borde de un segundo porta al deslizarlo en ángulo sobre el primero. En el método del cubreobjetos, se deposita una gota central de sangre sobre un cubreobjetos, donde se apoya y desliza un segundo cubreobjetos. Con esta segunda técnica se consigue un frotis más fino, pero requiere mayor destreza. El frotis debe secarse al aire de forma rápida, identificarse y teñirse. Las tinciones más utilizadas son la tinción de Wright's, May-Grünwald Giemsa y la tinción Diff-Quick^{18,34}.

La evaluación del frotis sanguíneo debe hacerse de forma sistemática: (1) con los objetivos de 4x y 10x, evaluar el borde final para la detección de formas parasitarias, agregados plaquetarios y ocasionales células de gran tamaño. En el área de recuento, situada entre el borde final y el cuerpo del frotis reconocible por la superposición de células, se observan células dispersas, palidez central en los GR y pueden diferenciarse los tipos de GB¹⁸. Este área se evalúa a bajos aumentos para estimar la densidad de GR y GB. Por último, se utilizan los objetivos de 40x y 100x, para el recuento diferencial de GB en seis categorías principales – NEU, NEU en banda, LIN, EO, MON y BAS -, contando un mínimo de 100 GB. Debe reseñarse, cualquier anomalía en la estructura de los GB, GR y PLQ. Además puede hacerse una estimación del recuento de PLQ, encontrando adecuado observar de 8 a 12 PLQ por campo a 100x^{14,18}.

La disposición de los GR en pilas de monedas puede estar aumentada en situaciones con incremento de proteínas en sangre, las cuales disminuyen aún más la carga negativa de la membrana. Esto debe diferenciarse de la aglutinación mediante la dilución en solución salina³⁸. En la sangre equina no suelen observarse reticulocitos, únicamente en aspirados de médula ósea³⁴.

Las alteraciones morfológicas de los GR más frecuentes en caballos son:

- Excentrocitos (hemifantasma), son GR en los que la membrana se encuentra fusionada en una región, lo que da lugar a una zona más traslúcida, mientras que la Hb concentrada en un menor espacio se observa oscurecida. Esta morfología es indicadora de daño oxidativo severo. Los picnócitos, que también reflejan un daño oxidativo sobre los GR, se diferencian de los excentrocitos en que se ha perdido una mayor proporción de membrana.
- Esféricitos, son GR pequeños y redondeados en los que no se aprecia la palidez central. La forma esférica se debe a una pérdida parcial de la membrana celular por fagocitosis de células mononucleares, mientras que el volumen citoplasmático permanece intacto³⁴. Pueden verse en caso de anemia hemolítica inmunomediada y anemia infecciosa equina¹⁴.

- Equinocitos, o GR crenados, son consecuencia de un tiempo prolongado en el secado del frotis, son GR con forma estrellada, con proyecciones redondeadas y uniformemente distribuidas³⁴. En caballos, esta morfología puede verse asociada a la hiponatremia¹⁴.
- Cuerpos de Howell-Jolly, son restos del ADN en forma de inclusión basófila. Se observan ocasionalmente en caballos sanos y principalmente en anemias severas, donde pueden indicar una respuesta regenerativa³⁴.
- Cuerpos de Heinz, son formas esféricas localizadas en la membrana del eritrocito. Se forman por daño oxidativo sobre la Hb, que se desnaturaliza y precipita de forma irreversible¹⁴.

De forma menos frecuente, también pueden observarse las siguientes morfologías:

- Esquistocitos, son fragmentos irregulares de GR como consecuencia de fuerzas mecánicas o físicas. No se presentan de forma consistente en alteraciones de coagulación como en otras especies¹⁴. Han sido descritos en un caso de deficiencia de hierro en un potro y son poco frecuentes³⁹.
- Microcitosis, son GR de pequeño tamaño. Pueden estar asociados a parasitosis o alteraciones gastrointestinales con pérdida crónica de sangre, como neoplasias y ulceración³⁴.
- Queratocitos, son GR fragmentados con forma de medialuna y una o dos proyecciones en forma de cuerno. Están relacionados con alteraciones de la microcirculación y deficiencia de hierro. Poco frecuentes¹⁴.
- Acantocitos, son células espiculadas de forma irregular. Se desconoce su causa en animales, en la especie humana está relacionada con cambios en los fosfolípidos de la membrana. Son muy infrecuentes en caballos¹⁴.

1.3.2. Bioquímica

La química o bioquímica clínica, es la rama de la patología clínica que tiene como objeto el análisis de los fluidos corporales. Un perfil bioquímico es un conjunto de parámetros, normalmente determinados a partir de muestras de suero, cuyos valores obtenidos van a aportar información sobre uno o más aparatos y/o sistemas corporales, principalmente con fines diagnósticos y terapéuticos⁴⁰. Al igual que sucede con la hematología, en la bioquímica también existen diferencias significativas entre los équidos y otras especies domésticas, por lo que el veterinario clínico de équidos debe estar familiarizado con los valores fisiológicos de estas variables para su correcta interpretación¹⁴. El presente trabajo sólo hace referencia a una serie de parámetros seleccionados por su relevancia, frecuencia de uso y utilidad dentro de la medicina equina.

1.3.2.1. Técnicas de bioquímica clínica

Las técnicas analíticas más utilizadas en química clínica en veterinaria son:

- Fotometría: Técnica bioquímica en la que las concentraciones de sustancias y la actividad enzimática son determinadas mediante la medición de la intensidad lumínica total, gracias a la adición de reactivos que dan coloración. Estos analizadores pueden utilizar filtros para medir una determinada longitud de onda dentro del espectro de luz visible¹⁸.

La espectroscopía es la ciencia que estudia la interacción entre la radiación y la materia. Los métodos espectroscópicos utilizan o producen luz de varias longitudes de onda, dentro del espectro electromagnético (luz visible, ultravioleta e infrarroja). Estos métodos son utilizados para medir la mayoría de sustancias en los perfiles bioquímicos¹⁸.

- Espectroscopía de absorción molecular: En esta técnica analítica, la concentración de sustancias se determina según la cantidad de luz absorbida por dicha sustancia (cromóforo) o sus productos¹⁸. Según su longitud de onda, la luz puede clasificarse en:

- Luz ultravioleta (longitud de onda de <380 nm), es una región de alta energía, normalmente generada con una lámpara de deuterio.

- Luz visible (longitud de onda de 380 – 750 nm), es la utilizada para realizar mediciones de absorción de soluciones con color y se genera mediante una lámpara de tungsteno.

- Luz infrarroja (longitud de onda de 750 – 2000 nm), es una región de menor energía.

En un cromóforo en solución, en el que incide una luz perpendicular de una determinada longitud de onda, la cantidad total de luz será igual a la luz absorbida por el compuesto (absorbancia) más la luz que atraviesa el mismo (transmitancia)⁴¹. Cada compuesto cuenta con su propio espectro de absorción y la longitud de onda seleccionada será aquella en la que se produce la máxima absorción¹⁸. La concentración de un compuesto es directamente proporcional a su absorbancia (a mayor concentración, mayor será su absorbancia, siempre que su relación sea lineal) e inversa y logarítmicamente proporcional a la transmitancia (una transmitancia del 100% equivaldrá a una concentración igual a cero del compuesto). Mediante la ley de Lambert-Beer, puede calcularse la concentración a partir de la absorbancia, aplicando la siguiente fórmula:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

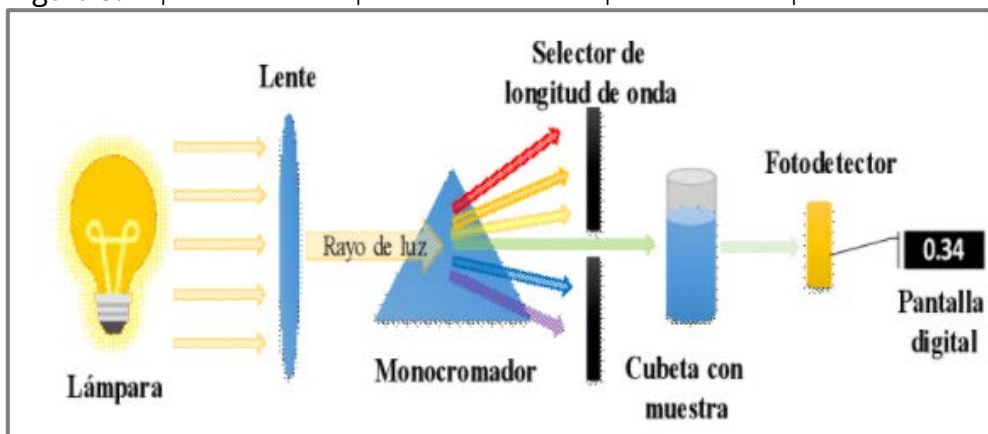
Siendo, A: absorbancia; ϵ : coeficiente de extinción o constante de proporcionalidad; c: concentración de la sustancia; l: diámetro o anchura de la cubeta por la que pasa la luz.

El espectrofotómetro está constituido por los siguientes componentes (Figura 3)⁴²:

- Fuente de luz: lámpara de deuterio y tungsteno.

- Sistema óptico que permite seleccionar diferentes longitudes de onda (lente o colimador, monocromador, selector de longitud de onda).
- Cubetas de diferentes materiales (vidrio, plástico o cuarzo), donde se añade la muestra. La pared de la cubeta absorbe una pequeña cantidad de luz, que debe sustraerse de la absorbancia de la muestra, lo que se consigue midiendo previamente la cubeta sólo con el disolvente del compuesto.
- Fotodetector (fototubo).
- Medidor, que transforma las señales luminosas en eléctricas y sistema de lectura de datos.

Figura 3. Representación esquemática de los componentes del espectrofotómetro.



Fuente: García RD. Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro. 2018.

La relación lineal entre los compuestos y su absorbancia debe asegurarse mediante una calibración previa y regular de los equipos¹⁸.

En estos instrumentos pueden realizarse análisis de punto final o cinéticos. En los análisis de punto final (por ejemplo, del calcio) el compuesto en solución con determinados reactivos se mide de forma puntual y su concentración se calcula en función de la absorbancia obtenida. En los análisis cinéticos (por ejemplo, de la fosfatasa alcalina), la absorbancia se mide varias veces a lo largo de un periodo de tiempo en el cual tiene lugar una reacción¹⁸.

- Fotometría de reflectancia: también denominada química seca, en la que se utiliza una tira como soporte para una matriz de reactivos en formato sólido que van a reaccionar con la muestra, dando lugar a un cambio de color en proporción a la concentración del analito, el cual puede medirse⁴³.
- Espectroscopía de absorción y emisión atómica: utilizada para medir elementos químicos y metales pesados basada en la propiedad de estos compuestos para absorber y emitir energía. Se irradia a una determinada longitud de onda el elemento en estado gaseoso y se mide el espectro de absorción o liberación de energía que genera⁴³.
- Espectroscopía de luminiscencia o de emisión molecular: basada en la emisión de energía en forma de luz de una molécula previamente excitada. Esta luz emitida puede ser cuantificada⁴³.
- Refractometría: basada en el índice de refracción de la luz. La muestra se coloca en un prisma donde la luz se refracta según la concentración del analito. Por medio de un visor y con ayuda de una escala puede determinarse el índice de refracción a través de una línea que separa las zonas con y sin luz⁴³.
- Electroforesis de proteínas o proteinograma: en el que se realiza una separación y medición de las diferentes fracciones de proteínas⁴³.

1.3.2.2. Enzimas

Las enzimas tienen como función la de catalizar reacciones a partir de un sustrato, que convierten en un producto¹⁸. Las enzimas proceden de la lisis o inducción celular, tienen como origen diferentes tejidos y están presentes en sangre durante un tiempo determinado. Debido a que la sangre es un mero medio de transporte, donde la mayoría de las enzimas no ejerce ninguna función, sus límites de referencia son amplios. Los valores por debajo del límite de referencia no

suelen tener significado clínico, mientras que los valores por encima del límite superior en caso de alteración suelen ser muy marcados. Es por ello por lo que deben interpretarse en mediciones seriadas en el tiempo y en conjunto con el resto de la evaluación del paciente. Las alteraciones en la célula (AST, LDH y CK), el aumento de la producción (ALP y GGT) o la disminución de la excreción dan lugar a elevaciones enzimáticas²⁷.

La concentración enzimática se mide en función de su capacidad para reaccionar frente a un sustrato¹⁸.

Enzimas con función muscular

- Creatina quinasa (CK, UI/L) o creatina fosfoquinasa, interviene en el metabolismo energético (transforma la creatina en fosfocreatina) y se produce mayoritariamente en el tejido muscular. Existen tres isoenzimas que pueden estar aumentadas en lesiones del músculo estriado (CK-MM) y menos frecuente en músculo cardiaco (CK-MB), cerebro y músculo liso (principalmente miometrio), (CK-BB)^{18,44}. En elevaciones por encima del límite de detección, su dilución puede producir una elevación paradójica, por dilución de sus inhibidores. Puede elevarse también en caso de hemólisis. Su vida media en sangre es de entre 24 horas y 4 días¹⁴.

- Lactato deshidrogenasa (LDH, UI/L), relacionada con la producción de energía (cataliza la conversión reversible de lactato a piruvato), se localiza en la mayoría de los tejidos. Es una de las proteínas de mayor tamaño del organismo y está constituida por cuatro subunidades, con forma H o L. Por tanto, pueden diferenciarse 5 isoenzimas: LDH₁ se asocia con los miocitos cardiacos y GR; LDH₂ encontrada principalmente en GB; LDH₃ presente en tejido pulmonar; LDH₄ encontrada en páncreas, riñón y placenta; LDH₅ se asocia con hígado y músculo esquelético, siendo la elevación de esta isoenzima normalmente más acusada que el resto^{44,45}. Por tanto, debido a su amplia distribución, el incremento de la LDH total es difícil de interpretar⁴⁴. Tiene una vida media de 7 días¹⁴.

Enzimas con función muscular / hepática

- Aspartato aminotransferasa (AST, UI/L), antes denominada transaminasa glutámico oxoacética (GOT), interviene en el metabolismo de aminoácidos y se encuentra principalmente en el citoplasma de hepatocitos, células musculares y en menor medida, de GR. Debe por tanto interpretarse en conjunto con otras enzimas para identificar su procedencia, aunque suele utilizarse principalmente para investigar el daño muscular⁴⁴. A diferencia de otras especies, en caballos sanos pueden darse concentraciones relativamente elevadas de esta enzima⁴⁴. Su vida media en caballos es de 7-8 días^{18,27}.

Enzimas con función hepática

- Gamma-glutamyltransferasa (GGT, UI/L), enzima encargada de transferir grupos gamma-glutamil entre péptidos, es producida en multitud de tejidos, encontrándose en mayor concentración en páncreas, riñón y en menor medida en mucosa intestinal, hepatocitos y células del epitelio biliar, siendo estas últimas las que contribuyen habitualmente a su elevación en sangre en caballos^{18,45}. Utilizada como indicadora de colestasis e hiperplasia biliar, así como de algunas lesiones gastrointestinales²⁷. Los potros durante su primer mes de vida tienen valores de GGT normales más elevados¹⁸. Su vida media en sangre es de 3 días¹⁴.

- Fosfatasa alcalina (ALP, UI/L), encargada de desfosforilar diversos tipos de moléculas, se encuentra principalmente en células hepatobiliares, hepatocitos, hueso e intestino. Su elevación en suero en los caballos suele darse por colestasis, metabolismo óseo en animales en crecimiento y en cólicos gastrointestinales²⁷. Su vida media en sangre es de 3 días¹⁴.

Otros parámetros de función hepática

- Bilirrubina total (BT, mg/dL), es la suma de bilirrubina indirecta o no conjugada y bilirrubina directa o conjugada. Es generada principalmente por la degradación de la Hb. El grupo hemo se descompone en hierro y protoporfirina, la cual es transformada en biliverdina y posteriormente en bilirrubina indirecta (BI, mg/dL), la cual unida a la albúmina llega al hígado. Allí es transformada en

bilirrubina directa (BD, mg/dL) que es excretada por medio de la bilis a intestino donde se transforma en su mayoría a estercobilina, eliminada en las heces y en urobilinógeno que es parcialmente excretado por vía renal, siendo el resto reabsorbido por el sistema portal al hígado¹⁸. La hiperbilirrubinemia da lugar a la ictericia de las membranas mucosas y puede deberse al ayuno, hemólisis intravascular, fallo hepático y colestasis⁴⁴. El caballo es la única especie en la que puede darse hiperbilirrubinemia por ayuno, con valores de hasta 5,85 mg/dL. Esto puede deberse a que los ácidos grasos libres, aumentados en condiciones de ayuno en equinos, compiten con la bilirrubina por ser captados por los hepatocitos⁴⁴.

1.3.2.3. Función renal

Los parámetros más utilizados para la evaluación de la función renal son la urea y la creatinina.

- Urea (U, mg/dL). Es un catabolito producto de la excreción de nitrógeno. La U se forma a partir de amoníaco y bicarbonato en el hígado y se elimina principalmente a través del glomérulo renal y una pequeña parte por vía digestiva. Una parte de la U es reabsorbida principalmente de forma pasiva a nivel de los túbulos renales, siendo esta reabsorción mayor cuanto menor es el flujo a través de los túbulos^{18,27}. La disminución de la U en sangre es infrecuente, por fallo hepático o shunt portosistémico¹⁸. Los caballos, en menor grado que los rumiantes, poseen una microflora en ciego y colon capaz de convertir parte de la U en aminoácidos que son reabsorbidos. Puede observarse uremia asociada a razas pesadas y ponis, al tipo de dieta (exceso o mala calidad de proteínas, deficiencia de carbohidratos), sepsis, anomalías hormonales, neoplasias, e insuficiencia renal⁴⁴.

- Creatinina (Cr, mg/dL). Derivado de la creatina, sustancia que estabiliza moléculas de alta energía (adenosina trifosfato), en la célula muscular⁴⁴. Su producción diaria es constante (2%/día) y proporcional a la masa muscular¹⁸. Es filtrada en su mayoría a través del glomérulo renal, sin apenas

reabsorción tubular. Aumentos en la Cr pueden responder a la liberación muscular durante el ejercicio, atrofia muscular, anorexia, rhabdomiolisis o a la disminución de la tasa de filtración glomerular²⁷.

1.3.2.4. Proteínas

Las proteínas totales (PT, mg/dL) plasmáticas y séricas son uno de los parámetros más comúnmente determinados en química clínica. La concentración de proteínas plasmáticas es algo mayor que la concentración sérica, ya que contiene el fibrinógeno y los factores de la coagulación. Las PT están formadas por la albúmina y las globulinas sintetizadas en el hepatocito, con excepción de las inmunoglobulinas. La determinación de PT puede hacerse mediante refractometría, donde el índice de refracción del plasma o suero será indicativo del nivel de sólidos totales, en su mayoría proteínas. Lipoproteínas, colesterol, U y glucosa pueden interferir en este índice de refracción¹⁸. En los equipos automáticos, se determinan las PT y la albúmina por los métodos espectrofotométricos de reacción de Biuret y de unión de tinte de bromocresol respectivamente, mientras que las globulinas suelen calcularse como diferencia de las PT y la albúmina²⁷. La hiperproteinemia suele asociarse a deshidratación, incremento de globulinas en enfermedades inflamatorias crónicas e inmunomediadas y paraproteinemias asociadas a parasitosis y neoplasia. La hipoproteinemia puede darse en situaciones de sobrehidratación, pérdida de albúmina (por vía renal, intestinal, por hemorragia o quemaduras) o disminución de la síntesis protéica (por bajo aporte en la dieta, malabsorción, fallo hepático o infecciones víricas)⁴⁴.

- Albúmina (ALB, mg/dL). Sintetizada en el hígado, es la proteína mayoritaria en el plasma, de carácter hidrosoluble, con una vida media plasmática de 19,4 días. Actúa como transportadora de variedad de compuestos – fármacos, hormonas, ácidos grasos e iones – y es la principal responsable

del mantenimiento de la presión osmótica coloidal¹⁴. En caballos, el método recomendado es el púrpura de bromocresol en lugar del verde de bromocresol, utilizado para otras especies⁴⁶.

- Globulinas (GLOB, mg/dL). Grupo formado por fracciones que pueden diferenciarse por electroforesis - α , β y γ globulinas -¹⁴. Sintetizadas mayoritariamente por el hígado a excepción de las inmunoglobulinas o anticuerpos, producidas en tejido linfoide¹⁸. Las α y β globulinas incluyen las proteínas de fase aguda entre otras. Las γ globulinas son principalmente inmunoglobulinas¹⁸.

- Cociente albúmina/globulina (ALB/GLOB). El ALB/GLOB es la división de la concentración de ALB entre la concentración de GLOB⁴⁰, y es un parámetro útil para la identificación de disproteinemias⁴⁷.

- Fibrinógeno (Fib, mg/dL). Sintetizado en hígado, es una glicoproteína esencial en el proceso de la coagulación donde, en presencia de trombina, se transforma en fibrina¹⁴. Interviene también en la respuesta inflamatoria aguda. Se considera un indicador de inflamación poco sensible, por su largo periodo de respuesta y su amplio intervalo de referencia. Se mide por refractometría antes y después de su precipitación por calor, o mediante el tiempo de trombina^{14,18}.

1.3.2.5. Calcio y fósforo

Los electrolitos, además de actuar como cofactores en multitud de reacciones enzimáticas, juegan un papel importante en el desempeño funciones relacionadas con el mantenimiento del balance hídrico, del equilibrio ácido-base, del potencial de membrana, la función muscular y la conducción nerviosa. El calcio y el fósforo, electrolitos objeto de estudio en el presente trabajo, son los principales constituyentes minerales de los huesos⁴⁸.

- Calcio (Ca, mg/dL). El Ca es el mineral más abundante en el organismo, contenido en su mayoría en el sistema esquelético⁴⁸. La paratiroides, las células parafoliculares tiroideas y la vitamina D actúan conjuntamente en la regulación de los niveles de Ca y fósforo. El Ca total sérico es la suma

de 1) calcio libre o ionizado (50%), forma biológicamente activa relacionada con el metabolismo óseo y neuromuscular, coagulación sanguínea y bioquímica celular; 2) calcio unido a proteína, principalmente ALB (40%) y 3) Ca unido a otros aniones (10%)^{38,49}. Las causas del aumento o disminución del calcio en sangre son numerosas, como consecuencia del gran número de procesos en los que interviene³⁸. En comparación con otras especies, los caballos tienen concentraciones más altas de Ca total y Ca ionizado en sangre, así como una pobre regulación de la absorción intestinal de Ca, una alta excreción fraccional de Ca en orina, bajas concentraciones séricas de metabolitos de la vitamina D y mayores valores normales³⁸. Los métodos colorimétricos sirven para determinar el Ca sérico total, son el análisis del complejo calcio-o-cresolftaleína y método del arsenazo III⁴⁹. Si existe lipemia pueden estar falsamente elevados³⁸. El Ca ionizado debe medirse con cuidado en muestras de plasma heparina, ya que el anticoagulante puede alterar los resultados^{38,49}. Anticoagulantes quelantes del Ca como el EDTA, citrato y oxalato tampoco deben usarse⁴⁹.

- Fósforo (P, mg/dL). El P inorgánico coexiste en varias formas según el pH. Algo más de la mitad (55%) se encuentra libre, mientras que el resto está unido a cationes proteicos o no proteicos. El P en sangre viene determinado por: (1) la excreción renal, cuyo aclaramiento está potenciado por la hormona paratiroidea, (2) la absorción intestinal de fosfatos dependiente de la dieta e incrementada por el calcitriol, (3) la reabsorción ósea por estímulo de la hormona paratiroidea, y (4) por el movimiento entre compartimentos intra y extracelular⁴⁹. La causa más común de hiperfosfatemia es la disminución de la filtración glomerular. La hipofosfatemia es menos frecuente, encontrándose principalmente asociada al hiperparatiroidismo³⁸. Para su análisis, se utiliza preferiblemente suero, aunque puede usarse plasma. El P se determina por técnicas de espectrofotometría, donde reacciona con molibdato de amonio formando un complejo coloreado⁴⁹.

- Cociente Calcio/Fósforo (Ca/P). El Ca y el P tienen funciones relacionadas, encontrándose en el hueso en una proporción 2:1 de forma fisiológica y existiendo un flujo constante de crecimiento y/o remodelación ósea, influenciados por la PTH y la calcitonina²⁷.

1.3.2.6. Lípidos

Los triglicéridos y el colesterol son marcadores del metabolismo energético y de los lípidos²⁷. Las muestras deben tomarse en pacientes en ayunas, para evitar la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia postprandial³⁸.

Se utiliza suero, aunque en el caso de los triglicéridos deben evitarse geles separadores siliconados ya que llevan glicerina que puede afectar al análisis. Su concentración es estable una semana a 4°C, tres meses a -20°C y años a -80°C, aunque deben evitarse congelaciones/descongelaciones repetidas⁴⁹.

- Colesterol (CT, mg/dL). Sintetizado principalmente en el hígado, por mediación de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), bajo influencia hormonal. Da lugar a LDL (low-density lipoproteins) o HDL (high-density lipoproteins), que son liberadas al torrente sanguíneo. Es utilizado para formar estructuras en la membrana celular y moléculas como la vitamina D, hormonas sexuales o esteroides y ácidos biliares. Tiene mayor relevancia diagnóstica en pequeños animales, ya que en herbívoros sus niveles son bajos y su incremento no suele ser significativo⁴⁴. Suele medirse mediante espectrofotometría. Por acción enzimática, el CT genera peróxido de hidrógeno, el cual va a una reaccionar con un colorante⁴⁹.

- Triglicéridos (TG, mg/dL). La concentración de TG en sangre en el caballo viene determinada en mayor medida por la síntesis hepática y también por su síntesis en células epiteliales intestinales a partir de la ingesta. Sus productos en sangre, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y

quilomicrones, son hidrolizados en ácidos grasos y glicerol respectivamente, principalmente en tejido muscular, donde son utilizados como fuente de energía o bien son almacenados en tejido adiposo, en forma de TG⁴⁹. Adicionalmente, la fermentación bacteriana de carbohidratos en intestino grueso da lugar a los ácidos grasos volátiles, utilizados para formar TG. La insulina y la hormona tiroidea promueven el almacenamiento de TG mientras que el glucagón, los corticosteroides y las catecolaminas estimulan su movilización²⁷. La hipertrigliceridemia puede darse como consecuencia de alteraciones endocrinas, renales y concretamente en el caballo por deficiencia crónica de carbohidratos en la dieta, frecuentemente asociada a anorexia secundaria a otra alteración⁴⁴. La concentración sérica de TG es representativa de los niveles totales de los mismos. Suele determinarse mediante espectrofotometría, donde una lipasa libera el glicerol que reacciona dando productos con coloración⁴⁹.

1.3.3. Equilibrio oxidante/antioxidante

El estrés oxidativo o equilibrio oxidante/antioxidante es un tema de alto interés en medicina equina. Prueba de ello, es que la búsqueda de los términos “oxidative stress and horse” en Google académico, se ha incrementado de 14.000 a 97.100 resultados en los últimos 12 años³.

El estrés oxidativo se define como el conjunto de alteraciones patológicas que se producen cuando la capacidad antioxidante del organismo se ve superada por la acción de moléculas oxidantes⁵⁰. Los radicales libres, oxidantes o especies reactivas de oxígeno (ROS), se generan de forma constante en el organismo y desempeñan un papel fisiológico importante tanto dentro del sistema inmune, como en la regulación redox de la expresión génica, actuando sobre ésta como estímulo pro-inflamatorio⁵⁰. También se consideran oxidantes las especies reactivas de nitrógeno (RNS), derivadas de óxido nítrico⁵¹. El organismo está provisto de sistemas antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos –superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutathion peroxidasa (GPx) –, como no

enzimáticos – α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, ceruloplasmina, transferrina, ALB, glutatión, ácido úrico, etc.⁵⁰. Estos antioxidantes actúan a diferentes niveles, bien previniendo la generación de oxidantes, inactivándolos, transformándolos una vez formados o limitando sus efectos⁵².

La detección de radicales libres necesita de instrumentación especializada que no suele estar disponible en la mayoría de los laboratorios. Es por ello que el diagnóstico del estrés oxidativo se realiza mediante la detección de marcadores oxidativos, ya sean marcadores antioxidantes (ácido úrico, AU; estado antioxidante total, TAS), o productos oxidativos a partir de lípidos (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico, TBARS), proteínas o material nuclear (8-hidroxi-2-deoxiguanosina, 8-OHdG)⁵³.

En el caballo, el equilibrio oxidante/antioxidante abarca numerosas áreas de estudio, entre las cuales destacan patologías con lesiones por isquemia-reperfusión, alteraciones de vías aéreas bajas y la fisiología del ejercicio⁵⁴. Otros temas en los que el estrés oxidativo tiene implicación en medicina equina son la enfermedad degenerativa articular, las alteraciones neurológicas, las patologías endocrinas, diversos desórdenes musculares, la reproducción equina, además de la evaluación de la capacidad antioxidante de numerosos compuestos⁵⁵.

En lo que respecta a la determinación de intervalos de referencia de marcadores de estrés oxidativo en caballos, se han realizado trabajos sobre valores de referencia de compuestos con capacidad antioxidante, como la superóxido dismutasa⁵⁶, el ácido ascórbico⁵⁷, selenio⁵⁸ y alfa-tocoferol⁵⁹. Se han determinado intervalos de referencia de ácido úrico en el caballo PRE⁶⁰, y diversos marcadores de estrés oxidativo en potros y adultos pura sangre inglés⁶¹. En otros estudios se ha evaluado la influencia de los ritmos circadianos y de las estaciones del año sobre marcadores de estrés oxidativo en caballos^{62,63}.

A continuación, se describen únicamente los marcadores objeto de estudio en el presente trabajo (AU, TBARS, TAS y 8-OHdG).

1.3.3.1. Ácido úrico

El ácido úrico (AU, mg/dL), es un compuesto orgánico, formado como producto final del metabolismo de los nucleótidos púricos, donde la oxidación de la hipoxantina mediada por la enzima xantina deshidrogenasa/oxidasa, da lugar a xantina y AU. Así, el AU actúa como eliminador de radicales libres, previniendo el daño tisular. Este compuesto es producido principalmente en el endotelio capilar de hígado, músculo, intestino y otros tejidos, para ser transportado posteriormente a riñón e hígado, donde en mamíferos (a excepción de primates), es transformado a alantoína por la acción de la uricasa y eliminado en la orina⁶⁴. Este metabolito se ha determinado en caballos según edad, sexo, raza y factores ambientales⁶⁵, en relación al ejercicio⁶⁶, lesiones articulares⁶⁷, alteraciones asociadas a la laminitis en ponis⁶⁸, anemia infecciosa equina⁶⁹ y suplementos antioxidantes en caballos con enfermedad recurrente de vías aéreas⁷⁰.

1.3.3.2. Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

Las membranas de fosfolípidos se ven afectadas frecuentemente por los radicales libres. Es por ello por lo que la peroxidación lipídica es uno de los procesos oxidativos más estudiados. Entre los productos que pueden obtenerse de esta reacción se encuentran los alcanos exhalados, los isoprostanos y los aldehídos. Dentro de estos últimos, el marcador más usado es la formación de malondialdehído (MDA), frecuentemente estudiado en ensayos con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Los resultados suelen expresarse como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) debido a que existen otras sustancias distintas del MDA, como por ejemplo la bilirrubina, que reaccionan con el TBA, e incluso puede formarse MDA a partir de otras fuentes en las condiciones de calor y acidez necesarias para la reacción. Algunos autores han recomendado al respecto precipitar mediante ácido la fracción lipoproteica de la muestra de forma previa, minimizando así las posibles interferencias y haciendo que el test sea más específico para la peroxidación lipídica⁷¹.

Este déficit de selectividad se ha mejorado posteriormente, incluyendo a este ensayo la tecnología HPLC⁷².

Se han evaluado los niveles de TBARS (μM) en relación a la administración de vitamina E y el ejercicio⁷³, niveles de selenio⁷⁴, obstrucción recurrente de vía aéreas⁷⁵, raid⁷⁶, concurso completo⁷⁷, colitis⁷⁸, transporte⁷⁹, nivel de forma física⁸⁰, efecto de suplementos antioxidantes^{81,82}, edad⁸³, raza⁸⁴, alteraciones endocrinas⁸⁵, parasitosis⁸⁶ y laminitis⁸⁷.

1.3.3.3. Estado antioxidante total

Debido a que la determinación de compuestos antioxidantes de forma individual es compleja y poco práctica por las asociaciones entre las diferentes moléculas, suele medirse la capacidad antioxidante total de la muestra (TAC), también denominada la actividad antioxidante total (TAA), poder antioxidante total (TAOP) o estado antioxidante total (TAS), entre otras. En estas determinaciones, se mide la capacidad antioxidante de la muestra para neutralizar un compuesto radical libre incluido en la reacción⁸⁸.

El TAS (mmol/L), ha sido evaluado en equinos en relación al selenio⁸⁹, vitamina E⁷³, concurso completo⁷⁷, sexo, edad, raza y factores ambientales⁶⁵, alteraciones endocrinas⁹⁰, ejercicio de alta intensidad⁹¹ y transporte⁹².

1.3.3.4. 8-hidroxi-2-deoxiguanosina

Los estudios que evalúan la 8-OHdG (ng/mL) como marcador de estrés oxidativo en caballos, son escasos hasta la fecha. Esta molécula se produce por el daño oxidativo de la guanosina, la cual es predominante sobre el resto de nucleótidos, lo que hace que la 8-OHdG sea

un reconocido indicador de estrés oxidativo sobre el ADN⁹³. En equinos se ha evaluado la concentración en semen en relación a la fertilidad⁹⁴ y a diferentes daños oxidativos⁹⁵, así como la concentración en orina asociada a enfermedad recurrente de vías aéreas⁹⁶ y la concentración sérica para evaluar terapias antioxidantes⁹⁷.

1.4. INTERVALOS DE REFERENCIA: EVOLUCIÓN HISTÓRICA

Los valores de referencia fueron definidos como el conjunto de observaciones de una determinada variable, generalmente extraída de un grupo de individuos con un estatus de salud definido. El término fue acuñado por primera vez por Gräsbeck y Saris en 1969, como posible reemplazo para el término valores normales, durante el XII Congreso de la Sociedad Escandinava de Química Clínica y Fisiología Clínica⁹⁸. La problemática con la palabra normal, tanto por su semántica en el área clínica (donde significa sano), estadística (sinónimo de gaussiano) y popular (equivale a convencional, habitual), como por la complejidad añadida del concepto de salud, y el componente emocional de la propia palabra, hicieron que este término cayese en desuso⁹⁹.

Las primeras publicaciones sobre valores de referencia en el ámbito veterinario se llevaron a cabo por Lumsden y colaboradores¹⁰⁰⁻¹⁰³, como respuesta a la necesidad de un acuerdo global para el establecimiento de la distribución de valores de animales sanos en cada metodología¹⁰⁴. Dentro de su obra, este autor publicó en 1980 los primeros valores de referencia hematológicos y bioquímicos del caballo ligero¹⁰⁵.

La necesidad de armonizar todo lo relacionado con la determinación de los valores de referencia dio lugar a la creación de dos comités por parte de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) y el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología (ICSH). Ambos comités elaboraron una serie de recomendaciones sobre los valores de referencia, dividida en 6 partes:

- En la primera parte, se justificó la creación de los intervalos de referencia (IR), debido a la variabilidad presente en los componentes de todo ser vivo, se definió la nomenclatura utilizada y las asociaciones entre los distintos términos, con el objetivo de que su uso fuese aceptado y generalizado⁴.

- La segunda parte estableció que los datos alrededor del cálculo de valores de referencia debían estar descritos y estandarizados. Se clasificaron los tipos de selección de individuos de referencia (*a posteriori* o retrospectivo, *a priori* o prospectivo, individual, de pacientes hospitalizados y de supervivientes) y se definieron los criterios exclusión de individuos del grupo de referencia que podían aplicarse y los criterios de partición, dependientes de la variable a medir (edad, sexo, genéticos, socioeconómicos, ambientales y biológicos). Además, se señaló que el concepto de salud es relativo y debía ser determinado en cada caso concreto¹⁰⁶.

- La tercera parte trató sobre la preparación de los individuos y el muestreo, donde se describían los factores biológicos y metodológicos más relevantes que afectaban a la variabilidad y se señaló que la estandarización de los procedimientos preanalíticos reducía dicha variabilidad en los resultados. En esta parte, se mencionó la necesidad de obtener más estudios de los efectos conjuntos de dos o más fuentes de variabilidad sobre los valores de referencia¹⁰⁷.

-La cuarta parte estableció que los métodos analíticos debían describirse en detalle y ser estables en el tiempo, ser equiparables al análisis rutinario, y transferibles a otros laboratorios. Se describieron las diferentes técnicas de monitorización de procedimientos, haciendo recomendaciones para un solo laboratorio (controles interno y externo) o para la colaboración entre múltiples laboratorios (comparación de resultados)¹⁰⁸.

-En la quinta parte se describió el análisis estadístico y la determinación de los límites de referencia. Se señaló que el IR debe contener el 95% de la selección de individuos, por lo que los límites de referencia debían ser estimados en los fractiles 0,025 y 0,975, añadiendo en ambos un intervalo de confianza (IC) del 0,90. Se recomendó un mínimo de 40 muestras para estimar fractiles y de 120

para una estimación fiable. Se estableció el procedimiento para estimar los límites de referencia: evaluación de la distribución, identificación de valores atípicos y selección del método paramétrico o no paramétrico, para estimar los límites de referencia¹⁰⁹.

-La sexta y última parte trató de la comparación de los valores observados de un parámetro con otros del mismo tipo, ya fuesen del mismo individuo o de la población de referencia¹¹⁰.

Las publicaciones posteriores sobre valores de referencia que aludieron a estas recomendaciones fueron numerosas¹¹¹⁻¹¹⁵, si bien algunos autores hicieron eco de la necesidad de revisión y la mejora de la practicidad de las mismas¹¹⁶⁻¹¹⁸. En respuesta a esto, el Instituto para los Estándares Clínicos y Laboratoriales (CLSI), creó en 2008 una versión simplificada de las recomendaciones de la IFCC en forma de normas aprobadas para la definición, establecimiento y verificación de los IR en el laboratorio clínico, cuya última edición (EC28-A3c), fue revisada por última vez en 2016¹¹⁹.

Otros autores aportaron nuevas herramientas en este área. Solberg introdujo un programa informático específico para calcular IR^{120,121}. Horn, en su libro sobre IR, ideó un método más novedoso para identificar valores atípicos¹²². En su publicación sobre aspectos prácticos de los IR, Horowitz expuso cómo deben integrarse en los laboratorios, desde comprobar valores de referencia aportados por los kits, verificar IR que se adopten de otros centros, hasta establecer sus propios IR¹²³.

En el ámbito veterinario, fueron Geffré y colaboradores quienes realizaron una revisión general actualizada, basándose en la guía del CLSI¹²⁴. Abordaron el cálculo de IR a partir de un bajo número de muestras¹²⁵ e introdujeron una herramienta informática para el cálculo de IR mediante un complemento de Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EEUU)¹²⁶.

En 2012, la Sociedad Americana de Patología Clínica Veterinaria (ASVCP), mediante el Comité de Estándares de Laboratorio y Control de Calidad (Quality Assurance and Laboratory Standards Committee, QALS), redactó un manual para la determinación de IR en especies veterinarias¹²⁷, trabajo del que Friedrichs realizó posteriormente una versión resumida¹²⁸.

En los últimos años, las publicaciones sobre este tema se han dirigido hacia el establecimiento de protocolos y procedimientos operativos de trabajo (SOPs), para uso común en estudios multicéntricos internacionales sobre IR¹²⁹, la determinación de los IR de forma armónica bajo los principios de la medicina basada en la evidencia¹³⁰, la problemática de las definiciones de salud y normalidad¹³¹ y la revisión más actualizada de las recomendaciones IFCC y CLSI¹³².

Por definición, el IR de una variable comprende el 95% central de una población seleccionada de individuos sanos. Aun así, es esperable que un pequeño porcentaje de pacientes sanos se encuentre ligeramente por encima o por debajo de estos valores. En otras ocasiones, sólo esa ligera desviación es indicativa de enfermedad, de ahí la dificultad en la interpretación y la importancia de los valores de referencia. Es por tanto deber del veterinario clínico conocer si los IR dados pertenecen a una población comparable con su paciente. Esto pone de manifiesto la necesidad de crear IR a partir de poblaciones de referencia representativas y comparables con los pacientes de cada laboratorio⁴⁰.

En clínica equina la tendencia es la aplicación de la medicina basada en la evidencia en la mejora de los estudios de IR⁵. Un área de especial interés es la de la variación biológica e individual de los IR¹³³. Hay estudios que sugieren el uso de IR basados en muestreos seriados de un mismo individuo, para determinados parámetros hematológicos y bioquímicos con variación individual significativa¹³⁴.

Algunos de los IR publicados en la bibliografía de las variables del hemograma, del análisis bioquímico y los marcadores de estrés oxidativo en caballos, se presentan en las Tablas 1, 2 y 3 respectivamente.

Tabla 1. Intervalos de referencia de valores del hemograma en équidos publicados en la bibliografía.

Parámetro	Unidades	Rosswales non-TB ¹	IR Razas sangre templada ²	IR Razas mixtas/ADVIA ³	IR Razas mixtas/Impedancia ³
Hct	%	31 - 43	27 - 39	34 - 49	29 - 50
GR	10 ⁶ /μl	6,2 - 10,2	6,6 - 9,8	6,0 - 11,3	6,4 - 11,1
Hb	g/dL	11,1 - 15,9	7,2 - 10,2	10,6 - 18,9	10,8 - 18,6
VCM	fL	40,0 - 50,0	36 - 46	38 - 49	40 - 50
CHCM	g/dL	33,5 - 38,7	41 - 45	37 - 40	34 - 39
HCM	pg	15,2 - 19,0	15 - 19	15 - 19	15 - 18
RDW-CV	%	-	-	17 - 21	16 - 20
GB	10 ³ /μl	6,0 - 10,0	4,4 - 12,0	5,3 - 13,8	5,7 - 13,1
NEU	10 ³ /μl	3,4 - 5,4	2,0 - 6,9	2,7 - 9,7	2,2 - 8,6
LIN	10 ³ /μl	2,0 - 3,2	1,5 - 5,6	1,1 - 5,7	1,4 - 6,4
MON	10 ³ /μl	0,2 - 0,4	0,2 - 0,6	0,1 - 0,6	0,0 - 0,8
EO	10 ³ /μl	0,0 - 0,4	0,1 - 0,7	0,1 - 0,6	0,0 - 0,5
BAS	10 ³ /μl	-	0,0 - 0,1	0,0 - 0,2	0,0 - 0,1
PLQ	10 ³ /μl	100 - 250	113 - 236	46 - 194	142 - 471
VPM	fL	-	-	5,6 - 8,3	7,4 - 11,8

¹ Fuente: Rosswales Laboratories (2016). Clinical pathology reference ranges for non-thoroughbred horses (<https://www.rossdales.com/laboratories/reference-ranges>). Parámetros determinados mediante el analizador ADVIA 2120i.

² Fuente: Köller, G., et al. Hematology and serum biochemistry reference ranges of horses of different breeds and age measured with newest clinico-pathological methods. *Pferdeheilkunde* 2014;30(4):381-393. Parámetros determinados mediante el analizador ADVIA 120.

³ Fuente: Giordano A., Rossi G., Perialisi C., et al. Evaluation of equine hemograms using the ADVIA 120 as compared with an impedance counter and manual differential count. *Vet Clin Pathol* 2008; 37:21 - 30.

Tabla 2. Intervalos de referencia de parámetros bioquímicos en équidos publicados en la bibliografía.

Parámetro	Unidades	Orsini ¹	Saunders ²	Pusterla ³	Köller ⁴	Rosssdales ⁵
U	mg/dL	21 - 51	21 - 48	28 - 49	15 - 44	15 - 60
Cr	mg/dL	1,2 - 1,9	1,0 - 2,3	0,7 - 1,7	1,0 - 1,8	1,0 - 1,9
PT	mg/dL	5,2 - 7,9	6,3 - 7,0	6,4 - 7,9	5,8 - 7,9	5,3 - 7,3
ALB	mg/dL	2,6 - 3,7	3,0 - 3,6	2,9 - 3,9	2,7 - 3,7	2,9 - 4,1
GLOB	mg/dL	2,6 - 4,0	1,7 - 4,0	1,9 - 3,9	2,4 - 4,5	1,8 - 3,8
ALB/GLOB		0,6 - 1,5	-	-	0,7 - 1,5	-
AST	UI/L	226 - 336	80 - 250	162 - 316	213 - 627	102 - 350
GGT	UI/L	4 - 44	<40	3 - 18	6,4 - 44,8	1 - 40
ALP	UI/L	138 - 251	< 250	48 - 148	89 - 268	147 - 261
BT	mg/dL	1,0 - 2,0	1,4 - 2,9	0,6 - 1,8	0,9 - 2,8	0,8 - 2,0
BD	mg/dL	0,0 - 0,4	0,2 - 0,9	0,1 - 0,3	0,3 - 0,7	0,2 - 0,9
BI	mg/dL	0,2 - 2,0	0,3 - 2,0	-	-	-
CK	UI/L	119 - 287	<50	82 - 303	146 - 354	110 - 250
LDH	UI/L	162 - 412	76 - 400	-	224 - 536	225 - 700
Ca	mg/dL	11,2 - 13,6	10,0 - 16,0	10,4 - 12,9	11,2 - 13,0	11,6 - 13,2
P	mg/dL	3,1 - 5,6	3,1 - 6,2	1,7 - 4,4	2,0 - 4,7	2,8 - 5,9
Ca/P		-	2 - 5	-	-	-
TG	mg/dL	-	9 - 71	10 - 60	12 - 54	18 - 106
CT	mg/dL	75 - 150	97 - 135	51 - 97	66 - 114	77 - 128
Fib	mg/dL	100 - 400	150 - 300	193 - 422	-	30 - 390

¹ Fuente: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors: Clinical biochemistry of domestic animals, ed 5, San Diego, 1997, Academic Press.

² Fuente: Knottenbelt, D. C. and F. Malalana (2014). Saunders Equine Formulary E-Book, Elsevier Health Sciences.

³ Fuente: Pusterla, N. and J. Higgins (2017). Interpretation of equine laboratory diagnostics, John Wiley & Sons.

⁴ Fuente: Köller, G., et al. Hematology and serum biochemistry reference ranges of horses of different breeds and age measured with newest clinico-pathological methods. Pferdeheilkunde 2014;30(4):381-393. Parámetros determinados mediante el analizador ADVIA 120.

⁵ Fuente: Rosssdales Laboratories (2016). Clinical pathology reference ranges for non-thoroughbred horses (<https://www.rossdales.com/laboratories/reference-ranges>).

Tabla 3. Intervalos de referencia de marcadores de estrés oxidativo en équidos publicados en la bibliografía.

Parámetro	Valores de referencia de parámetros de estrés oxidativo en caballos	
AU	0,18 - 0,96 mg/dL ¹	48 - 68 mmol/L ²
MDA	1,53 - 3,11 μM ³	
TAS	0,69 - 0,77 mmol/L ²	
8-OHdG	0,044 ng/ml ⁴	1,19 - 1,39 ng/ml ⁵

¹ Fuente: Escribano, B. M., et al. (2013). "Genetic analysis of haematological and plasma biochemical parameters in the Spanish purebred horse exercised on a treadmill." Animal 7(9): 1414-1422.

² Fuente: Balogh, N., et al. (2001). "Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise." Vet Clin Pathol 30(4): 214-218.

³ Fuente: N. Georgieva, G. B. (2011). "Changes in blood antioxidant status of hanoverian horses during four year seasons." Trakia Journal of Sciences.

⁴ Fuente: Niedzwiedz, A., et al. (2016). "Serum 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a marker of DNA oxidative damage in horses with recurrent airway obstruction." Acta Vet Scand 58(1): 38-38.

⁵ Fuente: Yamazaki, M., et al. (2015). "Intravenous infusion of H2-saline suppresses oxidative stress and elevates antioxidant potential in Thoroughbred horses after racing exercise." Scientific reports 5: 15514-15514.

1.5. INFLUENCIA DE FACTORES DE DIVERSA ÍNDOLE SOBRE LOS VALORES DE HEMATOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y ESTRÉS OXIDATIVO OBJETO DE ESTUDIO

1.5.1. Hematología

1.5.1.1. Influencia de caracteres fenotípicos

Las razas de caballos pueden diferenciarse en tres grandes categorías: 1) razas de sangre caliente, constituidas por el Pura Sangre Árabe, el Pura Sangre Inglés y razas asociadas; 2) razas de sangre fría, donde se incluyen las razas pesadas o de tiro y los ponis y 3) razas de sangre templada, que incluye los cruces de las dos razas anteriores. En general, en las razas de sangre caliente se observa un mayor número de GR, Hb, Hct y ligero incremento de GB, en comparación con razas de sangre fría¹⁶. En el caballo PRE, considerada una raza de sangre templada, los IR de algunos parámetros hematológicos difieren significativamente de otras razas¹³⁵.

Existen marcadas variaciones en los parámetros hematológicos del potro desde el nacimiento hasta la edad adulta. GR, Hb y Hct están aumentados al nacimiento, disminuyen gradualmente de forma fisiológica hacia las 2 semanas, donde se mantienen en el rango mínimo del IR adulto durante el primer año. El VCM sufre variaciones similares, llegando a su mínimo a los 3-5 meses de edad¹³⁶. En caballos geriátricos se observa un mayor recuento de GR, mayor VCM¹³⁷ y menor número de PLQ¹³⁸. También existen diferencias según la edad en el recuento diferencial de GB: los potros tienen NEU aumentados al nacimiento hasta los 4-6 meses y LIN disminuidos que aumentan a los 5 meses y llegan a niveles adultos en el primer año, para posteriormente disminuir a medida que avanza la edad^{16,136}. En lo que respecta al recuento diferencial de GB, hay estudios que sugieren que la edad influye en mayor medida que la raza y el sexo¹³⁹.

Se han documentado ligeras diferencias en la hematología según el sexo, con ligero aumento de GR, Hb y Hct en machos y de HCM, CHCM y GB en hembras. Además, las hembras reproductoras tienen menores valores eritrocitarios postparto y durante la lactación¹⁶, así como leucopenia durante la lactación¹⁴⁰. Otros estudios que documentan un mayor número de granulocitos en hembras que en machos¹³⁸.

En relación con el temperamento del animal asociado al leucograma, la estimulación del eje simpático-adrenal en situaciones de miedo, excitación o ejercicio intenso, dará lugar a un leucograma fisiológico con neutrofilia y/o linfocitosis. En situaciones de estrés, se dará leucocitosis con neutrofilia, linfopenia y eosinopenia, en respuesta a la liberación de cortisol²⁸.

1.5.1.2. Influencia del ejercicio y entrenamiento

La relación de los parámetros eritrocitarios con el ejercicio se ve dificultada por la influencia de otros factores, pero en general puede afirmarse que los caballos que realizan ejercicio intenso experimentan un incremento transitorio en GR, Hb y Hct¹⁴¹ consiguiendo aumentar la capacidad aeróbica, siendo el incremento de GR proporcional a la intensidad de ejercicio y/o a la velocidad¹⁴². En ejercicio de larga duración, la elevación de GR, Hb y Hct junto con unas PT sin cambios, son indicadores de deshidratación²⁸. Existen también cambios en algunos parámetros hematológicos si se compara el inicio y el final de la temporada deportiva en caballos de raid, con mayores valores de LIN y GR, y menor CHCM, RDW y PLQ al inicio de la temporada¹⁴³. En cuanto a la serie blanca, el ejercicio intenso de corta duración se asocia con leucocitosis neutrofílica y linfocítica, y el ejercicio de resistencia con leucocitosis neutrofílica y linfopénica^{144,145}.

El tipo de entrenamiento también influye en los valores hematológicos. El entrenamiento de alta intensidad/velocidad y corta duración suele dar lugar a una elevación de parámetros hematológicos

basales y entrenamientos de baja intensidad y larga duración obtienen valores sanguíneos basales menores, aunque dichos valores no son indicadores de un mejor estado de forma física^{28,146}.

1.5.1.3. Influencia del muestreo y manejo de las muestras

La toma de muestra durante un tiempo prolongado y el estrés durante el muestreo pueden alterar los valores hematológicos debido a la contracción esplénica. El uso de agujas de alto calibre ayuda a evitar la hemólisis durante la venopunción¹⁴⁷. La alimentación previa al muestreo puede provocar un incremento del Hct¹⁴⁸. En relación con el tiempo y temperatura de conservación de las muestras, existe una disminución de GR y GB y un aumento de Hb y Hct y en muestras conservadas a temperatura ambiente durante un tiempo prolongado, así como una disminución del Hct y CHCM por hemólisis *in vitro* en muestras conservadas varios días en refrigeración. Los parámetros hematológicos disminuyen al utilizar citrato sódico como anticoagulante en caballos, en comparación con el EDTA o la heparina de litio¹⁴⁹. El aumento de tamaño de los GR con la consiguiente elevación del VCM y el Hct, es el cambio más frecuente asociado al almacenamiento de las muestras¹⁵⁰. Esto también va a alterar el recuento de PLQ y el VPM²⁸.

1.5.1.4. Influencia de factores medioambientales y atmosféricos

En relación a los ritmos circadianos, hay autores que describen elevaciones de Hct y Hb durante la noche^{151,152}. Otro estudio sugiere que el recuento de LIN es mayor por la tarde y menor por la mañana¹⁵³.

En cuanto a las variaciones según la estación del año, se han demostrado variaciones en algunas razas, con disminuciones de GR, Hct y Hb en invierno, valores máximos de GR, Hct y VCM en verano y de Hb en primavera^{154,155}.

Otro estudio determinó que a mayor altitud, mayor GR, Hb y Hct, como respuesta fisiológica adaptativa ante la disminución del oxígeno atmosférico¹⁵⁶.

1.5.2. Bioquímica

1.5.2.1. Influencia de caracteres fenotípicos

En cuanto a la influencia de la raza, en el PRE algunos IR de parámetros bioquímicos difieren respecto de otras razas⁶⁰. La BT en un estudio sí parece depender de la raza, siendo los PSI los que poseen valores más altos y las razas de sangre fría las que muestran los valores mínimos del rango de referencia⁶⁵. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de PT, ALB, GLOB y ALB/GLOB, al comparar diferentes razas⁴⁷. Razas con mucha masa muscular pueden tener valores de Cr ligeramente por encima de los valores de referencia¹⁴.

Respecto a la edad, las PT aumentan al nacimiento por la absorción de inmunoglobulinas en el calostro. El Fib es bajo al nacimiento y aumenta hacia los 3 meses de edad. ALP y GGT se encuentran elevadas en animales jóvenes debido al crecimiento óseo. BT y BD se encuentran también elevadas en las primeras semanas postparto²⁷. Los valores de ALP, AST, BT, CT, GGT, P y TG en potros son por lo general mayores que en adultos, mientras que la ALB, Cr, GLOB, PT y la U suelen estar disminuidas en potros respecto a los niveles en adultos⁴⁰. Los potros poseen una mayor concentración de P, influenciada por la hormona de crecimiento y que se corresponde también con niveles más altos de ALP que en el adulto⁴⁹. El Ca total en potros demostró ser significativamente más bajo que en adultos en un estudio¹⁵⁷.

La BT también se ve influida por el sexo, siendo los caballos castrados los que poseen valores más bajos⁶⁵.

Otros de los factores que pueden influir en la bioquímica equina es la dieta. En caballos, a diferencia de otras especies, la bilirrubina puede encontrarse ligeramente elevada en situaciones de ayuno¹⁵⁸. El contenido de proteína en la dieta también va a afectar a la concentración sérica de U en equinos⁴⁴.

1.5.2.2. Influencia del ejercicio y entrenamiento

La CK y la AST pueden estar ligeramente aumentadas de forma fisiológica en respuesta a un daño muscular leve (después del ejercicio, de un transporte, o de una inyección intramuscular)²⁷. Los niveles de Ca disminuyen y los niveles de P y GGT aumentan de forma significativa después de una carrera¹⁵⁹. En otros estudios la LDH y la Cr también aumentan junto con la CK y la AST, en respuesta al entrenamiento¹⁶⁰. En caballos de polo se ha observado un incremento de PT, CK y LDH y una disminución de Ca y P de tipo transitorio, durante la actividad física ¹⁶¹. En caballos de carreras, se observa un incremento de la bilirrubina después de la carrera. El entrenamiento de estos caballos se asocia a un aumento de bilirrubina y GGT y una disminución de ALP, además de la elevación de las PT y la ALB en respuesta al intercambio de fluidos entre compartimentos corporales. Elevaciones importantes de GGT en este estudio fueron indicadoras de bajo rendimiento¹⁶².

1.5.2.3. Influencia del muestreo y manejo de las muestras

La alimentación previa al muestreo puede producir un incremento en las PT plasmáticas¹⁴⁸. En general muestras con hemólisis, lipemia o ictericia no son adecuadas para los análisis basados en la espectrofotometría⁴⁰. La Cr se mide mediante técnicas de espectroscopía y debe tenerse en cuenta que puede verse falsamente aumentada por otros crómógenos como son los cuerpos

cetónicos, glucosa, carotenos, piruvato, ácido ascórbico, AU y vitamina A¹⁸. La hiperbilirrubinemia puede interferir dando valores falsamente disminuidos de Cr. Una concentración sérica de glucosa o U elevadas, pueden aumentar ligeramente las proteínas, así como CT y lipoproteínas²⁷. La presencia de lipemia o hiperproteinemia dan valores falsamente disminuidos de electrolitos⁴⁹.

En cuanto a la conservación de la muestra, la hemólisis y el almacenamiento prolongado van a alterar los resultados de electrolitos. El Ca sérico en equinos ha demostrado ser estable durante menos de 24 horas tanto a temperatura ambiente como en refrigeración¹⁶³. Pueden observarse valores aumentados de P si existe hemólisis in vitro y retraso en la separación del suero⁴⁹. Es conveniente evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, ya que esto suele provocar un daño en las proteínas de la muestra. Debe también tenerse en cuenta a la hora de interpretar valores de AST y LDH, ya que la hemólisis de la muestra o el retraso en separar el suero del coágulo puede liberar AST y LDH intraeritrocitario, dando valores falsamente elevados de estas enzimas⁴⁰. Un mal muestreo y manejo de la muestra puede producir falsas elevaciones en los niveles de CK así como las hemólisis de la muestra, por interferencias con sustancias similares^{40,164}. Además es importante señalar que la falta de homogeneización del suero previa al análisis puede alterar los resultados de forma general.

1.5.2.4. Influencia de factores medioambientales y atmosféricos

Los caballos de diferentes explotaciones muestran diferencias significativas en sus niveles séricos de bilirrubina⁶⁵. Algunos autores han observado que las PT, U, Ca, AST, CK y LDH muestran variaciones circadianas¹⁵². Las enzimas tienen una mayor actividad durante el día, mientras que la U aumenta durante la noche¹⁵². La ALP y el P parecen estar influenciados principalmente por las comidas¹⁵².

1.5.3. Estrés oxidativo

1.5.3.1. Influencia de caracteres fenotípicos

En cuanto al estado antioxidante, se ha observado que puede variar entre diferentes razas⁸⁰. Por ejemplo, los PSI tienen mayores concentraciones de AU que las razas de sangre fría¹⁶⁵. Un estudio donde se compararon diferentes marcadores de estrés oxidativo diferenciando hembras y machos, antes y después del ejercicio resultó en una disminución significativa de TBARS eritrocitarios en sementales después del ejercicio¹⁶⁶.

1.5.3.2. Influencia del ejercicio y entrenamiento

Varios estudios señalan que el entrenamiento regular reduce los niveles de TBARS e incrementa la capacidad antioxidante, mientras que en animales no entrenados se produce incremento de TBARS postejercicio⁸⁰.

Diferenciando por disciplinas, el salto sí parece aumentar de forma significativa los niveles de TBARS postejercicio¹⁶⁷. En otro estudio en trotones, el AU se mostró elevado después del ejercicio⁶⁴.

El AU también ha demostrado tener una alta correlación genética en el PRE en entrenamiento, además de elevarse en respuesta al ejercicio⁶⁰.

1.5.3.3. Influencia del muestreo y manejo de las muestras

En cuanto al TAS y su relación con otros parámetros analíticos, los niveles de TAS mostraron una correlación negativa con la bilirrubina y el AU en un estudio⁶⁵. Los niveles de MDA plasmáticos

han demostrado ser estables durante 48 horas tanto a temperatura ambiente como en refrigeración. El AU en cambio, es estable menos de 24 horas desde el muestreo, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración¹⁶³.

1.5.3.4. Influencia de factores medioambientales y atmosféricos

En relación con las estaciones del año, los niveles de MDA en el caballo Hanoveriano alcanzan sus niveles máximos al final del invierno e inicio de primavera, coincidiendo con los meses de temperaturas más bajas y humedad más elevada, lo cual puede favorecer el desarrollo de estrés oxidativo. Es al inicio del verano cuando los niveles de MDA alcanzan su nivel mínimo, coincidiendo con temperaturas templadas y ambiente seco⁶³.

Sobre la relación de los marcadores de estrés oxidativo y los ritmos circadianos, existen estudios en humana sobre variaciones de 8-OHdG, donde se ha observado que la concentración de este analito se mantiene constante durante el día y que las variaciones observadas entre individuos se encuentran asociadas al estilo de vida. Así, la 8-OHdG en este estudio resulta ser un parámetro constante y se sugiere como un buen indicador de alteración oxidativa para añadir a chequeos los anuales en medicina humana¹⁶⁸.

En cuanto a diferencias entre poblaciones, los niveles de TAS mostraron diferencias significativas entre diferentes explotaciones⁶⁵. Los niveles de AU también mostraron diferencias entre distintas explotaciones, probablemente relacionadas con el tipo de actividad de los animales⁶⁵.

INTERÉS Y OBJETIVOS

2. INTERÉS Y OBJETIVOS

Los IR representan la distribución estimada de los valores obtenidos a partir de una población sana de individuos comparables. Estos intervalos son necesarios para la interpretación de las pruebas laboratoriales y la consiguiente toma de decisiones clínicas por parte del veterinario. No obstante, el rango de una variable analítica puede verse influenciado por multitud de factores fisiológicos, por lo que dichos factores deben ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar el resultado. Se entiende por factor fisiológico cualquier elemento de tipo biológico o individual que pueda afectar a una variable analítica sin causar alteración patológica. La presente tesis doctoral se centró en la determinación de IR de parámetros hematológicos, bioquímicos y de estrés oxidativo en una población de caballos sanos perteneciente a centros hípicas localizados en la zona central de España. Las hipótesis formuladas en el presente trabajo, en relación a los IR, fueron las siguientes:

- 1) Los IR de las variables analíticas en una población de caballos sanos residentes en centros hípicas en la zona central de España, pueden diferir de las determinadas para otras poblaciones.
- 2) El IR de una variable analítica puede variar según el método estadístico empleado para su determinación.
- 3) Existen numerosos factores fisiológicos que afectan a las variables analíticas y que por tanto, deben ser tenidos en cuenta a la hora de su interpretación.

La determinación de IR de una población de caballos sanos mediante métodos que busquen el mejor ajuste a la distribución real de los datos y el conocimiento de la posible influencia de factores influyentes en los mismos, son herramientas clave para la correcta interpretación clínica por parte del veterinario de équidos. Además, la determinación de rangos de variables analíticas en una

población específica, teniendo en cuenta la influencia de su entorno, se encuentra en consonancia con la actual tendencia dentro de la biopatología clínica, dirigida a la individualización de los parámetros fisiológicos.

De esta forma, el presente estudio tuvo como objetivos principales:

- 1) La determinación de IR de valores hematológicos en una población de caballos sanos residentes en centros hípicos en la zona central de España, mediante dos métodos distintos (Reference Value Advisor y @RISK).
- 2) La determinación de IR de valores bioquímicos en una población de caballos sanos residentes en centros hípicos en la zona central de España, mediante dos métodos distintos.
- 3) La determinación de IR de valores de estrés oxidativo en una población de caballos sanos residentes en centros hípicos en la zona central de España, mediante dos métodos distintos.

A partir de los IR estimados, se definieron los siguientes objetivos secundarios:

- 1) Comparación de los dos métodos utilizados para la determinación de IR de valores hematológicos, bioquímicos y de estrés oxidativo.
- 2) La comparación de los IR de valores hematológicos, bioquímicos y de estrés oxidativo calculados con los existentes en la bibliografía.
- 3) El estudio de los posibles efectos que ejercen factores fisiológicos de diversa índole sobre los parámetros hematológicos, bioquímicos y de estrés oxidativo analizados, así como la interpretación de las asociaciones observadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Lugar de estudio

El área seleccionada para este estudio ha sido la zona central de España, concretamente las provincias de Madrid, Segovia (Castilla y León), Cuenca y Toledo (Castilla la Mancha) y Badajoz (Extremadura). Este área comprende una superficie total de 69.225 km², equivalente a un 13,68% de la superficie total de España (505.990 km²)¹⁶⁹. El área de estudio tiene una altitud media de 684 metros, siendo Segovia la provincia de mayor altitud (1005 metros) y Badajoz la provincia de menor altitud (186 metros)¹⁷⁰. La población en estas provincias en 2021 fue de 6.965.302 habitantes, que representa un 17,33% de la población nacional total. La densidad de población media en estas provincias en 2021 fue de 191 habitantes por km², siendo Madrid la provincia con mayor densidad de población (845 habitantes por km²) y Castilla la Mancha la provincia con menor densidad de población (11 habitantes por km²)¹⁶⁹.

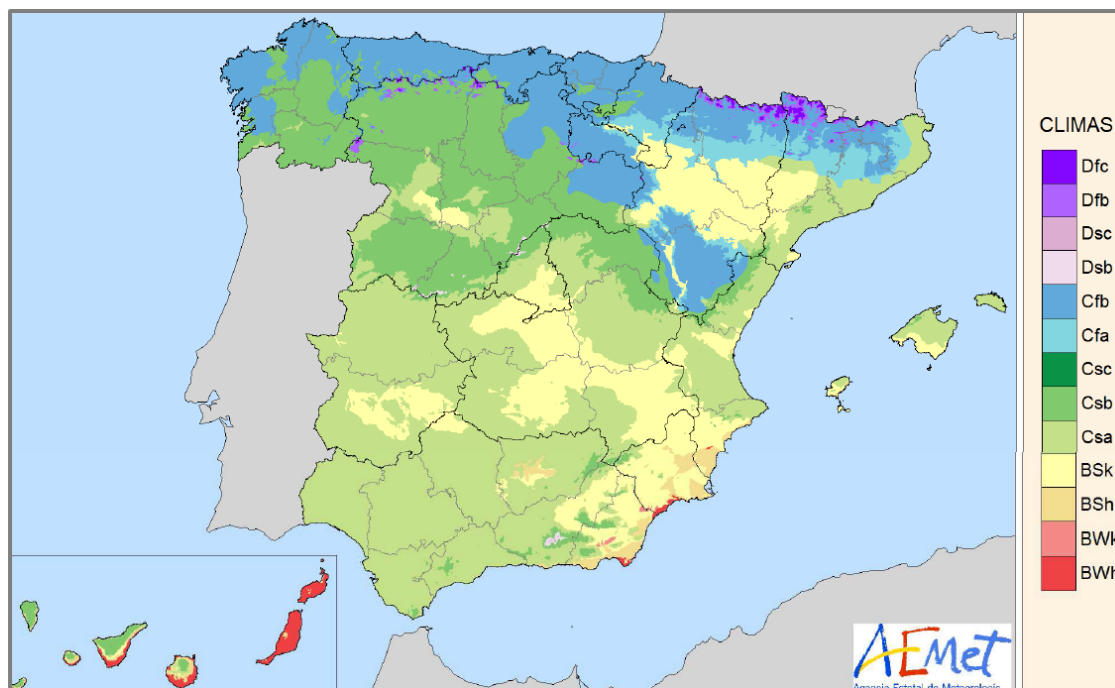
En la Tabla 4 se muestra la clasificación climática de Köppen de los grupos climáticos áridos y templados. Según esta clasificación, el clima es templado con verano seco y suave (Warm-summer Mediterranean climate, Csb), en Segovia, la zona norte de Madrid y noreste de Cuenca; templado con verano seco y caluroso (Hot-summer Mediterranean climate, Csa), en la región central de Madrid y Cuenca, mitad oeste de Toledo y área periférica de Badajoz; y clima estepario frío (Cold semi-arid steppe climate, BSk), en la zona sur de Madrid y Cuenca, mitad oeste de Toledo y área central de Badajoz (Figura 4).

Tabla 4. Clasificación climática de Köppen, de los grupos árido y templado.

BSh	Hot semi-arid (steppe) climate	Arid	Steppe	Hot
BSk	Cold semi-arid (steppe) climate	Arid	Steppe	Cold
BWh	Hot deserts climate	Arid	Desert	Hot
BWk	Cold desert climate	Arid	Desert	Cold
Cfa	Humid subtropical climate	Temperate	Without dry season	Hot summer
Cfb	Temperate oceanic climate	Temperate	Without dry season	Warm summer
Cfc	Subpolar oceanic climate	Temperate	Without dry season	Cold summer
Csa	Hot-summer Mediterranean climate	Temperate	Dry summer	Hot summer
Csb	Warm-summer Mediterranean climate	Temperate	Dry summer	Warm summer
Csc	Cool-summer Mediterranean climate	Temperate	Dry summer	Cold summer
Cwa	Monsoon-influenced humid subtropical climate	Temperate	Dry winter	Hot summer
Cwb	Subtropical highland climate or temperate oceanic climate with dry winters	Temperate	Dry winter	Warm summer
Cwc	Cold subtropical highland climate or subpolar oceanic climate with dry winters	Temperate	Dry winter	Cold summer

Fuente: Mapas climáticos de España (1981-2010).

Figura 4. Mapa de España según la clasificación climática de Köppen-Geiger (1981-2010)¹⁷¹.



Fuente: Mapas climáticos de España (1981-2010).

La temperatura media anual en la zona Central de España es de entre 10°C (zona de Segovia y norte de Madrid) y 15°C (resto de Madrid, Toledo, Cuenca y Badajoz), alcanzando temperaturas máximas de entre 30 y 35°C en agosto y mínimas de entre -2,5 y 2,5°C en enero. La precipitación media anual

es de 1400 mm en zonas de montaña de Segovia y Madrid, 500 mm en resto de Segovia, zona central Madrid, Cuenca y Badajoz y 400 mm en sur de Madrid y Toledo¹⁷¹.

El censo de caballos en España en 2021 fue de 638.312 ejemplares (SINTRAN, 2021). El censo de caballos en las comunidades autónomas correspondientes en enero de 2021 era de 21.168 caballos en la Comunidad de Madrid (3%), 67.167 caballos en Castilla y León (11%), 23.730 caballos en Castilla la Mancha (4%) y 40.235 caballos en Extremadura (6%), con una tendencia al alza en las dos primeras comunidades (SINTRAN, 2021).

Del total de animales censados en España, el 48,2% es de raza pura. El porcentaje de équidos de raza pura en estas comunidades autónomas es del 88,7% (Madrid), 46,4% (Castilla y León), 58,3% (Castilla la Mancha) y 41,50% (Extremadura)¹⁷².

El número de explotaciones equinas se ha incrementado notablemente en los últimos años (un 50,8% de 2008 a 2021), existiendo en 2021 un total de 193.500 de las cuales, 2587 explotaciones equinas se encuentran en Madrid, 18.818 en Castilla y León, 7068 en Castilla la Mancha y 18.133 en Extremadura. Del total de estas explotaciones, 3483 (1,8%), se encuentran registradas como establecimientos para la práctica ecuestre (SINTRAN, 2021)⁷. El número de clubes federados en 2021 era de 810, de los cuales hay 74 en la Comunidad de Madrid, 47 en Castilla y León, 19 en Castilla la Mancha y 22 en Extremadura¹⁷³. Se estima además que los centros hípicos no federados suponen un 20% de los centros federados, por lo que las cifras anteriores son probablemente mayores⁶. No obstante, según este mismo informe, 91.414 explotaciones se encuentran sin clasificar (SINTRAN, 2021).

3.1.2. Población objeto de estudio

El caballo medio residente en centros hípicos es un caballo adulto, en fase de explotación, utilizado con fines deportivos y de ocio⁶. El número de licencias deportivas equinas expedidas por

la FHE en 2021 fue de 22.423, de las cuales, 3139 pertenecen a Madrid, 1185 a Castilla y León, 639 a Castilla la Mancha y 566 a Extremadura¹⁷³.

Respecto a la proporción de hembras y machos dentro de los centros hípicas, no hay datos registrados. No obstante, podría hacerse una estimación extrapolando el número de licencias deportivas en caballos (67%) y yeguas (33%) en 2021 (comunicación personal). Por tanto, en lo que se refiere a caballos de competición, la proporción de machos es el doble de la de hembras.

Según datos de la Federación Ecuéstrea Internacional, del total de licencias expedidas para caballos de competición, el 45% son de salto, 12,5% de doma y 42% de otras disciplinas⁶.

3.1.2.1. Estimación del tamaño muestral

La población que formó parte del estudio se encontraba englobada dentro del chequeo anual de salud ofertado por el Servicio de Vigilancia Sanitaria Equina SEVISEQ, del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, VISAVET-UCM.

Acorde a las recomendaciones de la ASVCP, el número mínimo de animales para la determinación de IR es de 120¹²⁸. Teniendo en cuenta que la población de referencia debía estar constituida por animales sanos y que la presencia de enfermedad crónica, estimada en un 13%, podría pasar desapercibida¹⁷⁴, se calculó un tamaño muestral de 136 animales:

$$n = 120 + \frac{13 \times 120}{100} = 136$$

Además, siguiendo las recomendaciones de la ASVCP sobre la selección de individuos para la determinación de IR¹²⁸, los criterios de inclusión considerados fueron la ausencia de infección/inflamación en los últimos 7 días, ausencia de enfermedad en el último mes, y la presencia de un examen físico dentro de los límites fisiológicos previo al muestreo. Los criterios de exclusión fueron la presencia de inflamación o infección en los últimos 7 días, la presencia de

enfermedad en el último mes y la observación de hallazgos anormales en el examen físico previo al muestreo.

3.1.2.2. Recopilación de datos de la población

Los participantes en el estudio fueron equinos sometidos al chequeo anual de salud ofertado por el Servicio SEVISEQ del Centro VISAVET-UCM. Los propietarios solicitantes del chequeo anual para sus caballos fueron previamente informados acerca del presente estudio e invitados a participar de forma voluntaria. Dicha participación consistía en ceder parte de las muestras del chequeo anual de salud a la determinación de analitos adicionales. En caso afirmativo, los propietarios de los animales debían dar su autorización expresa, mediante la firma del consentimiento informado (Anexo 1).

Los datos referentes a los criterios de inclusión que debía cumplir cada caballo seleccionado para el estudio comprendían que, (1) el examen físico general se encontrase dentro de los límites normales, (2) existiese ausencia de enfermedad severa en el último mes y (3) existiese ausencia de infección o inflamación en la última semana.

Para recopilar la información de cada animal, en el momento del muestreo se cumplimentó un cuestionario con ayuda del propietario, responsable del caballo o veterinario habitual. Si el veterinario habitual era el encargado de la toma y envío de las muestras, se le envió de forma previa el material de muestreo y el cuestionario, este último bien en papel o en formato digital. El cuestionario recopilaba documentación que podía dividirse en datos generales – edad, sexo, raza - , información acerca de la vacunación y desparasitación, condición corporal - escala de 1 al 5, donde 1 representaba delgadez extrema y 5 obesidad -, tipo de alojamiento, alimentación recibida, datos acerca del tipo de entrenamiento, antecedentes médicos, historia de transporte reciente en el último mes y examen físico general. El modelo de cuestionario se muestra en el Anexo 2.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Muestreo

A cada caballo incluido en el estudio se le tomó una muestra de sangre venosa previa limpieza de la zona con antiséptico, mediante punción de la vena yugular, empleando aguja de calibre 20G y tubos con el sistema BD Vacutainer® (Becton Dickinson S.A., San Agustín del Guadalix, Madrid). Se recogieron 10 ml de sangre en total, 5 ml de sangre en tubo con anticoagulante EDTA y 5 ml en tubo sin anticoagulante. Cada tubo fue identificado con el nombre del caballo. Una vez obtenidas, las muestras de sangre se transportaron al laboratorio de forma inmediata, en un tiempo máximo de 12 horas, manteniendo el tubo de EDTA en refrigeración y dejando a temperatura ambiente el tubo sin aditivo, permitiendo así la formación del coágulo.

Una vez en el laboratorio, a las muestras de cada animal se les asignó un número de referencia interno. Las muestras de EDTA se conservaron a 5°C hasta su análisis. Las muestras de suero fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 21°C, utilizando una centrífuga Eppendorf® 5810 R (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España). Posteriormente, el suero fue dispensado en alícuotas de 700 µL en tubos Micronic® (Micronic Europa, Países Bajos). Una alícuota de suero se mantuvo refrigerada a 5°C hasta el análisis bioquímico. El resto de alícuotas de suero de cada animal fueron congeladas a -80°C, hasta el análisis de marcadores de estrés oxidativo.

Todas las muestras fueron analizadas o almacenadas en congelación, en un tiempo máximo de 24 horas desde su extracción.

3.2.2. Análisis hematológico de las muestras

Los parámetros hematológicos fueron analizados mediante el analizador URIT 2900Vet Plus TS (URIT Global Diagnostics Supplier, China), que utiliza las tecnologías de impedancia eléctrica para la determinación de la serie blanca, serie roja y PLQ, y de colorimetría fotoeléctrica para el análisis de la Hb (Figura 5). El equipo de hematología fue calibrado para el análisis de sangre equina de forma previa al estudio, siguiendo las instrucciones del fabricante. El mantenimiento del equipo consistió en el aclarado diario, previo y posterior al análisis de las muestras y la limpieza de sonda y conductos, efectuada semanalmente. Además, se llevaron a cabo los pertinentes controles de calidad de forma periódica, según las recomendaciones del fabricante.

Figura 5. Analizador hematológico URIT 2900Vet, utilizado en el estudio.



Fuente: Cortesía del Servicio de Informática y Comunicación (VISAVET).

El volumen de muestra utilizada fue de 20 μ L de sangre EDTA, previamente atemperada a 21°C y homogeneizada. La técnica de impedancia del instrumento diferencia, según su volumen, los GR

(30-110 fL), los GB (35-450 fL), las PLQ (2-30 fL), y detecta la cantidad de cada célula por microlitro.

Los valores del volumen corpuscular medio (VCM) y del volumen plaquetar medio (VPM), son calculados también a partir de esta medición. Para la diferenciación de los GB, estos son parcialmente disgregados mediante un agente lisante, disolviendo la membrana, citoplasma y gránulos, dejando expuesto el núcleo celular. De este modo, pueden diferenciarse, según el volumen del núcleo, LIN (LYM, 35-98 fL), MON (MID, 99-135 fL) y granulocitos (GRAN, 136-450 fL). Debido a que el analizador sólo diferencia 3 tipos de GB, estos datos no se tuvieron en cuenta.

El agente lisante rompe los GR liberando la Hb, que es calculada midiendo las diferencias en la absorbancia a 540 nm, del diluyente y la muestra.

Los valores calculados a partir de fórmulas por el propio equipo son el Hct, la HCM y la CHCM:

$$\text{Hct (\%)} = \frac{\text{GR} \times \text{VCM}}{10}$$

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{GR}}$$

$$\text{CHCM (g/L)} = \frac{100 \times \text{Hb}}{\text{Hct}}$$

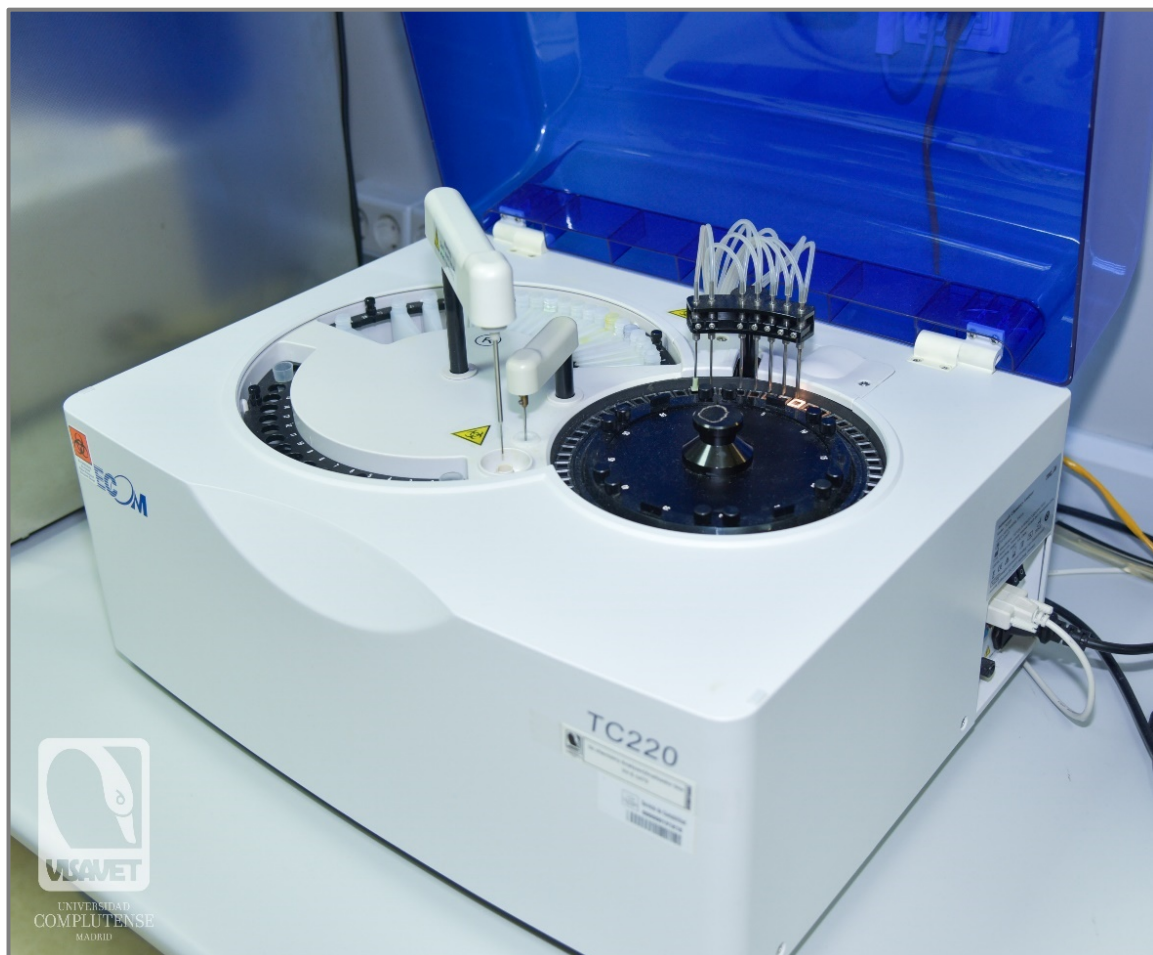
El coeficiente de variación de la amplitud de distribución eritrocitaria (RDW-CV), deriva del histograma de los GR.

La evaluación celular y el recuento diferencial de GB se realizaron de forma manual mediante la observación microscópica del frotis sanguíneo. Se realizó un frotis en cuña a partir de 15-20 μL de sangre EDTA previamente homogeneizada. Una vez seco, se realizó una tinción Diff-Quick de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se observó al microscopio de forma metódica, teniendo en cuenta para el recuento diferencial, un total de 100 GB, obteniendo así los porcentajes de NEU, LIN, EO, MON, y BAS.

3.2.3. Análisis bioquímico de las muestras

Los parámetros bioquímicos fueron analizados con el analizador automático compacto de química clínica TC220 (Jiangxi Tecom Science Corporation, China). El equipo está compuesto por una bandeja donde se colocan los reactivos (hasta un total de 25 posiciones), y una bandeja con capacidad para 18 muestras (Figura 6). Entre ambas bandejas, se encuentra el sistema dispensador provisto de un rotor y una sonda. Este sistema se encarga de dispensar muestra (rango de volumen de 1 a 50 μL) o reactivo (rango de volumen de 10 a 400 μL), a la cubeta de reacción.

Figura 6. Sistema de bandejas del analizador automático compacto de química clínica TC220.



Fuente: Cortesía del Servicio de Informática y Comunicación (VISAVET).

Además, este sistema también se encarga del mezclado de reactivo y muestra en la cubeta de reacción. La bandeja de reacción consiste en una placa giratoria provista de un total de 60 cubetas de reacción numeradas. Los principales componentes del sistema fotométrico son, una lámpara halógena de tungsteno, la cubeta de reacción, una fibra óptica, un filtro óptico y un procesador. Este sistema tiene capacidad para leer a 9 longitudes de onda (340nm, 405nm, 450nm, 510nm, 546nm, 578nm, 620nm, 660nm y 690nm), con un rango fotométrico de absorbancia de 0.0000 a 4.0000. En ambas bandejas existen dispositivos de control de temperatura.

El equipo fue calibrado de forma previa para analizar sangre de équido. Además, el mantenimiento del equipo comprendía labores diarias (chequeo de depósitos de agua y desechos, verificación de la señal de las cubetas y del correcto funcionamiento de la sonda), semanales (limpieza de la sonda, el pocillo de lavado, las bandejas de muestras y reactivos, la bandeja de reacción, las agujas de lavado y las cubetas) y mensuales (limpieza de la ranura de incubación, el panel, los depósitos y la pantalla), realizadas según las recomendaciones del fabricante.

Las variables determinadas por este equipo y los métodos empleados para cada una de ellas fueron los siguientes:

La **CK** se calculó por el método descrito por Oliver¹⁷⁵, modificado por Rosalki¹⁷⁶ y posteriormente por Szasz¹⁷⁷. Está basado en la actividad enzimática de la CK en presencia creatina fosfato y ADP, que va a dar lugar a creatina y ATP. El ATP resultante, reacciona con D-glucosa en presencia de la enzima hexoquinasa, produciendo ADP y D-glucosa-6-fosfato. Esta molécula, catalizada por la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, reacciona con NADP⁺ dando lugar a D-6-fosfogluconato y NADPH. La absorbancia de NADPH a 340 nm es proporcional a la actividad de CK de la muestra.

La **LDH** se midió según el método desarrollado por Henry *et al.*¹⁷⁸, en el que la enzima cataliza la formación de L-lactato y NAD⁺ a partir de piruvato, NADH e iones hidrógeno. La disminución de la absorbancia a 340 nm por el paso de NADH a NAD⁺, es directamente proporcional a la cantidad de LDH de la muestra.

La **AST** se determinó según el método recomendado por la IFCC¹⁷⁹, basado en su capacidad enzimática para transferir el grupo amino de la L-aspartato, al 2-oxoglutarato, produciendo oxalacetato y L-glutamato. El oxalacetato, en presencia de malato deshidrogenasa, produce una reducción de la NADH, obteniéndose L-malato y NAD⁺. La tasa de reducción en la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de la AST.

La **GGT** se determinó según los métodos de Szasz¹⁸⁰ y Rosalki¹⁸¹. La GGT cataliza la reacción de L-G-glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida y glicilglicina, formando L-G-glutamyl-glicilglicina y p-nitroanilina, cuya absorbancia medida a 405 nm es proporcional a la concentración de GGT del suero.

La determinación de la **ALP** se realizó en función de su actividad catalítica para transformar p-nitrofenilfosfato, en p-nitrofenol y fosfato en medio alcalino de tampón DEA (dietanolamina). La concentración de fosfatasa es proporcional al incremento del p-nitrofenol, que conlleva la consiguiente variación en la absorbancia a 405 nm.

La **BT** y la **BD** fueron medidas según el método de Rand y Di Pasqua¹⁸², revisado por Golub *et al.*¹⁸³, según el cual la bilirrubina de la muestra reacciona, en presencia de un detergente, con dicloroanilina diazotada, formando azobilirrubina, cuya absorbancia medida a 550 nm es proporcional a la concentración de bilirrubina de la muestra. La **BI** se calcula por la diferencia de las otras dos.

La **U** se determinó por el método cinético, que consiste en una reacción enzimática descrita por Talke y Schubert¹⁸⁴ y optimizada por Tiffany *et al.*¹⁸⁵. La ureasa cataliza la transformación de U y agua en amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco reacciona con oxoglutarato, NADH e hidrógeno por la acción catalítica de la glutamato deshidrogenasa, para dar lugar a glutamato, NAD⁺, y agua. La disminución de la absorbancia medida a 340 nm, por la conversión de NADH a NAD⁺, es proporcional a la concentración de U de la muestra.

La medición de la **Cr** se efectuó mediante la reacción de Jaffé, consistente en una reacción colorimétrica de la creatina con ácido pícrico en medio alcalino, cuya cinética es medida en dos puntos a 490 nm.

Las **PT** fueron determinadas mediante el método Biuret, descrito por Gornall *et al.*¹⁸⁶. Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con iones de cobre disueltos en medio alcalino de tartrato sódico potásico para formar un complejo coloreado, cuya máxima absorbancia es medida a 550 nm.

La **ALB** se determinó por el método BCG. El reactivo, listo para su uso, está constituido por verde de bromocresol en solución tampón de pH 4,2. Este compuesto se combina con la ALB para dar un compuesto con coloración, cuya absorbancia medida a 630 nm, es proporcional a la concentración de ALB de la muestra. Las **GLOB** fueron calculadas por la diferencia entre las PT y la ALB. El **ALB/GLOB**, se determinó a partir de los resultados de las respectivas variables.

El **Fib** se determinó de forma manual mediante el método de precipitación por calor descrito por Schulz¹⁸⁷, Goodwin¹⁸⁸ y Low, Hill y Searcy¹⁸⁹. Los sólidos totales son medidos en el plasma EDTA mediante refractometría, antes y después de someter la muestra a una incubación de 5 minutos a 56°C. El Fib resulta de la diferencia de los dos valores.

El **Ca** se determinó por el método arsenazo III, donde el Ca reacciona con arsenazo III en un medio ligeramente ácido, formando el complejo calcio-arsenazo III de color azul, cuya absorbancia a 650 nm es directamente proporcional a la concentración de Ca de la muestra.

La medición de **P** se basó en el trabajo descrito por Daly *et al.*¹⁹⁰ modificado posteriormente por Gamst y Try¹⁹¹. Según este método, los iones fosfato reaccionan con el molibdato de amonio en medio ácido, formando un complejo fosfo-molibdico cuya absorbancia medida a 340 nm es proporcional a la concentración de iones fosfato de la muestra. El cociente **Ca/P** se determinó a partir de los resultados anteriores.

El **CT** se determinó por el método de Allain *et al.*¹⁹², mediante un reactivo listo para su uso donde los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesterol ester-hidrolasa, a colesterol y ácidos grasos libres. El colesterol formado, es oxidado por la colesterol oxidasa, formando 4-colesten-3-ona y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con 4-aminoantipirina y fenol en presencia de

peroxidasa, para dar lugar a quinoneimina, un cromógeno de color rosa cuya máxima absorbancia a 500 nm, es proporcional a la concentración sérica de CT.

Los **TG** fueron determinados por el método desarrollado por Fossati y Prencipe¹⁹³, asociado a la reacción de Trinder¹⁹⁴. En presencia de lipasa, los TG son transformados en glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol en presencia de la enzima glicerol kinasa, reacciona con ATP dando lugar a ADP y glicerol-3-fosfato, el cual en presencia de oxígeno y catalizado por la enzima glicerol fosfato oxidasa, forma dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno. El peróxido producido reacciona con 4-clorofenol y 4-aminoantipirina dando lugar a un cromógeno rosa (quinoneimina), cuya absorbancia medida a 500 nm es proporcional a la concentración de TG en la muestra.

3.2.4. Análisis de estrés oxidativo de las muestras

Los parámetros analizados en relación con el estrés oxidativo en este estudio fueron AU, TBARS, TAS y 8-OHdG.

El **AU** fue analizado mediante el analizador automático compacto de química clínica TC220 (Jiangxi Tecom Science Corporation, China), mediante el método de la uricasa. Mediante la acción de la uricasa, el AU produce alantoína, dióxido de carbono y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, en presencia de peroxidasa, reacciona con un cromógeno (diclorohidroxibenzeno sulfonato y amino-antipirina), para formar un complejo de color rosa, la quinoneimina. La absorbancia de este compuesto coloreado, medida a 500 nm, es proporcional a la cantidad de AU de la muestra.

El resto de marcadores de estrés oxidativo fueron analizados mediante varios kits comerciales:

Para la determinación de **TBARS**, se utilizó el TBARS Assay kit (Cayman Chemical, Michigan, USA), (Figura 7). En esta prueba, se analiza la peroxidación lipídica en suero midiendo colorimétricamente

a una longitud de onda de 530nm, la unión formada por malondialdehído (MDA) y ácido tiobarbitúrico (TBA) en condiciones acídicas y alta temperatura (90-100°C).

Figura 7. TBARS Assay kit utilizado en el estudio.



Fuente: Cortesía del Servicio de Informática y Comunicación (VISAVET).

El kit está provisto de TBA, ácido acético concentrado, hidróxido de sodio concentrado, MDA 500 μM y solución de sulfato dodecil sódico (SDS), almacenados en refrigeración (2-8°C). De forma previa al análisis, deben atemperarse todos los componentes, diluir los concentrados de ácido acético e hidróxido de sodio y preparar un reactivo de color, mezclando por cada muestra 22,1 g de TBA, 2,1 ml de ácido acético diluido y 2,1 ml de hidróxido de sodio diluido, mezclando hasta disolver el TBA. El material necesario no proporcionado por el kit consiste en pipetas y puntas de diferente tamaño, agua destilada, tubos de 5ml con tapón de rosca, contenedores de varios tamaños, flotador, baño, hielo, centrífuga y lector de absorbancia con filtro de 530-540 nm y cubetas compatibles. Para la preparación de los estándares colorimétricos, se diluyen 250 μL de

MDA en 750 μL de agua, obteniendo una solución 125 μM de MDA, a partir de la cual, se realizan las diluciones mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5. Diluciones de MDA para la preparación de los estándares colorimétricos.

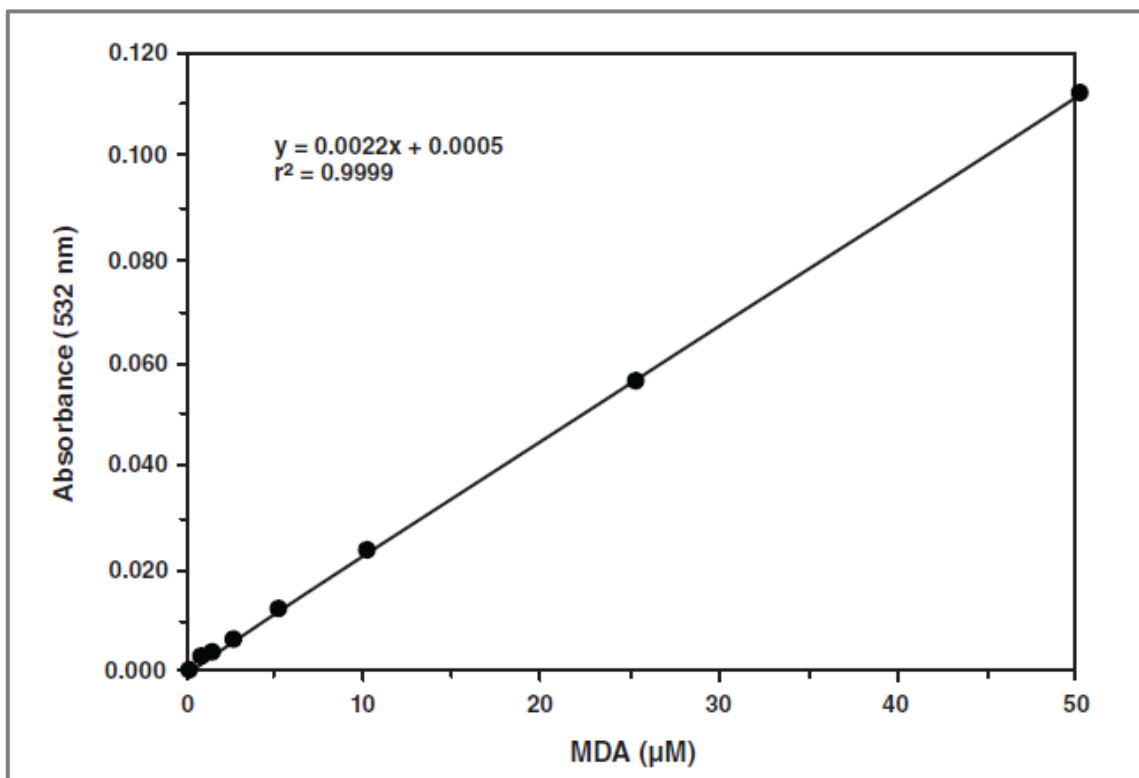
Tubo	MDA (μL)	Agua (μL)	Concentración MDA (μM)
A	0	1000	0
B	5	995	0.625
C	10	990	1.25
D	20	980	2.5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

Para realizar el análisis se rotuló un tubo de 5 ml por cada estándar y muestra. En cada tubo, se añadió 100 μL del estándar o muestra correspondiente, 100 μL de solución SDS y se mezcló mediante vórtex. Seguidamente, se añadió 4 ml de reactivo de color y se volvió a homogeneizar. Los tubos se colocaron en un flotador y se incubaron en agua hirviendo durante 1 hora. Pasado este tiempo, los tubos se metieron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 1600 g durante 10 minutos a 4°C. Dentro de la siguiente media hora, se leyó la absorbancia de los tubos de estándares y muestras, a 530-540 nm.

Para el cálculo de la concentración de MDA en cada estándar y muestra se restó el valor de absorbancia del estándar A (0 μM) del resto de estándares y muestras para obtener el valor de absorbancia corregido. Se realizó un gráfico (Figura 8), con los valores de absorbancia de los estándares y su respectiva concentración de MDA y se extrapola la concentración de MDA de cada muestra a partir de la curva estándar, por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{MDA } (\mu\text{M}) = \left[\frac{(\text{Absorbancia corregida}) - (\text{y-intercepto})}{\text{Pendiente de la curva}} \right]$$

Figura 8. Ejemplo de curva estándar colorimétrica de MDA.



Fuente: Manual del kit para la determinación de TBARS (Cayman Chemical).

Para la determinación del **TAS** se utilizó el kit Total Antioxidant Status (Fortress Diagnostics Limited, Reino Unido), que consiste en una medición colorimétrica basada en la habilidad de los antioxidantes de la muestra, para inhibir la formación de ABTS⁺ por oxidación de ABTS (1,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina-sulfonato) con metmioglobina (una peroxidasa). El ABTS⁺ tiene una coloración azul verdosa estable, que puede ser medida a 600 nm. Los antioxidantes de la muestra suprimen la formación del color en proporción a su concentración (Figura 9).

Figura 9. Total Antioxidant Status kit utilizado en el estudio.



Fuente: Cortesía del Servicio de Informática y Comunicación (VISAVET).

El kit está provisto de un tampón fosfato salino con una concentración de 80 mmol/L, un cromógeno con ABTS (610 $\mu\text{mol/L}$), metmioglobina (6,1 $\mu\text{mol/L}$) y un calibrador específico de cada lote, todo almacenado en refrigeración (2-8°C). El calibrador debe reconstituirse de forma previa añadiendo 1 ml de agua destilada y dejando disolver durante 30 minutos. El material necesario no incluido consta de pipetas y puntas de diferente calibre, vórtex, termobloque o estufa a 37°C, lector de absorbancia a 660 nm y cubetas compatibles.

Para la realización del test se rotuló 1 eppendorf de 1,5 ml por cada muestra a medir, además de dos eppendorf más rotulados como blanco y calibrador. Se dispensó en cada eppendorf 800 μL de tampón, seguido de 50 μL de cada muestra, calibrador o blanco en el tubo correspondiente. Se leyó la absorbancia inicial de cada muestra, blanco y calibrador a 660 nm. Posteriormente se añadió a cada tubo 125 μL de cromógeno, se mezcló mediante vórtex y se incubó a 37°C durante 5 minutos. Después se leyó la absorbancia final de todas las muestras, blanco y calibrador a 660 nm.

Para el cálculo de resultados se aplicaron las siguientes fórmulas:

$A_2 - A_1 = \Delta$ Absorbancia de la muestra / Blanco / Calibrador

$$\text{Resultado TAS (mmol/L)} = \frac{\Delta \text{ Absorbancia de la muestra}}{\Delta \text{ Absorbancia de calibrador}} \times \text{Concentración del calibrador}$$

Este método es lineal hasta una concentración de 2,7 mmol/L.

Para la determinación del metabolito de la oxidación de la guanina, **8-OHdG**, se utilizó el ELISA de competición Highly sensitive 8-OHdG Check (Japan Institute for the Control of Aging, Fukuroi, Japón), que utiliza una placa tapizada con 8-OHdG y un anticuerpo monoclonal específico para 8-OHdG, el cual reacciona competitivamente con el 8-OHdG de la placa y el 8-OHdG de las muestras (Figura 11). Posteriormente, el anticuerpo secundario, marcado con una enzima, se une al anticuerpo primario unido a la placa. Finalmente, la adición de un sustrato cromático da lugar a la coloración en el pocillo en proporción al anticuerpo unido al tapizado. Por tanto, a mayor concentración de 8-OHdG en las muestras, menor es la concentración de anticuerpo unido a la placa y menor la intensidad del color.

El kit contiene una microplaca, anticuerpo primario liofilizado, solución de anticuerpo primario, anticuerpo secundario conjugado con HRP liofilizado y solución de anticuerpo secundario, solución cromática o sustrato enzimático, diluyente, solución de lavado concentrada, solución de parada, soluciones estándar de 8-OHdG y sello adhesivo para placas (Figura 10). El kit fue almacenado a 4°C hasta su uso.

Figura 10. ELISA de competición Highly sensitive 8-OHdG Check utilizado en el estudio.



Fuente: Cortesía del Servicio de Informática y Comunicación (VISAVET).

El material necesario no incluido en el kit constó de una pipeta de 10-100 μL (Eppendorf Research® plus, AG, Alemania) y puntas compatibles, pipeta multicanal de rango 30-300 μL (Transferpette®S-8, Brand GmbH, Wertheim, Alemania) y puntas compatibles, agitador de microplacas (Genie, Scientific Industries Inc., New York, USA), refrigerador (Candy Hoover Group Srl, Monza, Italia) y lector de placas con un filtro capaz de leer la absorbancia a 450nm (MB-580, Heales, Shenzhen, China).

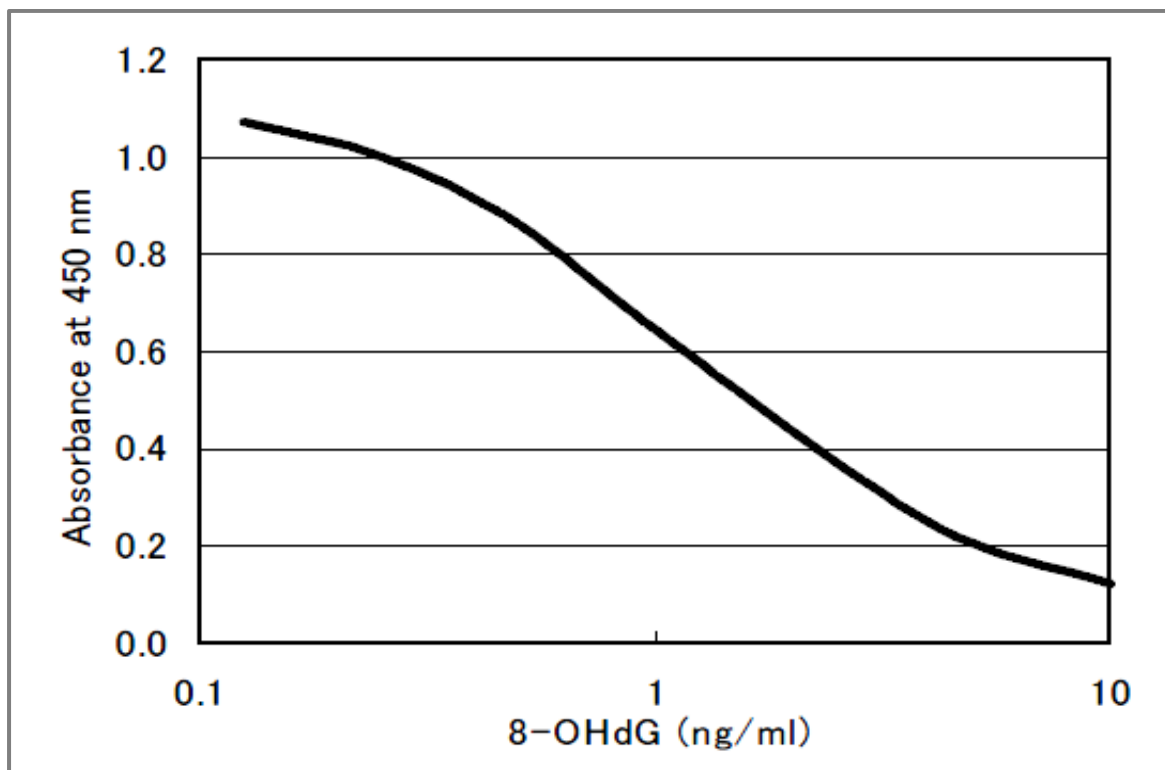
Los reactivos utilizados cada día fueron atemperados previamente a 20-25°C. Antes de comenzar el ensayo se registró el orden de muestras y estándares, se preparó la solución de lavado y se reconstituyó el anticuerpo primario. Se añadieron 50 μL de los estándares y las muestras a cada pocillo siguiendo el orden de la hoja de trabajo. Seguidamente, se añadieron 50 μL de anticuerpo primario en cada pocillo. Se agitó y selló la placa y se incubó a 4°C durante 12 horas.

Pasado este tiempo, se desechó el contenido de la placa y se realizaron tres lavados con 250 μ L de solución de lavado. Posteriormente se reconstituyó el anticuerpo secundario y se añadieron 100 μ L en cada pocillo. La placa se agitó y selló y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Al final de esta incubación, se desechó el contenido y se lavaron los pocillos tres veces.

Se reconstituyó la solución cromática o solución de sustrato enzimático, con la solución de dilución, en proporción 1:100. Se añadieron 100 μ L de este sustrato a cada pocillo, se agitó la placa y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado este tiempo, se añadieron a cada pocillo 100 μ L de solución de parada, se agitó e inmediatamente se leyó la absorbancia en el lector a 450nm.

Se generó una curva estándar de la absorbancia *versus* el logaritmo de la concentración de los estándares (Figura 11). A partir de esta curva y de los valores de absorbancia de las muestras, se determinó la concentración de 8-OHdG de cada muestra.

Figura 11. Gráfico de la absorbancia de los estándares de 8-OHdG a 450 nm *versus* el logaritmo de su concentración en ng/ml.



Fuente: Manual de Highly sensitive 8-OHdG Check (JaICA).

3.2.5. Análisis estadístico de las muestras

Todos los datos obtenidos fueron recopilados en un documento Excel® (Microsoft Corporation (Redmond, Washington, EEUU).

A partir de la información recuperada de cada animal, se cotejaron los valores analíticos con los datos del cuestionario en busca de referencias que no cumplieren los criterios de inclusión, reflejados en la Tabla 6, y que por tanto debían ser excluidas del análisis.

Tabla 6. Criterios de inclusión de la población objeto de estudio¹⁹⁵.

Presencia de inflamación (últimos 7 días)	Ausencia
Historia de enfermedad (último mes)	Ausencia
Examen físico:	
- Actitud general	Alerta
- Pliegue cutáneo	< 1 segundo
- Membranas mucosas	Húmedas, rosas
- Tiempo de relleno capilar	< 2 segundos
- Auscultación cardíaca	Ritmo sinusal. Ausencia de soplos. Ausencia de arritmias.
- Frecuencia cardíaca	16-36 lpm
- Auscultación pulmonar	Eupnea. Sonidos vesiculares.
- Frecuencia respiratoria	8-16 rpm
- Temperatura	37,5 – 38,2 °C
- Micción/defecación	Orina de amarillo claro a parduzca, con turbidez variable. Heces formadas de estructura redondeada y blandas, color marrón/verde (según la alimentación).

Posteriormente, se procedió a codificar las variables categóricas del cuestionario para simplificar en análisis estadístico. A partir de estos documentos, se crearon tres bases de datos en Excel®, diferenciadas por el tipo de análisis (hematología, bioquímica y estrés oxidativo), con los resultados de cada análisis y la información recopilada en el cuestionario.

3.2.5.1. Análisis comparativo de dos métodos de determinación de intervalos de referencia

Los IR fueron determinados mediante dos metodologías con el objetivo de comparar los resultados obtenidos. En ambos métodos se partió de la base de datos en Excel®, para cada tipo de análisis (hematología, bioquímica y estrés oxidativo).

En primer lugar, los resultados del análisis laboratorial fueron analizados con el conjunto de macros de Excel®, **Reference Value Advisor** (Bioestadística, Escuela Nacional Veterinaria de Toulouse¹⁹⁶), siguiendo las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y Laboratoriales (CLSI).

Para cada variable se generó una hoja de Excel® utilizando varios métodos, distribuidos en columnas (Tabla 7):

Tabla 7. Ejemplo de tabla de resultados de la herramienta Reference Value Advisor.

Reference Value		Results for HCT			
Advisor V2.1					
				Date	23/12/2021
				Performed by	Aranzazu
Method	Untransformed data		Box-Cox transformed data		Nonparametric
	Standard	Robust	Standard	Robust	
N	46	46	46	46	46
Mean	35,2		5,1		
Median	34,6	35,0	5,1	5,1	
SD	4,4	4,5	0,5	0,5	
Minimum	27,2	27,2	4,0	4,0	
Maximum	46	46	6,3	6,3	
λ_1 coefficient Box-Cox			-13,419	-13,419	
λ_2 coefficient Box-Cox			0,309	0,309	
P-Value Anderson-Darling/		0,452	0,609		
Symmetry test for Robust			0,617	0,814	
Outliers Dixon					
Outliers Tukey		0	0	0	0
Suspect data Tukey		0	0	0	0
Lower limit of reference interval					
Upper limit of reference interval		26,2	25,9	27,2	27,2
		44,1	44,1	45,1	45,5
90% CI for lower limit					
		24,4	24,5	26,0	26,0
		28,2	27,7	28,7	28,4
90% CI for upper limit					
		42,2	42,0	42,8	42,7
		46,0	45,8	47,5	47,5
					46,0

Fuente: Reference Value Advisor en Excel®

Esta herramienta generó dos grupos de resultados: en el primer grupo, utiliza los datos sin transformar y en el segundo grupo, utilizó los datos transformados mediante Box-Cox. En ambos grupos realizó los cálculos mediante el método estándar (asume distribución Gaussiana de los datos) y el método robusto (asume distribución simétrica no Gaussiana de los datos).

En cada columna, siguiendo el correspondiente método, este complemento de Excel® calculó:

- Los estadísticos descriptivos (número de observaciones, media, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo).

- b) El test de Anderson Darling para evaluar si los datos seguían una distribución normal o simétrica. Si el valor de p era menor de 0,05 se rechazaba la hipótesis de normalidad/simetría en la distribución de los datos.
- c) Los valores fuera de rango para los cuales se utilizó el test de Dixon, que analiza los valores mínimo y máximo de cada variable, y el método de Tukey, que identifica posibles valores fuera de rango y/o valores sospechosos de estarlo. Siguiendo la recomendación de la IFCC-CLSI, C28-A3, los valores sospechosos y fuera de rango fueron revisados, favoreciendo siempre la retención de datos frente a la eliminación.
- d) Los límites inferior y superior del IR y los IC del 90%, en función del número de observaciones y la dispersión de los datos. En este apartado, la herramienta incluyó además la determinación no paramétrica tanto del IR, como de los IC. Según las recomendaciones de la IFCC-CLSI C28-A3, la determinación no paramétrica de los datos puede ser utilizada siempre y cuando el número de observaciones sea igual o mayor de 120.
- e) Gráficos de dispersión y diagrama de cajas, histograma de los datos observados y curva de distribución ajustada, y gráfico cuantil-cuantil de los valores observados frente al valor esperado.

A partir de los datos generados por esta herramienta se cumplimentó el *addendum* proporcionado por la ASVCP, con los estadísticos, IR, IC del 90%, distribución y método utilizado.

En segundo lugar, los IR fueron estimados mediante el complemento de Excel®, **@RISK** (Palisade EMEA & India, Middlesex, UK). Con esta herramienta se procedió a seleccionar la distribución teórica que mejor ajustaba los datos observados para cada variable analítica de la hematología, el análisis bioquímico y los marcadores de estrés oxidativo. Para ello se seleccionó la opción de ajuste, preseleccionando las distribuciones más apropiadas para el ajuste de datos de origen biológico:

beta, exponencial, gamma, invgaussiana, logistic, loglogistic, log normal, normal, pert, uniform y weibull^{197,198}.

- La distribución Beta es una distribución continua definida por dos parámetros de forma. La distribución puede adoptar diferentes formas dependiendo de los valores de los dos parámetros. Cuando ambas formas son iguales a 1, la distribución beta es una distribución uniforme.
- La distribución Exponencial es una distribución continua que se utiliza para modelar tiempos de espera para la ocurrencia de un cierto evento.
- La distribución Gamma para modelar valores de datos positivos que sean asimétricos a la derecha y mayores que 0. La mayoría de los valores en una distribución gamma ocurren cercanos entre sí, pero algunos valores quedan al final de la cola superior.
- La distribución Gaussiana inversa también conocida como distribución de Wald, es un tipo de distribución exponencial, utilizada para modelar datos no negativos, positivos con sesgo.
- La distribución Logística se utiliza para modelar distribuciones de datos que tengan colas y curtosis más elevadas que en la distribución normal.
- La distribución Log-logística es la distribución de probabilidad de una variable aleatoria cuyo logaritmo tiene una distribución logística. Tiene una forma parecida a la distribución logarítmica normal, pero con colas más pesadas.
- La distribución Log-normal es una distribución de valores mayores de 0, de línea asimétrica hacia la derecha. Si una variable aleatoria se distribuye de forma log-normal, su logaritmo tendrá una distribución normal.
- La distribución Normal es una distribución con forma de campana donde las desviaciones estándar sucesivas con respecto a la media establecen valores de referencia para estimar el porcentaje de observaciones de los datos.
- La distribución Pert es una distribución con forma de campana, casi normal, considerada una versión de la distribución triangular con líneas más suaves.

- La distribución Uniforme es una distribución continua que modela un rango de valores con igual probabilidad. La distribución uniforme se especifica mediante cotas inferior y superior.
- La distribución de Weibull es una distribución versátil que se puede utilizar para modelar una amplia gama de aplicaciones. Dependiendo de los valores de sus parámetros, la distribución de Weibull puede adoptar varias formas.

De esta forma se obtuvo la distribución con mejor ajuste y los estadísticos de distribución de cada parámetro, incluyendo el IC del 95%, de especial relevancia en el cálculo de los IR. En este método, el criterio de evaluación utilizado para evaluar la bondad del ajuste de la distribución a los datos fue el Criterio de Información de Akaike (AIC), que utiliza el logaritmo neperiano de la verosimilitud para estimar la calidad relativa de la distribución seleccionada, teniendo en cuenta el número de parámetros. Dicha estimación fue llevada a cabo mediante la comparación de la distribución observada con la esperada si los datos se hubieran generado utilizando la distribución con mejor ajuste. Por tanto, una diferencia no significativa implica que la distribución observada no puede distinguirse de la distribución estimada, lo cual puede asumirse como evidencia de que los datos observados podrían provenir de una distribución teórica de esas características.

Se seleccionó también el análisis Bootstrap, técnica de remuestreo que incluye distribución y estadísticos para los parámetros ajustados, así como otros estadísticos de la bondad del ajuste.

3.2.5.2. Análisis comparativo de los valores de referencia obtenidos con la bibliografía

Los IR de los parámetros de hematología, bioquímica y estrés oxidativo obtenidos mediante el método que se consideró óptimo a partir de los dos inicialmente utilizados, fue contrastado con otros IR presentes en la bibliografía.

En primer lugar se realizó una búsqueda bibliográfica de valores de referencia de parámetros de hematología, bioquímica y estrés oxidativo en équidos. Se seleccionaron los IR obtenidos preferentemente con una metodología conocida y comparable con los métodos utilizados en este estudio y de una población de caballos de razas mixtas.

Para realizar esta comparativa, se observó el número de valores no coincidentes de los límites superior e inferior del IR, al superponer el determinado en el presente estudio con el publicado en la bibliografía, para cada analito.

3.2.5.3. Análisis estadístico de los factores asociados

Para el **análisis univariable** de la posible asociación de **cada analito con las categorías del cuestionario**, se utilizó la herramienta informática SPSS® (IBM España S.A.). Como consecuencia del tipo de muestreo, realizado a grupos de animales pertenecientes a diferentes explotaciones y la posibilidad de que no todos los analitos muestren una distribución gaussiana, todos los tests realizados fueron no paramétricos. Así, para variables con 2 categorías se realizó una comparación mediante el test de Mann-Whitney y las variables con 3 categorías fueron evaluadas con el test de Kruskal-Wallis. Se seleccionaron aquellas variables del cuestionario que cumplieron una proporción 1:4 o menor, en el número de observaciones por categoría, considerando que en una relación superior a 1:4 podría perderse la capacidad de los test estadísticos para detectar las posibles asociaciones. La segunda parte de este análisis univariable consistió en analizar de forma gráfica las posibles asociaciones significativas de cada analito con las variables del cuestionario, para lo cual se realizaron una serie de gráficos.

Además, las **asociaciones hipotéticas entre las diferentes variables analíticas** de cada tipo de análisis (hematología, bioquímica y estrés oxidativo), fueron evaluadas mediante el test de Rho de

Spearman. Por último, las **posibles asociaciones entre las variables del cuestionario** se evaluaron mediante el test Chi-Cuadrado. Dichas asociaciones fueron igualmente recogidas en una matriz de Excel®. Para estos test estadísticos, se utilizó el programa SPSS® (IBM España S.A.).

En lo que respecta al **análisis multivariable**, se tuvo en cuenta que los datos obtenidos a partir de la población de referencia no eran independientes, ya que se encontraban agrupados en función de las explotaciones muestreadas. Como consecuencia de ello, se construyeron modelos de regresión lineal mixta, realizados con el programa estadístico STATA™ (StataCorp LLC, Texas, USA), para explicar determinadas variables analíticas. Así, los parámetros analíticos constituían la variable dependiente o variable respuesta. Las variables independientes o variables explicativas incluyeron una selección de categorías del cuestionario. El factor aleatorio del modelo fue la explotación de la que procedía cada animal incluido en el estudio. La elección del mejor modelo para una determinada variable analítica fue determinada, además de por los propios resultados del modelo, por el cumplimiento de los supuestos de linealidad de las variables, de independencia, homocedasticidad y normalidad de los residuos, de ausencia de interacción entre las variables independientes incluidas en el modelo, y del mejor ajuste del modelo evaluado mediante la parsimonia (AIC, BIC).

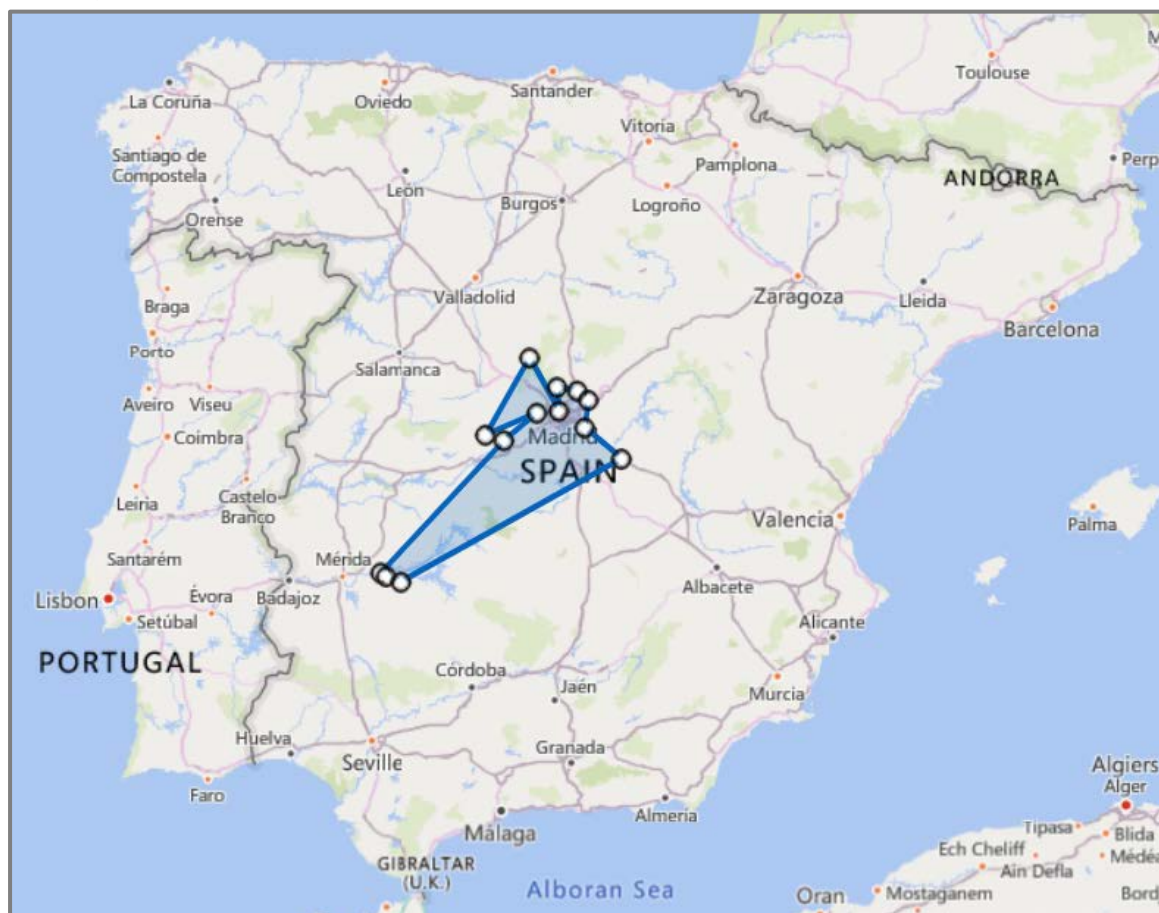
RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DE ESTUDIO

El área de centros hípicos muestreados comprendió 17.528 km² (Figura 12). La altitud media de los centros hípicos por provincias fue de 906 m en la Comunidad de Madrid, 1079 m en Segovia, 780 m en Cuenca, 550 m en Toledo y 288 m en Badajoz.

Figura 12. Área constituida por los centros hípicos muestreados en el presente trabajo.



Fuente: <https://www.calcmaps.com/es/map-area/>

Los grupos climáticos incluidos en el área de estudio fueron templado con verano seco y suave (Csb) en la provincia de Segovia y zona norte de Madrid, templado con verano seco y caluroso (Csa) en las zonas muestreadas en Cuenca; a este clima templado con verano seco y caluroso (Csa), combinado con el clima estepario frío (BSk), pertenecían las zonas muestreadas de Madrid y

Badajoz. Por último, la zona objeto de estudio en Toledo estaba incluida en el clima estepario frío (BSk).

La población seleccionada para este trabajo representó un 0,1% del censo total de caballos en las comunidades autónomas objeto de estudio. Concretamente las muestras fueron recogidas en centros hípicas de la Comunidad de Madrid (83% de las muestras totales), Castilla y León (7%), Castilla la Mancha (4%) y Badajoz (6%). Los caballos de raza pura incluidos en el estudio por comunidades fueron un 84% en la Comunidad de Madrid, 89% en Castilla y León, 33% en Castilla la Mancha y 93% en Badajoz. Las muestras fueron recogidas de 14 centros hípicas, que suponen un 7,4% del total de centros hípicas en las comunidades autónomas incluidas en el estudio.

4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

4.2.1. Tamaño muestral de la población de estudio

En el año 2017, el Servicio de Vigilancia Sanitaria Equina SEVISEQ (VISAVET-UCM) realizó un total de 314 chequeos anuales a caballos, ubicados en la Comunidad de Madrid (56%), Comunidades limítrofes (14%) y resto de España (30%). Entre los meses de enero y noviembre de 2017, se utilizaron muestras de sangre en EDTA y suero de 138 de estos caballos, cumpliendo con el tamaño de muestra mínimo calculado según las recomendaciones de la ASVCP.

Siguiendo los criterios de inclusión de la población de referencia establecidos (Tabla 6), se obtuvieron los siguientes datos:

- 9 caballos quedaron excluidos del estudio, por haber padecido inflamación en los 7 días previos al muestreo.

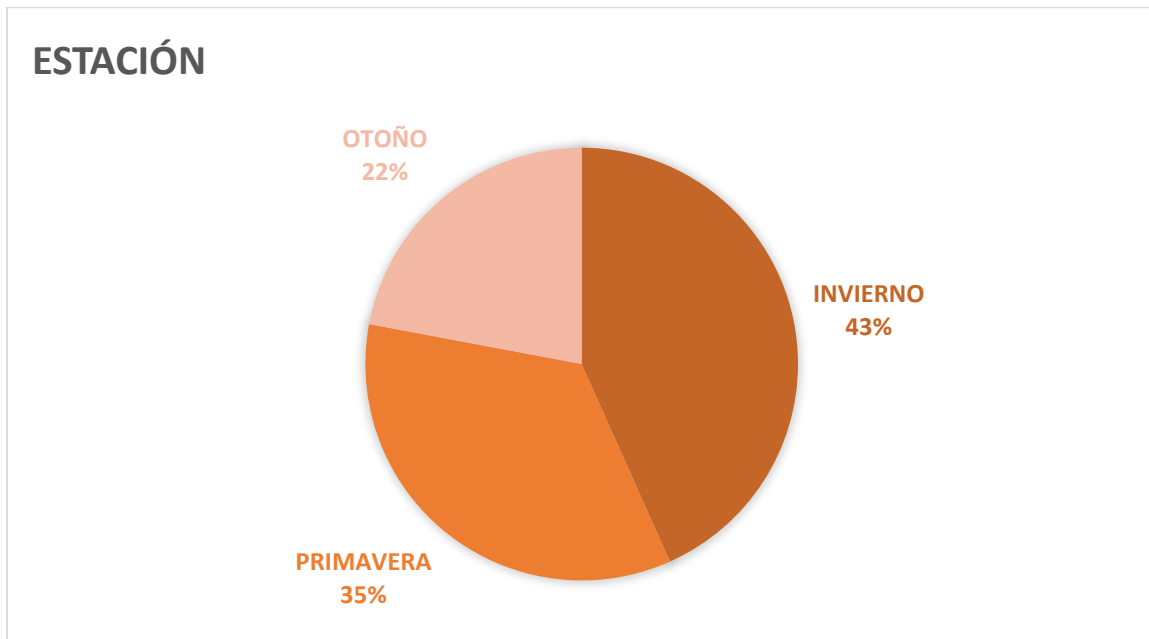
- La actitud general fue de alerta en todos los individuos, con ligeros matices (nerviosismo, somnolencia...), según el temperamento de cada animal, siempre dentro de los límites normales.
- El pliegue cutáneo se mantuvo durante menos de un segundo en todos los animales.
- Las membranas mucosas se mostraron rosadas y húmedas en todos los animales.
- El tiempo de relleno capilar fue menor de dos segundos en todos los animales, excepto en un caballo, en el que fue mayor de dos segundos, por lo que se excluyó del estudio.
- La auscultación y frecuencia cardíacas se encontraron dentro de los límites normales en todos los animales a excepción de un equino que mostró una auscultación cardíaca y pulso anormales. Este caballo, que además había padecido un episodio de laminitis en el último mes, fue excluido del estudio.
- La auscultación pulmonar y frecuencia respiratoria se encontraron dentro de los límites normales en todos los animales.
- La temperatura rectal se encontró dentro del rango normal en todos los animales.
- La frecuencia y características macroscópicas de la orina y heces de los individuos incluidos en el estudio, se encontró dentro de los límites normales.

Así, excluyendo los animales que no cumplieron los criterios de inclusión, la población objeto de estudio quedó constituida por 127 caballos, cuyos resultados analíticos se encuentran recopilados en una hoja de Excel® por tipo de análisis, en los Anexos 3, 4 y 5.

4.2.2. Datos recopilados de los caballos incluidos en el estudio

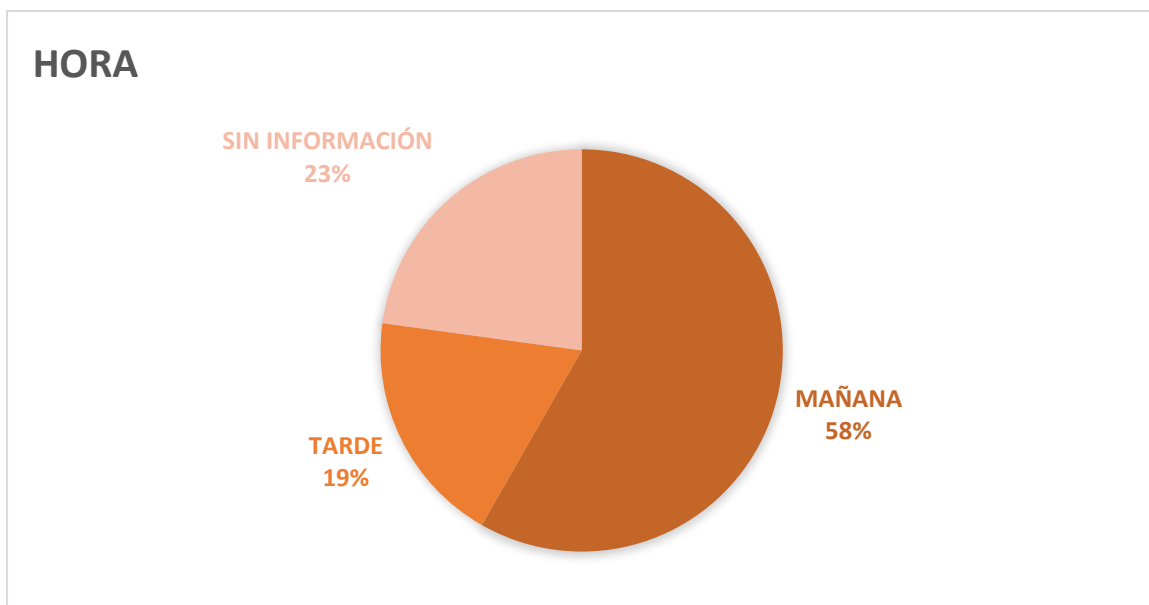
De los equinos seleccionados, se recopilaron a través del cuestionario los siguientes datos (Anexos 6, 7 y 8), expuestos de forma gráfica en las Figuras 13 a 30.

Figura 13. Gráfico sectorial de proporciones de la estación de muestreo de la población de referencia.



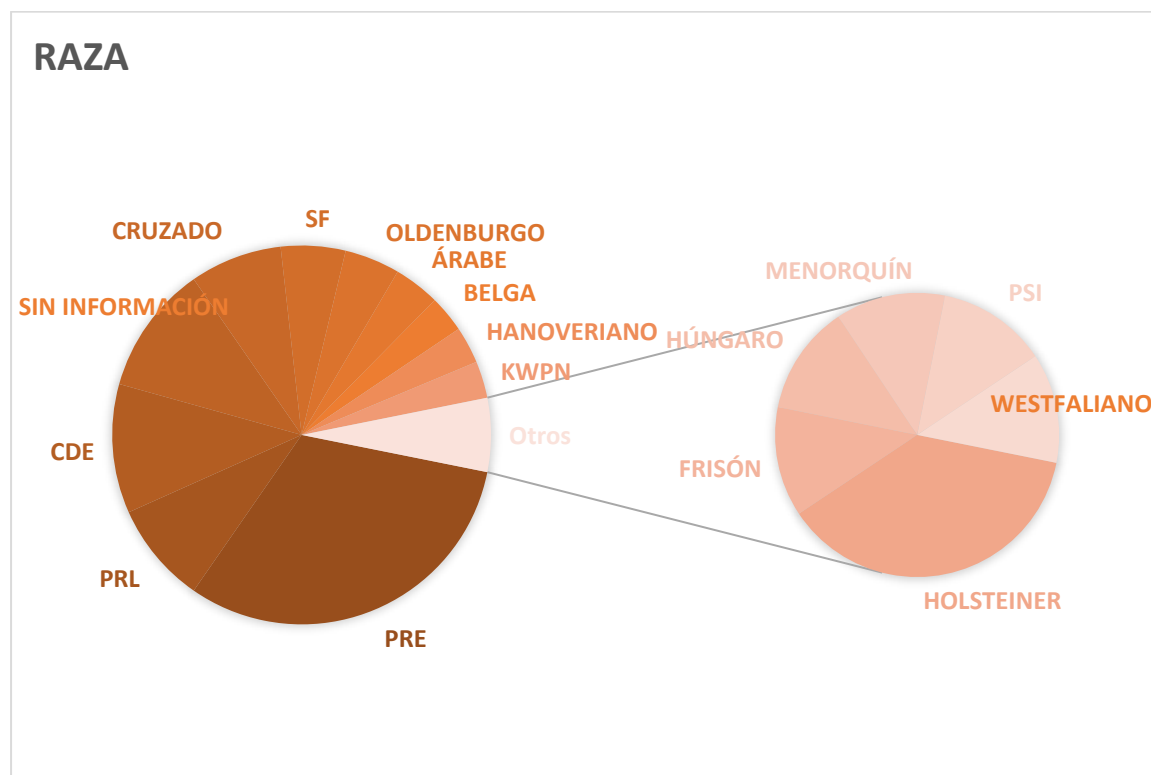
La toma de muestras fue realizada en los meses de invierno a un 43% de los animales, en primavera a un 35% y en otoño a un 22%. En este estudio no se realizó toma de muestras en los meses de verano.

Figura 14. Gráfico sectorial de proporciones del momento del día del muestreo de la población de referencia.



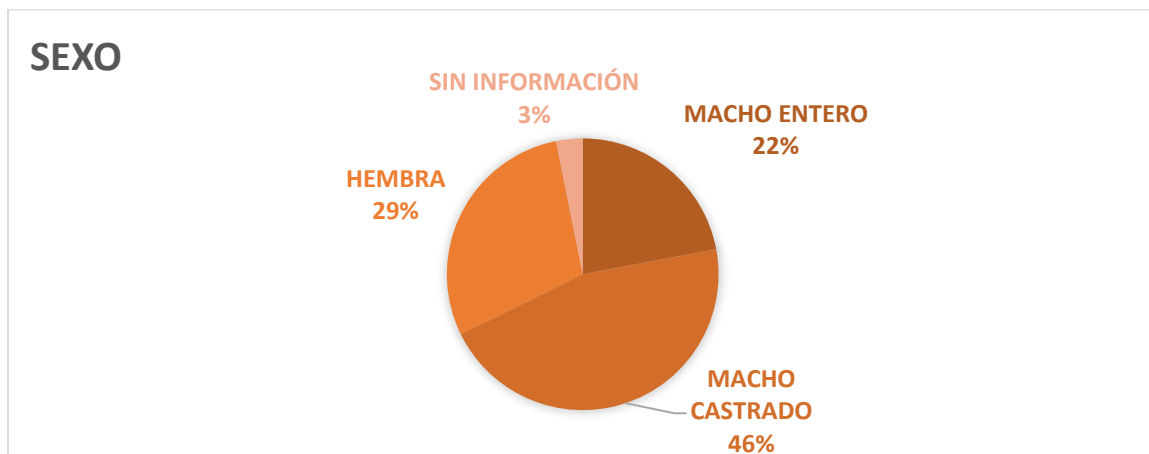
De los datos recopilados sobre la hora de toma de muestra, más de la mitad de los muestreos se realizó antes del mediodía (58%), principalmente entre las 9 y las 10 am. Se realizaron menos muestreos a partir de mediodía (19%).

Figura 15. Gráfico sectorial de proporciones de las razas de la población de referencia.



De los animales con información acerca de la raza, un tercio de los caballos muestreados eran de PRE (31%), otras razas frecuentes en la población objeto de estudio fueron el Caballo de Deporte Español (CDE), (11%), Pura Sangre Lusitano (PSL) y sus cruces (9%), caballos cruzados (8%), Silla Francés (SF), (6%) y Oldemburgo (5%). En menor proporción se incluyeron diversas razas árabes (4%), Belga, Hanoveriano y KWPN (3% cada una) y Holsteiner (2%). Las razas representadas de forma minoritaria en esta población fueron el Frisón, Húngaro, Menorquín, Pura Sangre Inglés (PSI) y Westfaliano, con un animal de cada raza contabilizado.

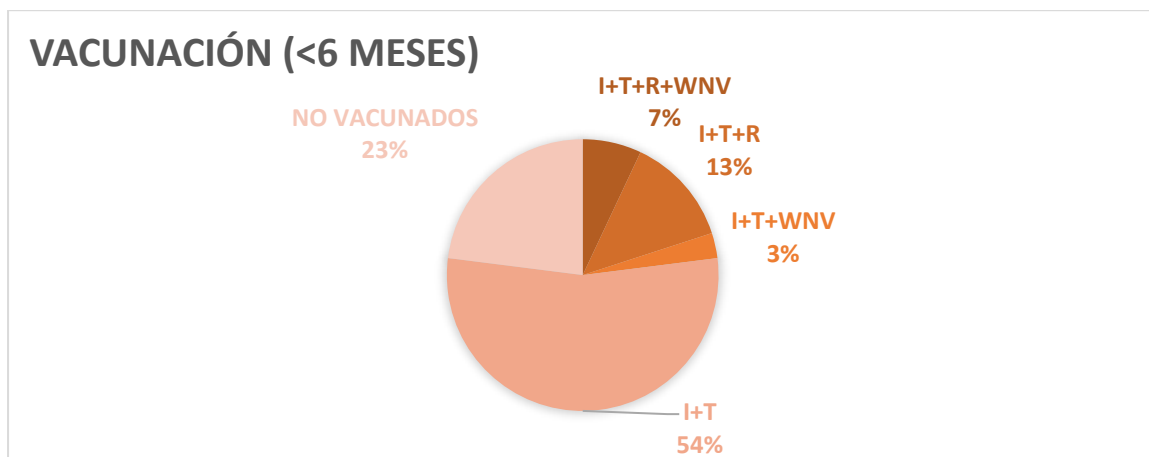
Figura 16. Gráfico sectorial de proporciones del sexo de la población de referencia.



De datos recopilados del sexo de los animales, la población muestral constó de un 29% de hembras y un 68% de machos, de los cuales un 46% fueron machos castrados y un 22% machos enteros.

La edad media de la población de estudio fue de 10 años, con una edad mínima de 2 años y máxima de 27 años.

Figura 17. Gráfico sectorial de proporciones de la vacunación de la población de referencia.

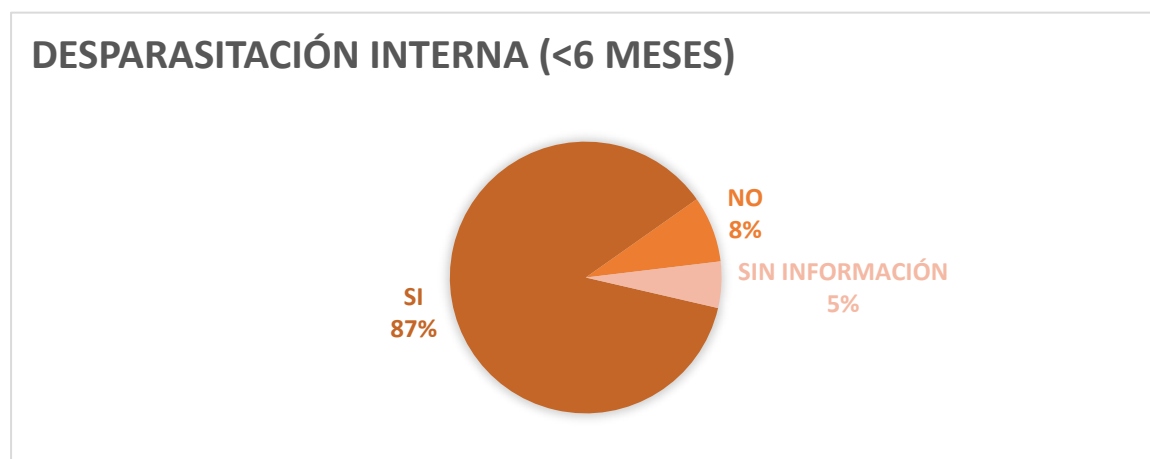


I, Influenza; T, Tétanos; R, Rinoneumonitis; WNV, Fiebre del Nilo Occidental.

Más de la mitad de los animales se encontraban vacunados frente a Influenza equina y Tétanos en los seis meses previos al muestreo (54%). Adicionalmente a la vacunación de Influenza equina y Tétanos, un 13% de los animales se encontraban vacunados frente a Rinoneumonitis equina, un 7% frente a Rinoneumonitis equina y virus de la Fiebre del Nilo Occidental y un 3% únicamente frente

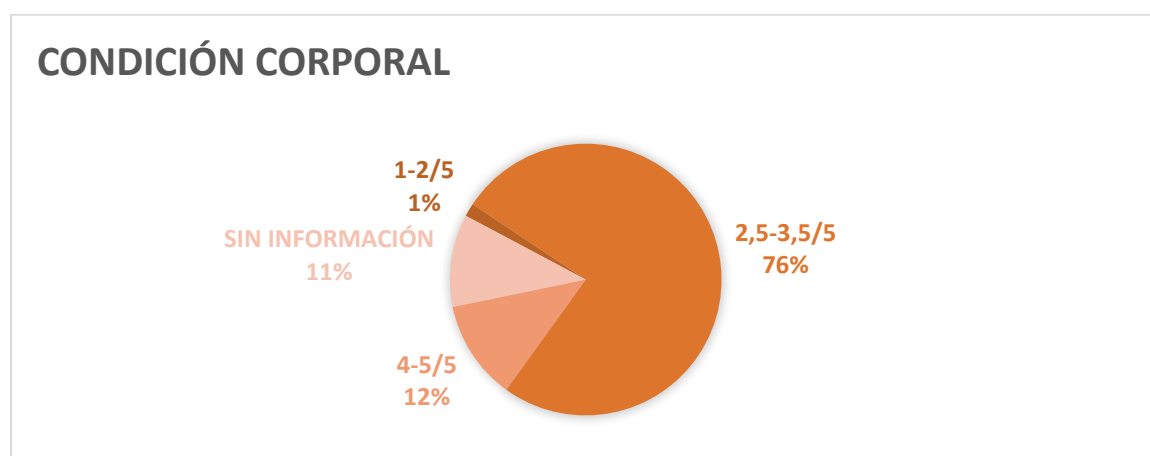
al virus de la Fiebre del Nilo Occidental. Un 23% de los caballos no habían recibido ninguna vacunación en el último semestre.

Figura 18. Gráfico sectorial de proporciones de la desparasitación de la población de referencia.



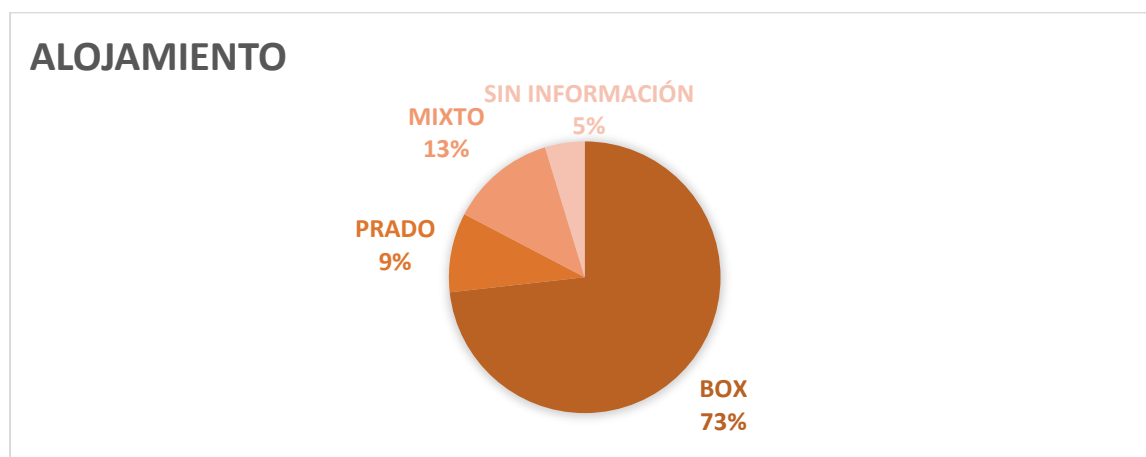
De los datos recopilados sobre desparasitación interna, el 87% de los equinos se encontraba desparasitado en el último semestre, mientras que el 8% no se encontraba desparasitado.

Figura 19. Gráfico sectorial de proporciones de la condición corporal de la población de referencia.



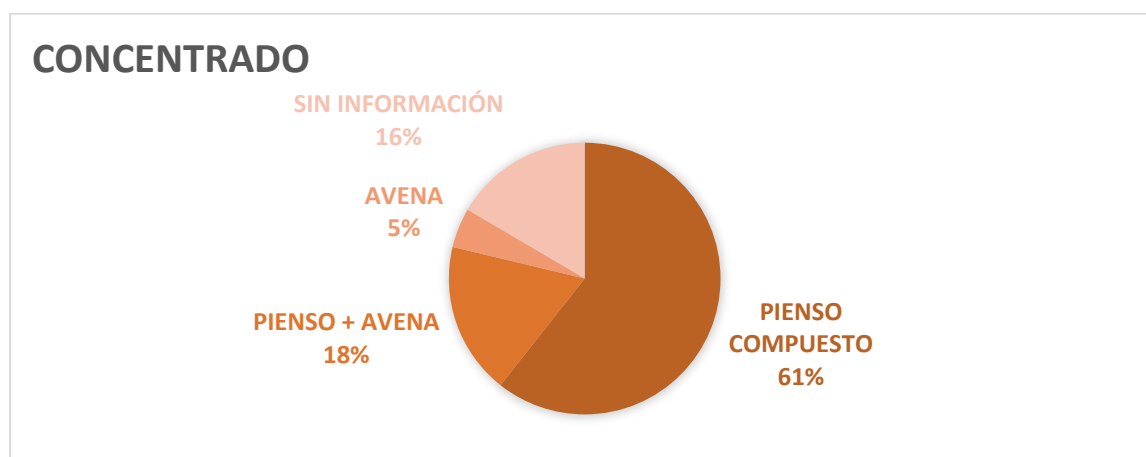
Sobre los caballos con información sobre la condición corporal, la mayoría de los animales de la población seleccionada (76%) se encontraba en el rango medio de la escala de condición corporal, es decir, de 2,5 a 3,5. Un 1% de los caballos sufría delgadez y un 12% sobrepeso.

Figura 20. Gráfico sectorial de proporciones del alojamiento de la población de referencia.



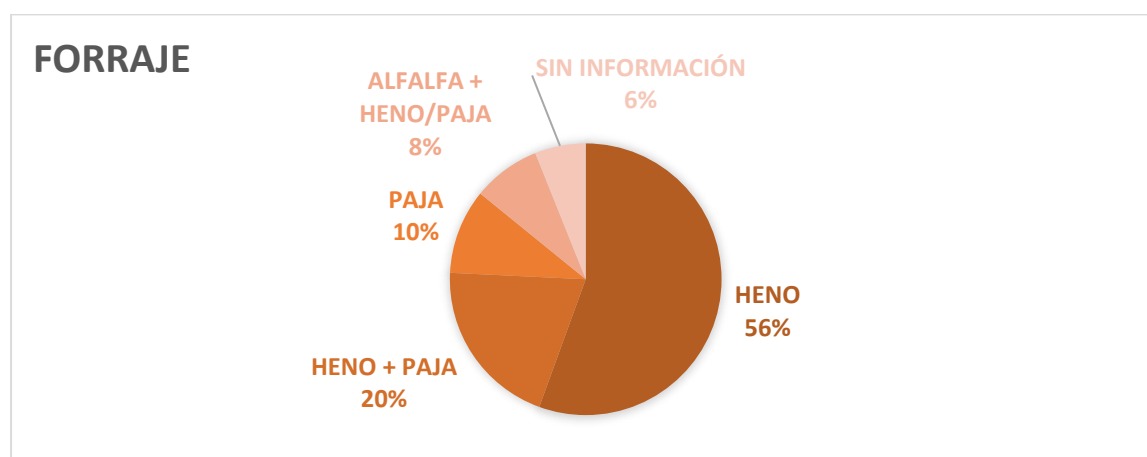
Los datos obtenidos sobre el alojamiento indicaron que casi tres cuartas partes de la población objeto de estudio se alojaba en un box o cuadra (73%), mientras que menos de un cuarto tenía acceso al exterior de forma habitual, bien mediante estabulación mixta box-exterior (13%), o bien por alojarse permanentemente en el exterior (9%).

Figura 21. Gráfico sectorial de proporciones del alimento concentrado de la población de referencia.



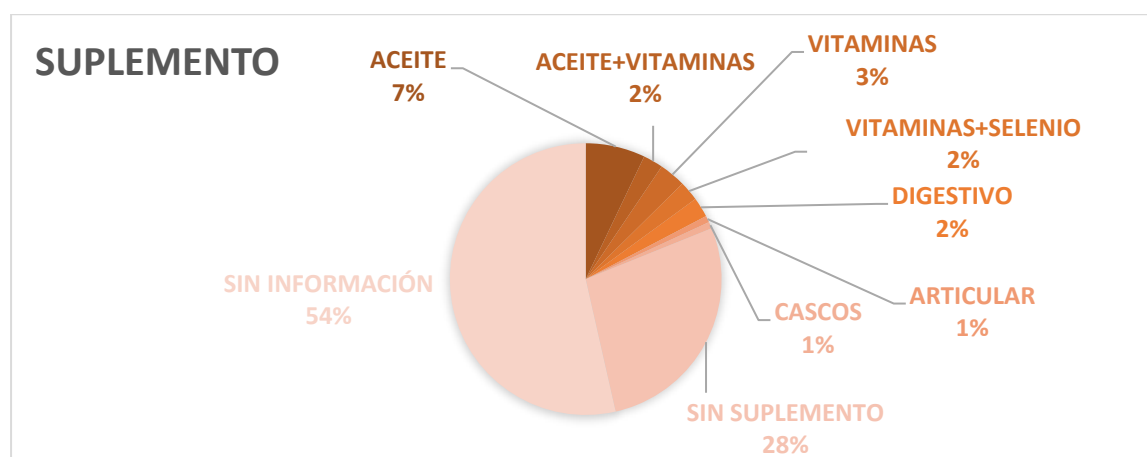
Acerca de la información recopilada sobre el concentrado, un 61% de los caballos consumían pienso compuesto, un 18% mezcla de pienso y avena y un 5% sólo recibían avena.

Figura 22. Gráfico sectorial de proporciones del forraje de la población de referencia.



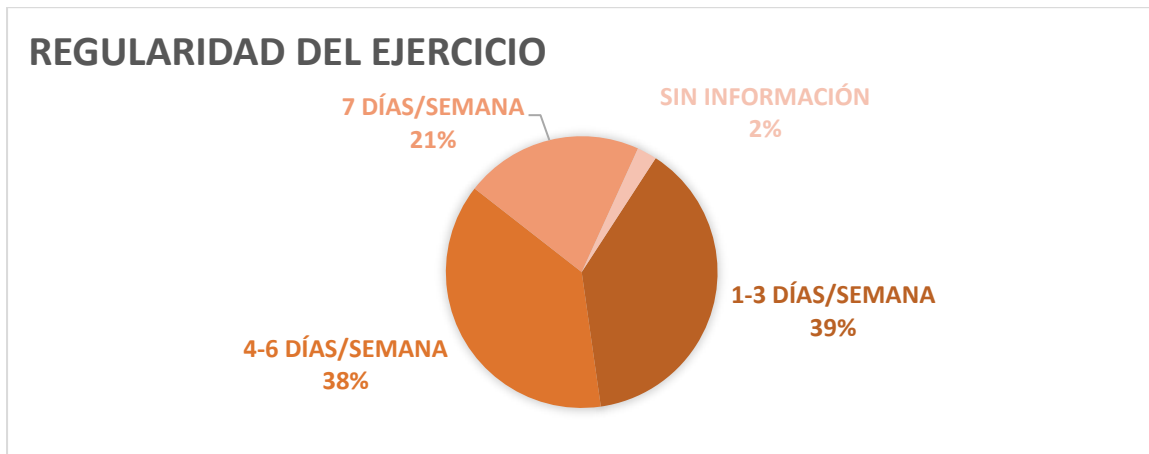
De la información obtenida acerca del forraje, algo más de la mitad de los animales consumían heno de avena (56%), un 20% heno mezclado con paja, un 10% sólo paja y un 8% una combinación de alfalfa y heno o paja.

Figura 23. Gráfico sectorial de proporciones del suplemento de la población de referencia.



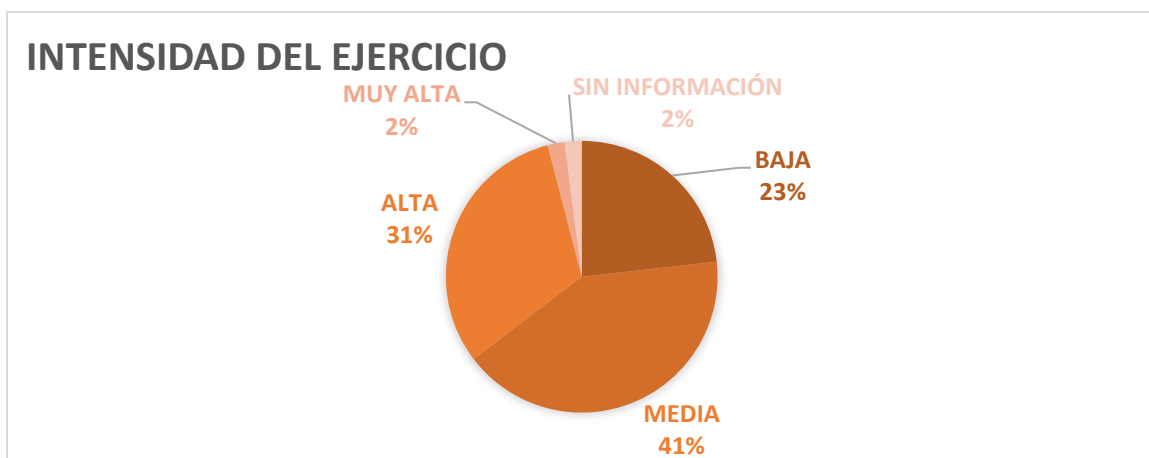
De los animales de los que se obtuvo información acerca de la suplementación alimenticia, el 28% de los caballos no tomaba ningún suplemento. Del 18% de los animales que si tomaban diariamente algún tipo de suplemento, aproximadamente la mitad (9%), consumía aceite sólo (7%), o combinado con otro suplemento (2%), un 5% vitaminas con o sin selenio, y una menor proporción recibía suplementos para el cuidado digestivo (2%), articular (1%), y de los cascos (1%).

Figura 24. Gráfico sectorial de proporciones de la regularidad del ejercicio de la población de referencia.



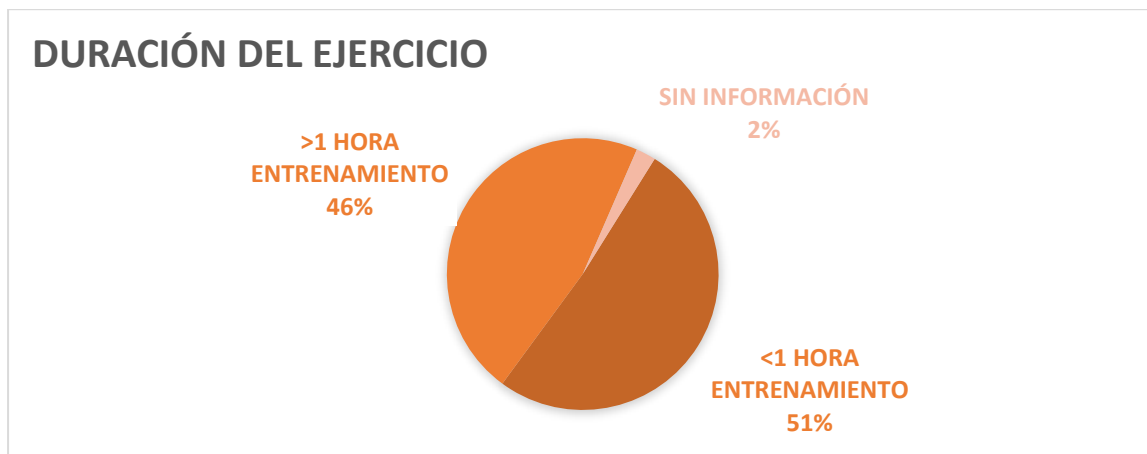
De los caballos con datos recopilados sobre la regularidad de entrenamientos semanales, un 39% de los caballos entrenaban de 0 a 3 días en semana, un 38% entrenaban de 4 a 6 días en semana y un 21% entrenaban todos los días.

Figura 25. Gráfico sectorial de proporciones de la intensidad del ejercicio de la población de referencia.



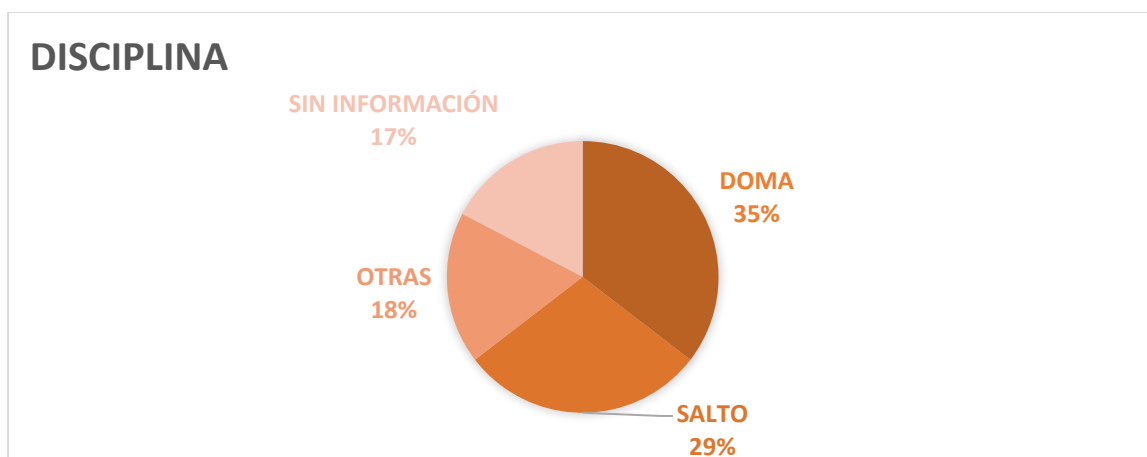
En los caballos con información sobre la intensidad del ejercicio, el 23% de los caballos desarrollaba un ejercicio de baja intensidad, el 41% de intensidad media, el 31% de intensidad alta y el 2% de intensidad muy alta.

Figura 26. Gráfico sectorial de proporciones de la duración del ejercicio de la población de referencia.



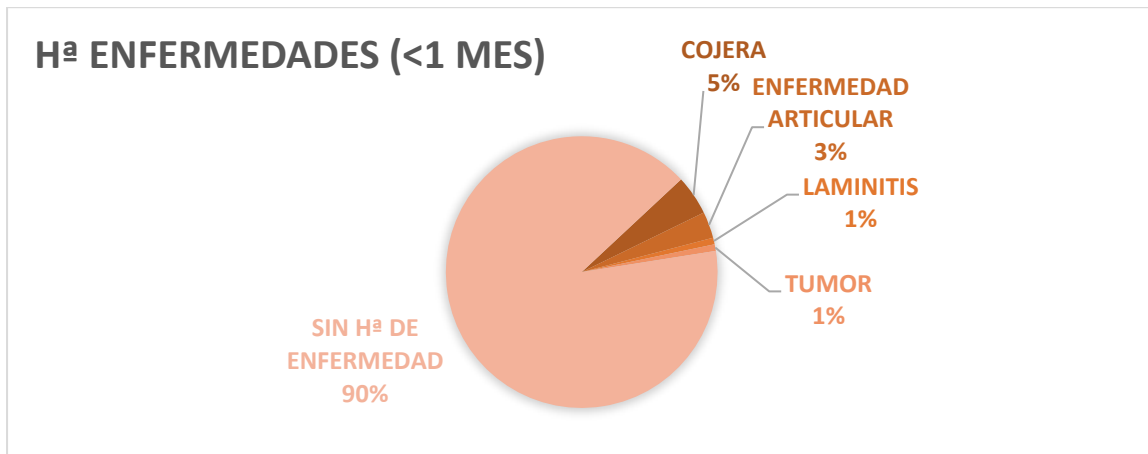
En los caballos incluidos en el estudio con información acerca de la duración del ejercicio, el 51% realizaba entrenamientos de menos de una hora, mientras que el 46% entrenaba más de una hora en cada sesión.

Figura 27. Gráfico sectorial de proporciones de la disciplina de la población de referencia.



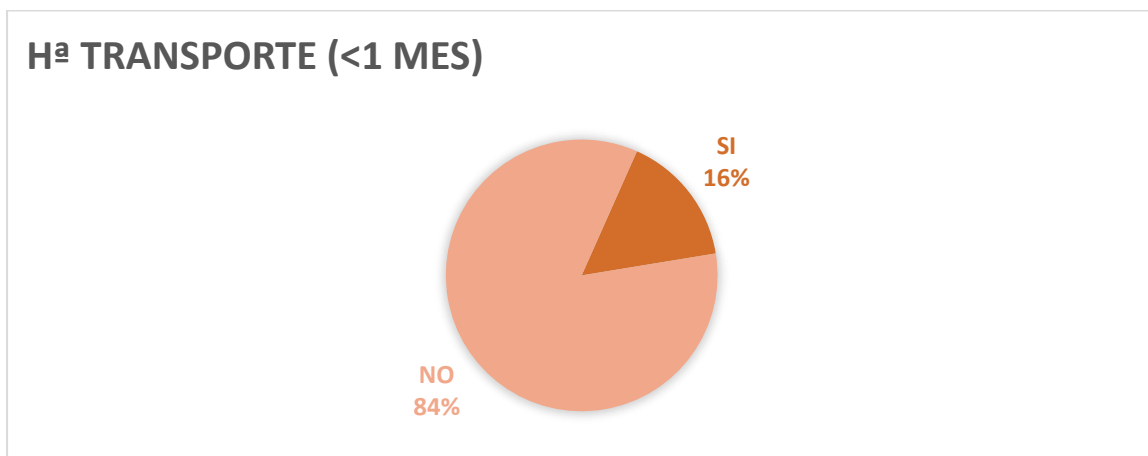
En cuanto a los datos obtenidos acerca de la disciplina, la más frecuente fue la doma clásica (35%), seguida del salto (29%). En menor proporción se muestrearon caballos de otras actividades (18%), tales como paseo, doma vaquera, rejoneo y enganches.

Figura 28. Gráfico sectorial de proporciones de la historia de enfermedades en el último mes de la población de referencia.



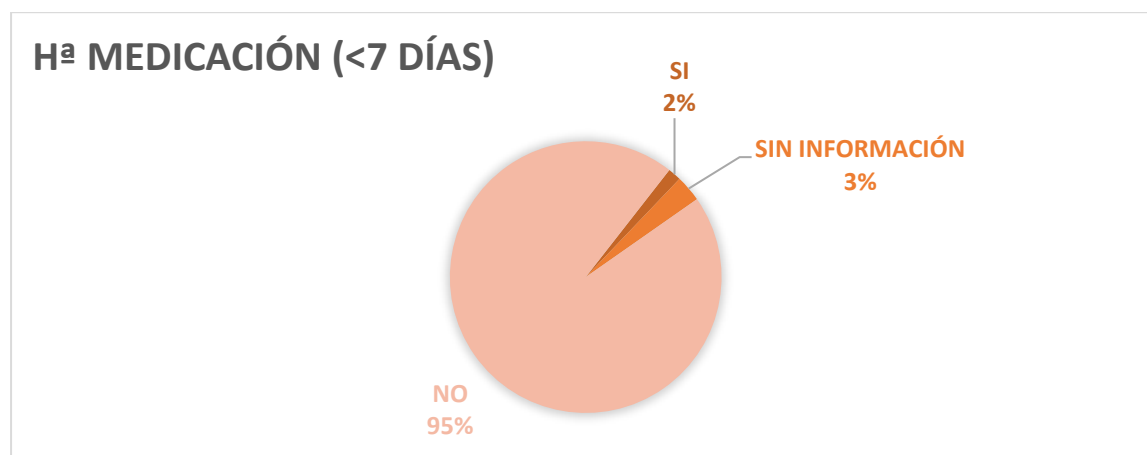
En cuanto al cuestionario sobre enfermedades padecidas en el último mes, la mayoría de los animales no sufrieron ninguna patología (90%), mientras que un pequeño porcentaje había padecido alguna patología ortopédica ya resuelta (5% de cojeras, 3% de enfermedad articular y 1% de laminitis) y un 1% algún tipo de neoplasia.

Figura 29. Gráfico sectorial de proporciones de la historia de transporte en el último mes de la población de referencia.



Respecto a los caballos sometidos a un transporte en el mes previo al estudio, hubo una ausencia de transporte en un 84% de la población y sólo un 16% de los caballos fueron transportados en el mes previo al muestreo.

Figura 30. Gráfico sectorial de proporciones de la historia de medicación en los últimos siete días de la población de referencia.



Por último, la mayoría de los animales no recibió ninguna medicación en los siete días previos al muestreo, mientras que un 2% si recibió algún tipo de medicación puntual, siendo xilacina e ivermectina los medicamentos utilizados.

4.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS LABORATORIAL E INTERVALOS DE REFERENCIA OBTENIDOS MEDIANTE DOS METODOLOGÍAS

Los resultados de los diferentes análisis – hematología, bioquímica y estrés oxidativo -, fueron recopilados en una hoja Excel® (Anexos 3, 4 y 5).

4.3.1. Método clásico: Reference Value Advisor

Durante el análisis mediante Reference Value Advisor se evidenciaron valores fuera de rango en cuatro yeguas mediante el método de Tukey, con enzimas hepáticas marcadamente por encima del resto de valores, por lo que se decidió excluir a estos animales del estudio. En consecuencia, la población de referencia quedó constituida por 123 caballos. El resto de los valores

fuera de rango sugeridos fueron evaluados y conservados, puesto que no se encontró evidencia para justificar su exclusión.

El test de Anderson Darling reveló que las siguientes variables seguían una distribución gaussiana:

- Hematología: GB, NEU%, LIN%, NEU, GR, Hct, VCM, HCM, RDW-CV.
- Bioquímica: U, PT, ALB, GLOB, Ca.
- Estrés oxidativo: TBARS y TAS.

El resto de los parámetros no mostraron una distribución gaussiana:

- Hematología: MON%, EO%, BAS%, LEU, MON, EO, BAS, Hb, CHCM, PLQ y VPM.
- Bioquímica: Cr, ALB/GLOB, AST, GGT, ALP, BT, BD, CK, LDH, P, TG, CT, BI, Ca/P y Fib.
- Estrés oxidativo: AU y 8-OHdG.

Por motivos técnicos (muestra insuficiente o inadecuada para el análisis) tras la realización de todos los análisis, la determinación de los valores de referencia se hizo a partir de 121 observaciones para la hematología, 121 observaciones para el análisis bioquímico y 120 observaciones para los marcadores de estrés oxidativo.

Se seleccionaron los métodos de análisis estándar de los datos sin transformar para la obtención de los datos estadísticos y no paramétrico para los IR de cada una de las variables. Esta información viene recogida para cada tipo de análisis en las Tablas 8, 9 y 10.

Tabla 8. Intervalos de referencia del análisis hematológico, calculados mediante la herramienta Reference Value Advisor.

Parámetros	Unidades convencionales	Unidades SI	n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	LRI	LRS	LRI 90% IC	LRS 90% IC	Distribución ^a	Método ^b
Hct	%	L/L	121	34,5	4,4	34,2	24,9	46,5	27,2	43,4	24,9 - 27,6	42,5 - 46,5	G	NP
GR	10 ⁹ /μl	10 ¹² /L	121	7,6	1,1	7,5	5,6	10,9	5,8	10,0	5,6 - 6,1	9,5 - 10,9	G	NP
Hb	g/dL	g/L	121	12,4	1,5	12,2	9,2	16,9	9,7	16,4	9,2 - 10,4	15,5 - 16,9	NG	NP
VCM	fL	fL	121	45,5	4,1	45,2	36,3	57,3	37,1	53,6	36,3 - 38,7	51,7 - 57,3	G	NP
CHCM	g/dL	g/L	121	36,1	2,7	35,6	30,0	41,3	30,4	41,0	30,0 - 31,6	40,8 - 41,3	NG	NP
HCM	pg	pg	121	16,3	1,1	16,2	13,9	20,4	14,4	18,2	13,9 - 14,7	17,8 - 20,4	G	NP
RDW-CV	%	%	121	19,4	0,9	19,4	17,1	21,3	17,6	21,0	17,1 - 17,8	20,6 - 21,3	G	NP
GB	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	121	7,3	1,7	7,3	3,7	12,1	3,8	10,5	3,7 - 4,3	10,0 - 12,1	G	NP
NEU	%	%	114	58,8	7,3	58,0	37,0	76,0	41,5	75,1	37,0 - 48,6	72,0 - 76,0	G	NP
NEU	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	114	4,2	1,2	4,2	2,0	7,7	2,1	6,9	2,0 - 2,4	6,5 - 7,7	G	NP
LIN	%	%	114	37,6	7,5	38,0	17,0	61,0	21,8	54,5	17,0 - 24,0	48,1 - 61,0	G	NP
LIN	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	114	2,7	0,9	2,6	1,0	5,7	1,2	4,7	1,0 - 1,6	4,4 - 5,7	NG	NP
MON	%	%	114	1,9	1,6	1,5	0,0	6,0	0,0	6,0	0,0 - 0,0	5,0 - 6,0	NG	NP
MON	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	114	0,1	0,1	0,1	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0 - 0,0	0,4 - 0,5	NG	NP
EO	%	%	114	1,7	1,8	1,0	0,0	11,0	0,0	6,1	0,0 - 0,0	5,0 - 11,0	NG	NP
EO	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	114	0,1	0,1	0,1	0,0	0,7	0,0	0,5	0,0 - 0,0	0,4 - 0,7	NG	NP
BAS	%	%	114	0,1	0,5	0,0	0,0	4,0	0,0	1,0	0,0 - 0,0	1,0 - 4,0	NG	NP
BAS	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	114	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0 - 0,0	0,1 - 0,2	NG	NP
PLQ	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	121	152,6	77,0	135,0	68,0	522,0	76	379	68 - 81	330 - 522	NG	NP
VPM	fL	fL	121	6,3	0,9	6,2	5,3	8,9	5,3	8,8	5,3 - 5,4	8,7 - 8,9	NG	NP

^a G, Gaussiana; NG, no Gaussiana.

^b NP, no paramétrico.

SI, sistema internacional; DE, desviación estándar; IR, intervalo de referencia; LRI, límite de referencia inferior; LRS, límite de referencia superior; IC, intervalo de confianza.

Tabla 9. Intervalos de referencia del análisis bioquímico, calculados mediante la herramienta Reference Value Advisor

Parámetros	Unidades convencionales	Unidades SI	n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	LRI	LRS	LRI 90% IC	LRS 90% IC	Distribución ^a	Método ^b
U	mg/dl	mmol/L	121	28,1	6,3	28,1	15,5	45,5	16,0	41,6	15,5 - 18,9	40,2 - 45,5	G	NP
Cr	mg/dl	μmol/L	121	1,4	0,3	1,4	0,7	2,9	0,9	2,2	0,7 - 1,0	2,0 - 2,9	NG	NP
PT	mg/dl	g/L	121	6,7	0,4	6,7	5,6	7,8	5,9	7,4	5,6 - 6,1	7,2 - 7,8	G	NP
ALB	mg/dl	g/L	121	3,2	0,3	3,2	2,3	4,2	2,7	3,7	2,3 - 2,8	3,7 - 4,2	G	NP
GLOB	mg/dl	g/L	121	3,4	0,4	3,4	2,4	5,0	2,6	4,3	2,4 - 2,8	4,1 - 5,0	NG	NP
ALB/GLOB			121	1,0	0,2	1,0	0,5	1,7	0,7	1,4	0,5 - 0,7	1,2 - 1,7	NG	NP
AST	U/L	μkat/L	121	268	48	265	157	421	196	386	157 - 200	352 - 421	NG	NP
GGT	U/L	μkat/L	121	12,1	5,4	11,0	2,0	28,0	3,0	27,9	2,0 - 5,0	23,0 - 28,0	NG	NP
ALP	U/L	μkat/L	121	289	104	271	84	727	96	532	84 - 161	445 - 727	NG	NP
BT	mg/dl	μmol/L	121	1,9	0,6	1,9	0,6	4,2	0,9	3,2	0,6 - 1,0	3,0 - 4,2	NG	NP
BD	mg/dl	μmol/L	121	0,3	0,1	0,3	0,1	0,7	0,2	0,5	0,1 - 0,2	0,5 - 0,7	NG	NP
BI	mg/dl	μmol/L	121	1,6	0,5	1,6	0,4	3,8	0,7	2,8	0,4 - 0,8	2,5 - 3,8	NG	NP
CK	U/L	U/L	121	203	119	174	77	909	88	670	77 - 91	369 - 909	NG	NP
LDH	U/L	U/L	121	720	250	685	241	1631	360	1315	242 - 382	1137 - 1631	NG	NP
Ca	mg/dl	mmol/L	121	12,5	0,7	12,5	10,5	15,3	11,0	13,8	10,5 - 11,4	13,4 - 15,3	G	NP
P	mg/dl	mmol/L	121	3,0	0,7	2,9	1,2	5,0	1,7	4,6	1,2 - 1,9	4,2 - 5,0	NG	NP
Ca/P			121	4,3	1,3	4,4	0,8	10,7	1,0	6,9	0,8 - 2,5	6,1 - 10,7	NG	NP
TG	mg/dl	mmol/L	121	22,8	10,8	20,7	5,8	66,0	7,7	56,4	5,8 - 8,8	43,3 - 66,0	NG	NP
CT	mg/dl	mmol/L	121	102	18	100	71	180	73	147	71 - 78	134 - 180	NG	NP
Fib	mg/dl	g/L	119	195	59	200	100	400	100	300	100 - 100	300 - 400	NG	NP

^aG, Gaussiana; NG, no Gaussiana.

^bNP, no paramétrico.

SI, sistema internacional; DE, desviación estándar; IR, intervalo de referencia; LRI, límite de referencia inferior; LRS, límite de referencia superior; IC, intervalo de confianza.

Tabla 10. Intervalos de referencia del análisis de marcadores de estrés oxidativo, calculados mediante la herramienta Reference Value Advisor

Parámetros	Unidades convencionales	Unidades SI	n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	LRI	LRS	LRI 90% IC	LRS 90% IC	Distribución ^a	Método ^b
AU	mg/dL	mmol/L	120	0,5	0,2	0,5	0,1	1,1	0,3	0,9	0,1 - 0,3	0,8 - 1,1	NG	NP
TBARS	µM	nmol/ml	120	0,7	0,4	0,7	0,1	1,7	0,1	1,6	0,1 - 0,1	1,5 - 1,7	G	NP
TAS	mmol/L	mmol/L	120	1,7	0,4	1,7	0,3	2,7	1,0	2,4	0,3 - 1,1	2,2 - 2,7	G	NP
8-OHdG	ng/ml	ng/ml	120	3,5	1	3,4	1,2	7,1	1,7	5,8	1,2 - 2,1	5,6 - 7,1	NG	NP

^aG, Gaussiana; NG, no Gaussiana.

^bNP, no paramétrico.

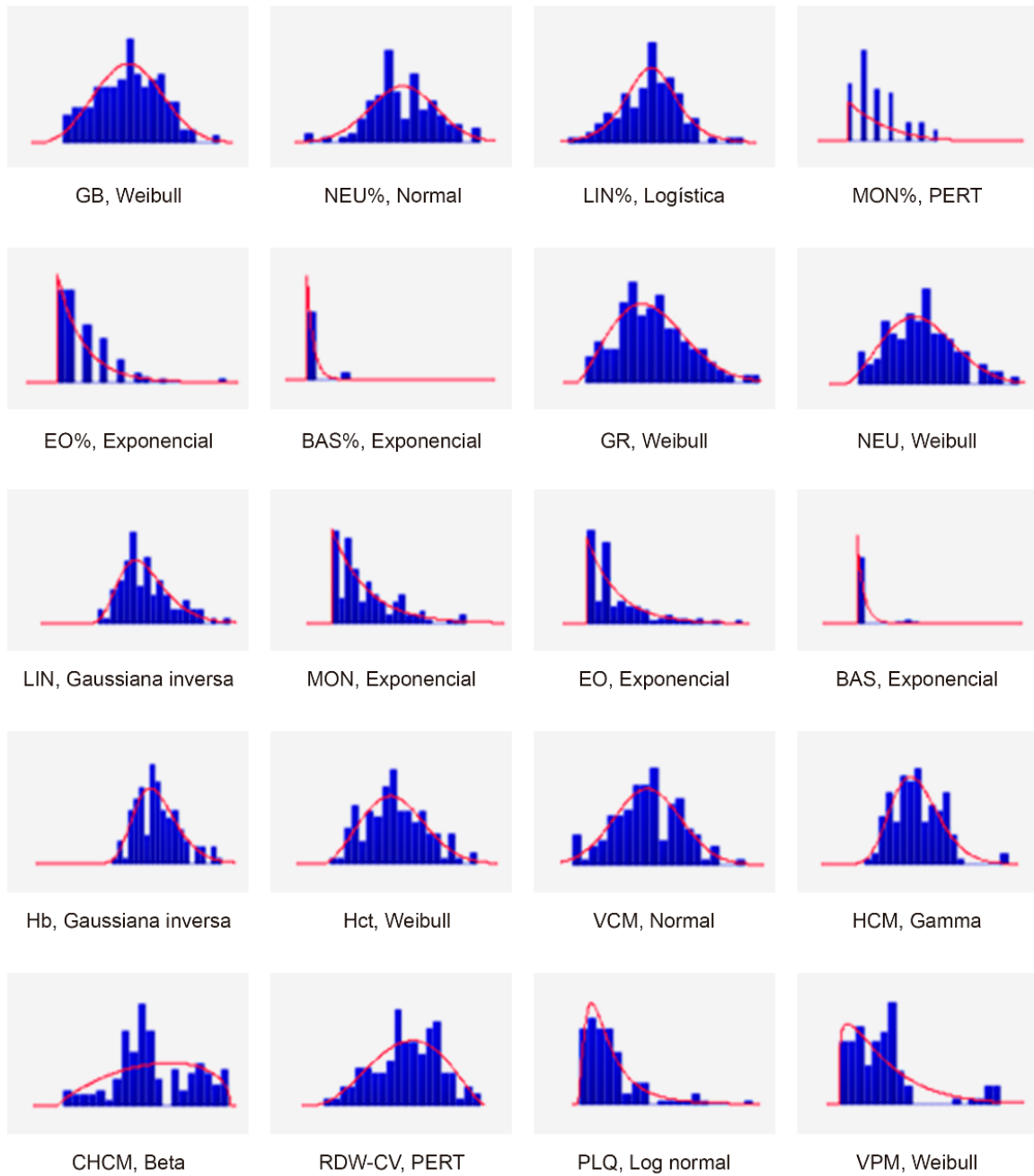
SI, sistema internacional; DE, desviación estándar; IR, intervalo de referencia; LRI, límite de referencia inferior; LRS, límite de referencia superior; IC, intervalo de confianza.

4.3.2. Método alternativo: @RISK

El análisis mediante @RISK generó a partir de los datos de cada variable, el histograma y la línea de ajuste, el ranking de distribuciones que mejor se adecuaron, los criterios de información, los estadísticos de distribución y percentiles, y los parámetros y pruebas calculados a partir del Bootstrap (prueba Chi-Cuadrado, Anderson-Darling y Kolmogórov-Smirnov).

Las distribuciones que mejor se ajustaron a los datos de las variables de la hematología se encuentran representadas en la Figura 31.

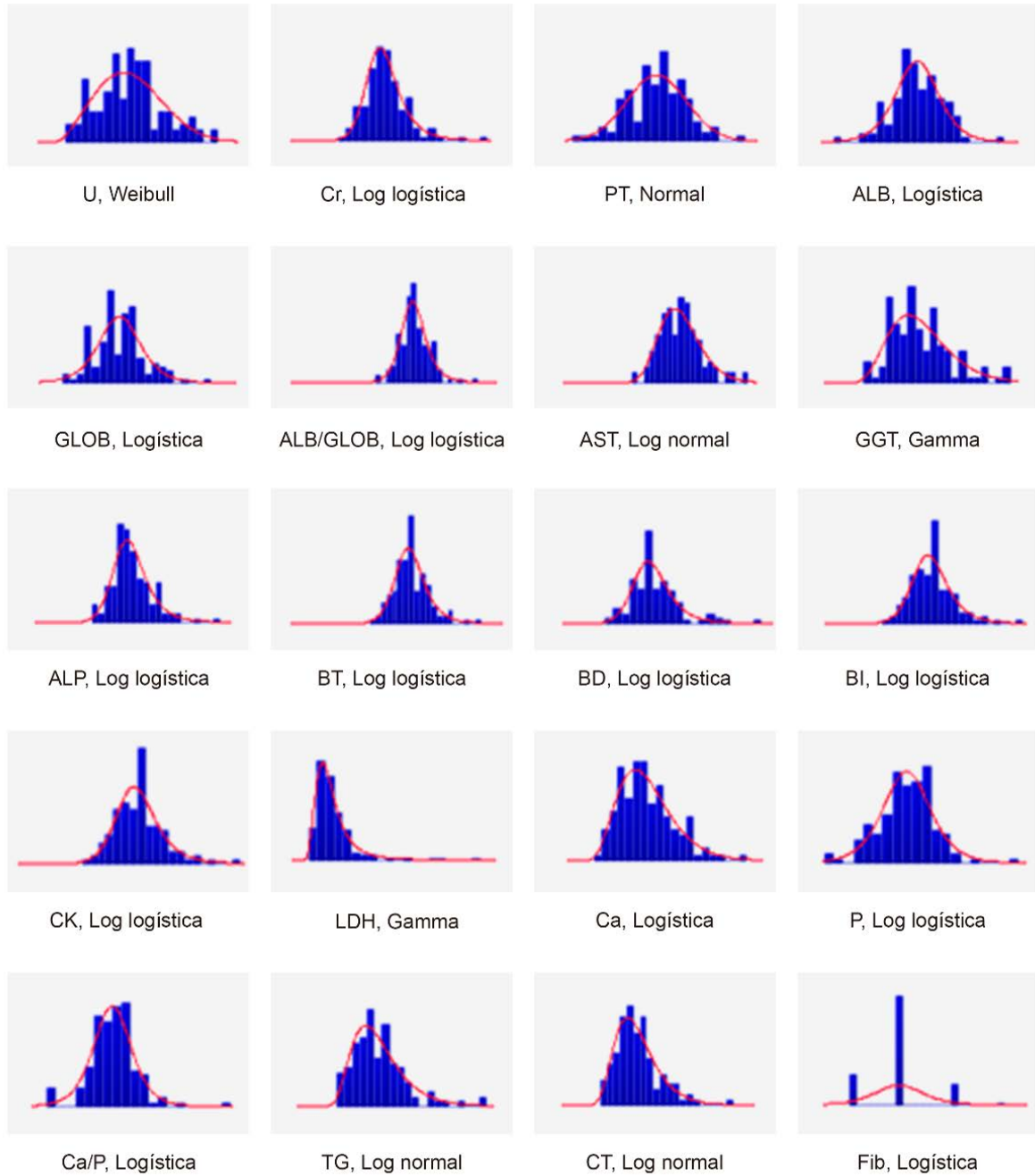
Figura 31. Distribuciones con mejor ajuste para cada variable de la hematología.



Fuente: @RISK

En el análisis bioquímico, las distribuciones que mejor se ajustaron a los valores observados para cada una de las variables, se encuentran representadas en la Figura 32.

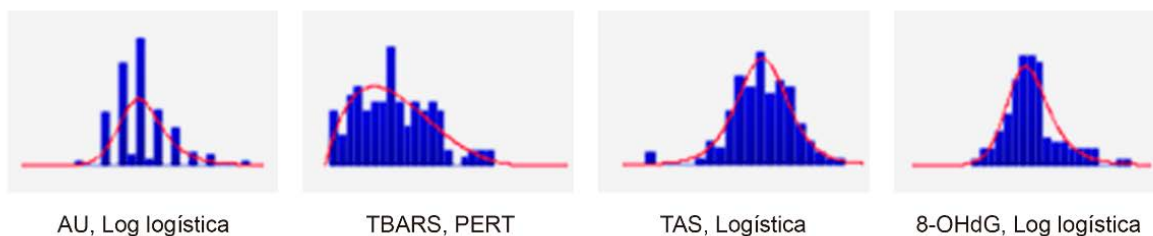
Figura 32. Distribuciones con mejor ajuste para cada variable del análisis bioquímico.



Fuente: @RISK

En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo, las distribuciones que mejor explicaron los datos obtenidos se encuentran representadas en la Figura 33.

Figura 33. Distribuciones con mejor ajuste para cada variable del análisis de marcadores de estrés oxidativo.



Fuente: @RISK.

A partir de los datos obtenidos con este método, se cumplimentó una tabla con los parámetros de referencia para cada analito, incluida en las Tablas 11, 12 y 13.

Tabla 11. Intervalos de referencia del análisis hematológico, calculados mediante la herramienta @RISK.

Parámetros	Unidades Convencionales	Unidades SI	n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	LRI	LRI	LRI 90% IC	LRS 90% IC	Distribución ^a	Distribución con mejor ajuste
Hct	%	L/L	121	34,5	4,4	34,2	24,0	+∞	26,8	43,6	24,9 - 27,6	42,5 - 46,5	G	Weibull
GR	10 ⁹ /μl	10 ¹² /L	121	7,6	1,1	7,5	5,4	+∞	5,9	9,9	5,6 - 6,1	9,5 - 10,9	G	Weibull
Hb	g/dL	g/L	121	12,4	1,5	12,2	5,6	+∞	9,9	15,9	9,2 - 10,4	15,5 - 16,9	NG	InvGauss
VCM	fL	fL	121	45,5	4,1	45,5	-∞	+∞	37,5	53,5	36,3 - 38,7	51,7 - 57,3	G	Normal
CHCM	g/dL	g/L	121	36,2	2,8	36,4	29,6	41,4	30,8	40,9	30,0 - 31,6	40,8 - 41,3	NG	Beta
HCM	pg	pg	121	16,3	1,1	16,2	12,2	+∞	14,4	18,7	13,9 - 14,7	17,8 - 20,4	G	Gamma
RDW-CV	%	%	121	19,4	0,9	19,4	16,7	21,5	17,6	20,9	17,1 - 17,8	20,6 - 21,3	G	Pert
GB	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	121	7,3	1,7	7,2	2,4	+∞	4,1	10,7	3,7 - 4,3	10,0 - 12,1	G	Weibull
NEU	%	%	114	58,8	7,3	58,8	-∞	+∞	44,4	73,2	37,0 - 49,0	71,0 - 76,0	G	Normal
NEU	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	114	4,2	1,2	4,2	1,6	+∞	2,2	6,7	2,0 - 2,4	6,5 - 7,7	G	Weibull
LIN	%	%	114	37,7	7,6	37,7	-∞	+∞	22,3	53,0	17,0 - 24,0	48,0 - 61,0	G	Logistic
LIN	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	114	2,7	0,9	2,6	-0,3	+∞	1,3	4,8	1,0 - 1,6	4,4 - 5,7	NG	InvGauss
MON	%	%	114	1,9	1,6	1,5	-7,40E-09	11,3	0,1	5,9	0,0 - 0,0	5,0 - 6,0	NG	Pert
MON	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	114	0,1	0,1	0,1	-0,001	+∞	0,0	0,5	0,0 - 0,0	0,4 - 0,5	NG	Expon
EO	%	%	114	1,7	1,7	1,2	-0,01	+∞	0,0	6,3	0,0 - 0,0	5,0 - 11,0	NG	Expon
EO	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	114	0,1	0,1	0,1	-0,001	+∞	0,0	0,5	0,0 - 0,0	0,4 - 0,7	NG	Expon
BAS	%	%	114	0,1	0,1	0,1	-0,001	+∞	0,0	0,5	0,0 - 0,0	1,0 - 4,0	NG	Expon
BAS	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	114	0,0	0,0	0,0	-8,77E-05	+∞	0,0	0,04	0,0 - 0,0	0,07 - 0,23	NG	Expon
PLQ	10 ³ /μl	10 ⁹ /L	121	152,9	80,7	130,3	57,9	+∞	75	365	68 - 81	330 - 522	NG	Lognorm
VPM	fL	fL	121	6,3	0,9	6,0	5,3	+∞	5,3	8,5	5,3 - 5,4	8,7 - 8,9	NG	Weibull

^aG, Gaussiana; NG, no Gaussiana.

SI, sistema internacional; DE, desviación estándar; IR, intervalo de referencia; LRI, límite de referencia inferior; LRS, límite de referencia superior; IC, intervalo de confianza.

Intervalos de confianza del 90% calculados manualmente según recomendaciones de la IFCC.

Tabla 12. Intervalos de referencia del análisis bioquímico, calculados mediante la herramienta @RISK.

Parámetros	Unidades Convencionales	Unidades SI	n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	LRI	LRS	LRI 90% IC	LRS 90% IC	Distribución ^a	Distribución con mejor ajuste
U	mg/dL	mmol/L	121	28,1	6,3	27,7	13,6	+∞	17,3	41,5	15,51 - 18,86	40,2 - 45,5	G	Weibull
Cr	mg/dL	μmol/L	121	1,4	0,3	1,4	0,3	+∞	0,9	2,1	0,7 - 1,0	2,0 - 2,9	NG	LogLogistic
PT	mg/dL	g/L	121	6,7	0,4	6,7	-∞	+∞	5,9	7,4	5,6 - 6,1	7,2 - 7,8	G	Normal
ALB	mg/dL	g/L	121	3,3	0,3	3,3	-∞	+∞	2,7	3,8	2,3 - 2,8	3,7 - 4,2	G	Logistic
GLOB	mg/dL	g/L	121	3,4	0,4	3,4	-∞	+∞	2,5	4,3	2,4 - 2,8	4,1 - 5,0	G	Logistic
ALB/GLOB			121	1,0	0,2	1,0	-0,3	+∞	0,7	1,4	0,5 - 0,7	1,2 - 1,7	NG	LogLogistic
AST	U/L	μkat/L	121	268	48	264	21,8	+∞	188	375	157 - 200	352 - 421	NG	LogNorm
GGT	U/L	μkat/L	121	12,1	5,4	11,4	-1,1	+∞	3,7	24,7	2,0 - 5,0	23 - 28	NG	Gamma
ALP	U/L	μkat/L	121	289	105	276	-112,5	+∞	122	532	84 - 161	445 - 727	NG	LogLogistic
BT	mg/dL	μmol/L	121	1,9	0,6	1,9	-1,2	+∞	0,9	3,2	0,6 - 1,0	3,0 - 4,2	NG	LogLogistic
BD	mg/dL	μmol/L	121	0,3	0,1	0,3	0,02	+∞	0,2	0,5	0,1 - 0,2	0,5 - 0,7	NG	LogLogistic
BI	mg/dL	μmol/L	121	1,6	0,5	1,6	-1,0	+∞	0,7	2,8	0,4 - 0,8	2,5 - 3,8	NG	LogLogistic
CK	U/L	U/L	121	200	126	173	60,8	+∞	92	471	77 - 91	369 - 909	NG	LogLogistic
LDH	U/L	U/L	121	720	249	686	131,9	+∞	338	1300	241 - 382	1137 - 1631	NG	Gamma
Ca	mg/dL	mmol/L	121	12,5	0,7	12,5	-∞	+∞	11,1	13,9	10,5 - 11,4	13,4 - 15,3	G	Logistic
P	mg/dL	mmol/L	121	3,0	0,7	2,9	-0,8	+∞	1,7	4,6	1,2 - 1,9	4,2 - 5,0	NG	LogLogistic
Ca/P			121	4,3	1,2	4,3	-∞	+∞	1,9	6,8	0,8 - 2,5	6,1 - 10,7	NG	Logistic
TG	mg/dL	mmol/L	121	22,8	10,7	20,8	-3,4	+∞	7,8	48,8	5,8 - 8,8	43,3 - 66,0	NG	LogNorm
CT	mg/dL	mmol/L	121	102	18	99	49,4	+∞	75	145	71 - 78	134 - 180	NG	LogNorm
Fib	mg/dL	g/L	119	195	56	195	-∞	+∞	82	309	100 - 100	300 - 400	NG	Logistic

^aG, Gaussiana; NG, no Gaussiana.

SI, sistema internacional; DE, desviación estándar; IR, intervalo de referencia; LRI, límite de referencia inferior; LRS, límite de referencia superior; IC, intervalo de confianza.

Intervalos de confianza del 90% calculados manualmente según recomendaciones de la IFCC.

Tabla 13. Intervalos de referencia del análisis de estrés oxidativo, calculados mediante la herramienta @RISK

Parámetros	Unidades convencionales	Unidades SI	n	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo	Límite inferior IR	Límite superior IR	LRI 90% IC	LRS 90% IC	Distribución ^a	Distribución con mejor ajuste ^b
AU	mg/dL	mmol/L	120	0,5	0,2	0,5	0,1	1,1	0,2	0,9	0,1 - 0,3	0,8 - 1,1	NG	LogLogistic
TBARS	μM	nmol/ml	120	0,7	0,4	0,6	0,1	1,7	0,1	1,5	0,1 - 0,1	1,5 - 1,7	G	Pert
TAS	mmol/L	mmol/L	120	1,7	0,4	1,7	0,3	2,7	0,9	2,5	0,3 - 1,1	2,2 - 2,7	G	Logistic
8-OHdG	ng/ml	ng/ml	120	3,4	1,0	3,3	1,2	7,1	1,8	5,8	1,2 - 2,1	5,6 - 7,1	NG	LogLogistic

^aG, Gaussiana; NG, no Gaussiana.
^bNP, no paramétrico.
SI, sistema internacional; DE, desviación estándar; IR, intervalo de referencia; LRI, límite de referencia inferior; LRS, límite de referencia superior; IC, intervalo de confianza.

4.3.3. Comparación de los intervalos de referencia estimados con la bibliografía

Los resultados obtenidos al comparar los IR estimados de elección, calculados con la herramienta @RISK, con los IR publicados en la bibliografía, se muestran en las Tablas 14, 15 y 16.

Tabla 14. Comparación de los IR estimados en el análisis hematológico con la bibliografía.

Parámetros	IR @RISK		IR bibliografía ¹		Diferencia valores LI	Diferencia valores LS
Hct	27	44	31	43	4	-1
GR	5,9	9,9	6,2	10,2	0	0
Hb	9,9	15,9	11,1	15,9	1	0
VCM	37	53	40	50	3	-3
CHCM	31	41	34	39	3	-2
HCM	14	19	15	19	1	0
RDW-CV	18	21	17	21	-1	0
GB	4,1	10,7	4,4	12,0	0	1
NEU	2,2	6,7	2,0	6,9	0	0
LIN	1,3	4,8	1,5	5,6	0	1
MON	0,0	0,5	0,2	0,6	0	0
EO	0,0	0,5	0,1	0,7	0	0
BAS	0,0	0,0	0,0	0,1	0	0
PLQ	75	365	100	250	25	-115
VPM	5,3	8,5	5,6	8,3	0	0

¹Datos publicados de diferentes autores¹⁹⁹⁻²⁰¹. LI, límite inferior; LS, límite superior.

Tabla 15. Comparación de los IR estimados en el análisis bioquímico con la bibliografía.

Parámetros	IR @RISK		IR bibliografía ¹		Diferencia valores LI	Diferencia valores LS
U	17,3	41,5	15,0	44,0	-2	2
Cr	0,9	2,1	1,0	1,9	0	0
PT	5,9	7,4	5,8	7,9	0	0
ALB	2,7	3,8	2,7	3,7	0	0
GLOB	2,5	4,3	2,4	4,5	0	0
ALB/GLOB	0,7	1,4	0,7	1,5	0	0
AST	188	375	102	350	-86	-25
GGT	3,7	24,7	1,0	40,0	-3	15
ALP	122	532	89	268	-33	-264
BT	0,9	3,2	0,9	2,8	0	0
BD	0,2	0,5	0,3	0,7	0	0
BI	0,7	2,8	0,6	2,1	0	-1
CK	92	471	82	303	-10	-168
LDH	338	1300	146	536	-192	-764
Ca	11,1	13,9	11,2	13,0	0	-1
P	1,7	4,6	2,0	4,7	0	0
Ca/P	1,9	6,8	5,6	2,8	4	-4
TG	7,8	48,8	12,0	54,0	4	5
CT	75	145	66	114	-9	-31
Fib	82	309	30	390	-52	81

¹Datos publicados de diferentes autores^{27,199,201}. LI, límite inferior; LS, límite superior.

Tabla 16. Comparación de los IR estimados del análisis de estrés oxidativo con la bibliografía.

Parámetros	IR @RISK		IR bibliografía ¹		Diferencia valores LI	Diferencia valores LS
AU	0,2	0,9	0,2	1,0	-0,1	0,1
TBARS	0,1	1,5	1,5	3,1	1,4	1,6
TAS	0,9	2,5	0,7	0,8	-0,3	-1,7
8-OHdG	1,8	5,8	1,2	1,4	-0,6	-4,4

¹Datos publicados de diferentes autores^{60,63,77,97}. LI, límite inferior; LS, límite superior.

4.4. ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS

Para el análisis estadístico del efecto de la información recogida en el cuestionario sobre las variables analíticas, en primer lugar se realizó una codificación del cuestionario, clasificando cada dato en las categorías indicadas en la Tabla 17.

Tabla 17. Datos del cuestionario, con sus respectivas categorías y codificación asignadas, incluyendo número de observaciones sobre el total de animales y su expresión en porcentaje. Los datos sin información asociada se contabilizaron aparte y no fueron codificados.

DATOS DEL CUESTIONARIO	CATEGORÍA	CÓDIGO	Nº OBSERVACIONES	PORCENTAJE
FECHA DE MUESTREO	Invierno (21 dic – 20 mar)	1	55	45
	Primavera (21 mar – 20 jun)	2	44	36
	Otoño (21 sept – 20 dic)	3	24	20
HORA DE MUESTREO	Mañana (hasta las 12:00)	1	70	57
	Tarde (desde las 12:01)	2	24	20
EDAD	De 2 a 8	1	54	44
	De 9 a 16	2	53	43
	De 17 a 27	3	11	9
SEXO	Macho entero	1	28	23
	Macho castrado	2	58	47
	Hembra	3	33	27
	Macho (sin determinar)	-	4	3
RAZA	Ibérico	1	47	38
	Europeo	2	45	37
	Otras	3	17	14
VACUNACIÓN	Vacunados	1	104	85
	No vacunados	2	15	12
DESPARASITACIÓN	Desparasitados	1	110	89
	No desparasitados	2	6	5
CONDICIÓN CORPORAL	Óptima	1	92	75
	No óptima	2	17	14
ALOJAMIENTO	Box	1	93	76
	Acceso al exterior	2	24	20
DIETA (CONCENTRADO)	Pienso compuesto	1	100	81
	Sólo avena	2	6	5
DIETA (FORRAJE)	Heno	1	102	83
	Paja	2	13	11
SUPLEMENTACIÓN	Con suplementación	1	24	20
	Sin suplementación	2	35	28
REGULARIDAD EJERCICIO	Baja (1-3 días/semana)	1	45	37
	Media (4-6 días/semana)	2	48	39
	Alta (7 días/semana)	3	27	22
INTENSIDAD EJERCICIO	Baja	1	25	20
	Media	2	52	42
	Alta	3	43	35

DATOS DEL CUESTIONARIO	CATEGORÍA	CÓDIGO	Nº OBSERVACIONES	PORCENTAJE
DURACIÓN EJERCICIO	Menos de 1 hora	1	61	50
	Más de 1 hora	2	59	48
DISCIPLINA	Doma	1	45	37
	Salto	2	37	30
	Paseo/otras	3	23	19
Hª DE TRANSPORTE EN EL ÚLTIMO MES	Transporte	1	16	13
	Sin transporte	2	107	87
Hª DE ENFERMEDADES EN EL ÚLTIMO MES	Enfermedad si/no	1/2	17/106	14/86
	Cojera si/no	1/2	10/113	8/92
	Enfermedad articular si/no	1/2	5/118	4/96
	Laminitis si/no	1/2	1/122	1/99
	Tumor si/no	1/2	1/122	1/99
Hª DE MEDICACIÓN EN LOS ÚLTIMOS 7 DÍAS	Medicación si/no	1/2	2/121	2/98
Nº TOTAL DE OBSERVACIONES / PORCENTAJE TOTAL			123	100

Las diferentes razas se clasificaron en tres grupos: el grupo **ibérico**, que comprendía las razas, PRE y PSL y sus cruces; el grupo **europeo**, que comprendía las razas belga, CDE, hanoveriano, holsteiner, húngaro, KWPN, oldenburgo, PSI, SF y westfaliano; y el grupo **otras**, que incluyó las razas árabe y sus cruces, frisón, menorquina y los caballos cruzados.

Para la clasificación según la condición corporal, se consideró **óptima**, en los animales con una puntuación de entre 2,5 y 3,5, en una escala del 1 al 5²⁰², y **no óptima**, en los animales con puntuaciones del 1 al 2 y del 4 al 5, sobre 5.

4.4.1. Análisis univariable

Para el análisis univariable se tuvieron en cuenta los datos del cuestionario cuyas categorías cumplían una proporción 1:4, siendo estas: fecha de muestreo, hora de muestreo, sexo, edad, raza, suplementación, alojamiento, regularidad de ejercicio, intensidad de ejercicio, duración de ejercicio y disciplina. No obstante, la categoría suplementación se descartó del análisis debido a la heterogeneidad de los productos administrados.

A) Análisis univariable de los parámetros analíticos y los factores asociados.

Como resultado de los test no paramétricos de asociación entre cada parámetro analítico y las categorías del cuestionario, se obtuvo un valor de p, representado en el Anexo 9. En el Anexo 10 se resumen de forma gráfica las asociaciones significativas de cada analito.

Existieron diferencias significativas en el número de GB con menores recuentos en invierno, y mayores en primavera y otoño. Los GB fueron significativamente mayores en el grupo de razas ibéricas que en las razas europeas o en el grupo de otras razas. El recuento de GB fue mayor en caballos con nivel de entrenamiento bajo, tanto en regularidad como en intensidad y menor en caballos con nivel de entrenamiento medio o alto. Los caballos de salto tenían un recuento de GB significativamente más bajo que los caballos de doma o de otras disciplinas.

El recuento de NEU fue significativamente menor en invierno que en primavera y otoño. También fue significativamente mayor en las razas ibéricas, comparado con el grupo otras razas. Los caballos que entrenaban diariamente tenían un recuento de NEU menor que los equinos que entrenaban con menor frecuencia.

En invierno se observó un recuento significativamente menor de LIN, comparado con primavera y otoño. En las razas ibéricas, el recuento de LIN fue más elevado que en las razas europeas u otras razas. En animales con frecuencia de entrenamiento baja, el recuento fue más elevado que en caballos con mayor frecuencia de entrenamiento. Los caballos de salto tenían menor recuento de LIN que los caballos de doma u otras disciplinas.

El recuento de EO fue significativamente menor en invierno que en otoño. Se observaron diferencias significativas entre el recuento de EO de los caballos que habitaban exclusivamente en box, y los que tenían acceso al exterior, siendo más elevado en este último.

El recuento de BAS fue mayor en los caballos que entrenaban más de una hora, comparado con los que entrenaban menos de una hora.

Los GR fueron más altos en los equinos de entre 2 y 8 años, que en los caballos de entre 9 y 16 años y los de entre 17 y 27 años. Los machos tenían mayor recuento de GR que las hembras. Dentro del grupo machos, los machos enteros tenían mayor recuento de GR que los machos castrados. Los animales destinados a la doma tenían un mayor recuento de GR que los destinados al salto.

La Hb en los equinos muestreados en primavera fue significativamente más elevada que la de los equinos muestreados en otoño. Los machos, y más concretamente los machos enteros, tenían mayor nivel de Hb que las hembras. Los animales estabulados tenían más Hb que los que tenían acceso al exterior.

El Hct fue más elevado en los equinos muestreados en primavera respecto a los muestreados en invierno. Los machos enteros tenían mayor porcentaje de Hct que las hembras. El Hct fue significativamente mayor en los animales que entrenaban de 4 a 6 días en semana que los que entrenaban a diario. Los caballos de doma tenían mayor Hct que los caballos de salto.

El VCM fue menor en invierno que en primavera o en otoño. Fue también menor en los caballos que entrenaban a diario, comparado con los que entrenaban con menos frecuencia, y fue más elevado en los animales muestreados por la mañana respecto de los muestreados por la tarde.

La HCM, fue significativamente mayor en el grupo de caballos muestreados por la mañana. Fue también más elevada en caballos geriátricos, comparado con caballos jóvenes y en caballos de otras disciplinas, comparado con los que realizaban doma clásica.

La CHCM fue mayor en los meses invierno, que en primavera y otoño; en animales muestreados durante la mañana, respecto a los muestreados por la tarde; en caballos geriátricos, comparado con los caballos adultos; en el grupo de equinos estabulados respecto de los que tenían acceso al exterior; y en los que entrenaban a diario, respecto de los que entrenaban con menor frecuencia.

La RDW fue mayor en caballos jóvenes que en geriátricos; en machos enteros que en machos castrados; en razas ibéricas respecto de las europeas; en los que entrenaban de 1 a 3 días a la semana, comparado con los que trabajaban a diario; y menor en los caballos de salto respecto del resto de disciplinas incluidas en el estudio.

El recuento de PLQ fue significativamente mayor en los caballos muestreados por la tarde respecto de los de la mañana; en los animales jóvenes, que en los adultos y los geriátricos; en los equinos con acceso al exterior que en los estabulados; y en los caballos de doma, respecto de las otras disciplinas.

El VPM fue mayor en los equinos muestreados por la tarde; mayor en animales que entrenaban de 4 a 6 días en semana comparado con los que trabajaban con menor frecuencia; y mayor en caballos de doma, respecto de las otras disciplinas.

La U en los animales muestreados en los meses de primavera fue significativamente más elevada que en los caballos muestreados en los meses de otoño; en los animales estabulados respecto de los que tienen acceso al exterior; y menor en los caballos de doma comparado con el salto y otras disciplinas.

La concentración de Cr sérica fue mayor en los meses de invierno que en los de primavera y otoño.

La concentración de PT en sangre en los caballos de salto fue significativamente menor que en los equinos de otras disciplinas.

La concentración de ALB sérica fue mayor en invierno que en primavera y otoño; mayor en las razas europeas que en las ibéricas; menor en los caballos que entrenaban de 1 a 3 días en semana, comparado con los que entrenaban con mayor frecuencia; y menor en los caballos con baja intensidad de entrenamiento que en los de intensidad media y alta.

Los caballos que practicaban otras disciplinas tenían un nivel de GLOB séricas más elevado, que los que practicaban doma y salto.

La concentración sérica de AST en los caballos muestreados por la mañana fue significativamente mayor que en los muestreados por la tarde; mayor en los caballos con acceso al exterior que en los estabulados, y mayor en los equinos que realizaban una actividad física de intensidad media, comparado con los de intensidad alta.

La concentración de GGT sérica fue significativamente menor en primavera que en otoño. Fue más elevada en las razas ibéricas, que en las razas europeas. La GGT fue también mayor en animales

cuya intensidad de entrenamiento era baja, si se compara con los animales en régimen de entrenamiento alto. Y más elevada también en caballos de doma, respecto a los de salto.

Las concentraciones de ALP sérica fueron significativamente distintas en todas las estaciones muestreadas, registrándose valores mínimos en invierno, mayores en primavera y máximos en otoño. Las razas ibéricas tenían mayores concentraciones de ALP que el resto de las razas. Los valores de ALP fueron más elevados en caballos con acceso al exterior, que en los estabulados. También más elevados en equinos que entrenaban de 1 a 3 veces en semana, comparado con los que entrenaban a diario y más elevada en los que realizaban ejercicio de intensidad baja que en los que entrenaban con una intensidad media o alta. Por último, la concentración de ALP fue más elevada en caballos que entrenaban durante menos de una hora que en los que entrenaban un tiempo mayor.

La concentración de BT sérica fue más baja en los meses de otoño, que en invierno y primavera. Fue también menor en las razas ibéricas, respecto de las europeas. Fue más elevada en los caballos estabulados, si lo comparamos con los animales que tienen acceso al exterior. Fue menor en caballos que entrenaban con poca frecuencia, en comparación con los de nivel de entrenamiento medio y alto; menor en equinos con intensidad de entrenamiento baja, comparado con los de intensidad alta; e inferior en caballos de doma, respecto a los de salto.

La concentración de BD fue menor en los meses de otoño que en invierno y primavera. Fue significativamente mayor en machos enteros que en machos castrados, mayor en caballos estabulados que los que tenían acceso al exterior, y menor en los caballos que entrenaban de 1 a 3 días en semana, comparado con los que entrenaban de 4 a 6 días en semana.

La concentración de CK en sangre fue menor en los meses de invierno que en los de primavera. Mostró valores más elevados en los muestreos de la mañana que en los de la tarde.

La concentración de LDH fue inferior en los meses de invierno, comparado con los meses de primavera y otoño. También fue más elevada en las razas ibéricas, comparado con el resto de las razas; mayor en caballos con acceso al exterior que en exclusivamente estabulados; mayor en

caballos que entrenaban con menor frecuencia e intensidad, comparado con los que entrenaban con mayor frecuencia e intensidad; y mayor en los equinos con entrenamiento de menos de una hora de duración.

La concentración de Ca total fue significativamente menor en caballos con una frecuencia de entrenamiento media, comparado con los equinos que entrenaban con menor y mayor frecuencia. El P fue más elevado en primavera que en invierno y en otoño, mayor en los muestreos de la tarde, más elevado en animales jóvenes, comparado con los otros dos grupos de edad; mayor en los equinos que entrenaban menos de una hora, y menor en los caballos de doma, comparado con los de salto.

El nivel de TG en sangre fue más elevado en los caballos de doma, comparado con los de salto.

La concentración de CT en suero fue mayor en invierno que en otoño. Los caballos de salto poseían menores concentraciones de CT que los de otras disciplinas.

La concentración de Fib sérico fue menor en machos que en hembras, concretamente menor en machos castrados, y más elevada en los equinos que entrenaban menos de 1 hora.

La concentración de AU varió significativamente entre las tres estaciones muestreadas, siendo mayor en invierno, menor en primavera y menor aun en otoño. Fue más elevada en los caballos que entrenaban diariamente que en los que entrenaban con menor frecuencia.

La concentración de 8-OHdG fue significativamente menor en invierno que en primavera, y mayor en hembras que en machos, concretamente en machos enteros.

B) Análisis univariable de los factores asociados.

A partir del análisis mediante test Chi-cuadrado de Pearson para analizar las posibles asociaciones entre las categorías de los datos recopilados en el cuestionario, se obtuvo un valor de p, mostrado en el Anexo 11.

C) Análisis univariable de los parámetros analíticos.

El valor de p del test Rho de Spearman para evaluar las asociaciones hipotéticas entre los analitos que componen hemograma, la bioquímica y los marcadores de estrés oxidativo entre sí, se muestra en los Anexos 12, 13 y 14 respectivamente.

4.4.2. Análisis multivariable

Las variables independientes incluidas en el análisis multivariable fueron la estación, hora, edad, sexo, raza, alojamiento, regularidad de ejercicio, intensidad de ejercicio, duración del ejercicio y disciplina. Respecto a la explotación, incluida como factor aleatorio, el número de centros hípicos incluidos en el estudio fue de 14. El número de caballos en cada explotación osciló entre 1 y 35.

En lo que respecta a la hematología, las variables dependientes que mejor fueron explicadas por el modelo lineal mixto fueron los GB, los GR, el Hct y la Hb. En todos estos modelos:

- No se halló interacción entre las variables independientes.
- Se cumplieron los supuestos de relación lineal de las variables y los supuestos de independencia, homocedasticidad y normalidad de los residuos.
- No hubo evidencia de agrupamiento a nivel de explotación.

Los resultados del modelo lineal mixto para los GB, que incluyó la estación y el régimen de ejercicio como variables independientes, se presentan en la Tabla 18. Respecto al intercepto (caballos muestreados en invierno, con frecuencia de entrenamiento de 1 a 3 días en semana), los recuentos de GB fueron significativamente más elevados en las estaciones de primavera y otoño y menores en los animales que entrenaban diariamente.

Tabla 18. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con el recuento de GB ($10^3/\mu\text{l}$), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 118).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	6,87	0,28	0,000	6,33 – 7,42
Estación de toma de muestra				
Primavera	1,74	0,27	0,000	1,21 – 2,27
Otoño	1,72	0,36	0,000	1,02 - 2,43
Régimen de ejercicio				
Medio	-0,51	0,28	0,076	-1,06 - 0,05
Alto	-1,48	0,35	0,000	-2,16 - -0,81

El modelo lineal mixto para los GR (Tabla 19), incluyó la edad y el sexo como variables independientes. Respecto al intercepto (caballos de entre 2 y 8 años, macho entero), los recuentos de GR fueron significativamente menores tanto en animales mayores de 8 años, como en machos castrados y yeguas.

Tabla 19. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con el recuento de GR ($10^6/\mu\text{l}$), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 112).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	8,45	0,19	0,000	8,07 - 8,82
Edad				
8 – 16 años	-0,37	0,18	0,043	-0,73 - -0,01
17 – 27 años	-0,70	0,31	0,022	-1,30 - -0,10
Sexo				
Macho castrado	-0,75	0,22	0,001	-1,18 - -0,33
Hembra	-0,88	0,24	0,000	-1,36 - -0,41

El modelo lineal mixto que mejor se ajustó a la variable Hct, incluyó como variables independientes la estación del año y el sexo y se encuentra representado en la Tabla 20. Respecto al intercepto (caballos muestreados en otoño/invierno, macho entero), el valor Hct fue significativamente más elevado en caballos muestreados en primavera y menor tanto en machos castrados como en hembras.

Tabla 20. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con el Hct (%), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 117). *Variable recodificada a Estación fría (otoño e invierno) y Estación templada (primavera).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	35,22	0,86	0,000	33,54 – 36,90
Estación de toma de muestra*				
Estación templada	3,35	0,83	0,000	1,73 – 4,98
Sexo				
Macho castrado	-1,82	0,88	0,038	-3,55 - -0,10
Hembra	-2,84	0,96	0,003	-4,73 - -0,96

Por último, el modelo con mejor ajuste para la variable Hb (Tabla 21), incluyó como variables independientes la estación del año, el sexo y la disciplina. Comparado con el intercepto (caballos muestreados en invierno, macho entero, de doma clásica), la concentración de Hb fue significativamente menor en caballos muestreados en otoño, en hembras y en caballos de salto.

Tabla 21. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la Hb (g/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 102).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	13,16	0,29	0,000	12,59 – 13,72
Estación de toma de muestra				
Primavera	0,57	0,29	0,052	-0,01 – 1,14
Otoño	-0,77	0,39	0,047	-1,52 - -0,01
Sexo				
Macho castrado	-0,57	0,32	0,076	-1,20 – 0,06
Hembra	-0,99	0,41	0,016	-1,79 - -0,19
Disciplina				
Salto	-0,67	0,34	0,049	-1,33 - -0,003
Otras	-0,24	0,35	0,500	-0,92 – 0,45

Las variables del análisis bioquímico sobre las cuales se construyó un modelo lineal mixto fueron U, Cr, PT, AST, GGT, ALP, BT, LDH, Ca, P, TG y Fib. Se observó agrupamiento a nivel de explotación en los modelos de PT y P. Existió interacción entre variables independientes en los modelos del Ca y de LDH, en cuyo caso se decidió recodificar una de las variables respectivamente, lo cual resultó en la eliminación de la interacción y la consecuente simplificación en la interpretación del modelo.

El modelo que mejor se ajustó a la variable U (Tabla 22), incluyó como única variable independiente la disciplina. Comparando con el intercepto (caballos de doma clásica), la concentración de U fue significativamente mayor tanto en caballos de salto, como de otras disciplinas.

Tabla 22. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la U (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 103).

Variable	Coficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	25,77	1,14	0,000	23,53 – 28,00
Disciplina				
Salto	3,13	1,42	0,028	0,34 – 5,92
Otras	4,61	1,57	0,003	1,54 – 7,68

El modelo lineal mixto que mejor se ajustó a la variable Cr incluyó como variables independientes la estación del año y la edad y se encuentra representado en la Tabla 23. Respecto al intercepto (caballos muestreados en invierno, de entre 2 y 8 años), la concentración de Cr en sangre fue significativamente menor en caballos muestreados en primavera y otoño y mayor en animales de entre 17 y 20 años. No se cumplieron los supuestos de homocedasticidad y de distribución normal de los residuos.

Tabla 23. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la Cr , (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 116).

Variable	Coficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	1,46	0,05	0,000	1,36 – 1,56
Estación de toma de muestra				
Primavera	-0,16	0,06	0,010	-0,28 - -0,04
Otoño	-0,33	0,07	0,000	-0,47 - -0,19
Edad				
8 – 16 años	0,09	0,06	0,135	-0,03 – 0,20
17 – 27 años	0,32	0,10	0,001	0,13 – 0,51

El modelo lineal mixto para las PT (Tabla 24), incluyó la disciplina como variable independiente. Respecto al intercepto (caballos de doma clásica), la concentración de PT séricas fue mayor en equinos que practicaban otras disciplinas, diferentes del salto. Existió heterocedasticidad en la

varianza de los residuos, comparando las categorías de doma clásica y otras disciplinas, con una mayor varianza en los errores de esta última.

Tabla 24. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con las PT (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 103).

Variable	Coficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	6,63	0,08	0,000	6,48 – 6,78
Disciplina				
Salto	-0,12	0,09	0,176	-0,30 – 0,05
Otras	0,23	0,10	0,021	0,03 – 0,42

El modelo que mejor se ajustó a la variable AST contó con la edad y la intensidad de ejercicio como variables independientes y queda representado en la Tabla 25. Respecto al intercepto (caballos de entre 2 y 8 años, con intensidad de entrenamiento baja), la concentración de AST fue significativamente menor tanto en caballos de entre 9 y 16 años, como en equinos sometidos a una intensidad alta de ejercicio. Respecto al supuesto de homocedasticidad, sólo se cumplió para intensidad del ejercicio, existiendo para la edad, una disminución de la varianza de los residuos de la AST, a medida que la edad asciende. Tampoco se cumplió el supuesto de normalidad de los residuos para este modelo.

Tabla 25. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la AST (UI/L), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 115).

Variable	Coficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	288,18	10,74	0,000	267,14 – 309,24
Edad				
8 – 16 años	-20,66	9,09	0,023	-38,47 - -2,85
17 – 27 años	-6,82	15,41	0,658	-37,02 – 23,37
Intensidad del ejercicio				
Media	-0,33	11,28	0,977	-22,44 – 21,78
Alta	-24,84	11,78	0,035	-47,93 - -1,74

El modelo lineal mixto con mejor ajuste para la GGT incluyó como variable independiente únicamente la disciplina y se encuentra representado en la Tabla 26. Comparado con el intercepto

(caballos de doma clásica), la concentración de GGT en sangre fue significativamente menor en caballos de salto. Se cumplieron todos los supuestos del modelo.

Tabla 26. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la GGT (UI/L), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 103).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	13,51	0,83	0,000	11,89 – 15,13
Disciplina				
Salto	-3,57	1,22	0,003	-5,95 - -1,18
Otras	-1,16	1,40	0,406	-3,91 – 1,58

El modelo elegido para la variable ALP incluyó la estación del año, el alojamiento y la duración del ejercicio como variables independientes y se encuentra representado en la Tabla 27. Respecto al intercepto (caballos muestreados en invierno, estabulados en box, cuyos entrenamientos tienen menos de 1 hora de duración), la concentración de ALP sérica fue significativamente mayor en caballos muestreados en primavera y otoño, mayor en animales con acceso al exterior en su alojamiento habitual y significativamente menor en animales que entrenaban durante más de 1 hora. Se cumplieron todos los supuestos para este modelo.

Tabla 27. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la ALP (UI/L), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 114).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	255,41	16,53	0,000	223,01 – 287,81
Estación de toma de muestra				
Primavera	53,95	18,16	0,003	18,35 – 89,55
Otoño	139,98	20,70	0,000	99,41 – 180,55
Alojamiento				
Acceso a exterior	47,29	21,95	0,031	4,28 – 90,31
Duración del ejercicio				
> 1 hora	-46,56	16,71	0,005	-79,30 - -13,81

Para la BT, el modelo seleccionado incluyó como variables independientes la estación de muestreo, el sexo y la disciplina y se encuentra representado en la Tabla 28. Comparado con el intercepto (caballos muestreados en invierno, macho entero, de doma clásica), la BT sérica fue significativamente menor en caballos muestreados en otoño y en machos castrados, y más elevada

en caballos de salto. No se cumplió el supuesto de homocedasticidad de los residuos en la variable sexo, ya que existía mayor varianza en los machos castrados que en los machos enteros. No se cumplió el supuesto de normalidad de los residuos, debido a que la distribución de los residuos tenía un marcado sesgo hacia la derecha.

Tabla 28. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la BT (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 100).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	2,10	0,11	0,000	1,88 – 2,33
Estación de toma de muestra				
Primavera	-0,15	0,11	0,176	-0,37 – 0,07
Otoño	-0,31	0,15	0,037	-0,61 – -0,02
Sexo				
Macho castrado	-0,27	0,13	0,032	-0,52 – -0,02
Hembra	-0,16	0,16	0,334	-0,48 – 0,16
Disciplina				
Salto	0,42	0,13	0,002	0,16 – 0,68
Otras	0,02	0,14	0,866	-0,24 – 0,29

Para la LDH, el modelo que mejor se ajustó a los datos, incluyó la estación edad, la raza y la intensidad del ejercicio como variables independientes (Tabla 29). Comparando con el intercepto (caballos muestreados en invierno, de entre 2 y 8 años, raza ibérica e intensidad de ejercicio no intensa), la concentración de LDH fue más elevada en primavera y otoño, y significativamente menor en los caballos de entre 9 y 16 años, en los equinos en régimen de entrenamiento intenso y en el resto de las razas no ibéricas incluidas en el estudio. No se cumplió la homocedasticidad de los residuos para la estación y la edad, ni el supuesto de distribución normal de los residuos, con sesgo a la derecha.

Tabla 29. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con la LDH (UI/L), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 105). * Variable recodificada a dicotómica en intensidad de ejercicio no intenso e intenso.

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	802,88	56,81	0,000	691,54 – 914,22
Estación de toma de muestra				
Primavera	195,14	52,28	0,000	92,68 – 297,60
Otoño	183,56	67,84	0,007	50,59 – 316,53
Edad				
8 – 16 años	-98,00	41,23	0,017	-178,80 - -17,19
17 – 27 años	-63,88	66,47	0,337	-194,16 – 66,39
Raza				
Europeo	-112,52	47,11	0,017	-204,86 - -20,18
Otras	-133,74	56,14	0,017	-243,77 - -23,71
Intensidad del ejercicio*				
Intenso	-153,93	42,20	0,000	-236,65 - -71,21

El modelo que mejor se ajustó a la variable C_a , contó con la estación y la disciplina como variables independientes (Tabla 30). Respecto al intercepto (caballos muestreados en invierno, de otras disciplinas diferentes al salto), la concentración de Ca en sangre fue significativamente menor en caballos muestreados en primavera y otoño, y en caballos de salto. No se cumplió el supuesto de distribución normal de los residuos.

Tabla 30. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con Ca (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 103). * Variable recodificada a dicotómica en otras disciplinas y salto.

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	13,10	0,19	0,000	12,72 – 13,47
Estación de toma de muestra				
Primavera	-0,44	0,18	0,013	-0,79 - -0,09
Otoño	-1,07	0,32	0,001	-1,69 - -0,44
Disciplina*				
Salto	-0,36	0,15	0,017	-0,66 - -0,07

El modelo elegido para el P incluyó la estación del año y la edad como variables independientes (Tabla 31). Respecto al intercepto (caballos muestreados en invierno, de entre 2 y 8 años), la concentración de P en sangre fue significativamente mayor en caballos muestreados en primavera y menor en los equinos mayores, tanto de 9 a 16 años, como de 17 a 27 años. No se cumplió el supuesto de relación lineal del P con la edad, ni se cumplió la homocedasticidad de los residuos

para la estación ni la edad, existiendo en el grupo muestreado en primavera, mayor varianza y en el grupo de 17 a 27 años, menor varianza que en el resto de los grupos.

Tabla 31. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con P (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 116).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	2,95	0,15	0,000	2,65 – 3,25
Estación de toma de muestra				
Primavera	0,72	0,15	0,000	0,43 – 1,00
Otoño	-0,09	0,22	0,673	-0,52 – 0,34
Edad				
8 – 16 años	-0,37	0,10	0,000	-0,57 - -1,62
17 – 27 años	-0,56	0,17	0,001	-0,90 - -0,22

El modelo que mejor se ajustó a la variable TG, incluyó como variables independientes, el sexo y la disciplina y está representado en la Tabla 32. Comparando con el intercepto (caballo macho entero de doma clásica), el nivel de TG en sangre fue significativamente menor en caballos de salto y de otras disciplinas. No hubo ninguna categoría significativa en la variable sexo. No se cumplió el supuesto de homocedasticidad de los residuos en la disciplina, ni el supuesto de distribución normal de los residuos, debido a un sesgo hacia la derecha.

Tabla 32. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con los TG (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 100).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	27,77	1,85	0,000	24,15 – 31,39
Sexo				
Macho castrado	-3,27	2,20	0,137	-7,57 – 1,04
Hembra	1,37	2,84	0,631	-4,21 – 6,94
Disciplina				
Salto	-6,82	2,14	0,001	-11,02 - -2,62
Otras	-5,06	2,35	0,031	-9,67 - -0,46

El modelo lineal mixto con mejor ajuste para el Fib incluyó como variables independientes la estación y la duración del ejercicio y queda representado en la Tabla 33. Comparado con el intercepto (caballos muestreados en invierno que entrenan menos de una hora), la concentración de Fib en sangre fue significativamente mayor en caballos muestreados en primavera y menor en

caballos que trabajaban más de una hora por entrenamiento. No se cumplieron los supuestos de homocedasticidad ni de distribución normal de los residuos.

Tabla 33. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con el Fib (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 116).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	192,40	9,30	0,000	174,19 – 210,63
Estación de toma de muestra				
Primavera	27,65	11,56	0,017	4,99 – 50,30
Otoño	11,20	14,17	0,429	-16,57 – 38,96
Duración del ejercicio				
> 1 hora	-23,28	10,36	0,025	-43,59 - -2,97

Por último, los modelos lineales mixtos de los marcadores de estrés oxidativo resultaron en modelos con una sola variable explicativa a excepción de TAS, cuyos datos no se ajustaron a los modelos planteados. Se observó agrupamiento a nivel de explotación en el modelo de 8-OHdG.

El modelo que mejor se ajustó a la variable TBARS, tuvo el sexo como variable independiente y está representado en la Tabla 34. Respecto al intercepto (caballo macho entero), el valor de TBARS fue significativamente mayor en yeguas. Se cumplieron los supuestos, a excepción de la homocedasticidad de los residuos.

Tabla 34. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con TBARS (μM), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 117).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	0,60	0,07	0,000	0,45 – 0,74
Sexo				
Macho castrado	0,08	0,09	0,340	-0,09 – 0,26
Hembra	0,20	0,10	0,040	0,01 – 0,40

El modelo seleccionado para el AU tuvo la regularidad del ejercicio como variable independiente y está representado en la Tabla 35. Respecto al intercepto (caballo con regularidad de entrenamiento baja), el valor de AU fue significativamente mayor en caballos sometidos a entrenamiento diario. No se cumplieron los supuestos de homocedasticidad y normalidad de los residuos.

Tabla 35. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con el AU (mg/dL), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 118).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	0,45	0,02	0,000	0,40 – 0,50
Regularidad del ejercicio				
Media	0,02	0,03	0,497	-0,04 – 0,09
Alta	0,11	0,04	0,006	0,03 – 0,20

El modelo con mejor ajuste a la variable 8-OHdG, tuvo el sexo como variable independiente y está representado en la Tabla 36. Existió agrupamiento a nivel de la explotación (E = 0,380, p = 0,006). Respecto al intercepto (machos enteros), el valor de 8-OHdG fue significativamente mayor en yeguas. No se cumplieron los supuestos de homocedasticidad y normalidad de los residuos.

Tabla 36. Resultados del modelo de regresión lineal mixto, para factores asociados con 8-OHdG (ng/ml), en la población de referencia del estudio, agrupada según su explotación de residencia (n = 116).

Variable	Coefficiente	Error estándar	P valor	IC 95%
Intercepto	3,06	0,22	0,000	2,64 – 3,48
Sexo				
Macho castrado	0,28	0,22	0,210	-0,16 – 0,71
Hembra	0,83	0,24	0,001	0,35 – 1,30

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. REPRESENTACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CABALLOS RESIDENTES EN CENTROS HÍPICOS EN ZONA CENTRAL DE ESPAÑA

El área formada por los centros hípicos incluidos en el presente trabajo equivalía a un 25% de la superficie total de las provincias objeto de estudio y a un 3,5% de la superficie total de España. La altitud media de las regiones incluidas en el estudio fue semejante a la altitud media en la mayoría de las provincias, si bien fue ligeramente más elevada en Madrid (906 vs 703 metros respectivamente) y Badajoz (288 vs 186 metros respectivamente), e inferior en Cuenca (780 vs 999 metros respectivamente).

Las zonas objeto de estudio incluyeron los tres grupos climáticos propios de las provincias incluidas¹⁷¹, por lo que la climatología representativa de la región central de España se encuentra correctamente representada en este trabajo.

Si bien el tamaño muestral no fue representativo del censo de caballos en la zona central de España, sí fue representativo tanto a la población de pacientes del laboratorio de referencia (SEVISEQ) en la zona central de España, como del número de muestras a analizar para la determinación de IR, acorde a las recomendaciones de la ASVCP¹²⁷.

Los caballos de razas puras en este estudio fueron muestreados en una proporción similar al estimado en la Comunidad de Madrid (84% vs 88,7%), de especial relevancia debido a que fue la región de muestreo mayoritaria (112 de 138 animales)¹⁷². La proporción de razas puras muestreadas fue superior a la poblacional en Castilla y León y Extremadura (89% vs 46,4% y 93 vs 41,5%), e infraestimada en Castilla la Mancha (33% vs 58,3%)¹⁷².

El número de centros hípicos incluidos en el presente trabajo representó un 7,4% del total de centros registrados en las comunidades autónomas objeto de estudio⁶.

El perfil de los caballos de la población muestral fue representativo del caballo medio residente en centros hípicos, con una edad media 10 años, en fase de explotación y destinado tanto a disciplinas deportivas como de ocio. La proporción de machos y hembras incluida en el estudio fue semejante a las proporciones de machos y hembras federados en 2021 según la FHE, siendo el número de machos el doble que el de hembras.

El tamaño muestral empleado en este trabajo cumplió con las recomendaciones de la ASVCP ya que la estimación del número de animales fue de 136 y se tomaron un total de 138 muestras. Una observación interesante a tener en cuenta es que del total de animales, un 12% de los mismos fue excluido posteriormente del estudio por no cumplir con los criterios de inclusión o mostrar algún valor de la analítica fuera de rango, porcentaje que es muy similar al 13% de animales con enfermedad oculta estimados de forma teórica según la bibliografía¹⁷⁴.

5.1.1. Datos recopilados de los caballos incluidos en el estudio

Respecto a la estación del año en la que se tomaron las muestras, cabe señalar que la mayoría de las muestras fueron recopiladas en invierno o en las estaciones más frías, quedando menos representadas las estaciones cálidas, con un porcentaje menor en primavera y ninguna muestra recogida en verano. Teniendo en cuenta que la climatología en esta región incluye unos cambios de temperaturas marcados entre las estaciones frías y cálidas¹⁷¹, este sesgo debe ser tenido en cuenta.

Se recogieron más muestras por la mañana que por la tarde, dato que puede ser explicado por la preferencia de que el animal fuese muestreado en reposo, y reflejo también del horario laboral y

conveniencia de los veterinarios clínicos de équidos. Esta información podría ser relevante por la influencia de los ritmos circadianos sobre analitos como la AST, CK y LDH con mayor actividad durante el día o del Hct y Hb con mayores niveles durante la noche¹⁵².

Teniendo en cuenta que la raza PRE es mayoritaria en España, la proporción incluida en el estudio podría considerarse representativa, ya que supone un tercio del total de animales¹⁷². Otras razas incluidas, como el CDE y razas centroeuropeas, representadas en diversas proporciones, son utilizadas principalmente para disciplinas deportivas²⁰³. Por último, los caballos de otras razas y los caballos cruzados suelen ser destinados a actividades de ocio.

La mayor parte de los animales se encontraban vacunados frente Influenza Equina y Tétanos y desparasitados dentro de los seis meses previos al estudio, intervalo de tiempo que abarca la pauta habitual en este tipo de profilaxis. Además, cabe señalar que dicho régimen de vacunación de Influenza es obligatorio en animales en competición²⁰⁴. La inmunización antitetánica suele ser frecuente debido a la especial sensibilidad de esta especie a las infecciones por *Clostridium tetani*. La vacunación frente a Rinoneumonitis equina y WNV fue mucho menos frecuente, lo cual puede explicarse al no haber reportados brotes de dichas enfermedades en las fechas de muestreo, en el área objeto de estudio²⁰⁵.

El caballo medio representado en esta población tenía una condición corporal óptima, estaba alojado en cuadras o boxes y era alimentado a base de pienso compuesto y heno. Esta información guardó estrecha relación con la función de los equinos en centros hípicas, principalmente destinados a realizar una actividad física regular de exigencia media-alta⁶.

Del 19% de caballos con suplementación, casi la mitad fue con aceite, frecuentemente empleado por su alto aporte de energía sin incrementar la excitabilidad y su contenido en ácidos grasos omega-3 y omega-6²⁰⁶. Otros suplementos empleados en menor proporción, a base de vitaminas y selenio son frecuentes en los caballos de deporte, así como los suplementos para la prevención de patologías, sobre todo digestivas y ortopédicas²⁰⁷.

La actividad física desarrollada por estos animales, mayoritariamente destinados a disciplinas deportivas, también fue representativa del caballo medio en los centros hípicos, con un régimen de entrenamiento de varios días en semana, de intensidad media y de 1 hora de duración²⁰⁸.

Un pequeño número de animales (12 de 127) había sufrido algún tipo de patología durante el mes previo al muestreo, siendo patologías ortopédicas las más frecuentemente observadas. No obstante, estos animales se encontraban libres de enfermedad en el momento del muestreo.

De los caballos sometidos a un transporte en el mes previo al muestreo, resaltar que un 30% de estos animales fueron excluidos del estudio, de los cuales un 20% mostró unas enzimas musculares elevadas, lo cual pudo guardar relación con el transporte²⁰⁹.

Respecto a los dos animales que recibieron algún medicamento en los 7 días previos al muestreo, los fármacos utilizados fueron xilacina e ivermectina. La xilacina, un agonista alfa-2-adrenérgico, es frecuentemente utilizado en caballos como sedante de corta duración para facilitar la realización de procedimientos, con una vida media sérica de unos 50 minutos^{210,211}. La ivermectina es un antiparasitario perteneciente a las lactonas macrocíclicas, muy utilizado en clínica equina, tanto como antiparasitario externo como interno. La vida media de eliminación en monogástricos es de 0,5 a 2 días^{210,211}. Por tanto, dado que se utilizaron de forma puntual, es improbable que los medicamentos administrados tuviesen efecto alguno sobre los parámetros laboratoriales analizados en este estudio, resaltando además que el examen físico de estos animales en el momento del muestreo se mostró dentro de los límites normales.

5.2. VALORES DEL ANÁLISIS LABORATORIAL E INTERVALOS DE REFERENCIA

5.2.1. Comparación de dos metodologías para la determinación de intervalos de referencia

En la búsqueda en Pubmed® (National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD), de publicaciones acerca de la determinación de IR en medicina veterinaria con @RISK, sólo se halló un resultado en el que esta herramienta fue utilizada para la determinación de IR de ciertos parámetros bioquímicos en perros, empleando la técnica de *bootstrapping* y comparándola con los métodos tradicionales. En esta publicación se asumió que los valores se distribuían de forma normal, mientras que en el presente estudio no se asume *a priori* que la distribución sea normal²¹².

En el análisis hematológico, los estadísticos calculados por ambos métodos en general fueron similares, si bien en algunos parámetros variaron ligeramente. Acerca del ajuste o no de los datos a una distribución gaussiana, ambos métodos coincidieron en todos los parámetros. En lo que respecta a los IR, los resultados fueron también similares, con oscilaciones decimales en su mayoría. Los límites de referencia que más variación mostraron fueron NEU%, MON%, BAS% y PLQ. Cabe destacar que en líneas generales, los IR determinados por @RISK, fueron más acotados en prácticamente todas las variables (exceptuando HCM, GB y EO%), lo cual puede indicar un mejor ajuste de la distribución estimada a los datos reales y por tanto una mayor eficiencia en el cálculo de los IR. En un sentido práctico, esto significa que valores que antes se consideraban “normales” podrían no serlo.

En lo que respecta al análisis bioquímico, los estadísticos calculados fueron también semejantes en su mayoría, con las principales variaciones encontradas en la desviación estándar y en la mediana. En cuanto a los IR, se observó también la tendencia hacia rangos más acotados con @RISK, muy acusada en el caso de la mayoría de enzimas hepáticas y musculares. Por tanto, con esta

herramienta se reduce la probabilidad de obtener un resultado “falso negativo”. En el caso de la AST, el IR fue algo más acotado y marcadamente inferior al calculado por el método tradicional. En la ALP, el límite inferior fue notablemente mayor. En el caso de la GGT y la CK, los IR estimados por @RISK fueron también mucho más delimitados. Esto podría ser explicado por el mejor ajuste de las líneas de distribución estimadas por @RISK (gamma, log-logística y log-normal), respecto de la línea de una distribución normal, estimada por el método convencional, ya que los datos en estas variables tienen rangos más amplios que otros analitos y un sesgo hacia la derecha de los datos, característica frecuentemente observada en muchas variables analíticas. Esto pone de manifiesto el buen funcionamiento de @RISK en la determinación de IR, consiguiendo la obtención de límites de referencia en general más ajustados a los datos de una población dada. Estos límites más circunscritos podrían ayudar en mayor medida a la toma de decisiones clínicas, basadas en parte en valores fuera de estos rangos.

En la determinación de IR de parámetros de estrés oxidativo mediante ambas metodologías las diferencias fueron mínimas, de entre uno y dos decimales; sin embargo, el rango de valores en estos analitos, a excepción de la 8-OHdG, fue muy estrecho. También variaron en el orden de una décima, la media y mediana en la 8-OHdG y la mediana en TBARS. Aquí se pudo comprobar una vez más, como la eficiencia de ambos métodos es mayor cuanto más acotado es el IR a estimar.

En todos los parámetros estimados por @RISK, los valores mínimo y máximo teóricos calculados por la herramienta no se correspondieron de los valores reales, debido a que no se acotaron los límites al ejecutar el programa. Es por ello que los valores mínimo y máximo no pudieron ser estimados por este método. No obstante, esto no supone un problema, ya que los valores mínimo y máximo del conjunto de datos de un analito, son fácilmente identificables.

5.2.2. Comparación de los intervalos de referencia del análisis hematológico con la bibliografía

Al comparar los IR del análisis hematológico con otros IR publicados, se observaron diferencias atribuibles principalmente al tipo de raza que compone la población de referencia y en menor medida, al analizador utilizado.

Los valores de la serie roja obtenidos en el presente trabajo fueron equiparables a los de otras poblaciones de razas mixtas o razas de sangre templada. La población de referencia utilizada estaba compuesta por un 38% de razas ibéricas, mayoritariamente el PRE y el PRL, un 37% de razas europeas y 14% de otras razas. El PRE es considerado un caballo de sangre templada, así como la mayoría de razas incluidas en este estudio, lo cual explica por qué los intervalos obtenidos fueron semejantes a los establecidos para este tipo de razas¹³⁵.

Atendiendo al tipo de analizador utilizado, los resultados obtenidos mediante impedancia en este estudio fueron equiparables a los determinados mediante dispersión de la luz, concretamente los analizadores ADVIA2120i y ADVIA120, lo cual ha sido demostrado en otros trabajos^{213,201}. Por otro lado, al cotejar los resultados obtenidos con otros trabajos realizados en analizadores con tecnología de impedancia²⁰⁰, los intervalos de este trabajo fueron en general inferiores a los del analizador basado en la misma tecnología. No obstante, en ese mismo estudio, los rangos de referencia obtenidos por impedancia, fueron también semejantes a los obtenidos por dispersión de la luz, poniendo de manifiesto el mayor peso de la población de referencia sobre la técnica analítica utilizada²⁰⁰.

El recuento de GB en comparación con la bibliografía general mostró límites más bajos en el IR^{16,200}. No obstante, estos valores guardaron semejanzas con dos trabajos en los que se utilizaron analizadores ADVIA y emplearon caballos adultos con ausencia de razas de sangre caliente, población equiparable a la empleada en este trabajo^{199,201}. Por tanto el tipo de analizador, el uso

de caballos de edad adulta y la predominancia de razas de sangre templada podrían explicar este IR más bajo en relación a otros trabajos publicados^{200,213}.

El recuento diferencial, realizado de forma manual, fue también equiparable al determinado por los analizadores mediante dispersión de la luz, aunque también se encuentra sujeto a cierta variabilidad inherente al individuo y al ambiente que le rodea²⁸.

El rango de referencia del recuento de PLQ en este estudio fue más amplio que en otras publicaciones. La diferencia podría ser explicada por la facilidad en esta especie para formar agregados plaquetarios unida a que el analizador por impedancia podría incluir en el conteo de PLQ otras partículas, como restos celulares, pequeños agregados de PLQ y microcitos^{18,214}. A este respecto cabe señalar que aunque las muestras fueron procesadas en pocas horas, no fueron tomadas en medio anticoagulante específico para PLQ (por ejemplo, citrato), y en la evaluación del frotis sanguíneo no quedó registrada la existencia o no de agregados plaquetarios. Además, la diferencia en el recuento de PLQ al comparar distintos métodos analíticos, también ha sido documentada en la bibliografía²⁰⁰.

5.2.3. Comparación de los intervalos de referencia del análisis bioquímico con la bibliografía

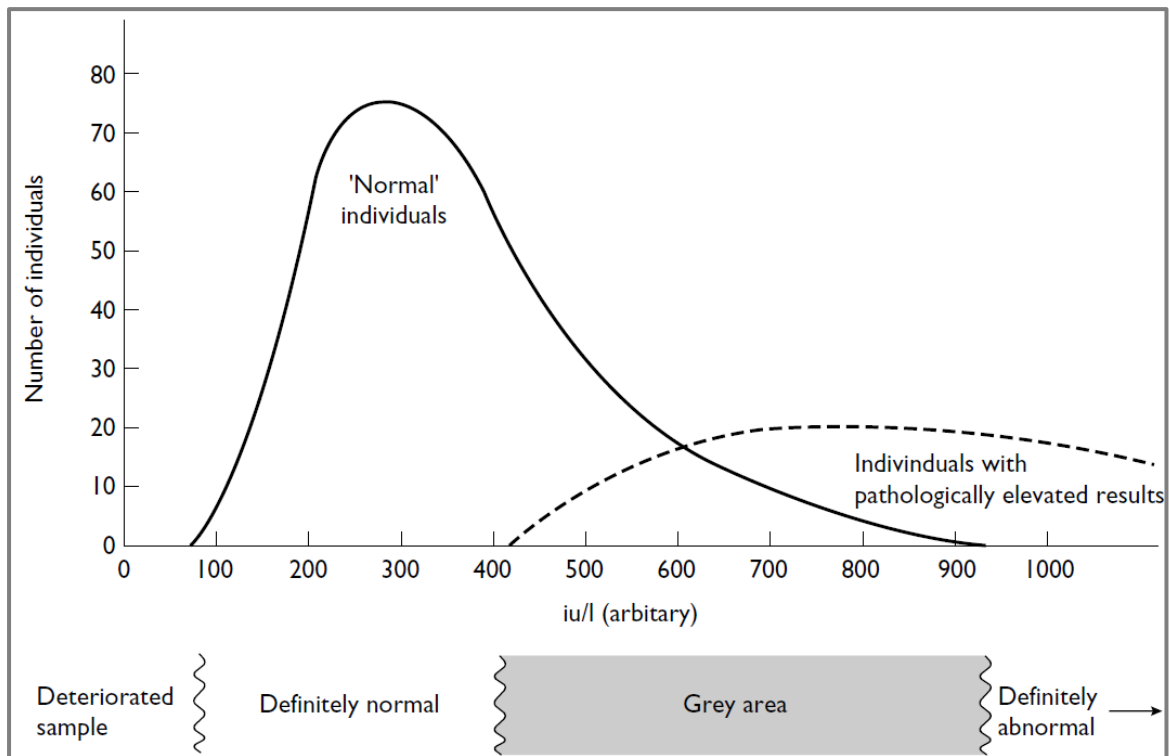
La comparación de los IR obtenidos en el presente trabajo con los referentes mencionados previamente en la bibliografía mostró semejanzas con el trabajo de Köller en la mayoría de variables²⁰¹.

La U mostró un intervalo similar al de este autor, sin embargo fue inferior al de otros autores²¹⁵. Esto podría explicarse por varios factores: la U también puede incrementarse de forma fisiológica con la edad y mostrarse en mayor concentración en razas pesadas y ponis, razas no representadas

en la población de referencia⁴⁴. Además, el exceso o la baja calidad de proteína en la dieta, poco probables en el presente trabajo, pueden incrementar la concentración de U⁴⁴. Por último, este resultado también podría estar influido por la técnica empleada, ya que por ejemplo la química seca utilizada por otros autores presenta una menor precisión³⁸.

Las enzimas mostraron en general intervalos más dispares, tanto al comparar rangos entre diferentes publicaciones, como con los intervalos de este trabajo. Esto podría ser debido al sesgo en la distribución de los datos, característica ya descrita en las enzimas equinas, especialmente marcada en la AST, CK y LDH. Esto da lugar a un rango de incertidumbre de difícil interpretación clínica (Figura 67), que requiere del apoyo de otras herramientas, como el examen clínico y otras técnicas diagnósticas, para su correcta interpretación⁴⁴. Por ejemplo, la AST se encuentra en la mayoría de equinos entre 200-400 UI/L, lo cual se corresponde con el IR determinado en este trabajo; sin embargo, en algunos caballos sanos puede llegar hasta 1000 UI/L, presuntamente por liberación muscular subclínica de esta enzima, lo cual podría explicar el límite de referencia superior en el estudio de Köller⁴⁴.

Figura 67. Representación esquemática de la distribución de los datos de un análisis de enzimas plasmáticas, mostrando el sesgo en la distribución de los datos, el cual produce un área de valores inciertos (Grey area), bastante amplia.



Fuente: Kerr, M. G. (2008). Veterinary laboratory medicine: Clinical biochemistry and haematology, John Wiley & Sons.

Además, en las enzimas ALP y LDH, se añaden diferencias en la propia reacción química, en la cual el tampón empleado en la reacción es distinto si se siguen las recomendaciones de las Asociaciones Europeas de Química Clínica (dietanolamina para ALP y piruvato para LDH), o las recomendaciones de la IFCC (2-amino-2metil-propanol para ALP y lactato para LDH). Esta diferencia da lugar a que el rango de referencia en estas enzimas, sea aproximadamente del doble, si se siguen las guías europeas respecto de la IFCC^{216,217}, siendo necesario aplicar un factor de corrección para poder compararlas.

Los valores superiores de la CK determinados en este trabajo se encontraron por encima de los valores publicados. Otros trabajos también corroboraron la amplia variación de esta enzima entre individuos, estrechamente relacionada con la actividad muscular¹³⁴.

Observando en su conjunto todas las enzimas musculares y teniendo en cuenta el tipo de actividad en esta población de équidos, se podría concluir que estas enzimas se encontraron en muchos individuos cerca o por encima de los niveles superiores de los IR previamente establecidos^{218,219}.

En la GGT, el IR superior calculado fue menor que la mayoría de límites establecidos, incluido el trabajo de Köller. Esto podría ser debido a que el sustrato a partir del cual se mide la absorbancia es distinto (5-amino-2-nitrobenzoato en el trabajo de Köller y p-nitroanilina en este estudio), aunque los intervalos de GGT utilizando estos dos sustratos en otros trabajos, no obtuvieron diferencias significativas en los resultados²²⁰. En el estudio realizado por Wright sobre la variación biológica de parámetros hematológicos y bioquímicos en el caballo, en la determinación de IR individualizados de GGT se demostró que la mayoría de los caballos tienen valores ubicados en la parte inferior del IR¹³⁴, lo cual podría explicar los resultados del presente trabajo.

Respecto a la BT, también se observó un límite superior del IR establecido mayor que los reportados en la bibliografía. Esto podría ser explicado por el momento de toma de muestra respecto de las horas de ayuno, debido a la hiperbilirrubinemia fisiológica en el caballo en ayuno (hasta 5,8 mg/dL), causada por la elevación de ácidos grasos libres en plasma al competir con la bilirrubina para ser captados por los hepatocitos⁴⁴. La mayoría de las muestras en los caballos con niveles de BT mayor de 3 mg/dL, se tomaron a primera hora de la mañana, por lo que es muy probable que hubieran tenido al menos 12 horas de ayuno, ya que no se les proporcionaba heno *ad libitum*.

También se observó un límite superior más bajo en los TG, respecto de los otros intervalos consultados. Esto podría ser debido a la dependencia de esta variable del manejo dietético y la amplia variabilidad individual demostrada¹³⁴.

Por último, cabe señalar que los límites de referencia de Fib determinados se encontraron ligeramente por debajo de la mayoría de valores publicados, siendo además su IR más acotado, lo cual podría implicar una mayor eficiencia en la interpretación clínica, principalmente como marcador inflamatorio³⁸.

5.2.4. Comparación de los intervalos de referencia de los marcadores de estrés oxidativo con la bibliografía

Los IR del AU calculados fueron prácticamente iguales a los publicados por Escribano a partir de una población de caballos PRE, lo cual podría explicarse por ser el PRE la raza mayoritaria en este estudio⁶⁰. En otros trabajos el rango difirió ligeramente, si bien las razas incluidas, la edad de los animales y el tipo de entrenamiento recibido fueron diferentes⁷⁷.

El IR de TBARS calculado sí varió respecto de la bibliografía consultada, si bien los valores de la publicación seleccionada correspondían a valores de TBARS en diferentes estaciones del año, no habiéndose encontrado publicaciones con un IR de TBARS a partir de una población semejante. Señalar además, que otros valores de TBARS encontrados en la bibliografía varían notablemente entre sí^{63,77,84}, lo cual puede deberse en gran medida a las diferencias en los objetivos de cada estudio. A esto se añade la inespecificidad de la propia técnica, ya que la propia muestra puede contener MDA de otras fuentes distintas a la peroxidación lipídica y el TBA puede reaccionar con otras sustancias distintas al MDA⁷¹.

El intervalo determinado de TAS fue más amplio que otros rangos publicados, si bien el rango calculado englobó casi todos los límites de la bibliografía consultada. En varios estudios se mostró que el valor de TAS en sangre está relacionado con el nivel de entrenamiento^{77,91}, por lo que el intervalo más amplio de este estudio podría ser debido en parte, a los diferentes niveles de entrenamiento de su población. Además, otros estudios mostraron que el temperamento de los animales, principalmente asociado a la raza, también afecta los niveles de TAS, siendo los animales más reactivos o temperamentales, los que exhiben niveles de TAS basales más elevados comparado con razas más tranquilas⁸⁴.

Por último, este trabajo fue el primero en determinar el IR de 8-OHdG en suero equino en una población de 120 animales. En los buscadores consultados hasta la fecha, sólo se hallaron dos

publicaciones que mostraron datos sobre este analito en suero equino, en caballos con enfermedad respiratoria y en caballos de carreras en respuesta a la administración de un suplemento^{96,97}. Además de las diferencias en los objetivos de estudio, ambas coincidían en el análisis de pocos animales y obtuvieron valores más bajos que los obtenidos en el presente trabajo. Los valores más altos de este estudio podrían deberse en parte al tratamiento previo de las muestras, ya que los sueros analizados en este trabajo fueron diluidos según las recomendaciones del fabricante, pero no filtrados.

5.3. ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS

La investigación acerca de cómo determinados factores fisiológicos podían afectar a las variables analíticas, incluyó los análisis univariable y multivariable. En el análisis univariable, habría que tener en cuenta que, al comparar numerosas variables entre sí, podría darse el fenómeno de encontrar asociaciones significativas por azar, sin que estas fuesen biológicamente reales. Este fue uno de los principales motivos por los que se decidió realizar el análisis multivariable, mediante la construcción de modelos lineales mixtos, en los cuales era más difícil que apareciesen estas asociaciones “no reales”. Al mismo tiempo, el análisis multivariable sirvió para evaluar cuáles de las múltiples asociaciones encontradas tenían mayor peso y por tanto se incluían en el modelo.

5.3.1. Análisis univariable

En el análisis de las posibles asociaciones entre las categorías del cuestionario se hallaron, por una parte, relaciones fruto del carácter aleatorio del muestreo en los diferentes centros hípicas, como las características fenotípicas de los animales y su hábitat, y por otra parte, como consecuencia de la ausencia de muestras de caballos de salto en los meses de otoño, la cual fue

también fruto del azar, pero que afectó a su vez a las asociaciones observadas entre la estación y el nivel de ejercicio. Otros hallazgos dignos de mención fueron el mayor número en machos que en hembras, en línea con la proporción de licencias de la FHE y el mayor número de machos enteros en la raza PRE, característica arraigada a la cría de esta raza en España, amparada por el programa de cría del caballo de PRE y el programa de difusión de la mejora establecido por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación y la ANCEE, en junio de 2020²²¹. La asociación de la raza PRE con la doma y de razas europeas con el salto es inherente a las aptitudes físicas de las respectivas razas. Por último, las asociaciones halladas en el alojamiento y el nivel de ejercicio, guardaron una relación dentro de la lógica y la proporcionalidad, con caballos estabulados asociados con un mayor nivel de entrenamiento y también una relación entre regularidad, intensidad y duración del ejercicio, incluyendo a los caballos de salto, dentro del régimen de entrenamiento más intenso y los caballos de doma y ocio en nivel decreciente, tal y como se describe en la bibliografía²²².

El análisis de asociaciones entre los parámetros analíticos mostró en el hemograma numerosas asociaciones. Multitud de observaciones fueron fruto de la estrecha relación entre los analitos. En el caso de los índices eritrocitarios, se evidenció la proporcionalidad con las variables utilizadas para su determinación. Aparte estas asociaciones fisiológicas más evidentes, se observó también una relación directamente proporcional entre las tres líneas celulares (GR, GB y PLQ). En la especie humana, se han descrito ratios entre las diferentes líneas celulares, siendo de 1 glóbulo blanco por cada 600-700 GR y de 1 plaqueta por cada 20 GR²²³. Por tanto, cabe esperar que procediendo de un progenitor común como es la célula madre pluripotencial en la médula ósea, la producción en equinos sea proporcionada en animales sanos. Es interesante saber que estos ratios se están utilizando como indicadores de inflamación en la especie humana y canina, como por ejemplo el ratio PLQ:GB, con resultados prometedores^{224,225}.

En la bioquímica también se observaron múltiples asociaciones entre parámetros. La asociación entre la U, algunas enzimas hepáticas y los TG, podría explicarse por su dependencia del metabolismo hepático, si bien no se encontró una justificación concreta en la bibliografía. Respecto de las relaciones significativas encontradas en la Cr, tan sólo se encontró justificación biológica en la asociación inversa con el P, por la formación de fosfocreatina a partir de creatina, metabolito para el almacenamiento energético en el músculo, reacción que da lugar a la Cr³⁸. Se halló una asociación proporcional entre las PT y sus principales componentes, la ALB y las GLOB. En cambio, no se halló justificación para la asociación de las PT con la GGT, más allá de su relación con el metabolismo hepático. La asociación de la ALB con la bilirrubina, podría deberse a su unión con la BI en su transporte al hígado. La relación inversa de la ALB y las GLOB, podría explicarse por su función para regular la presión oncótica plasmática³⁸. La asociación de la ALB con el Ca también podría guardar relación con la proporción de este mineral unido a la ALB⁴⁹. La relación positiva de la ALB con los TG tendría explicación por su origen hepático común, al igual que su relación negativa con la ALP y la LDH, sin quedar estas asociaciones respaldadas de otro modo por la bibliografía consultada. La relación inversa de las GLOB con la bilirrubina, pudo ser producto de la asociación de la bilirrubina con la ALB como proteína transportadora en sangre. Las enzimas hepáticas y musculares mostraron asociación positiva entre sí (AST, GGT, ALP, CK y LDH). Concretamente, la asociación de GGT con la ALP, reflejaría su función común como indicadores de colestasis. La asociación positiva de la CK con la LDH, por su origen muscular y con el P por la reacción que cataliza¹⁸. Se desconoce la naturaleza de las asociaciones negativas entre la bilirrubina y las enzimas GGT, ALP y LDH, más allá del origen hepático común.

La relación de TAS y 8-OHdG séricas guardó una relación directamente proporcional, hecho que se contrapone con lo publicado en la bibliografía. Esto podría deberse principalmente a que los trabajos publicados, que coincidían en señalar una correlación negativa de ambos marcadores de estrés oxidativo, incluyeron una población con enfermedad o sometida a un entrenamiento de alta intensidad, donde TAS se incrementaba y 8-OHdG disminuía²²⁶⁻²²⁹. En otro estudio en la especie

humana se halló asociación positiva de TAS con el ejercicio, pero no entre 8-OHdG y el nivel de entrenamiento²³⁰. Un trabajo reciente en osos, sugiere la relación entre el comportamiento social y la 8-OHdG fecal, modulado por el estado de salud, la personalidad y otros factores individuales²³¹. Por tanto, la correlación de estos metabolitos en animales sanos, muchos de ellos con un régimen de entrenamiento menor, parece tener poca relevancia a nivel biológico.

Las asociaciones entre las variables analíticas y los datos del cuestionario o factores, representados de forma gráfica, mostraron cómo dichas variables no sólo oscilaron por su relación directa con otros analitos, sino que además se vieron afectadas por estos factores, todo ello en el marco de los límites fisiológicos. Si a esta red de conexiones ya de por sí compleja, se añade el hecho comprobado de que los factores analizados pueden a su vez influirse entre sí, la interpretación de esta red de asociaciones se torna mucho más compleja, sobre todo para discernir qué factores influyen realmente sobre una determinada variable analítica. Todo ello pone de manifiesto la complejidad para definir “valores normales”, ya que cada resultado puede estar influenciado por multitud de factores.

5.3.2. Análisis multivariable

Para la interpretación de los resultados de los modelos se estableció en primer lugar, que el incumplimiento de alguno de los supuestos podría afectar a los resultados obtenidos y por tanto, se decidió no interpretar dichas asociaciones, por existir incertidumbre acerca de su veracidad.

En el modelo de los GB, este parámetro fue menor en caballos entrenados diariamente respecto de los animales con una regularidad de entrenamiento baja. Si bien algunos autores señalan que el recuento de GB no se ve afectado por el entrenamiento¹⁵³, otros postulan que un entrenamiento moderado tiene efectos beneficiosos y estimulantes sobre el sistema inmunitario²³². En otros estudios se ha observado una disminución de los GB en el 4º y 5º mes de entrenamiento regular

en los caballos, comparado con el recuento inicial²³³, lo cual podría explicar los resultados del presente trabajo. Acerca de la estación del año y recuento de GB en caballos, existen pocos estudios en la bibliografía, con diferentes resultados. Algunos autores proponen que la estación no afecta al nivel de GB²³⁴, mientras que otros señalan que si hay cambios, en potros y en yeguas de cría^{235,236}. Los factores que producen cambios fisiológicos de los GB entre estaciones propuestos en otros trabajos, tanto en veterinaria como en sanidad humana, fueron las condiciones climáticas, el fotoperiodo, las variaciones de los subtipos celulares y la estacionalidad de procesos inflamatorios subclínicos y autoinmunes^{235,237-240}. En relación con los resultados del presente estudio, el mayor nivel de GB en los meses de primavera y otoño podría estar relacionado con un mayor estímulo sobre el sistema inmune, asociada a procesos alérgicos o parasitarios subclínicos.

En el modelo elaborado a partir de los GR, el sexo y la edad mostraron variaciones significativas entre sus categorías. En consonancia con otros estudios, en este trabajo se observa que el grupo de caballos jóvenes contó con un recuento de GR mayor que en caballos adultos y en equinos de edad avanzada, posiblemente relacionado con una disminución de la actividad de la médula ósea asociada a la edad^{135,138,201,241,242}. Los machos enteros mostraron con un mayor número de GR que los machos castrados y las hembras, observación ya contemplada ampliamente en la bibliografía, posiblemente debida a la estimulación androgénica de la eritropoyesis^{16,28}.

El Hct se asoció de manera significativa con las estaciones del año y el sexo. El incremento del Hct en los meses de primavera en comparación con los meses fríos del año (otoño e invierno), ha sido documentado en otros trabajos resumidos por Satué²⁸. Este fenómeno también ha sido explicado en ratones, que mostraron una menor vida media de los GR asociada al frío intenso²⁴³. El menor porcentaje de Hct en machos castrados y hembras, comparado con los machos enteros, se halla en consonancia lo observado en los GR y en otros trabajos publicados^{16,244}.

La Hb en este estudio fue menor en hembras que en machos, dato que se corresponde con sus variables asociadas, GR y Hct y con lo publicado anteriormente^{16,28,135}. La menor concentración de

Hb en los caballos de salto podría estar asociada a la población muestreada, dado que entre los caballos de salto hay una mayor proporción de hembras que en el grupo de caballos de doma. No obstante, el valor de p obtenido de la asociación de la Hb en caballos de salto y en los muestreados en otoño roza el límite de la no significancia, lo cual explicaría el escaso aporte de estas dos asociaciones desde el punto de vista biológico.

La concentración de U en sangre se mostró significativamente más elevada en los caballos de salto y de otras disciplinas, que en los caballos de doma. Esto podría estar relacionado con la proporción de masa muscular y la miólisis inducida por el tipo de ejercicio, el porcentaje de proteína administrado en la dieta, o al papel de la U descrito en la retención renal de agua, responsable de la hipervolemia inducida por el entrenamiento^{245,246}.

La elevación del nivel de Cr en animales geriátricos podría ser debido a una disminución en la tasa de filtración glomerular, bien por cambios degenerativos subclínicos de las nefronas o bien asociada al ejercicio²⁴⁷.

La mayor concentración de AST sérica en animales jóvenes no entrenados hallada en el presente trabajo, también ha sido observada en otras publicaciones^{248,249}. Estos trabajos sugieren que los niveles de esta enzima son más elevados en las etapas iniciales del entrenamiento, habitual en la doma de animales jóvenes. A medida que el nivel de entrenamiento progresa, los niveles de AST disminuyen^{248,249}.

El nivel de acondicionamiento físico, de mayor regularidad e intensidad en los caballos de salto en este estudio, podría explicar los menores niveles de GGT respecto de los caballos de doma, menos acostumbrados en su régimen de entrenamiento a los sobreesfuerzos, lo cual se traduciría en una ligera elevación de la GGT dentro de los límites fisiológicos²⁵⁰.

La ALP se mostró en este estudio en el límite superior del rango fisiológico en los meses de primavera y otoño, en animales con acceso al exterior y en entrenamientos de menos de 1 hora de

duración. Dado que los animales con acceso al exterior y muestreados en primavera y otoño entrenaban menos si se comparan con los animales estabulados y entrenados en invierno, los niveles más elevados de ALP podrían asociarse con animales con menor nivel de acondicionamiento físico, lo cual guarda relación con otros trabajos, que señalan un incremento de la ALP asociado al ejercicio físico en animales no habituados²⁵¹.

La elevación de la BT asociada en los meses de invierno con respecto al otoño y en caballos de salto en comparación con los de doma, pudo explicarse una vez más por su asociación con el entrenamiento ya indicado por otros autores, debido a que en este estudio las muestras tomadas en invierno y en caballos de salto se encuentran asociadas a mayores niveles de ejercicio²⁵². Tanto en la especie humana como en la equina se ha documentado la denominada “anemia del deportista”, que puede explicarse en parte por una hemólisis intravascular inducida por el ejercicio. Debido a la degradación de la Hb liberada por la lisis eritrocitaria se forma bilirrubina, cuyos niveles suelen incrementarse en el día siguiente al evento deportivo²⁵³.

La CK no mostró asociación significativa con los factores incluidos en el estudio, lo cual muestra concordancia con otros trabajos en los que esta enzima permanece estable en relación al entrenamiento²⁵². El hecho de que no se encuentre elevación de esta enzima asociado a un sobreesfuerzo, indicado por otros marcadores bioquímicos en este trabajo, puede deberse a su corta vida media, ya que incluso con elevaciones marcadas, vuelve a niveles basales en 24-48 horas⁴⁴.

La asociación de la LDH con la raza y el ejercicio, ha sido descrita en otros trabajos, donde también se observó una mayor elevación de las enzimas musculares en el PRE en respuesta al entrenamiento, si se compara con otras razas^{254,255}. Esto puede responder al porcentaje de masa muscular de la propia raza y al tipo de entrenamiento realizado. Una vez más, en este modelo se evidenció que los menores niveles de enzima muscular corresponden a individuos con mejor acondicionamiento físico.

La estacionalidad observada en el Ca sérico mostró igual tendencia, con niveles más elevados en los meses de invierno y verano (aunque este último no se encuentra representado en este trabajo), y menores en primavera y otoño, en asociación con las horas de luz, absorción de vitamina D y la actividad de la hormona paratiroidea²⁵⁶. En cambio, el menor nivel de Ca encontrado en los caballos de salto respecto de las otras disciplinas no se corresponde con lo observado por otros autores, que sostienen que los niveles de Ca y otros electrolitos se mantienen constantes en caballos de deporte independientemente del uso²⁵⁷. No obstante, hay que puntualizar que, en el trabajo referenciado, consideraron no significativa una diferencia de 0,28 mg/dl entre disciplinas mientras que el presente modelo considera significativa una diferencia de 0,36 mg/dl.

Atendiendo a los modelos constituidos con los marcadores de estrés oxidativo, la regresión lineal mixta elaborada para el AU mostró asociación significativa con la regularidad del ejercicio. Si bien no se cumplía el supuesto de homocedasticidad, cabe señalar que la varianza de los residuos en las categorías con diferencias significativas es bastante similar, por lo que en este caso concreto la heterocedasticidad observada no parece afectar a las diferencias encontradas. Es por ello por lo que esta asociación si se tuvo en cuenta para la presente discusión.

El modelo para el AU mostró una asociación con la regularidad del ejercicio, con valores más elevados en animales que entrenan diariamente comparado con los que trabajaban con baja frecuencia. Este resultado es contrario al hallado en otros trabajos, donde la elevación del AU se asociaba con una peor condición física⁶⁴. En otras publicaciones la correlación encontrada entre el AU y el rendimiento, era muy débil, posiblemente por el tipo de metabolismo muscular desarrollado, ya que el AU es considerado un marcador del metabolismo anaerobio del músculo esquelético²⁵⁸. El entrenamiento diario se encontró asociado con un mayor esfuerzo muscular, lo cual podría explicar los resultados obtenidos.

En cierto modo, es esperable no haber encontrado asociaciones significativas en el resto de los marcadores de estrés oxidativo, debido a que son indicadores del desequilibrio oxidante-

antioxidante, descrito principalmente asociado a patologías y a la suplementación alimentaria con antioxidantes. En la bibliografía consultada, también se hallaron estudios que evaluaron TAS y TBARS asociados a factores fisiológicos. En TAS no se encontraron diferencias significativas asociadas al sexo, a la raza y a la edad⁶⁵. Sólo se hallaron diferencias de TAS en diferentes establos, en los que las condiciones ambientales eran muy distintas⁶⁵. Estas diferencias ambientales entre explotaciones no se dan en presente trabajo. En la evaluación de TAS asociado el ejercicio en otro estudio, no se hallaron diferencias significativas, supuestamente al no ser el ejercicio suficientemente intenso o prolongado⁹¹. Si bien el tipo ejercicio realizado por la población de estudio fue variable, es cierto que puede no haber sido suficientemente intenso como para provocar estrés oxidativo. Los cambios encontrados en TBARS respecto a la edad en la bibliografía, comparan yeguas adultas con potros de un año, edad no representada en la población de estudio del presente trabajo⁸³. En una publicación que evaluó diferencias entre dos razas y el sexo, sí se hallaron diferencias en TBARS⁸⁴. No obstante, se comparó una raza de sangre caliente con una de sangre fría por lo que esta asociación no es extrapolable al presente trabajo. En cambio, los resultados en el sexo, con mayores niveles de TBARS en hembras que en machos, fueron atribuibles a una mayor sensibilidad de las hembras a factores estresantes, principalmente en animales con mucho temperamento⁸⁴. Estos resultados sí coinciden con lo obtenido en el presente análisis multivariable. Sin embargo, al no haberse cumplido los supuestos de este modelo, estos resultados deben ser interpretados con cautela. La disminución de TBARS atribuida a un mejor acondicionamiento físico en otro estudio, fue demostrada midiendo los niveles pre y post ejercicio⁸⁰, mientras que en el presente trabajo sólo se ha realizado una determinación en caballos en reposo, por lo que no es posible evaluar su asociación directa con la actividad física.

Por último señalar que los estudios encontrados hasta la fecha de 8-OHdG sérica en equinos, fueron en asociación con una patología respiratoria⁷⁵ y en respuesta a la suplementación en caballos de carreras⁹⁷, por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo no son equiparables. El hecho

de no encontrar cambios en los niveles de 8-OHdG en relación con factores fisiológicos, indica que dichos factores no producen un daño oxidativo a nivel del ADN en caballos sanos. Por tanto, podría decirse que TAS, TBARS y 8-OHdG son marcadores que permanecen en general estables en una población de caballos sanos y no parecen estar influenciados por ningún tipo de factor dentro de los límites fisiológicos.

FUTURO TRABAJO

6. FUTURO TRABAJO

La determinación de IR en caballos residentes en centros hípicas en la región central de España, en comparación con la bibliografía, pone de manifiesto que existen diferencias en algunas de las variables y que se ha determinado por primera vez en este trabajo el IR de 8-OHdG sérica en el caballo. Además, en este estudio también se han sentado las bases para el empleo de un método alternativo válido en el cálculo de IR. Queda también constatado que existen múltiples factores fisiológicos que de un modo u otro afectan a los resultados analíticos de la hematología y la bioquímica y que por tanto deben tenerse en consideración a la hora de realizar e interpretar análisis clínicos. Dichos factores fisiológicos, a su vez, ejercen poca o nula influencia sobre los marcadores de estrés oxidativo.

Como continuación a las conclusiones del presente trabajo, las líneas de investigación a seguir serían: 1) el desarrollo de un método de determinación de intervalos a través una primera investigación con códigos R que posteriormente se transformen a través de determinadas aplicaciones en una interfase sencilla y de fácil manejo para su implementación en laboratorios; de esta forma, al introducir los datos específicos de un caballo para su análisis, esta herramienta calcularía los IR para los parámetros considerados; 2) el estudio de los ratios de las distintas líneas de células sanguíneas en diferentes patologías en el caballo y su significación clínica; 3) el estudio de los marcadores de estrés oxidativo – AU, TBARS, TAS y 8-OHdG - en caballos con alteración o patología en comparación con los valores de referencia obtenidos en este trabajo.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Los criterios de selección de la población muestral para la determinación de IR constituyeron una herramienta clave para detección de **animales con alteración subclínica, que representaron un 12% de la población inicial en la población estudiada.**
2. El método alternativo para la determinación de IR (**@RISK**), obtuvo intervalos en general **más acotados y con mejor ajuste a la distribución de los datos**, por lo que esta herramienta supone una mejora en la precisión del cálculo de los IR de las variables analíticas.
3. Los **IR de los parámetros hematológicos** guardan estrecha relación con la **edad y el tipo de raza**, mientras que en el análisis bioquímico, los **IR de las enzimas** se encuentran principalmente condicionados por el **método de determinación analítica y la actividad física.**
4. De la comparativa entre los marcadores de EO determinados y los resultados obtenidos en otros estudios, se observaron **IR del AU similares a los del PRE** (raza mayoritaria en este estudio), **IR diferentes para TBARS** posiblemente por la **imprecisión del método analítico**, **IR más amplios para TAS** por la **heterogeneidad del nivel de entrenamiento y del temperamento de los animales** estudiados, e **IR establecidos *de novo* para la 8-OHdG sérica** en caballos.
5. La **asociación encontrada entre GR, GB y PLQ**, sugiere una posibilidad de creación de **ratios** con interés como **marcadores inflamatorios**, ya utilizados en otras especies.

6. **La asociación encontrada entre las variables del análisis bioquímico** se debió en gran medida a su **metabolismo**, mientras que **la asociación encontrada entre los marcadores de estrés oxidativo en condiciones fisiológicas fue débil o inexistente.**
7. La **complejidad de las asociaciones** entre las variables analíticas y los factores fisiológicos pone de manifiesto **la importancia del análisis multivariable para dilucidar la influencia real de estas relaciones.**
8. En los modelos construidos con las variables del análisis hematológico, los **GB se reducen cuanto más regular es el ejercicio** y **aumentan en primavera y otoño probablemente por procesos subclínicos.** Se constata la **asociación entre GR, Hct y Hb con el sexo**, con **mayores índices en machos enteros**, ampliamente recogida en la bibliografía.
9. Los modelos construidos con las variables del análisis bioquímico reflejan que **la disciplina y la forma física son los factores con mayor influencia sobre las variables bioquímicas.**
10. En los modelos construidos con los marcadores de EO se observó una **relación directamente proporcional entre el AU y la regularidad del ejercicio** atribuida al **metabolismo muscular anaerobio** en respuesta al esfuerzo. La **falta de factores fisiológicos influyentes sobre TAS, TBARS y 8OHdG** puede explicarse **por la ausencia de patología o de ejercicio extenuante en los caballos estudiados.**
11. Debido a la dificultad para obtener de IR individualizados en la clínica equina es fundamental que **todos los pasos para su determinación sean objeto de continua mejora** y que, debido a su impacto sobre los juicios clínicos, **la variabilidad por influencia de factores fisiológicos como el tipo de raza o la actividad física sea tomada en cuenta.**

ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado de participación en el estudio.

Determinación de intervalos de referencia de parámetros hematológicos, bioquímicos y de estrés oxidativo en caballos residentes en centros hípicos en la zona central de España.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

- Por el presente acepto, que parte de los 10 mL de sangre de los caballos, destinada al chequeo anual de salud, sea utilizada para la determinación por parte el investigador del proyecto, de parámetros adicionales tanto bioquímicos como de estrés oxidativo.
- Por la presente doy mi permiso para la conservación de las muestras en el laboratorio para las posibles investigaciones de interés relacionadas con el proyecto.
- Por la presente acepto proporcionar al investigador de este proyecto la información relativa a los datos del animal, estado sanitario, hábitat, alimentación, régimen de entrenamiento y otra información relacionada, y acepto cumplimentar un cuestionario con este propósito.

Firmado:

Veterinario del caballo o Propietario del caballo

Fecha: _____ / _____ / _____

Anexo 2. Cuestionario de recogida de datos de los animales muestreados.

Identificación: _____ Fecha de recogida: _____

Lugar de recogida: _____ Hora de recogida: _____

INFORMACIÓN GENERAL

Edad		Sexo	M / H
Raza		Estado reproductivo	♂ entero / castrado ♀ gestante / vacía
Vacunación < 6 meses	gripe / tétanos rino / wnv	Desparasitación < 6 meses	S / N
Condición corporal (1-5)			
Alojamiento	box	prado	mixto
Dieta	heno / alfalfa / paja / avena / cebada / pienso compuesto		
Suplemento dietético (vit E, selenio, vit C, multivitamínicos, minerales, aceite...)			

RÉGIMEN DE EJERCICIO

Regularidad	diario	4-6 días/semana	1-3 días/semana	no trabaja
Intensidad	muy intenso	intenso	moderado	ligero
Duración	> 2 horas	1-2 horas	< 1 hora	
Disciplina	paseo	doma	salto	otro: _____

HISTORIA CLÍNICA (Señalar la presencia de alguna de estas alteraciones en el último mes, si procede).

	No	Si
Cojera		
Enfermedad articular (osteoartritis, OCD) RAO ⁽¹⁾ o EIPH ⁽²⁾ (1) RAO = Recurrent Airway Obstruction; (2) EIPH = Exercise induced pulmonary hemorrhage		
Rabdomiolisis		
Cólico		
Diarrea		
Endometritis		

Síndrome de Cushing		
Quemaduras		
Laminitis		
Patología renal		
Patología hepática		
Anemia		
Tumores (melanomas)		
Anestesia general		
Neurona motora equina		
Transporte		
Signos de inflamación en los últimos 7 días		
Signos de infección en los últimos 7 días		
Medicación administrada en los últimos 7 días (fenilbutazona, n-acetilcisteína, DMSO, ...)		Especificar:

EXAMEN FÍSICO

Actitud general	alerta	nervioso	decaído
Pliegue cutáneo	< 1 segundo	> 1 segundo	
Mucosas	rosas	pálidas	congestivas
TRC	< 2 segundos	2-3 segundos	> 2 segundos
Auscultación cardíaca	normal / patológico	Frecuencia cardíaca	normal / anormal Especificar:
Auscultación pulmonar	normal / patológico	Frecuencia respiratoria	normal / anormal Especificar:
Temperatura	normal / anormal Especificar:	Heces/orina	normal / anormal

Indicaciones para la recogida de muestras

- Rellenar un cuestionario por cada animal a analizar.
- La muestra debe recogerse mediante venopunción de la vena yugular, preferentemente a primera hora de la mañana con el animal en reposo, o al menos pasadas 2 horas después del trabajo.
- Deben extraerse al menos 15 ml de sangre, en vacutainers con EDTA y sin anticoagulante (2 tubos x 5 ml cada uno).
- Las muestras deben identificarse y almacenarse con frío inmediatamente y enviar a SEVISEQ junto con el cuestionario lo antes posible (desde la toma de muestras hasta su recepción en SEVISEQ no deben pasar más de 12 horas).

Anexo 3. Resultados del análisis hematológico de las muestras.

REFERENCIA	FECHA	GB	NEU%	LIN%	MON%	EO%	BAS%	NEU	LIN	MON	EO	BAS	GR	Hb	Hct	VCM	HCM	CHCM	RDW-CV	PLQ	VPM
VSEI7/00025	10/01/2017	6,8	58	35	5	2	0	3,94	2,38	0,34	0,14	0,00	9,47	14,1	34,3	36,3	14,8	41,1	20,1	244	6,7
VSEI7/00026	10/01/2017	7,1	51	45	1	3	0	3,62	3,19	0,07	0,21	0,00	10,86	16,4	39,7	36,6	15,1	41,3	20,0	315	6,7
VSEI7/00027	10/01/2017	7,7	58	34	5	3	0	4,47	2,62	0,38	0,23	0,00	7,88	12,4	31,0	39,4	15,7	40,0	17,6	158	6,5
VSEI7/00028	10/01/2017	5,5	53	43	2	2	0	2,91	2,36	0,11	0,11	0,00	8,47	13,0	34,6	40,9	15,3	37,5	19,2	152	6,8
VSEI7/00057	13/01/2017	6,6	66	30	4	0	0	4,36	1,98	0,26	0,00	0,00	7,38	13,0	32,8	44,5	17,6	39,6	18,8	85	6,5
VSEI7/00058	13/01/2017	7,3	55	39	5	1	0	4,01	2,85	0,36	0,07	0,00	9,19	13,5	34,0	37,1	14,6	39,7	19,8	229	6,8
VSEI7/00059	13/01/2017	8,5	42	54	1	3	0	3,57	4,59	0,08	0,25	0,00	8,97	15,0	39,8	44,4	16,7	37,6	18,8	137	6,6
VSEI7/00060	13/01/2017	6,0	61	27	1	11	0	3,66	1,62	0,06	0,66	0,00	8,02	12,7	32,8	40,9	15,8	38,7	19,2	134	6,7
VSEI7/00061	13/01/2017	8,8	62	36	1	1	0	5,46	3,17	0,09	0,09	0,00	9,16	14,0	35,4	38,7	15,2	39,5	20,1	216	6,6
VSEI7/00063	14/01/2017	3,8	52	42	4	2	0	1,98	1,60	0,15	0,08	0,00	6,10	10,8	27,2	44,7	17,7	39,7	18,7	84	6,1
VSEI7/00064	14/01/2017	4,1	72	24	3	1	0	2,95	0,98	0,12	0,04	0,00	8,05	13,7	35,0	43,5	17,0	39,1	17,1	84	6,2
VSEI7/00065	14/01/2017	4,3	49	46	2	1	2	2,11	1,98	0,09	0,04	0,09	6,05	9,7	24,9	41,2	16,0	38,9	19,1	116	5,6
VSEI7/00066	14/01/2017	6,1	52	44	1	3	0	3,17	2,68	0,06	0,18	0,00	7,55	13,1	33,2	44,0	17,3	39,4	18,0	96	5,9
VSEI7/00073	14/01/2017	5,4	56	41	3	0	0	3,02	2,21	0,16	0,00	0,00	7,17	11,9	29,1	40,7	16,5	40,8	19,3	103	5,7
VSEI7/00074	14/01/2017	5,7	68	32	0	0	0	3,88	1,82	0,00	0,00	0,00	7,21	11,9	29,2	40,6	16,5	40,7	18,3	111	5,7
VSEI7/00089	18/01/2017	5,9	63	31	4	1	1	3,72	1,83	0,24	0,06	0,06	9,18	13,9	34,8	38,0	15,1	39,9	18,2	181	6,4
VSEI7/00090	18/01/2017	5,8	56	35	3	2	4	3,25	2,03	0,17	0,12	0,23	8,36	13,4	34,0	40,7	16,0	39,4	18,2	142	6,3
VSEI7/00091	18/01/2017	4,4	55	37	3	5	0	2,42	1,63	0,13	0,22	0,00	6,83	10,3	27,4	40,2	15,0	37,5	19,6	104	5,4
VSEI7/00092	18/01/2017	6,1	55	43	2	0	0	3,36	2,62	0,12	0,00	0,00	9,00	14,3	34,9	38,8	15,8	40,9	21,3	178	6,5
VSEI7/00093	18/01/2017	4,7	52	48	0	0	0	2,44	2,26	0,00	0,00	0,00	7,75	13,1	32,5	42,0	16,9	40,3	19,9	136	6,2
VSEI7/00094	18/01/2017	3,8	55	45	0	1	0	2,09	1,71	0,00	0,04	0,00	7,50	11,7	29,7	39,7	15,6	39,3	18,7	96	5,6
VSEI7/00095	18/01/2017	4,2	67	28	2	3	0	2,81	1,18	0,08	0,13	0,00	6,22	10,9	27,6	44,5	17,5	39,4	17,8	135	5,9
VSEI7/00096	18/01/2017	6,5	55	45	0	0	0	3,58	2,93	0,00	0,00	0,00	6,60	11,3	27,5	41,8	17,1	41,0	17,8	93	5,7
VSEI7/00097	18/01/2017	5,3	60	39	1	0	0	3,18	2,07	0,05	0,00	0,00	6,84	12,0	29,7	43,5	17,5	40,4	19,2	108	5,3
VSEI7/00098	18/01/2017	4,6	50	45	3	2	0	2,30	2,07	0,14	0,09	0,00	7,51	13,2	32,3	43,1	17,5	40,8	20,4	76	5,6
VSEI7/00109	19/02/2017	3,7	56	43	1	0	0	2,07	1,59	0,04	0,00	0,00	6,23	11,0	27,9	44,8	17,6	39,4	17,7	113	5,9
VSEI7/00110	19/02/2017	6,3	54	42	4	0	0	3,40	2,65	0,25	0,00	0,00	7,20	12,5	31,3	43,6	17,3	39,9	19,2	68	5,6
VSEI7/00111	19/02/2017	6,7	63	32	5	0	0	4,22	2,14	0,34	0,00	0,00	6,47	10,6	33,4	51,7	16,3	31,7	20,0	230	8,8
VSEI7/00112	19/02/2017	5,4	56	43	1	0	0	3,02	2,32	0,05	0,00	0,00	7,07	11,0	28,4	40,2	15,5	38,7	19,5	114	6,5

VSE17/00113	19/02/2017	7,0	56	37	4	2	1	3,92	2,59	0,28	0,14	0,07	7,06	11,2	28,8	40,9	15,8	38,8	19,3	105	6,8
VSE17/00114	19/02/2017	4,9	56	39	3	2	0	2,74	1,91	0,15	0,10	0,00	5,87	10,7	28,2	48,2	18,2	37,9	18,4	120	5,9
VSE17/00115	19/02/2017	4,3	47	47	6	0	0	2,02	2,02	0,26	0,00	0,00	7,79	12,3	31,7	40,8	15,7	38,8	19,3	101	5,4
VSE17/00116	19/02/2017	5,7	67	32	1	0	0	3,82	1,82	0,06	0,00	0,00	9,02	13,8	39,6	37,3	15,2	41,0	19,7	198	6,3
VSE17/00117	19/02/2017	5,2	52	42	1	6	0	2,70	2,18	0,05	0,31	0,00	6,49	10,4	27,2	42,0	16,0	38,2	19,8	106	5,6
VSE17/00118	19/02/2017	6,3	56	40	3	1	0	3,53	2,52	0,19	0,06	0,00	7,25	12,3	31,9	44,1	16,9	38,5	21,0	124	5,7
VSE17/00119	19/02/2017	4,9	55	41	1	3	0	2,70	2,01	0,05	0,15	0,00	6,15	10,9	28,7	46,8	17,7	37,9	19,0	113	5,7
VSE17/00136	26/01/2017	4,5	65	32	1	2	0	2,93	1,44	0,05	0,09	0,00	7,40	12,0	31,4	42,5	16,2	38,2	17,5	83	5,6
VSE17/00450	16/03/2017	7,7	56	42	1	1	0	4,31	3,23	0,08	0,08	0,00	9,58	15,5	42,3	44,2	16,1	36,6	19,0	210	6,3
VSE17/00451	16/03/2017	6,0	51	44	4	1	0	3,06	2,64	0,24	0,06	0,00	7,86	12,6	34,5	43,9	16,0	36,5	20,3	169	6,3
VSE17/00452	16/03/2017	8,2	55	43	2	0	0	4,51	3,53	0,16	0,00	0,00	9,98	16,2	42,5	42,6	16,2	38,1	19,6	226	6,5
VSE17/00453	16/03/2017	7,8	62	37	0	1	0	4,84	2,89	0,00	0,08	0,00	5,63	11,5	28,9	51,5	20,4	39,7	18,5	100	5,4
VSE17/00454	16/03/2017	9,0	52	45	3	0	0	4,68	4,05	0,27	0,00	0,00	5,97	10,7	30,9	51,9	17,9	34,6	19,3	134	6,3
VSE17/00455	16/03/2017	5,0	60	37	2	1	0	3,00	1,85	0,10	0,05	0,00	7,17	12,4	35,9	50,1	17,2	34,5	19,0	85	6,3
VSE17/00456	16/03/2017	6,7	66	30	4	0	1	4,42	2,01	0,27	0,00	0,07	7,00	12,1	35,0	50,0	20,1	40,7	18,0	113	6,0
VSE17/00457	16/03/2017	6,7	59	36	2	3	0	3,95	2,41	0,13	0,20	0,00	6,60	11,7	36,0	54,0	17,8	32,8	20,0	112	5,9
VSE17/00458	16/03/2017	5,4	56	43	1	0	0	3,02	2,32	0,05	0,00	0,00	6,70	11,1	32,0	48,0	16,4	34,6	19,0	108	5,9
VSE17/00459	16/03/2017	4,8	61	32	6	0	1	2,93	1,54	0,29	0,00	0,05	8,10	13,9	39,0	48,0	17,1	35,8	20,0	148	6,2
VSE17/00460	16/03/2017	6,9	57	41	2	0	0	3,93	2,83	0,14	0,00	0,00	8,70	13,7	38,0	44,0	15,7	36,0	20,0	166	6,5
VSE17/00503	23/03/2017	5,5	58	41	1	0	0	3,19	2,26	0,06	0,00	0,00	7,42	12,2	34,5	46,5	16,4	35,3	18,1	88	5,8
VSE17/00504	23/03/2017	7,4	59	39	0	1	1	4,37	2,89	0,00	0,07	0,07	8,23	13,6	38,1	46,4	16,5	35,6	19,2	125	6,3
VSE17/00505	23/03/2017	7,0	62	34	2	1	1	4,34	2,38	0,14	0,07	0,07	7,53	12,2	34,1	45,4	16,2	35,7	19,6	160	6,1
VSE17/00506	23/03/2017	6,3	60	37	0	3	0	3,78	2,33	0,00	0,19	0,00	7,99	12,6	35,8	44,9	15,7	35,1	18,7	144	6,2
VSE17/00507	23/03/2017	6,2	58	38	1	3	0	3,60	2,36	0,06	0,19	0,00	7,62	13,5	38,4	50,4	17,7	35,1	19,9	97	6,5
VSE17/00508	23/03/2017	10,0	71	28	1	0	0	7,10	2,80	0,10	0,00	0,00	7,05	11,9	33,2	47,2	16,8	35,8	18,9	85	5,4
VSE17/00509	23/03/2017	7,4	65	33	1	1	0	4,81	2,44	0,07	0,07	0,00	7,53	12,0	33,7	44,8	15,9	35,6	18,8	135	6,2
VSE17/00510	23/03/2017	8,1	55	44	0	1	0	4,46	3,56	0,00	0,08	0,00	7,79	12,0	33,9	43,6	15,4	35,3	20,4	168	6,3
VSE17/00511	23/03/2017	5,3	54	44	2	0	0	2,86	2,33	0,11	0,00	0,00	7,42	11,1	31,3	42,2	14,9	35,4	19,8	186	6,3
VSE17/00535	29/03/2017	8,4	61	38	0	1	0	5,12	3,19	0,00	0,08	0,00	7,64	13,2	37,3	48,9	17,2	35,3	19,4	77	5,7
VSE17/00536	29/03/2017	7,4	57	42	1	0	0	4,22	3,11	0,07	0,00	0,00	8,56	13,8	38,3	44,8	16,1	36,0	19,9	145	6,4
VSE17/00537	29/03/2017	9,2	63	37	0	0	0	5,80	3,40	0,00	0,00	0,00	8,42	13,3	37,3	44,4	15,7	35,6	20,1	188	6,4
VSE17/00539	29/03/2017	8,4	62	38	0	0	0	5,21	3,19	0,00	0,00	0,00	10,54	16,9	46,5	44,2	16,0	36,3	20,1	241	6,5
VSE17/00540	29/03/2017	9,2	53	48	0	0	0	4,88	4,42	0,00	0,00	0,00	5,78	9,6	27,0	46,8	16,6	35,5	20,2	158	5,3

REFERENCIA	FECHA	GB	NEU%	LIN%	MON%	EO%	BAS%	NEU	LIN	MON	EO	BAS	GR	Hb	Hct	VCM	HCM	CHCM	RDW-CV	PLQ	VPM
VSE17/00542	29/03/2017	8,7	65	34	0	1	0	5,66	2,96	0,00	0,09	0,00	8,74	15,6	43,4	49,7	17,8	35,9	20,1	130	5,4
VSE17/00543	29/03/2017	7,2	62	37	0	1	0	4,46	2,66	0,00	0,07	0,00	5,69	9,9	29,0	51,0	17,3	34,1	18,6	137	5,5
VSE17/00544	29/03/2017	10,5	62	32	1	4	1	6,51	3,36	0,11	0,42	0,11	8,50	14,1	41,3	48,7	16,5	34,1	19,5	121	6,6
VSE17/00545	29/03/2017	7,8	62	35	1	2	0	4,84	2,73	0,08	0,16	0,00	9,57	15,0	43,1	45,1	15,6	34,8	19,8	175	6,5
VSE17/00546	29/03/2017	6,7	63	35	1	2	0	4,22	2,35	0,07	0,13	0,00	6,91	11,9	34,2	49,6	17,2	34,7	19,1	83	5,7
VSE17/00547	29/03/2017	8,8	65	34	0	1	0	5,72	2,99	0,00	0,09	0,00	8,69	14,5	40,6	46,8	16,6	35,7	20,2	164	6,4
VSE17/00548	29/03/2017	9,1	49	50	0	1	0	4,46	4,55	0,00	0,09	0,00	7,12	10,8	29,9	42,0	15,1	36,1	19,9	169	6,4
VSE17/00549	29/03/2017	8,3	70	27	0	3	0	5,81	2,24	0,00	0,25	0,00	7,25	12,8	38,3	52,9	17,6	33,4	19,0	125	5,8
VSE17/00550	29/03/2017	8,4	68	31	0	1	0	5,71	2,60	0,00	0,08	0,00	7,88	13,5	36,7	46,6	17,1	36,7	19,2	90	5,3
VSE17/00748	28/04/2017	9,9	68	24	3	5	0	6,73	2,38	0,30	0,50	0,00	9,22	15,5	43,0	46,7	16,8	36,0	20,2	152	6,2
VSE17/00749	28/04/2017	9,0	72	25	3	0	0	6,48	2,25	0,27	0,00	0,00	9,21	16,4	46,0	50,0	17,8	35,6	19,0	135	6,3
VSE17/00750	28/04/2017	9,5	69	30	1	1	0	6,56	2,85	0,10	0,10	0,00	8,47	15,0	42,6	50,3	17,7	35,2	18,9	81	5,5
VSE17/00751	28/04/2017	9,6	54	40	3	3	0	5,18	3,84	0,29	0,29	0,00	7,98	13,2	37,6	47,2	16,5	35,1	20,0	144	5,3
VSE17/00752	28/04/2017	10,0	50	43	3	4	0	5,00	4,30	0,30	0,40	0,00	6,10	10,6	30,0	49,3	17,3	35,3	19,2	138	5,5
VSE17/00753	28/04/2017	7,8	53	43	1	2	1	4,13	3,35	0,08	0,16	0,08	9,32	14,2	39,3	42,2	15,2	36,1	20,9	248	6,2
VSE17/00754	28/04/2017	9,0	54	38	2	6	0	4,86	3,42	0,18	0,54	0,00	8,13	13,0	36,3	44,7	15,9	35,8	19,9	164	6,3
VSE17/00983	06/06/2017	8,3	57	40	0	3	0	4,73	3,32	0,00	0,25	0,00	7,81	12,9	36,4	46,7	16,5	35,4	20,2	149	6,4
VSE17/00984	04/06/2017	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,76	12,9	40,6	46,4	14,7	31,7	20,4	209	6,2
VSE17/00985	06/06/2017	7,4	61	38	1	0	0	4,51	2,81	0,07	0,00	0,00	7,70	12,1	35,2	45,8	15,7	34,3	18,4	120	6,3
VSE17/00986	04/06/2017	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,82	12,3	36,8	47,1	15,7	33,4	20,1	141	6,4
VSE17/01025	08/06/2017	7,2	69	28	2	1	0	4,97	2,02	0,14	0,07	0,00	7,00	12,0	34,5	49,3	17,1	34,7	18,2	122	6,6
VSE17/01026	08/06/2017	7,7	68	23	6	4	0	5,24	1,77	0,46	0,31	0,00	7,17	11,5	32,5	45,4	16,0	35,3	18,5	100	5,5
VSE17/01027	09/06/2017	9,2	51	46	1	2	0	4,69	4,23	0,09	0,18	0,00	6,76	11,3	32,7	48,4	16,7	34,5	18,5	102	5,8
VSE17/01028	08/06/2017	8,5	75	22	1	0	1	6,38	1,87	0,09	0,00	0,09	7,11	12,4	35,1	49,4	17,4	35,3	18,2	105	6,1
VSE17/01029	09/06/2017	10,6	54	39	5	2	0	5,72	4,13	0,53	0,21	0,00	8,80	14,3	40,5	46,1	16,2	35,3	19,4	169	6,3
VSE17/01030	08/06/2017	7,4	63	34	2	1	0	4,66	2,52	0,15	0,07	0,00	7,97	13,3	39,0	49,0	16,6	34,1	19,3	70	5,6
VSE17/01032	13/06/2017	9,0	58	37	3	1	1	5,22	3,33	0,27	0,09	0,09	7,39	12,5	33,4	45,3	16,9	37,4	18,6	140	6,1
VSE17/01036	14/06/2017	7,2	56	40	1	2	0	4,03	2,88	0,07	0,14	0,00	8,52	13,5	36,8	43,2	15,8	36,6	20,6	150	6,9
VSE17/01068	16/06/2017	6,1	62	32	3	3	0	3,78	1,95	0,18	0,18	0,00	7,16	11,4	32,8	45,9	15,9	34,7	19,4	100	5,7
VSE17/01069	16/06/2017	7,1	76	17	5	2	0	5,40	1,21	0,36	0,14	0,00	6,31	10,7	31,4	49,8	16,9	34,0	18,0	78	5,8
VSE17/02129	24/09/2017	6,6	62	36	0	2	0	4,09	2,38	0,00	0,13	0,00	8,13	12,5	36,3	44,7	15,3	34,4	19,7	133	6,4
VSE17/02131	24/09/2017	6,6	72	24	2	2	0	4,75	1,58	0,13	0,13	0,00	6,79	12,0	34,6	51,1	17,6	34,6	19,4	82	5,7
VSE17/02132	24/09/2017	10,1	76	20	2	2	0	7,68	2,02	0,20	0,20	0,00	7,18	10,7	32,1	44,8	14,9	33,3	19,7	145	6,4

Anexo 4. Resultados del análisis bioquímico de las muestras.

REFERENCIA	FECHA	U	Cr	PT	ALB	GLOB	ALB/GLOB	AST	GGT	ALP	BT	BD	BI	CK	LDH	Ca	P	Ca/P	TG	CT	Fib
VSE17/00025	10/01/2017	30,42	1,2	7,0	3,59	3,40	1,05	311,9	15	236	2,26	0,31	1,95	117,21	557,60	13,00	2,80	4,60	13,70	112	200
VSE17/00026	10/01/2017	29,18	1,4	7,1	3,52	3,60	0,98	301,6	14	323	1,92	0,29	1,63	88,98	735,80	13,10	3,70	3,50	19,50	125	300
VSE17/00027	10/01/2017	23,93	1,7	6,5	3,56	2,90	1,21	293,7	17	353	1,82	0,34	1,48	119,05	501,60	13,70	3,10	4,40	29,20	94	200
VSE17/00028	10/01/2017	25,30	1,2	6,3	3,38	2,90	1,16	221,8	3	173	1,57	0,35	1,22	76,71	359,60	12,80	3,50	3,70	29,90	87	100
VSE17/00057	13/01/2017	27,69	1,2	7,1	3,48	3,60	0,96	270,7	12	178	1,95	0,35	1,60	200,67	804,20	11,80	2,60	4,50	12,70	106	200
VSE17/00058	13/01/2017	33,46	1,4	7,1	3,33	3,80	0,88	336,2	16	234	1,40	0,23	1,17	214,17	736,80	13,00	2,60	5,00	26,00	127	200
VSE17/00059	13/01/2017	28,54	1,3	6,8	3,50	3,30	1,06	323,9	12	230	2,31	0,50	1,81	246,70	788,70	12,50	3,00	4,20	26,40	83	200
VSE17/00060	13/01/2017	30,95	2,2	6,6	3,44	3,20	1,09	266,0	12	326	2,45	0,26	2,19	128,87	433,20	13,40	2,90	4,60	19,60	140	200
VSE17/00061	13/01/2017	40,65	1,3	6,8	3,30	3,50	0,94	314,8	8	284	1,94	0,37	1,57	165,08	1227,00	12,50	2,50	5,00	20,40	102	100
VSE17/00063	14/01/2017	30,03	1,7	6,9	3,11	3,80	0,82	264,5	7	84	1,46	0,23	1,23	125,19	420,75	12,20	2,50	4,90	22,40	128	200
VSE17/00064	14/01/2017	28,11	1,5	6,6	3,58	3,00	1,19	267,2	11	103	2,48	0,35	2,13	168,76	497,45	13,30	2,90	4,60	20,30	98	200
VSE17/00065	14/01/2017	28,93	1,8	6,7	3,24	3,50	0,94	285,9	6	95	2,24	0,28	1,96	219,69	361,15	13,00	3,30	3,90	15,00	74	100
VSE17/00066	14/01/2017	28,51	1,2	7,4	3,22	4,20	0,77	312,9	16	118	2,32	0,33	1,99	168,76	413,00	12,80	2,30	5,60	20,50	82	200
VSE17/00073	14/01/2017	22,58	1,5	7,0	3,57	3,40	1,04	265,3	7	89	2,48	0,31	2,17	136,85	241,45	12,20	2,60	4,70	13,20	106	100
VSE17/00074	14/01/2017	27,33	1,6	6,8	3,47	3,30	1,04	283,7	12	121	1,79	0,30	1,49	172,44	487,60	12,50	2,70	4,60	13,30	86	200
VSE17/00089	18/01/2017	25,87	1,1	7,1	3,60	3,50	1,03	384,1	15	272	1,53	0,24	1,29	210,49	1029,10	12,30	3,00	4,10	17,80	89	300
VSE17/00090	18/01/2017	30,90	1,4	6,4	3,50	2,90	1,21	286,1	15	236	1,96	0,28	1,68	223,38	876,70	12,80	1,20	10,70	11,80	94	200
VSE17/00091	18/01/2017	26,82	1,4	7,4	3,32	4,10	0,81	259,1	19	295	1,87	0,26	1,61	138,69	607,30	12,60	2,10	6,00	20,10	134	300
VSE17/00092	18/01/2017	18,41	1,7	7,3	3,49	3,80	0,92	235,8	3	242	3,13	0,33	2,80	136,85	470,50	12,90	2,90	4,40	34,00	88	200
VSE17/00093	18/01/2017	19,85	1,6	6,6	3,37	3,20	1,04	222,8	14	233	2,33	0,30	2,03	119,67	693,30	12,40	2,30	5,40	25,20	84	300
VSE17/00094	18/01/2017	35,14	2,1	7,3	3,50	3,80	0,92	310,2	23	217	2,51	0,28	2,23	122,73	777,30	13,40	2,60	5,20	26,30	134	100
VSE17/00095	18/01/2017	25,44	1,6	6,3	3,12	3,20	0,98	264,8	10	253	2,11	0,27	1,84	90,82	467,40	12,20	2,60	4,70	8,30	109	200
VSE17/00096	18/01/2017	38,52	2,9	6,3	3,53	2,80	1,27	239,0	7	259	4,18	0,37	3,81	82,85	363,80	12,90	2,50	5,20	21,70	97	200
VSE17/00097	18/01/2017	38,15	2,5	6,7	3,34	3,40	0,99	243,2	28	321	1,89	0,26	1,63	133,17	457,00	11,50	1,90	6,10	30,70	144	200
VSE17/00098	18/01/2017	36,32	1,9	6,9	3,76	3,10	1,20	343,3	17	295	3,03	0,35	2,68	171,83	570,00	12,70	2,40	5,30	24,70	111	200
VSE17/00109	19/02/2017	40,15	1,4	6,5	3,66	2,80	1,29	230,4	3	161	2,34	0,32	2,02	139,92	612,50	12,10	3,10	3,90	8,80	73	300
VSE17/00110	19/02/2017	29,63	1,7	6,7	3,65	3,00	1,20	300,1	10	219	2,44	0,37	2,07	220,92	643,60	12,90	2,60	5,00	22,50	93	200
VSE17/00111	19/02/2017	31,07	1,4	6,3	3,44	2,90	1,20	238,3	8	161	1,96	0,30	1,66	233,81	687,10	12,20	3,80	3,20	30,50	110	200
VSE17/00112	19/02/2017	30,50	1,3	6,5	3,40	3,10	1,10	259,6	10	236	2,00	0,28	1,72	216,01	577,20	12,90	3,20	4,00	8,60	110	200

VSE17/00113	19/02/2017	31,29	1,3	6,4	3,44	3,00	1,16	279,0	6	289	3,65	0,36	3,29	180,42	733,70	12,20	3,30	3,70	19,00	97	200
VSE17/00114	19/02/2017	33,68	1,4	6,2	3,31	2,90	1,15	284,9	19	352	2,16	0,34	1,82	177,96	706,80	12,50	3,80	3,30	8,90	89	200
VSE17/00115	19/02/2017	30,48	1,5	6,2	3,46	2,70	1,26	264,5	10	257	1,89	0,28	1,61	192,08	503,70	12,40	2,80	4,40	15,50	104	200
VSE17/00116	19/02/2017	24,94	1,6	6,8	3,34	3,50	0,97	250,3	13	193	2,14	0,41	1,73	178,58	680,90	12,70	3,20	4,00	63,20	180	200
VSE17/00117	19/02/2017	26,74	1,7	6,3	3,09	3,20	0,96	223,6	11	295	1,73	0,26	1,47	137,46	529,60	12,30	2,70	4,60	24,80	152	300
VSE17/00118	19/02/2017	29,77	1,3	7,0	3,73	3,30	1,14	287,6	18	298	1,91	0,27	1,64	199,44	635,30	13,30	2,70	4,90	26,00	132	200
VSE17/00119	19/02/2017	26,51	1,2	6,0	3,51	2,50	1,41	239,3	8	255	2,22	0,30	1,92	193,31	599,00	12,00	3,20	3,80	11,80	71	200
VSE17/00136	26/01/2017	25,50	2,1	6,8	3,35	3,50	0,97	236,3	5	179	2,71	0,32	2,39	140,53	373,10	12,80	2,40	5,30	13,00	116	200
VSE17/00450	16/03/2017	28,42	1,4	6,7	3,64	3,10	1,19	285,6	15	223	2,26	0,35	1,91	311,74	686,10	12,10	2,80	4,30	28,20	109	100
VSE17/00451	16/03/2017	19,76	1,2	6,3	3,04	3,30	0,93	259,1	11	269	2,03	0,35	1,68	144,83	498,50	12,30	2,40	5,10	44,80	122	100
VSE17/00452	16/03/2017	21,14	1,3	7,0	3,31	3,70	0,90	278,3	11	191	1,80	0,34	1,46	134,39	497,40	12,80	2,40	5,30	30,70	122	100
VSE17/00453	16/03/2017	29,68	1,5	6,2	2,87	3,30	0,86	344,1	23	264	1,14	0,23	0,91	201,90	672,60	12,40	2,80	4,40	25,90	101	100
VSE17/00454	16/03/2017	45,49	2,0	6,7	3,24	3,50	0,94	217,4	11	236	1,88	0,23	1,65	103,10	418,70	12,30	1,80	6,80	15,70	135	100
VSE17/00455	16/03/2017	26,62	1,2	6,6	3,27	3,30	0,98	265,0	12	163	2,15	0,30	1,85	171,83	569,00	13,40	2,60	5,20	25,30	101	200
VSE17/00456	16/03/2017	28,99	1,4	6,3	3,04	3,30	0,93	224,5	6	194	1,92	0,25	1,67	139,30	636,30	13,10	1,90	6,90	29,40	123	200
VSE17/00457	16/03/2017	22,83	1,4	7,4	3,06	4,30	0,71	385,8	8	239	1,08	0,19	0,89	228,29	924,40	12,90	2,20	5,90	5,80	100	100
VSE17/00458	16/03/2017	24,66	1,4	5,9	3,02	2,90	1,05	240,0	5	201	1,39	0,24	1,15	119,05	513,00	12,10	2,10	5,80	17,60	98	200
VSE17/00459	16/03/2017	21,56	1,2	6,2	3,34	2,90	1,17	223,3	8	169	1,63	0,28	1,35	164,46	539,90	13,20	3,00	4,40	36,60	112	200
VSE17/00460	16/03/2017	23,64	1,2	7,0	3,38	3,40	1,05	216,7	12	236	1,73	0,32	1,41	191,47	460,10	13,10	2,60	5,00	29,60	95	100
VSE17/00503	23/03/2017	30,48	1,3	6,5	3,37	3,10	1,08	233,4	5	213	2,42	0,28	2,14	284,74	844,60	12,70	3,70	3,40	25,10	91	100
VSE17/00504	23/03/2017	27,52	1,2	6,6	3,61	3,00	1,21	242,5	10	277	1,91	0,27	1,64	270,63	606,30	11,60	2,80	4,10	26,50	97	200
VSE17/00505	23/03/2017	20,41	1,1	6,2	3,40	2,80	1,21	370,1	10	302	1,80	0,27	1,53	279,22	1136,90	13,20	4,50	2,90	31,60	98	100
VSE17/00506	23/03/2017	34,81	1,4	6,5	3,24	3,30	0,99	205,9	10	224	2,76	0,30	2,46	192,08	609,40	12,80	4,60	2,80	23,00	88	200
VSE17/00507	23/03/2017	31,23	1,6	6,9	3,70	3,20	1,16	227,0	17	271	1,58	0,24	1,34	193,31	602,10	12,80	3,00	4,30	33,30	110	100
VSE17/00508	23/03/2017	27,78	1,8	6,4	3,09	3,30	0,93	309,9	15	429	3,17	0,32	2,85	140,53	394,80	13,10	3,80	3,40	18,20	94	200
VSE17/00509	23/03/2017	22,60	1,1	5,8	3,09	2,70	1,14	258,2	13	275	1,89	0,24	1,65	262,04	803,20	12,40	3,70	3,40	15,50	84	300
VSE17/00510	23/03/2017	29,55	1,3	6,9	3,18	3,70	0,85	237,8	9	267	1,86	0,28	1,58	213,56	848,80	13,00	3,60	3,60	23,10	94	200
VSE17/00511	23/03/2017	26,68	1,4	6,0	3,11	2,90	1,08	214,0	7	187	1,88	0,27	1,61	279,83	705,70	12,50	3,70	3,40	24,80	87	200
VSE17/00535	29/03/2017	24,29	1,3	6,5	3,23	3,30	0,99	313,1	13	270	1,96	0,27	1,69	308,68	801,10	12,70	4,10	3,10	9,40	105	200
VSE17/00536	29/03/2017	34,16	1,3	7,0	3,37	3,60	0,93	236,1	9	266	2,50	0,31	2,19	908,84	787,60	13,50	4,40	3,10	20,10	112	200
VSE17/00537	29/03/2017	30,70	0,9	6,1	3,17	2,90	1,08	230,4	8	334	1,59	0,26	1,33	221,55	1066,40	12,60	5,00	2,50	18,40	130	200
VSE17/00539	29/03/2017	29,04	1,1	7,0	3,69	3,30	1,11	261,6	13	372	2,62	0,50	2,12	190,24	862,20	13,10	3,30	4,00	49,30	88	200
VSE17/00540	29/03/2017	31,21	1,4	6,9	2,33	4,60	0,51	266,5	22	425	1,12	0,35	0,77	477,43	1116,10	12,50	3,80	3,30	9,60	98	200

REFERENCIA	FECHA	U	Cr	PT	ALB	GLOB	ALB/GLOB	AST	GGT	ALP	BT	BD	BI	CK	LDH	Ca	P	Ca/P	TG	CT	Fib
VSE17/00542	29/03/2017	44,22	1,3	7,1	3,15	4,00	0,80	219,4	8	291	1,70	0,48	1,22	148,51	431,10	13,80	3,60	3,80	12,20	106	100
VSE17/00543	29/03/2017	36,07	1,2	6,2	2,89	3,30	0,87	248,3	6	264	1,78	0,31	1,47	182,26	720,30	11,30	3,20	3,50	14,80	101	200
VSE17/00544	29/03/2017	36,83	1,4	7,0	3,17	3,80	0,83	224,1	8	311	1,85	0,26	1,59	133,78	559,60	12,90	3,20	4,00	20,40	103	400
VSE17/00545	29/03/2017	34,16	1,4	6,9	3,21	3,70	0,87	285,2	12	358	1,56	0,25	1,31	211,10	690,20	12,90	3,80	3,40	11,60	94	300
VSE17/00546	29/03/2017	21,20	1,5	6,3	3,12	3,20	0,98	208,8	9	210	1,94	0,27	1,67	206,19	853,90	13,10	3,40	3,90	17,40	113	200
VSE17/00547	29/03/2017	41,67	1,3	7,0	3,39	3,60	0,94	416,9	7	294	2,10	0,37	1,73	187,17	667,40	14,30	3,40	4,20	17,00	107	200
VSE17/00548	29/03/2017	40,09	1,4	6,5	2,78	3,70	0,75	267,0	9	239	1,61	0,28	1,33	174,90	635,30	12,40	3,00	4,10	66,00	104	300
VSE17/00549	29/03/2017	28,28	1,4	6,6	3,07	3,50	0,87	195,6	8	264	2,68	0,29	2,39	198,83	615,60	13,40	3,00	4,50	16,20	115	300
VSE17/00550	29/03/2017	28,20	1,4	6,8	3,24	3,60	0,91	170,1	9	217	1,67	0,30	1,37	146,67	625,90	12,90	2,90	4,40	24,20	100	200
VSE17/00748	28/04/2017	28,00	1,9	6,5	3,19	3,30	0,96	215,0	20	285	1,54	0,29	1,25	348,56	985,60	11,60	2,70	4,30	29,50	106	300
VSE17/00749	28/04/2017	31,01	2,1	6,2	3,11	3,10	1,01	285,2	14	232	1,72	0,26	1,46	368,82	987,60	11,70	3,00	3,90	20,30	95	100
VSE17/00750	28/04/2017	25,53	1,7	7,2	3,41	3,80	0,9	242,9	15	367	2,08	0,35	1,73	330,15	958,60	12,80	2,10	6,10	26,00	101	300
VSE17/00751	28/04/2017	19,93	0,9	6,3	2,76	3,50	0,78	421,4	16	493	1,13	0,22	0,91	401,34	1631,20	12,50	3,10	4,00	17,80	105	300
VSE17/00752	28/04/2017	24,21	1,2	6,6	2,91	3,70	0,79	332,3	15	342	1,28	0,26	1,02	676,26	1370,00	11,70	3,90	3,00	56,80	147	200
VSE17/00753	28/04/2017	18,98	1,3	7,1	3,14	4,00	0,79	255,5	13	280	2,36	0,36	2,00	227,67	868,50	11,70	3,20	3,70	14,80	91	200
VSE17/00754	28/04/2017	15,77	1,5	7,0	3,15	3,90	0,82	291,0	12	404	1,46	0,27	1,19	324,63	1319,30	12,50	2,40	5,20	7,70	104	200
VSE17/00983	06/06/2017	27,78	1,5	6,9	3,16	3,70	0,84	226,5	7	306	2,58	0,32	2,26	101,87	663,30	11,50	3,80	3,00	20,40	78	200
VSE17/00984	04/06/2017	19,76	1,2	7,0	3,27	3,70	0,88	370,3	7	350	1,66	0,37	1,29	249,15	1126,50	12,30	4,20	2,90	21,80	97	200
VSE17/00985	06/06/2017	30,59	1,3	6,2	3,12	3,10	1,01	210,8	7	265	1,97	0,22	1,75	118,44	382,40	12,80	2,50	5,10	28,80	91	200
VSE17/00986	04/06/2017	25,70	1,0	6,7	3,21	3,50	0,92	277,1	7	263	2,41	0,54	1,87	203,12	1028,10	11,80	5,00	2,40	13,50	127	200
VSE17/01025	08/06/2017	41,16	1,0	6,9	3,34	3,60	0,94	242,2	9	178	1,55	0,37	1,18	139,92	482,90	12,50	2,80	4,50	32,90	79	200
VSE17/01026	08/06/2017	33,34	1,0	6,5	3,37	3,10	1,08	195,8	8	232	2,99	0,48	2,51	112,30	530,60	11,80	3,70	3,20	31,00	113	200
VSE17/01027	09/06/2017	25,95	1,6	6,5	2,90	3,60	0,81	280,0	14	331	1,62	0,29	1,33	157,71	657,00	12,40	3,30	3,80	9,60	88	200
VSE17/01028	08/06/2017	31,46	0,7	7,0	3,04	4,00	0,77	202,5	11	289	2,87	0,49	2,38	88,37	313,00	11,80	2,90	4,10	20,10	78	200
VSE17/01029	09/06/2017	29,89	1,5	6,5	2,90	3,60	0,81	196,6	6	419	2,24	0,32	1,92	90,21	604,20	11,80	2,20	5,40	13,60	91	200
VSE17/01030	08/06/2017	30,62	1,0	6,6	3,11	3,50	0,89	308,7	9	183	2,08	0,45	1,63	174,28	507,80	11,40	3,30	3,50	16,90	77	200
VSE17/01032	13/06/2017	23,84	1,3	6,9	3,31	3,60	0,92	278,8	9	383	1,36	0,22	1,14	125,19	554,40	12,10	4,00	3,00	20,70	109	200
VSE17/01036	14/06/2017	33,79	1,5	6,2	3,37	2,80	1,19	272,9	4	253	2,27	0,38	1,89	160,78	902,70	12,90	2,50	5,20	20,30	83	200
VSE17/01068	16/06/2017	38,38	1,7	7,1	3,10	4,00	0,78	339,1	9	275	1,99	0,27	1,72	231,35	1236,40	10,60	4,30	2,50	17,20	86	300
VSE17/01069	16/06/2017	40,32	1,4	6,7	3,25	3,50	0,94	244,9	12	277	1,92	0,28	1,64	257,13	859,10	12,20	3,70	3,30	18,40	91	200
VSE17/02129	24/09/2017	37,09	1,1	6,6	3,15	3,50	0,91	197,3	17	271	3,25	0,65	2,60	220,31	587,20	12,20	3,10	3,90	23,60	91	200
VSE17/02131	24/09/2017	35,56	1,3	7,2	3,12	4,10	0,76	200,0	7	194	1,88	0,32	1,56	166,30	678,10	11,80	2,70	4,40	21,50	105	200
VSE17/02132	24/09/2017	28,98	1,1	7,8	2,84	5,00	0,57	157,3	2	226	1,01	0,19	0,82	153,42	684,70	11,00	3,20	3,40	20,70	73	200

VSE17/02135	24/10/2017	31,58	1,0	6,5	2,91	3,60	0,81	224,1	21	498	0,83	0,14	0,69	146,05	1074,70	11,50	2,40	4,80	12,20	105	200
VSE17/02136	24/10/2017	35,74	1,4	6,4	3,02	3,40	0,89	245,4	14	333	1,37	0,20	1,17	131,33	817,70	12,70	2,50	5,10	15,60	89	300
VSE17/02137	24/10/2017	24,48	1,7	6,5	3,27	3,20	1,01	207,4	12	403	1,47	0,28	1,19	559,67	788,90	13,20	2,40	5,50	24,00	100	200
VSE17/02138	24/10/2017	31,15	1,0	6,5	3,09	3,40	0,91	239,8	11	236	1,97	0,30	1,67	142,37	811,00	12,00	2,30	5,20	6,70	79	200
VSE17/02162	26/10/2017	19,53	1,3	6,9	2,85	4,10	0,70	285,6	19	339	1,24	0,24	1,00	212,33	908,50	12,60	3,00	1,00	26,90	89	100
VSE17/02163	26/10/2017	25,77	1,3	6,6	2,64	4,00	0,67	286,1	15	414	1,02	0,19	0,83	185,33	981,60	11,30	3,30	0,83	37,20	101	200
VSE17/02164	26/10/2017	19,25	1,2	6,7	2,83	3,90	0,73	291,0	16	425	1,57	0,33	1,24	153,42	831,00	12,60	2,90	1,24	32,00	83	200
VSE17/02165	26/10/2017	19,50	1,3	7,0	2,81	4,20	0,67	378,7	25	533	1,46	0,23	1,23	272,47	1730,60	12,50	3,60	1,23	16,80	71	200
VSE17/02166	26/10/2017	19,62	1,0	7,1	2,83	4,30	0,66	292,5	11	419	1,04	0,21	0,83	265,11	1127,90	12,10	2,70	0,83	19,50	79	200
VSE17/02167	26/10/2017	18,06	1,3	6,5	3,27	3,20	1,01	333,5	17	412	1,80	0,29	1,51	257,13	988,30	12,70	2,50	5,10	29,00	98	200
VSE17/02168	26/10/2017	20,88	1,3	5,6	2,82	2,80	1,01	302,3	16	727	1,66	0,27	1,39	143,60	725,70	12,30	3,60	3,40	24,80	94	200
VSE17/02169	26/10/2017	24,24	1,2	6,8	3,45	3,40	1,03	302,6	16	364	1,48	0,29	1,19	159,55	808,80	13,20	2,70	4,90	23,40	115	200
VSE17/02170	26/10/2017	18,86	1,3	6,3	3,24	3,10	1,06	270,4	11	251	1,36	0,24	1,12	147,28	909,60	12,60	2,50	5,00	42,40	101	200
VSE17/02171	26/10/2017	25,28	1,2	6,0	2,85	3,10	0,90	266,3	11	335	1,49	0,22	1,27	122,12	685,80	12,50	2,60	4,80	12,50	92	200
VSE17/02172	26/10/2017	21,12	1,0	6,3	3,08	3,20	0,96	251,3	6	333	1,56	0,24	1,32	169,99	1153,40	12,70	2,20	5,80	43,30	95	200
VSE17/02173	26/10/2017	28,34	0,9	6,5	3,04	3,50	0,88	298,9	15	356	1,22	0,28	0,94	147,89	644,80	13,30	3,00	4,40	9,40	108	100
VSE17/02174	26/10/2017	25,62	1,1	6,1	3,00	3,10	0,97	320,0	13	307	1,69	0,33	1,36	717,38	1105,70	12,00	2,40	5,00	29,90	92	200
VSE17/02176	26/10/2017	26,17	1,5	6,7	2,67	2,60	1,54	271,9	8	409	0,85	0,18	0,67	160,17	920,70	13,50	1,70	7,90	16,80	122	200
VSE17/02177	26/10/2017	21,64	1,3	7,2	2,85	4,30	0,66	317,8	17	612	1,04	0,14	0,90	273,70	1092,40	12,70	3,60	3,50	8,30	80	200
VSE17/02178	26/10/2017	19,65	1,3	7,4	3,05	4,40	0,70	323,4	14	440	1,39	0,27	1,12	273,70	1457,00	12,80	2,50	5,10	34,90	80	200
VSE17/02179	26/10/2017	23,69	0,9	6,9	3,09	3,80	0,81	421,1	27	610	1,36	0,24	1,12	521,62	2504,00	12,00	4,00	3,00	58,00	87	200
VSE17/02180	26/10/2017	20,29	0,5	7,4	2,99	4,40	0,68	433,4	21	457	1,20	0,34	0,86	759,11	1472,50	11,80	3,70	3,20	23,70	95	200
VSE17/02237	18/11/2017	25,95	1,9	6,7	4,21	2,40	1,73	294,9	10	532	2,42	0,37	2,06	154,68	1101,20	15,25	2,93	5,20	33,50	99	200
VSE17/02238	18/11/2017	29,38	1,6	7,2	3,56	3,60	0,98	351,6	28	444	1,88	0,28	1,59	119,48	439,20	11,39	3,16	3,60	25,50	105	100
VSE17/02239	18/11/2017	19,90	1,1	6,7	3,17	3,50	0,91	273,1	16	378	1,85	0,26	1,59	109,74	743,30	10,53	1,70	6,20	22,70	90	100
VSE17/02240	18/11/2017	24,64	1,5	6,7	3,27	3,50	0,94	259,9	19	434	2,24	0,29	1,94	176,41	611,30	12,05	3,56	3,40	20,40	102	200
VSE17/02241	18/11/2017	24,26	1,5	7,0	3,73	3,30	1,14	246,7	24	255	1,44	0,29	1,14	91,01	477,20	12,03	2,56	4,70	46,70	103	100
VSE17/02242	18/11/2017	15,51	1,7	7,1	3,44	3,60	0,95	291,5	28	244	1,22	0,21	1,01	174,91	762,30	13,10	2,68	4,90	35,40	121	100
VSE17/02243	18/11/2017	18,37	1,1	6,8	3,23	3,50	0,91	233,2	19	445	0,56	0,18	0,38	193,64	703,20	11,31	2,02	5,60	27,00	80	-
VSE17/02244	18/11/2017	15,84	1,5	6,8	3,32	3,50	0,96	271,6	26	529	1,71	0,25	1,46	157,68	474,10	12,60	1,87	6,70	13,80	75	-
VSE17/02245	18/11/2017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VSE17/02246	18/11/2017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 5. Resultados del análisis de marcadores de estrés oxidativo de las muestras.

REFERENCIA	FECHA	AU	TBARS	TAS	8-OH DG
VSE17/00025	10/01/2017	0,80	1,09	1,67	3,12
VSE17/00026	10/01/2017	1,10	0,22	1,51	2,94
VSE17/00027	10/01/2017	0,60	0,09	1,52	5,07
VSE17/00028	10/01/2017	0,70	0,48	1,68	5,40
VSE17/00057	13/01/2017	0,70	0,67	1,74	3,09
VSE17/00058	13/01/2017	0,50	0,70	1,34	2,55
VSE17/00059	13/01/2017	0,90	0,70	1,49	1,71
VSE17/00060	13/01/2017	0,70	0,96	1,25	2,34
VSE17/00061	13/01/2017	0,60	0,61	1,73	2,31
VSE17/00063	14/01/2017	0,40	1,22	1,12	4,89
VSE17/00064	14/01/2017	0,60	0,22	1,71	3,06
VSE17/00065	14/01/2017	0,40	0,64	1,17	2,64
VSE17/00066	14/01/2017	0,80	0,48	1,50	3,09
VSE17/00073	14/01/2017	0,60	0,38	1,31	2,22
VSE17/00074	14/01/2017	0,60	0,80	1,72	5,85
VSE17/00089	18/01/2017	0,60	0,18	1,39	2,61
VSE17/00090	18/01/2017	0,60	0,77	1,88	4,08
VSE17/00091	18/01/2017	0,80	1,16	1,44	3,69
VSE17/00092	18/01/2017	0,70	1,51	1,25	3,03
VSE17/00093	18/01/2017	0,80	1,19	1,30	5,67
VSE17/00094	18/01/2017	0,90	0,86	2,02	2,91
VSE17/00095	18/01/2017	0,50	0,70	1,11	2,55
VSE17/00096	18/01/2017	0,70	0,99	2,19	1,71
VSE17/00097	18/01/2017	0,90	1,64	1,03	2,58
VSE17/00098	18/01/2017	0,50	0,77	1,85	2,94
VSE17/00109	19/02/2017	0,60	0,25	1,92	3,18
VSE17/00110	19/02/2017	0,70	0,51	2,40	2,73
VSE17/00111	19/02/2017	0,30	1,03	1,72	3,12
VSE17/00112	19/02/2017	0,60	0,59	1,65	2,28
VSE17/00113	19/02/2017	0,70	1,12	1,42	2,70
VSE17/00114	19/02/2017	0,30	0,29	2,01	3,21
VSE17/00115	19/02/2017	0,50	0,64	2,13	3,03
VSE17/00116	19/02/2017	0,50	0,58	1,75	2,91
VSE17/00117	19/02/2017	0,40	0,11	1,85	3,36
VSE17/00118	19/02/2017	0,50	0,65	1,98	4,83
VSE17/00119	19/02/2017	0,40	0,34	2,24	3,54
VSE17/00136	26/01/2017	0,50	0,08	2,00	4,23
VSE17/00450	16/03/2017	0,50	0,58	2,03	3,99
VSE17/00451	16/03/2017	0,60	0,05	2,01	3,21
VSE17/00452	16/03/2017	0,60	0,31	2,17	4,47
VSE17/00453	16/03/2017	0,40	0,34	1,97	3,54
VSE17/00454	16/03/2017	0,40	0,29	2,03	3,63
VSE17/00455	16/03/2017	0,40	0,52	2,53	3,30
VSE17/00456	16/03/2017	0,30	0,66	2,31	3,84
VSE17/00457	16/03/2017	0,30	0,40	1,55	5,70
VSE17/00458	16/03/2017	0,50	0,64	2,11	3,81
VSE17/00459	16/03/2017	0,50	0,43	2,19	3,48
VSE17/00460	16/03/2017	0,50	0,79	2,36	3,48

VSE17/00503	23/03/2017	0,50	0,88	2,17	3,48
VSE17/00504	23/03/2017	0,40	0,49	1,77	3,36
VSE17/00505	23/03/2017	0,50	1,58	1,91	3,84
VSE17/00506	23/03/2017	0,70	1,09	1,77	3,69
VSE17/00507	23/03/2017	0,50	1,46	2,07	7,11
VSE17/00508	23/03/2017	0,50	0,73	2,08	3,66
VSE17/00509	23/03/2017	0,60	0,58	1,81	5,13
VSE17/00510	23/03/2017	0,60	0,70	2,24	3,21
VSE17/00511	23/03/2017	0,30	0,88	2,08	2,79
VSE17/00535	29/03/2017	0,50	0,21	0,27	3,42
VSE17/00536	29/03/2017	0,50	0,24	0,38	3,66
VSE17/00537	29/03/2017	0,50	0,37	1,95	2,97
VSE17/00539	29/03/2017	0,70	0,56	2,15	3,63
VSE17/00540	29/03/2017	0,40	1,18	1,57	4,14
VSE17/00542	29/03/2017	0,40	0,62	1,36	3,39
VSE17/00543	29/03/2017	0,50	0,93	2,18	3,54
VSE17/00544	29/03/2017	0,50	0,31	1,64	3,72
VSE17/00545	29/03/2017	0,50	1,71	1,29	3,27
VSE17/00546	29/03/2017	0,40	0,51	1,75	2,76
VSE17/00547	29/03/2017	0,40	1,18	1,54	3,81
VSE17/00548	29/03/2017	0,40	0,26	1,65	3,36
VSE17/00549	29/03/2017	0,40	0,51	1,91	3,24
VSE17/00550	29/03/2017	0,60	0,34	2,45	4,71
VSE17/00748	28/04/2017	0,60	0,45	2,01	3,57
VSE17/00749	28/04/2017	0,30	0,96	1,60	2,79
VSE17/00750	28/04/2017	0,60	0,44	1,47	3,09
VSE17/00751	28/04/2017	0,30	0,74	1,56	2,70
VSE17/00752	28/04/2017	0,50	0,80	1,33	2,70
VSE17/00753	28/04/2017	0,50	0,93	2,00	3,81
VSE17/00754	28/04/2017	0,50	0,40	1,39	3,24
VSE17/00983	06/06/2017	0,40	0,93	1,87	5,04
VSE17/00984	04/06/2017	0,40	1,09	1,91	3,21
VSE17/00985	06/06/2017	0,30	1,11	1,85	5,58
VSE17/00986	04/06/2017	0,70	0,64	2,08	5,61
VSE17/01025	08/06/2017	0,50	1,01	1,84	4,35
VSE17/01026	08/06/2017	0,50	1,47	1,75	4,53
VSE17/01027	09/06/2017	0,70	1,13	1,82	3,60
VSE17/01028	08/06/2017	0,50	1,07	1,82	3,57
VSE17/01029	09/06/2017	0,30	0,78	1,96	2,85
VSE17/01030	08/06/2017	0,50	0,89	1,92	6,57
VSE17/01032	13/06/2017	0,40	0,66	0,97	3,87
VSE17/01036	14/06/2017	0,50	0,39	1,72	2,07
VSE17/01068	16/06/2017	0,50	0,31	1,72	2,55
VSE17/01069	16/06/2017	0,40	-	-	-
VSE17/02129	24/09/2017	0,50	0,39	1,56	3,66
VSE17/02131	24/09/2017	0,40	0,87	1,90	3,33
VSE17/02132	24/09/2017	0,30	0,28	1,39	3,39
VSE17/02135	24/10/2017	0,40	1,01	1,40	2,76
VSE17/02136	24/10/2017	0,30	0,23	1,56	3,39
VSE17/02137	24/10/2017	0,50	0,71	1,48	3,09
VSE17/02138	24/10/2017	0,50	1,07	1,65	2,52
VSE17/02162	26/10/2017	0,50	0,34	1,88	3,24

VSE17/02163	26/10/2017	0,40	0,06	1,65	4,59
VSE17/02164	26/10/2017	0,50	1,55	1,67	3,96
VSE17/02165	26/10/2017	0,60	0,59	1,82	3,36
VSE17/02166	26/10/2017	0,30	0,13	1,12	3,81
VSE17/02167	26/10/2017	0,40	0,22	1,91	3,09
VSE17/02168	26/10/2017	0,40	1,13	1,63	3,45
VSE17/02169	26/10/2017	0,40	1,13	1,69	3,03
VSE17/02170	26/10/2017	0,50	0,25	1,54	3,36
VSE17/02171	26/10/2017	0,30	0,99	1,70	3,48
VSE17/02172	26/10/2017	0,30	0,64	1,40	4,23
VSE17/02173	26/10/2017	0,40	0,74	1,60	3,72
VSE17/02174	26/10/2017	0,40	0,99	1,69	2,58
VSE17/02176	26/10/2017	0,30	0,62	1,54	4,20
VSE17/02177	26/10/2017	0,40	0,71	2,73	5,13
VSE17/02178	26/10/2017	0,40	1,23	1,59	3,33
VSE17/02179	26/10/2017	0,60	0,94	1,62	3,39
VSE17/02180	26/10/2017	0,40	0,52	1,67	4,98
VSE17/02237	18/11/2017	0,53	0,53	1,33	2,40
VSE17/02238	18/11/2017	0,52	0,12	1,43	1,20
VSE17/02239	18/11/2017	0,10	1,27	1,37	1,80
VSE17/02240	18/11/2017	0,43	1,13	1,52	1,80
VSE17/02241	18/11/2017	0,45	0,77	1,40	1,50
VSE17/02242	18/11/2017	0,44	0,99	1,37	2,10
VSE17/02243	18/11/2017	0,36	0,88	1,38	2,10
VSE17/02244	18/11/2017	0,40	0,37	1,41	2,70
VSE17/02245	18/11/2017	-	-	-	-
VSE17/02246	18/11/2017	-	-	-	-

Anexo 6. Información recopilada de la población muestral a través del cuestionario: datos básicos y de hábitat.

REFERENCIA	FECHA	EXPLOTACIÓN	HORA	EDAD	RAZA	SEXO	SITUACIÓN REPRODUCTIVA	VACUNACIÓN	DESPARASITACIÓN	CONDICIÓN CORPORAL	ALOJAMIENTO
VSE17/00025	10/01/2017	4	10:30	9	PSL	M	Entero	G+T	SI	3	Box
VSE17/00026	10/01/2017	4	10:35	5	PSL	M	Entero	G+T	SI	3	Box
VSE17/00027	10/01/2017	4	10:20	6	OLDEMBURGO	H	-	G+T	SI	3,5	Box
VSE17/00028	10/01/2017	4	10:45	5	OLDEMBURGO	M	Castrado	G+T	SI	3,5	Box
VSE17/00057	13/01/2017	12	10:00	16	HANOVERIANO	M	Castrado	G+T+R	SI	2,5	Mixto
VSE17/00058	13/01/2017	12	10:00	7	PSL	H	-	G+T+R	SI	3	Box
VSE17/00059	13/01/2017	12	10:00	6	PSL	M	Entero	G+T+R	SI	2,5	Box
VSE17/00060	13/01/2017	12	10:00	15	HANOVERIANO	M	Castrado	G+T	SI	3	Mixto
VSE17/00061	13/01/2017	12	10:00	23	PRE	M	Castrado	G+T+R	SI	2,5	Mixto
VSE17/00063	14/01/2017	4	9:30	17	CRUZADO	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/00064	14/01/2017	4	9:30	15	CDE	M	Entero	G+T	SI	3	Box
VSE17/00065	14/01/2017	4	9:30	7	CRUZADO	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/00066	14/01/2017	4	9:30	27	Há	M	Castrado	G+T+R	SI	3	Box
VSE17/00073	14/01/2017	4	9:30	9	CRUZADO	M	Castrado	G+T+R+W	SI	3	Box
VSE17/00074	14/01/2017	4	9:30	7	KWPN	H	-	G+T+R+W	SI	3	Box
VSE17/00089	18/01/2017	4	9:10	7	OLDEMBURGO	M	Castrado	G	SI	3	Box
VSE17/00090	18/01/2017	4	9:30	10	HOLSTEINER	M	Castrado	G	SI	3	Box
VSE17/00091	18/01/2017	4	9:20	14	CDE	H	-	G+T	SI	3	Box
VSE17/00092	18/01/2017	4	9:15	7	CDE	H	-	G+T	SI	3	Box
VSE17/00093	18/01/2017	4	9:30	13	CDE	H	-	G+T	SI	3	Box
VSE17/00094	18/01/2017	4	9:30	12	HISPANOLUSO	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/00095	18/01/2017	4	9:45	12	BELGA	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/00096	18/01/2017	4	9:25	18	BELGA	H	-	G+T	SI	3	Box
VSE17/00097	18/01/2017	4	9:40	18	Prá	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/00098	18/01/2017	4	9:35	14	PRE	M	Entero	G+T	SI	4	Box

VSEI7/00109	19/02/2017	12	-	7	SF	H	-	G+T+R	SI	3	Box
VSEI7/00110	19/02/2017	12	-	11	SF	M	Castrado	G+T+R	SI	3	Box
VSEI7/00111	19/02/2017	12	-	9	WESTFALIANO	H	-	G+T	SI	2,5	Mixto
VSEI7/00112	19/02/2017	12	-	8	-	M	Entero	G+T+R	SI	3	Box
VSEI7/00113	19/02/2017	12	-	6	CDE	H	-	G+T+R	SI	3	Box
VSEI7/00114	19/02/2017	12	-	5	CDE	M	Castrado	G+T+R	SI	3	Box
VSEI7/00115	19/02/2017	12	-	11	SF	M	Castrado	G+T+R	SI	3	Box
VSEI7/00116	19/02/2017	12	-	11	CRUZADO	M	Entero	G+T	SI	4,5	Mixto
VSEI7/00117	19/02/2017	12	-	10	PRE	M	Entero	G+T	SI	4	Mixto
VSEI7/00118	19/02/2017	12	-	8	PRE	H	-	G+T	SI	3	Mixto
VSEI7/00119	19/02/2017	12	-	10	Ahá	H	-	G+T	SI	3	Mixto
VSEI7/00136	26/01/2017	4	10:00	13	PSI	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00450	16/03/2017	6	10:00	5	PSL	M	Entero	G+T	-	4	Box
VSEI7/00451	16/03/2017	6	10:50	6	PRE	M	Entero	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00452	16/03/2017	6	10:40	-	-	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00453	16/03/2017	6	10:05	20	PRE	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00454	16/03/2017	6	10:15	15	PRE	M	Castrado	G+T	SI	3	-
VSEI7/00455	16/03/2017	6	10:45	16	MENORQUIN	M	Castrado	G+T	SI	-	-
VSEI7/00456	16/03/2017	6	10:10	18	HANOVERIANO	M	Castrado	G+T	SI	-	Box
VSEI7/00457	16/03/2017	6	10:55	10	FRISON	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00458	16/03/2017	6	10:30	7	CRUZADO	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00459	16/03/2017	6	10:35	8	PRE	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00460	16/03/2017	6	10:25	4	PSL	M	Entero	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00503	23/03/2017	10	12:40	8	CDE	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00504	23/03/2017	10	12:35	8	CDE	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00505	23/03/2017	10	12:15	6	HOLSTEINER	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00506	23/03/2017	10	12:10	8	KWPN	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00507	23/03/2017	10	12:20	10	SF	H	-	G+T	SI	-	Box
VSEI7/00508	23/03/2017	10	12:00	7	CDE	M	Castrado	G+T	SI	2	-
VSEI7/00509	23/03/2017	10	12:05	6	HOLSTEINER	H	-	-	SI	3	Box
VSEI7/00510	23/03/2017	10	12:30	6	-	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSEI7/00511	23/03/2017	10	12:25	7	-	H	-	G+T	-	3	Box
VSEI7/00535	29/03/2017	13	-	-	PRE	M	Entero	G+T	SI	5	Box
VSEI7/00536	29/03/2017	1	-	8	PSL	M	-	G+T	-	3	Box

REFERENCIA	FECHA	EXPLOTACIÓN	HORA	EDAD	RAZA	SEXO	SITUACIÓN REPRODUCTIVA	VACUNACIÓN	DESPARASITACIÓN	CONDICIÓN CORPORAL	ALOJAMIENTO
VSE17/00537	29/03/2017	9	-	15	-	M	Entero	G+T	SI	-	Box
VSE17/00539	29/03/2017	7	-	6	CRUZADO	M	-	G	SI	-	Box
VSE17/00540	29/03/2017	13	-	4	-	M	Castrado	-	NO	3	Box
VSE17/00542	29/03/2017	14	-	8	-	M	Castrado	G+T	SI	-	Box
VSE17/00543	29/03/2017	1	-	-	-	M	-	-	-	-	-
VSE17/00544	29/03/2017	14	-	14	-	M	Castrado	G+T	SI	4	Box
VSE17/00545	29/03/2017	13	-	9	PRE	H	-	G+T	NO	4	Box
VSE17/00546	29/03/2017	14	-	6	PRE	M	Entero	G+T	SI	2	Box
VSE17/00547	29/03/2017	1	-	8	PRE	M	Castrado	G+T	NO	3	Box
VSE17/00548	29/03/2017	1	-	-	-	H	-	-	-	-	-
VSE17/00549	29/03/2017	14	-	11	PSL	M	Entero	-	NO	4	Box
VSE17/00550	29/03/2017	1	-	-	-	M	Castrado	G+T	SI	4	Box
VSE17/00748	28/04/2017	3	12:00	14	-	M	Entero	G+T	SI	3	Box
VSE17/00749	28/04/2017	3	12:00	7	PRE	M	Entero	G+T	SI	-	Box
VSE17/00750	28/04/2017	3	12:00	23	PRE	M	Entero	G+T	SI	-	Box
VSE17/00751	28/04/2017	3	12:00	4	PRE	H	-	R	-	-	Prado
VSE17/00752	28/04/2017	3	12:00	13	PRE	H	-	R	SI	4	Prado
VSE17/00753	28/04/2017	3	12:15	7	-	M	Entero	G+T	SI	-	Box
VSE17/00754	28/04/2017	3	12:00	5	PRE	M	-	G+T	-	-	-
VSE17/00983	06/06/2017	4	9:30	5	PRE	M	Castrado	G+T+R+W	SI	4	Box
VSE17/00984	04/06/2017	4	15:00	6	BELGA	H	-	G+T+R	SI	3	Box
VSE17/00985	06/06/2017	4	10:00	9	-	H	-	G+T+R+W	SI	3,5	Box
VSE17/00986	04/06/2017	4	9:00	6	CDE	H	-	G+T+R+W	SI	3	Box
VSE17/01025	08/06/2017	4	10:00	12	SF	H	-	G+T+R+W	SI	3	Box
VSE17/01026	08/06/2017	4	9:30	15	CRUZADO	H	-	G+T+R	SI	3	Box
VSE17/01027	09/06/2017	4	9:35	10	PRE	M	Castrado	G+T+R	SI	3	Box
VSE17/01028	08/06/2017	4	10:00	13	SF	M	Entero	G+T+R	SI	3	Box
VSE17/01029	09/06/2017	4	9:30	14	CDE	M	Castrado	G+T+R+W	SI	3	Box
VSE17/01030	08/06/2017	4	10:00	8	CDE	M	Castrado	G+T+R+W	SI	3	Box
VSE17/01032	13/06/2017	4	-	3	OLDEMBURGO	M	Castrado	G+T+R+W	SI	3	Box
VSE17/01036	14/06/2017	4	-	4	OLDEMBURGO	M	Entero	G+T+R	SI	3	Box
VSE17/01068	16/06/2017	4	-	8	CDE	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/01069	16/06/2017	4	-	16	SF	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/02129	24/09/2017	2	17:00	11	CRUZADO	M	Castrado	G+T+W	SI	5	Box

VSE17/02131	24/09/2017	2	17:35	16	KWPN	M	Castrado	G+T+W	SI	3	Box
VSE17/02132	24/09/2017	2	17:30	14	KWPN	M	Castrado	G+T+W	SI	3	Mixto
VSE17/02135	24/10/2017	11	14:00	7	PRE	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/02136	24/10/2017	8	13:15	8	CRUZADO	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/02137	24/10/2017	11	12:45	16	CRUZADO	H	-	G+T	SI	3	Box
VSE17/02138	24/10/2017	2	14:30	11	PRE	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/02162	26/10/2017	7	12:00	12	PRE	H	-	-	SI	3	Prado
VSE17/02163	26/10/2017	7	12:00	11	PRE	H	-	-	SI	3	Prado
VSE17/02164	26/10/2017	7	12:00	20	PRE	H	-	-	SI	3	Prado
VSE17/02165	26/10/2017	7	12:00	6	PRE	H	-	-	NO	3	Prado
VSE17/02166	26/10/2017	7	12:00	12	PRE	H	-	-	NO	3	Prado
VSE17/02167	26/10/2017	7	12:00	12	PRE	M	Entero	-	SI	2,5	Box
VSE17/02168	26/10/2017	7	12:00	2	PRÁ	M	Entero	-	SI	3	Box
VSE17/02169	26/10/2017	7	12:00	9	PRE	M	Castrado	-	SI	2,5	Box
VSE17/02170	26/10/2017	7	12:00	11	PRE	M	Castrado	-	SI	2,5	Box
VSE17/02171	26/10/2017	7	12:00	13	PRE	M	Castrado	-	SI	2,5	Box
VSE17/02172	26/10/2017	7	12:00	6	PRE	M	Entero	-	SI	3	Box
VSE17/02173	26/10/2017	7	12:00	12	PRE	M	Castrado	-	SI	3	Box
VSE17/02174	26/10/2017	7	12:00	4	PRE	M	Entero	-	SI	2,5	Box
VSE17/02176	26/10/2017	7	12:00	12	PRE	H	-	-	SI	2,5	Prado
VSE17/02177	26/10/2017	7	12:00	5	PRE	H	-	-	NO	3,5	Prado
VSE17/02178	26/10/2017	7	12:00	15	PRE	H	-	-	NO	4	Prado
VSE17/02179	26/10/2017	7	12:00	5	PRE	H	-	-	NO	-	Prado
VSE17/02180	26/10/2017	7	12:00	7	PRE	H	-	-	NO	3	Prado
VSE17/02237	18/11/2017	12	18:00	17	PSL	M	Entero	G+T	SI	3	Mixto
VSE17/02238	18/11/2017	12	18:00	11	BELGA	H	-	G+T	SI	3	Mixto
VSE17/02239	18/11/2017	5	7:30	13	PRE	M	Castrado	G+T	SI	4	Mixto
VSE17/02240	18/11/2017	12	18:00	4	HÚNGARO	M	Entero	-	SI	3	Mixto
VSE17/02241	18/11/2017	12	18:00	7	OLDEMBURGO	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/02242	18/11/2017	12	18:00	16	Há	M	Castrado	G+T+W	SI	3	Mixto
VSE17/02243	18/11/2017	5	7:30	12	PSL	M	Castrado	G+T	SI	3	Box
VSE17/02244	18/11/2017	5	7:30	21	HANOVERIANO	M	Castrado	G+T	SI	3,5	Box
VSE17/02245	18/11/2017	12	18:00	4	PRE	M	Entero	G+T	SI	3,5	Mixto
VSE17/02246	18/11/2017	12	18:00	6	CDE	H	-	G+T	SI	4	Mixto

Anexo 7. Información recopilada de la población muestral a través del cuestionario: datos de alimentación y actividad física.

REFERENCIA	CONCENTRADO	FORRAJE	SUPLEMENTO	TIPO SUPLEMENTO	REGULARIDAD DEL EJERCICIO	INTENSIDAD DEL EJERCICIO	DURACIÓN DEL EJERCICIO
VSE17/00025	Pienso	Heno	No	-	Diario	Moderado	<1 hora
VSE17/00026	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00027	Pienso	Heno	Si	Vitaminas+selenio	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00028	Pienso	Alfalfa+heno	Si	Digestivo	Diario	Moderado	<1 hora
VSE17/00057	Pienso	Heno	-	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00058	Pienso	Heno	-	-	Diario	Moderado	>1 hora
VSE17/00059	Pienso+avena	Heno	-	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/00060	Pienso+avena	Heno	Si	Biotina	1-3 días/sem	Ligero	<1 hora
VSE17/00061	Pienso	Heno	Si	Aceite+vitaminas	1-3 días/sem	Ligero	<1 hora
VSE17/00063	Pienso	Alfalfa+heno	-	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00064	Pienso	Alfalfa+heno	Si	Vitaminas	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00065	Pienso	Alfalfa+heno	-	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00066	Pienso	Heno	Si	Digestivo	Diario	Ligero	>1 hora
VSE17/00073	Pienso	Heno	No	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00074	Pienso	Heno	No	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00089	Pienso	Heno	Si	Aceite	Diario	Moderado	>1 hora
VSE17/00090	Pienso	Heno	Si	Aceite	Diario	Moderado	>1 hora
VSE17/00091	Pienso+avena	Heno	No	-	Diario	Ligero	<1 hora
VSE17/00092	Pienso	Heno	No	-	Diario	Moderado	<1 hora
VSE17/00093	-	-	-	-	-	-	-
VSE17/00094	Pienso+avena	Heno	No	-	Diario	Moderado	<1 hora
VSE17/00095	Pienso+avena	Heno	No	-	Diario	Moderado	>1 hora
VSE17/00096	Pienso+avena	Heno	No	-	Diario	Moderado	>1 hora
VSE17/00097	Pienso+avena	Heno	No	-	1-3 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00098	Pienso	Heno	No	-	Diario	Moderado	>1 hora
VSE17/00109	Pienso	Heno	Si	Aceite+vitaminas	4-6 días/sem	Intenso	<1 hora

VSE17/00110	Pienso	Heno	Si	Aceite	4-6 días/sem	Intenso	<1 hora
VSE17/00111	Pienso	Heno+paja	Si	Aceite	1-3 días/sem	Ligero	<1 hora
VSE17/00112	Pienso	Heno	Si	Aceite	4-6 días/sem	Intenso	<1 hora
VSE17/00113	Pienso	Heno	Si	Aceite	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00114	Pienso	Heno	Si	Aceite	4-6 días/sem	Intenso	<1 hora
VSE17/00115	Pienso	Heno	Si	Aceite+vitaminas	4-6 días/sem	Intenso	<1 hora
VSE17/00116	Pienso+avena	Heno	-	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00117	Pienso+avena	Heno	-	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00118	Pienso	Heno	-	-	1-3 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00119	Pienso	Heno	Si	Aceite	4-6 días/sem	Intenso	<1 hora
VSE17/00136	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/00450	Avena	Heno+paja	Si	Vitaminas	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/00451	Pienso	Heno+paja	No	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/00452	Pienso+avena	Heno+paja	No	-	1-3 días/sem	Muy intenso	>1 hora
VSE17/00453	Pienso	Heno+paja	No	-	1-3 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/00454	-	-	-	-	1-3 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00455	Avena	Heno+paja	-	-	1-3 días/sem	Ligero	<1 hora
VSE17/00456	Pienso	Heno+paja	No	-	1-3 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/00457	Pienso	Heno+paja	No	-	1-3 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/00458	Pienso	Heno+paja	-	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/00459	Pienso	Heno+paja	Si	Vitaminas	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/00460	Pienso	Heno+paja	Si	Vitaminas	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/00503	Pienso	Heno+paja	No	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00504	Pienso	Paja	-	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00505	Pienso	Heno+paja	-	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00506	Pienso	Heno+paja	No	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00507	Pienso	Paja	-	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00508	-	-	-	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00509	-	-	No	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00510	Pienso	Paja	No	-	Diario	Intenso	>1 hora
VSE17/00511	Pienso	Heno+paja	No	-	Diario	Moderado	>1 hora
VSE17/00535	Pienso+avena	Heno+paja	-	-	1-3 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00536	-	Heno	-	-	4-6 días/sem	Intenso	<1 hora
VSE17/00537	Pienso+avena	Heno	-	-	1-3 días/sem	-	-

REFERENCIA	CONCENTRADO	FORRAJE	SUPLEMENTO	TIPO SUPLEMENTO	REGULARIDAD DEL EJERCICIO	INTENSIDAD DEL EJERCICIO	DURACIÓN DEL EJERCICIO
VSE17/00542	Avena	Paja	-	-	1-3 días/sem	Muy intenso	>1 hora
VSE17/00543	-	-	-	-	-	-	-
VSE17/00544	Avena	Paja	-	-	1-3 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/00545	-	Alfalfa+heno+paja	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/00546	Avena	Alfalfa+paja	-	-	1-3 días/sem	Moderado	-
VSE17/00547	-	Alfalfa+paja	-	-	1-3 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/00548	-	-	-	-	-	-	-
VSE17/00549	Avena	Paja	-	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/00550	Pienso	Paja	-	-	1-3 días/sem	Muy intenso	>1 hora
VSE17/00748	Pienso	Heno+paja	-	-	1-3 días/sem	Moderado	-
VSE17/00749	Pienso	Heno	-	-	1-3 días/sem	-	<1 hora
VSE17/00750	Pienso+avena	Heno+paja	-	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00751	Pienso	Paja	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/00752	-	-	No	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/00753	Pienso	Heno+paja	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/00754	-	-	-	-	1-3 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00983	Pienso	Heno	-	-	4-6 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/00984	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00985	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/00986	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/01025	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/01026	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/01027	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/01028	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/01029	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/01030	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/01032	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/01036	Pienso	Heno	No	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/01068	Pienso+avena	Heno	Si	Vitaminas+selenio	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/01069	Pienso	Heno	Si	Vitaminas+selenio	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/02129	Pienso	Heno	-	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/02131	Pienso	Heno	-	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora

VSE17/02132	Pienso	Heno	No	-	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/02135	Pienso	Paja	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02136	Pienso	Paja	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02137	Pienso	Paja	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02138	Pienso	Paja	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02162	-	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02163	-	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02164	-	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	Ligero	>1 hora
VSE17/02165	-	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02166	-	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02167	Pienso	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/02168	Pienso+avena	Heno	-	-	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/02169	Pienso+avena	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/02170	Pienso+avena	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/02171	Pienso+avena	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/02172	Pienso+avena	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/02173	Pienso+avena	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/02174	Pienso+avena	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/02176	Pienso	Heno	Si	Digestivo	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02177	-	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02178	-	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02179	-	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02180	-	Heno	-	-	-	1-3 días/sem	-	-
VSE17/02237	Pienso	Heno+paja	-	-	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/02238	Pienso	Heno	Si	Articular	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/02239	Pienso	Alfalfa+heno+paja	Si	Aceite	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/02240	Pienso+avena	Heno+paja	-	-	-	4-6 días/sem	Ligero	<1 hora
VSE17/02241	Pienso+avena	Heno+paja	-	-	-	4-6 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/02242	Pienso	Heno+paja	-	-	-	4-6 días/sem	Moderado	>1 hora
VSE17/02243	Pienso	Alfalfa+heno+paja	-	-	-	4-6 días/sem	Intenso	>1 hora
VSE17/02244	Pienso	Heno+paja	-	-	-	-	-	>1 hora
VSE17/02245	Pienso	Heno+paja	-	-	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora
VSE17/02246	Pienso	Heno+paja	-	-	-	4-6 días/sem	Moderado	<1 hora

Anexo 8. Información recopilada de la población muestral a través del cuestionario: disciplina, historia de enfermedad, transporte en el último mes y medicación en los últimos 7 días.

REFERENCIA	DISCIPLINA	Hª ENFERMEDADES	Hª TRANSPORTE	Hª MEDICACIÓN	TIPO MEDICACIÓN
VSE17/00025	Doma	No	No	No	-
VSE17/00026	Doma	No	No	No	-
VSE17/00027	Doma	No	No	No	-
VSE17/00028	Doma	No	No	No	-
VSE17/00057	Doma	No	No	No	-
VSE17/00058	Doma	No	No	No	-
VSE17/00059	Doma	No	No	No	-
VSE17/00060	Doma	Cojera	No	No	-
VSE17/00061	Doma	Alt. articular	No	No	-
VSE17/00063	Salto	No	No	No	-
VSE17/00064	Salto	No	No	No	-
VSE17/00065	Salto	No	No	No	-
VSE17/00066	Otras	No	No	No	-
VSE17/00073	Salto	No	No	No	-
VSE17/00074	Salto	No	No	No	-
VSE17/00089	Salto	No	No	No	-
VSE17/00090	Salto	Cojera + alt. articular	No	No	-
VSE17/00091	Otras	No	No	No	-
VSE17/00092	Salto	No	No	No	-
VSE17/00093	-	No	No	No	-
VSE17/00094	Doma	No	No	No	-
VSE17/00095	Salto	No	No	No	-
VSE17/00096	Salto	No	No	No	-
VSE17/00097	Otras	No	No	No	-
VSE17/00098	Otras	No	No	No	-

VSEI7/00109	Salto	No	Si	No	-
VSEI7/00110	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00111	Doma	No	No	No	-
VSEI7/00112	Salto	No	Si	No	-
VSEI7/00113	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00114	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00115	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00116	Doma	No	Si	No	-
VSEI7/00117	Doma	No	No	No	-
VSEI7/00118	Doma	No	No	No	-
VSEI7/00119	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00136	Otras	No	No	No	-
VSEI7/00450	Doma	No	No	No	-
VSEI7/00451	Doma	No	No	No	-
VSEI7/00452	Otras	No	No	No	-
VSEI7/00453	Otras	No	No	No	-
VSEI7/00454	Otras	No	No	No	-
VSEI7/00455	Otras	No	No	No	-
VSEI7/00456	Doma	No	No	No	-
VSEI7/00457	Otras	No	No	No	-
VSEI7/00458	Doma	No	No	No	-
VSEI7/00459	Doma	No	No	No	-
VSEI7/00460	Doma	No	No	No	-
VSEI7/00503	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00504	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00505	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00506	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00507	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00508	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00509	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00510	Salto	No	No	No	-
VSEI7/00511	Salto	Cojera	No	No	-
VSEI7/00535	Doma	No	No	No	-
VSEI7/00536	Otras	No	No	No	-

REFERENCIA	DISCIPLINA	Hª ENFERMEDADES	Hª TRANSPORTE	Hª MEDICACIÓN	TIPO MEDICACIÓN
VSE17/00540	Otras	No	No	No	-
VSE17/00542	Otras	Cojera	No	No	-
VSE17/00543	-	No	-	-	-
VSE17/00544	Otras	No	No	Si	ivermectina
VSE17/00545	-	No	No	No	-
VSE17/00546	Otras	Alt. articular	Si	No	-
VSE17/00547	Otras	Cojera + alt. articular	No	No	-
VSE17/00548	-	No	-	-	-
VSE17/00549	-	No	No	No	-
VSE17/00550	Otras	Cojera	Si	No	-
VSE17/00748	Doma	No	No	-	-
VSE17/00749	-	No	No	No	-
VSE17/00750	Doma	No	No	No	-
VSE17/00751	-	No	No	No	-
VSE17/00752	-	No	No	-	-
VSE17/00753	-	Cojera	No	No	-
VSE17/00754	Doma	No	No	No	-
VSE17/00983	Doma	No	No	No	-
VSE17/00984	Salto	No	No	No	-
VSE17/00985	Salto	No	No	No	-
VSE17/00986	Salto	No	No	Si	xilacina
VSE17/01025	Salto	No	No	No	-
VSE17/01026	Salto	No	No	No	-
VSE17/01027	Doma	No	No	No	-
VSE17/01028	Salto	No	No	No	-
VSE17/01029	Salto	No	No	No	-
VSE17/01030	Salto	No	No	No	-
VSE17/01032	Doma	No	No	No	-
VSE17/01036	Doma	No	No	No	-
VSE17/01068	Salto	No	No	No	-
VSE17/01069	Salto	No	No	No	-
VSE17/02129	Doma	No	No	No	-

VSE17/02131	Otras	No	No	No	-
VSE17/02132	Otras	No	No	No	-
VSE17/02135	-	No	No	No	-
VSE17/02136	-	No	No	No	-
VSE17/02137	-	No	No	No	-
VSE17/02138	-	No	No	No	-
VSE17/02162	-	No	Si	No	-
VSE17/02163	-	No	No	No	-
VSE17/02164	Otras	No	No	No	-
VSE17/02165	-	No	Si	No	-
VSE17/02166	-	No	Si	No	-
VSE17/02167	Doma	No	No	No	-
VSE17/02168	Otras	No	No	No	-
VSE17/02169	Doma	No	No	No	-
VSE17/02170	Doma	No	No	No	-
VSE17/02171	Doma	Cojera + laminitis	No	No	-
VSE17/02172	Doma	No	No	No	-
VSE17/02173	Doma	No	No	No	-
VSE17/02174	Doma	No	No	No	-
VSE17/02176	-	Cojera	No	No	-
VSE17/02177	-	No	Si	No	-
VSE17/02178	-	No	Si	No	-
VSE17/02179	-	No	Si	No	-
VSE17/02180	-	No	Si	No	-
VSE17/02237	Doma	No	Si	No	-
VSE17/02238	Salto	No	Si	No	-
VSE17/02239	Doma	No	No	No	-
VSE17/02240	Doma	No	No	No	-
VSE17/02241	Doma	No	Si	No	-
VSE17/02242	Doma	No	Si	No	-
VSE17/02243	Doma	No	Si	No	-
VSE17/02244	Doma	No	Si	No	-
VSE17/02245	Doma	No	Si	No	-
VSE17/02246	-	No	Si	No	-

Anexo 9. Valor p obtenido mediante el test de Mann-Whitney / Kruskal-Wallis, para analizar las posibles asociaciones entre las variables analíticas de hematología, bioquímica y estrés oxidativo y las categorías de los datos recopilados en el cuestionario. En color rojo el valor de $p \leq 0,05$.

	ESTACIÓN	HORA	EDAD	SEXO	RAZA	ALOJAMIENTO	CONCENTRADO	FORRAJE	REGULARIDAD	INTENSIDAD	DURACIÓN	DISCIPLINA
GB	0,000	0,960	0,968	0,206	0,000	0,097	0,337	0,036	0,000	0,030	0,570	0,006
NEU%	0,031	0,136	0,243	0,197	0,006	0,883	0,192	0,571	0,480	0,610	0,694	0,332
LIN%	0,146	0,492	0,036	0,246	0,003	0,544	0,235	0,740	0,605	0,750	0,915	0,627
MON%	0,008	0,075	0,122	0,841	0,445	0,899	0,205	0,101	0,609	0,207	0,119	0,058
EO%	0,051	0,665	0,108	0,493	0,193	0,009	0,264	0,986	0,802	0,104	0,569	0,433
BAS%	0,604	0,578	0,443	0,073	0,081	0,060	0,962	0,816	0,399	0,446	0,034	0,161
NEU	0,000	0,689	0,791	0,876	0,027	0,203	0,165	0,024	0,000	0,177	0,475	0,061
LIN	0,000	0,780	0,056	0,082	0,000	0,507	0,568	0,125	0,000	0,082	0,779	0,004
MON	0,079	0,094	0,121	0,808	0,727	0,420	0,295	0,106	0,714	0,134	0,062	0,062
EO	0,002	0,798	0,134	0,333	0,051	0,004	0,207	0,773	0,227	0,084	0,449	0,188
BAS	0,559	0,534	0,488	0,078	0,074	0,061	0,851	0,753	0,441	0,453	0,039	0,181
GR	0,076	0,833	0,004	0,002	0,360	0,133	0,177	0,716	0,655	0,764	0,638	0,042
Hb	0,003	0,167	0,233	0,002	0,520	0,005	0,026	0,194	0,958	0,301	0,317	0,196
Hct	0,001	0,059	0,187	0,013	0,259	0,222	0,019	0,028	0,023	0,622	0,319	0,042
VCM	0,000	0,047	0,112	0,271	0,782	0,356	0,105	0,063	0,000	0,673	0,825	0,492
HCM	0,060	0,015	0,003	0,187	0,515	0,051	0,161	0,159	0,273	0,127	0,446	0,008
CHCM	0,000	0,000	0,031	0,551	0,435	0,015	0,516	0,243	0,000	0,259	0,895	0,415
RDW-CV	0,424	0,142	0,012	0,011	0,010	0,113	0,897	0,955	0,041	0,348	0,331	0,000
PLQ	0,904	0,025	0,003	0,130	0,380	0,027	0,795	0,741	0,454	0,575	0,761	0,001
VPM	0,123	0,018	0,147	0,219	0,253	0,178	0,886	0,466	0,022	0,522	0,901	0,001

	ESTACIÓN	HORA	EDAD	SEXO	RAZA	ALOJAMIENTO	CONCENTRADO	FORRAJE	REGULARIDAD	INTENSIDAD	DURACIÓN	DISCIPLINA
U	0,006	0,346	0,074	0,222	0,201	0,027	0,381	0,224	0,618	0,807	0,082	0,002
Cr	0,000	0,581	0,059	0,792	0,249	0,777	0,724	0,501	0,110	0,133	0,575	0,981
PT	0,538	0,844	0,727	0,487	0,981	0,191	0,416	0,985	0,790	0,836	0,829	0,040
ALB	0,000	0,467	0,897	0,687	0,012	0,208	0,871	0,583	0,000	0,002	0,724	0,066
GLOB	0,053	0,656	0,524	0,079	0,209	0,148	0,462	0,489	0,157	0,077	0,927	0,004
ALB/GLOB	0,000	0,539	0,481	0,099	0,024	0,254	0,487	0,228	0,004	0,013	0,757	0,002
AST	0,160	0,013	0,198	0,822	0,044	0,044	0,195	0,010	0,142	0,020	0,563	0,455
GGT	0,013	0,978	0,364	0,564	0,028	0,063	0,668	0,771	0,097	0,011	0,328	0,006
ALP	0,000	0,481	0,873	0,258	0,003	0,004	0,293	0,270	0,000	0,002	0,093	0,079
BT	0,000	0,953	0,836	0,050	0,008	0,029	0,238	0,239	0,000	0,016	0,919	0,005
BD	0,001	0,650	0,253	0,037	0,056	0,034	0,467	0,523	0,001	0,063	0,933	0,630
BI	0,000	0,993	0,914	0,055	0,010	0,025	0,251	0,234	0,000	0,015	0,972	0,003
CK	0,002	0,044	0,041	0,037	0,188	0,539	0,959	0,886	0,123	0,065	0,221	0,716
LDH	0,000	0,120	0,285	0,137	0,000	0,025	0,340	0,495	0,000	0,000	0,008	0,132
Ca	0,154	0,347	0,660	0,769	0,307	0,204	0,009	0,266	0,003	0,866	0,299	0,108
P	0,000	0,005	0,000	0,200	0,151	0,651	0,317	0,770	0,292	0,304	0,039	0,013
Ca/P	0,000	0,011	0,000	0,049	0,167	0,100	0,678	0,938	0,503	0,118	0,029	0,006
TG	0,677	0,573	0,228	0,065	0,574	0,144	0,290	0,500	0,840	0,295	0,293	0,023
CT	0,004	0,245	0,122	0,215	0,065	0,260	0,057	0,779	0,253	0,102	0,246	0,002
Fib	0,074	0,720	0,975	0,021	0,470	0,495	0,659	0,222	0,635	0,329	0,013	0,734

	ESTACIÓN	HORA	EDAD	SEXO	RAZA	ALOJAMIENTO	CONCENTRADO	FORRAJE	REGULARIDAD	INTENSIDAD	DURACIÓN	DISCIPLINA
AU	0,000	0,326	0,509	0,520	0,096	0,060	0,531	0,203	0,000	0,428	0,463	0,544
8-OHDG	0,030	0,183	0,474	0,021	0,794	0,123	0,614	0,943	0,391	0,325	0,162	0,083
TBARS	0,221	0,266	0,916	0,156	0,753	0,430	0,391	0,209	0,316	0,354	0,804	0,294
TAS	0,069	0,862	0,550	0,924	0,320	0,161	0,529	0,030	0,564	0,071	0,293	0,105

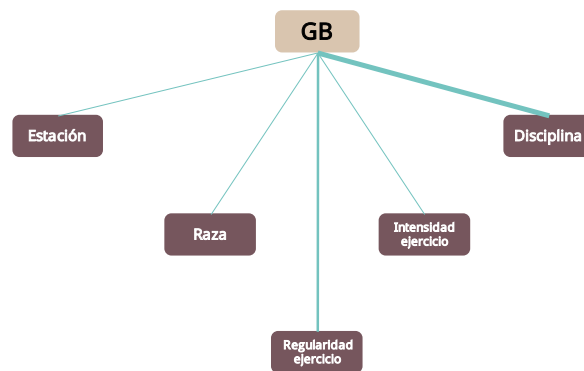
Anexo 10. Representación gráfica de las asociaciones significativas de cada analito con las categorías del cuestionario.

Leyenda

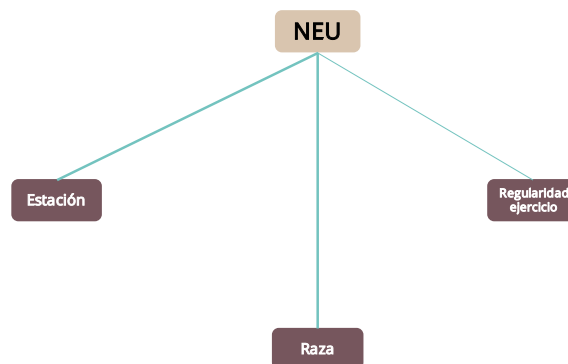
- $p = 0,000$
- $0,001 < p < 0,010$
- $0,011 < p < 0,049$



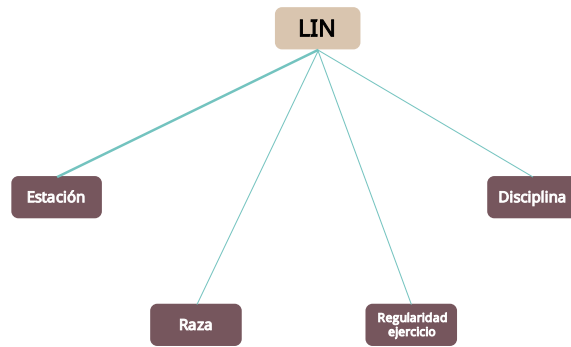
Representación de asociaciones significativas de los GB con las categorías del cuestionario.



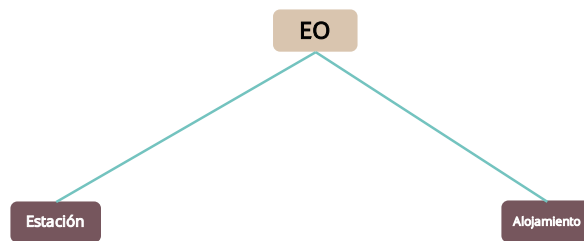
Representación de asociaciones significativas de los NEU con las categorías del cuestionario.



Representación de asociaciones significativas de los LIN con las categorías del cuestionario.



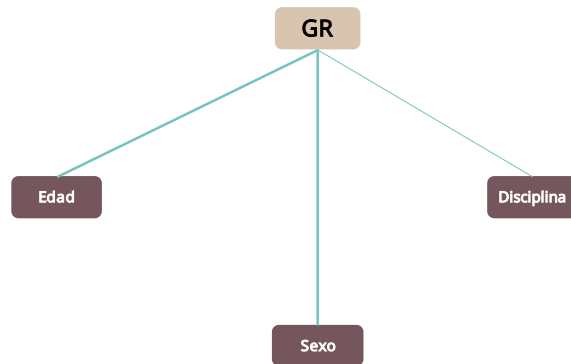
Representación de asociaciones significativas de los EO con las categorías del cuestionario.



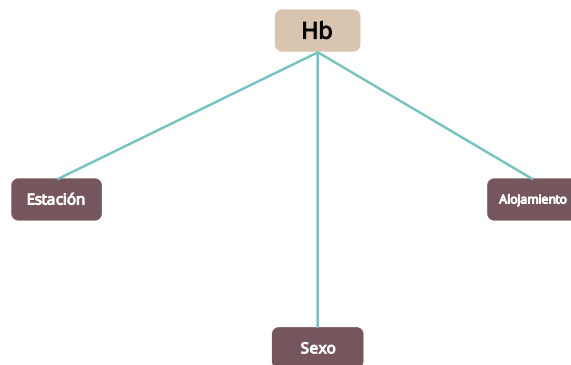
Representación de asociaciones significativas de los BAS con las categorías del cuestionario.



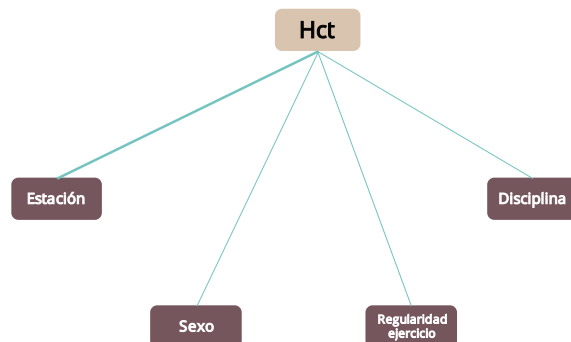
Representación de asociaciones significativas de los GR con las categorías del cuestionario.



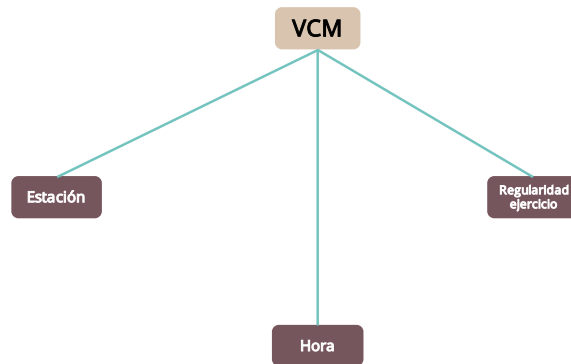
Representación de asociaciones significativas de la Hb con las categorías del cuestionario.



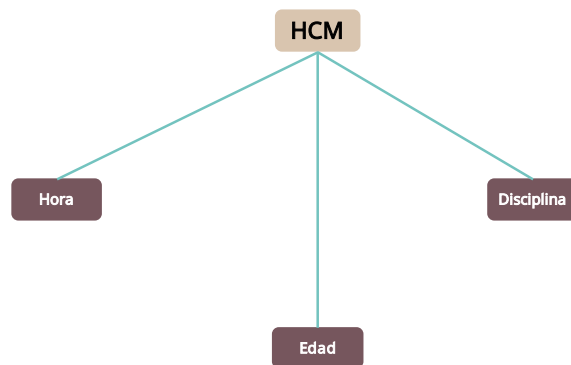
Representación de asociaciones significativas del Hct con las categorías del cuestionario.



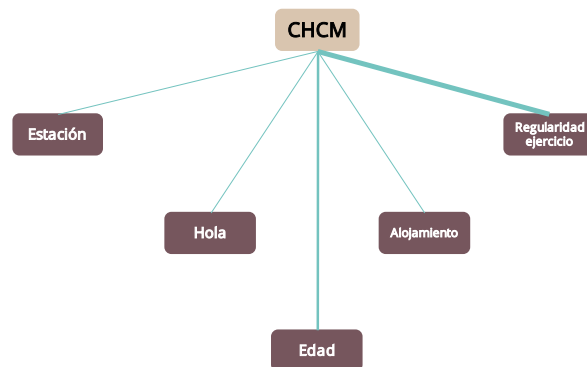
Representación de asociaciones significativas del VCM con las categorías del cuestionario.



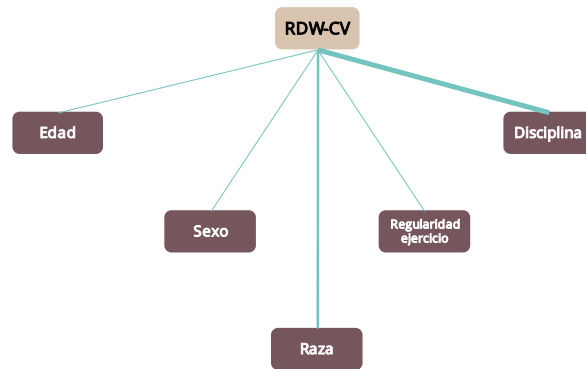
Representación de asociaciones significativas del HCM con las categorías del cuestionario.



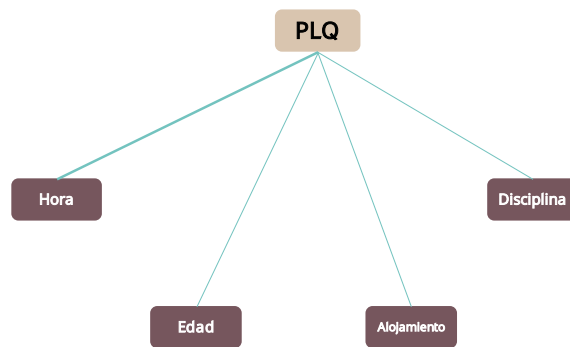
Representación de asociaciones significativas del CHCM con las categorías del cuestionario.



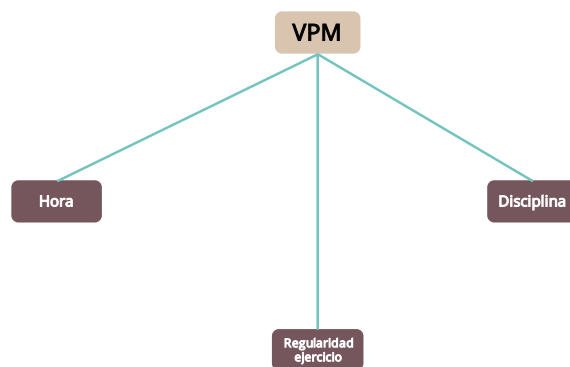
Representación de asociaciones significativas del RDW-CV con las categorías del cuestionario.



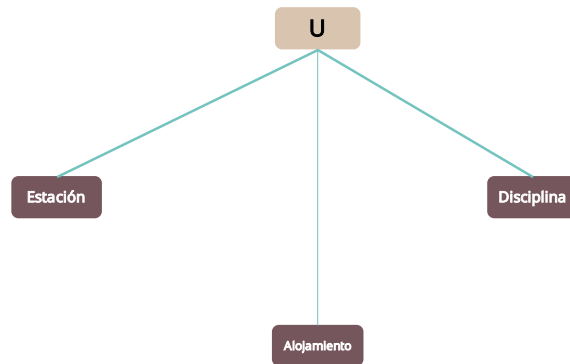
Representación de asociaciones significativas de las PLQ con las categorías del cuestionario.



Representación de asociaciones significativas del VPM con las categorías del cuestionario.



Representación de asociaciones significativas de la U con las categorías del cuestionario.



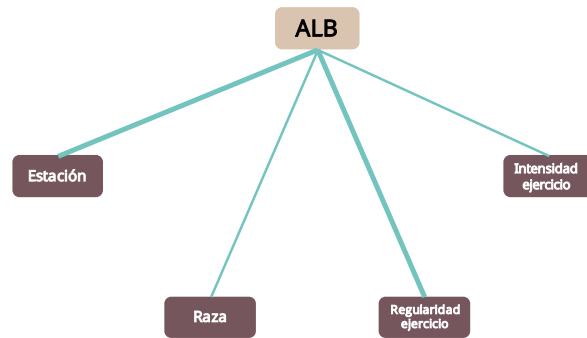
Representación de asociaciones significativas de la Cr con las categorías del cuestionario.



Representación de asociaciones significativas de las PT con las categorías del cuestionario.



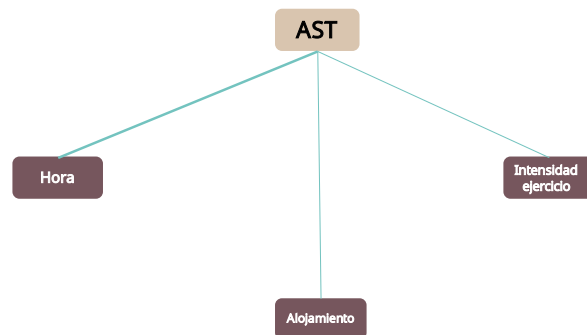
Representación de asociaciones significativas de la ALB con las categorías del cuestionario.



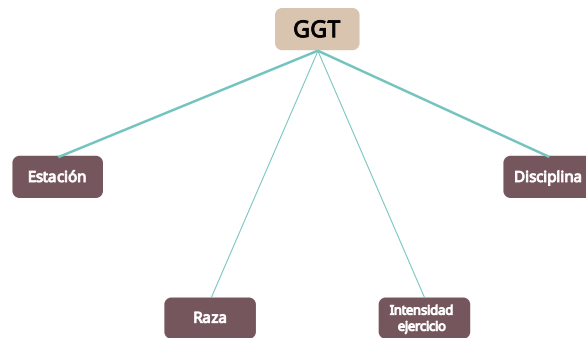
Representación de asociaciones significativas de las GLOB con las categorías del cuestionario.



Representación de asociaciones significativas de la AST con las categorías del cuestionario.



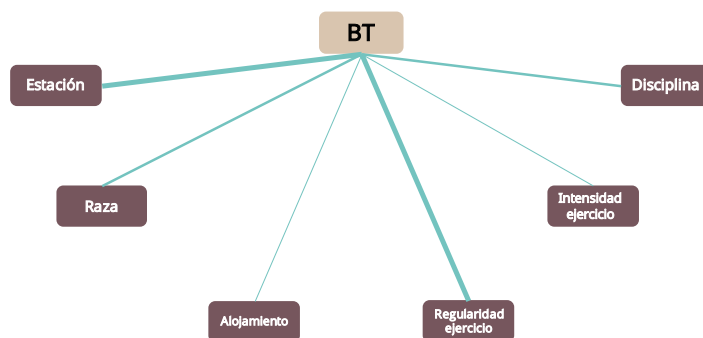
Representación de asociaciones significativas de la GGT con las categorías del cuestionario.



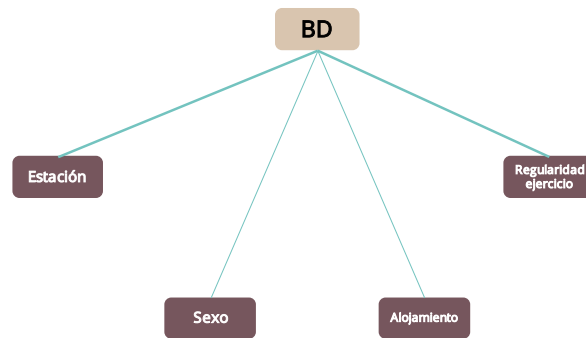
Representación de asociaciones significativas de la ALP con las categorías del cuestionario.



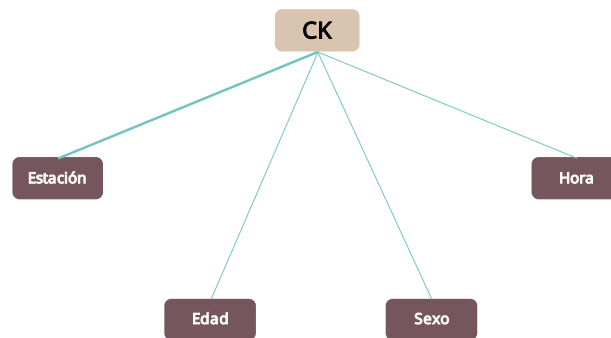
Representación de asociaciones significativas de la BT con las categorías del cuestionario.



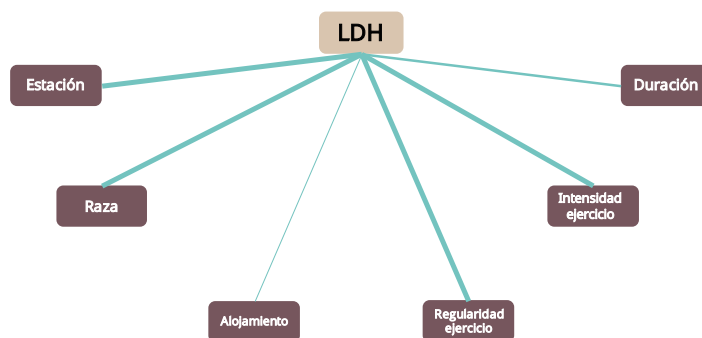
Representación de asociaciones significativas de la BD las categorías del cuestionario.



Representación de asociaciones significativas de la CK con las categorías del cuestionario.



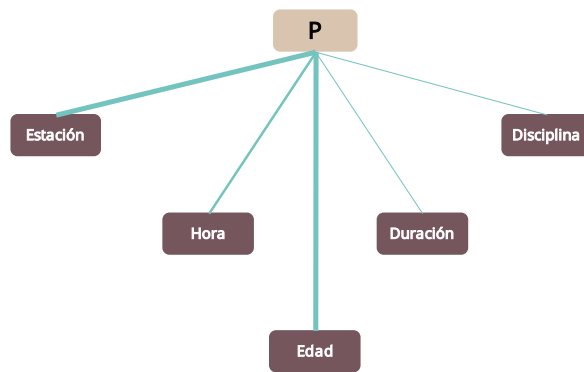
Representación de asociaciones significativas de la LDH con las categorías del cuestionario.



Representación de asociaciones significativas del Ca con las categorías del cuestionario.



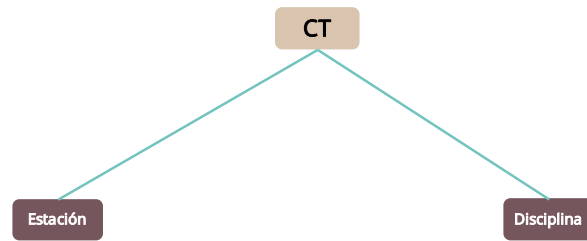
Representación de asociaciones significativas del P con las categorías del cuestionario.



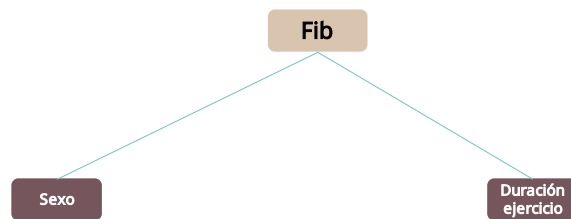
Representación de asociaciones significativas de los TG con las categorías del cuestionario.



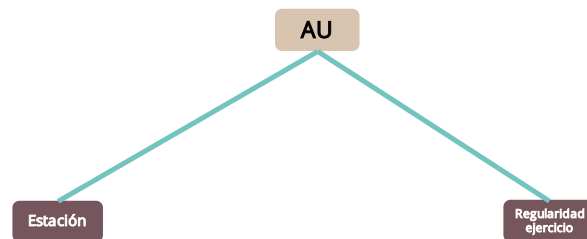
Representación de asociaciones significativas del CT con las categorías del cuestionario.



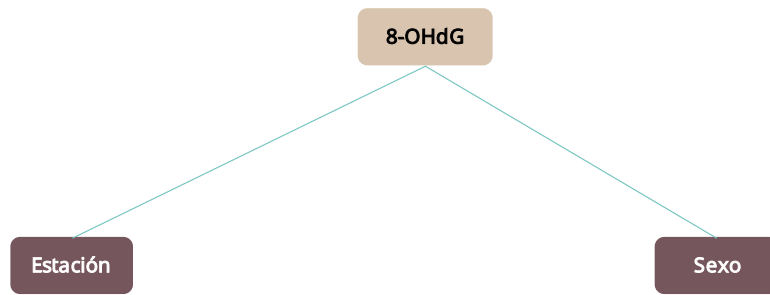
Representación de asociaciones significativas del Fib con las categorías del cuestionario.



Representación de asociaciones significativas del AU con las categorías del cuestionario.



Representación de asociaciones significativas de la 8-OHdG con las categorías del cuestionario.



Anexo 11. Valor p obtenido mediante el test Chi-cuadrado de Pearson para analizar las posibles asociaciones entre las categorías de los datos recopilados en el cuestionario. En color rojo el valor de $p \leq 0,05$.

	ESTACIÓN	HORA	EDAD	SEXO	RAZA	ALOJAMIENTO	REGULARIDAD	INTENSIDAD	DURACIÓN	DISCIPLINA
ESTACIÓN	-	0,100	0,017	0,901	0,005	0,009	0,000	0,045	0,580	0,003
HORA	0,100	-	0,065	0,797	0,023	0,259	0,208	0,395	0,653	0,174
EDAD	0,017	0,065	-	0,603	0,535	0,073	0,260	0,476	0,570	0,440
SEXO	0,901	0,797	0,603	-	0,004	0,004	0,243	0,016	0,001	0,000
RAZA	0,005	0,023	0,535	0,004	-	0,213	0,000	0,078	0,859	0,000
ALOJAMIENTO	0,009	0,259	0,073	0,004	0,213	-	0,012	0,000	0,000	0,010
REGULARIDAD	0,000	0,208	0,260	0,243	0,000	0,012	-	0,000	0,001	0,000
INTENSIDAD	0,045	0,395	0,476	0,016	0,078	0,000	0,000	-	0,000	0,000
DURACIÓN	0,580	0,653	0,570	0,001	0,859	0,000	0,001	0,000	-	0,944
DISCIPLINA	0,003	0,174	0,440	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,944	-

Anexo 12. Valor p obtenido mediante el test Rho de Spearman para analizar las posibles asociaciones entre los analitos que componen la hematología.
En color rojo el valor de $p \leq 0,05$.

	GB	NEU%	LIN%	MON%	EO%	BAS%	NEU	LIN	MON	EO	BAS	GR	Hb	Hct	VCM	HCM	CHCM	RDW-CV	PLQ	VPM
GB	-	0,908	0,792	0,280	0,135	0,646	0,000	0,000	0,070	0,001	0,772	0,016	0,058	0,000	0,001	0,460	0,000	0,024	0,002	0,240
NEU%	0,908	-	0,000	0,314	0,255	0,544	0,000	0,000	0,381	0,226	0,545	0,806	0,275	0,025	0,000	0,095	0,023	0,009	0,108	0,973
LIN%	0,792	0,000	-	0,170	0,223	0,150	0,000	0,000	0,134	0,289	0,154	0,751	0,306	0,049	0,001	0,192	0,038	0,010	0,182	0,883
MON%	0,280	0,314	0,170	-	0,642	0,277	0,183	0,032	0,000	0,787	0,336	0,877	0,772	0,512	0,549	0,977	0,463	0,591	0,871	0,515
EO%	0,135	0,255	0,223	0,642	-	0,481	0,381	0,505	0,384	0,000	0,533	0,682	0,404	0,881	0,387	0,493	0,056	0,913	0,875	0,559
BAS%	0,646	0,544	0,150	0,277	0,481	-	0,930	0,342	0,289	0,394	0,000	0,662	0,358	0,634	0,656	0,844	0,194	0,475	0,405	0,478
NEU	0,000	0,000	0,000	0,183	0,381	0,930	-	0,000	0,230	0,013	0,950	0,043	0,027	0,000	0,000	0,744	0,000	0,384	0,115	0,801
LIN	0,000	0,000	0,000	0,032	0,505	0,342	0,000	-	0,938	0,027	0,419	0,007	0,039	0,001	0,595	0,142	0,045	0,000	0,000	0,201
MON	0,070	0,381	0,134	0,000	0,384	0,289	0,230	0,938	-	0,230	0,321	0,573	0,824	0,597	0,828	0,726	0,567	0,980	0,499	0,289
EO	0,001	0,226	0,289	0,787	0,000	0,394	0,013	0,027	0,230	-	0,455	0,775	0,838	0,282	0,224	0,351	0,010	0,517	0,672	0,773
BAS	0,772	0,545	0,154	0,336	0,533	0,000	0,950	0,419	0,321	0,455	-	0,649	0,341	0,602	0,694	0,831	0,230	0,480	0,418	0,466
GR	0,016	0,806	0,751	0,877	0,682	0,662	0,043	0,007	0,573	0,775	0,649	-	0,000	0,000	0,000	0,000	0,073	0,000	0,000	0,000
Hb	0,058	0,275	0,306	0,772	0,404	0,358	0,027	0,039	0,824	0,838	0,341	0,000	-	0,000	0,058	0,989	0,002	0,010	0,006	0,001
Hct	0,000	0,025	0,049	0,512	0,881	0,634	0,000	0,001	0,597	0,282	0,602	0,000	0,000	-	0,002	0,540	0,000	0,000	0,000	0,000
VCM	0,001	0,000	0,001	0,549	0,387	0,656	0,000	0,595	0,828	0,224	0,694	0,000	0,058	0,002	-	0,000	0,000	0,052	0,026	0,118
HCM	0,460	0,095	0,192	0,977	0,493	0,844	0,744	0,142	0,726	0,351	0,831	0,000	0,989	0,540	0,000	-	0,187	0,000	0,000	0,000
CHCM	0,000	0,027	0,052	0,507	0,094	0,176	0,000	0,040	0,528	0,020	0,210	0,117	0,004	0,000	0,000	0,151	-	0,077	0,111	0,124
RDW-CV	0,024	0,009	0,010	0,591	0,913	0,475	0,384	0,000	0,980	0,517	0,480	0,000	0,010	0,000	0,052	0,000	0,100	-	0,000	0,000
PLQ	0,002	0,108	0,182	0,871	0,875	0,405	0,115	0,000	0,499	0,672	0,418	0,000	0,006	0,000	0,026	0,000	0,144	0,000	-	0,000
VPM	0,240	0,973	0,883	0,515	0,559	0,478	0,801	0,201	0,289	0,773	0,466	0,000	0,001	0,000	0,118	0,000	0,173	0,000	0,000	-

Anexo 13. Valor p obtenido mediante el test Rho de Spearman para analizar las posibles asociaciones entre los analitos del análisis bioquímico. En color rojo el valor de $p \leq 0,05$.

	U	Cr	PT	ALB	GLOB	ALB/GLOB	AST	GGT	ALP	BT	BD	BI	CK	LDH	Ca	P	Ca/P	TG	CT	Fib
U	-	0,171	0,920	0,224	0,897	0,653	0,040	0,051	0,015	0,001	0,017	0,001	0,259	0,035	0,967	0,137	0,492	0,042	0,453	0,253
Cr	0,171	-	0,404	0,006	0,363	0,040	0,839	0,381	0,312	0,016	0,756	0,006	0,095	0,003	0,033	0,046	0,003	0,952	0,019	0,932
PT	0,920	0,404	-	0,007	0,000	0,000	0,065	0,048	0,908	0,949	0,275	0,721	0,834	0,743	0,400	0,577	0,726	0,956	0,419	0,496
ALB	0,224	0,006	0,007	-	0,000	0,000	0,467	0,569	0,002	0,000	0,000	0,000	0,456	0,003	0,001	0,701	0,059	0,036	0,152	0,173
GLOB	0,897	0,363	0,000	0,000	-	0,000	0,276	0,081	0,096	0,010	0,410	0,005	0,895	0,311	0,138	0,784	0,173	0,291	0,993	0,810
ALB/GLOB	0,653	0,040	0,000	0,000	-	0,662	0,293	0,009	0,009	0,000	0,032	0,000	0,726	0,047	0,007	0,759	0,095	0,081	0,442	0,351
AST	0,040	0,839	0,065	0,467	0,276	0,662	-	0,000	0,004	0,080	0,605	0,054	0,006	0,000	0,259	0,491	0,500	0,424	0,764	0,174
GGT	0,051	0,381	0,048	0,569	0,081	0,293	0,000	-	0,000	0,005	0,041	0,007	0,130	0,082	0,707	0,117	0,319	0,175	0,249	0,701
ALP	0,015	0,312	0,908	0,002	0,096	0,009	0,004	0,000	-	0,000	0,009	0,001	0,363	0,000	0,534	0,412	186,000	0,572	0,669	0,067
BT	0,001	0,016	0,949	0,000	0,010	0,000	0,080	0,005	0,000	-	0,000	0,000	0,127	0,000	0,188	0,157	0,925	0,490	0,579	0,507
BD	0,017	0,756	0,275	0,000	0,410	0,032	0,605	0,041	0,009	0,000	-	0,000	0,596	0,030	0,483	0,055	0,298	0,416	0,185	0,522
BI	0,001	0,006	0,721	0,000	0,005	0,000	0,054	0,007	0,001	0,000	0,000	-	0,114	0,000	0,168	0,216	0,921	0,452	0,636	0,357
CK	0,259	0,095	0,834	0,456	0,895	0,726	0,006	0,130	0,363	0,127	0,596	0,114	-	0,000	0,983	0,001	0,000	0,660	0,404	0,533
LDH	0,035	0,003	0,743	0,003	0,311	0,047	0,000	0,082	0,000	0,000	0,030	0,000	0,000	-	0,308	0,106	0,022	0,834	0,509	0,063
Ca	0,967	0,033	0,400	0,001	0,138	0,007	0,259	0,707	0,534	0,188	0,483	0,168	0,983	0,308	-	0,903	0,014	0,510	0,012	0,515
P	0,137	0,046	0,577	0,701	0,784	0,759	0,491	0,117	0,412	0,157	0,055	0,216	0,001	0,106	0,903	-	0,000	0,406	0,304	0,313
Ca/P	0,492	0,003	0,726	0,059	0,173	0,095	0,500	0,319	186,000	0,925	0,298	0,921	0,000	0,022	0,014	0,000	-	0,573	0,052	0,475
TG	0,042	0,952	0,956	0,036	0,291	0,081	0,424	0,175	0,572	0,490	0,416	0,452	0,660	0,834	0,510	0,406	0,573	-	0,100	0,079
CT	0,453	0,019	0,419	0,152	0,933	0,442	0,764	0,249	0,669	0,579	0,185	0,636	0,404	0,509	0,012	0,304	0,052	0,100	-	0,475
Fib	0,253	0,932	0,496	0,173	0,810	0,351	0,174	0,701	0,067	0,507	0,522	0,357	0,533	0,063	0,515	0,313	0,475	0,079	0,475	-

Anexo 14. Valor p obtenido mediante el test Rho de Spearman para analizar las posibles asociaciones entre los marcadores de estrés oxidativo. En color rojo el valor de $p \leq 0,05$.

	AU	8-OHDG	TBARS	TAS
AU	-	0,44	0,973	0,676
8-OHDG	0,44	-	0,897	0,001
TBARS	0,973	0,897	-	0,39
TAS	0,676	0,001	0,39	-

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Mihók Z, Montijano RC. El sector ecuestre y la economía. *Archivos de zootecnia*. 2016;65(252):481-488.
2. Marcella KL. Equine Hematology and Serum Chemistry in Health and Disease; Navigating by the Numbers. In: *Proc. 7th Mid-Atlantic Nutr. Conf., College Park, MD*. 2009.
3. Williams CA. Oxidative stress or oxidant/antioxidant dis-equilibrium in horses? A hot topic. *The Veterinary Journal*. 2008;177(2):157-158.
4. Solberg HE. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *Clin Chim Acta*. 1987;165(1):111-118.
5. Friedrichs KR. Can evidence-based medicine be applied to the theory of reference intervals?. *Veterinary clinical pathology*. 2016;45(4):529-530.
6. Revuelta J. Estudio del impacto del sector ecuestre en España. *Editorial Deloitte*. 2013.
7. Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cigenéticas DGdPyMA. El sector equino en cifras: Principales indicadores económicos. In: *Ministerio de Agricultura PyA, ed: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. 2020.
8. Real Federación Hípica Española: Licencias hípicas 2020. <https://rfhe.com/wp-content/uploads/2018/02/Resumen-de-Licencias-2020-RFHE.pdf>. Published 2020. Accessed.
9. Lester SJ, Mollat WH, Bryant JE. Overview of Clinical Pathology and the Horse. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2015;31(2):247-268.
10. Kirschvink N, de Moffarts B, Lekeux P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*. 2008;177(2):178-191.
11. Real Academia Española. Diccionario de la lengua española. Hematología. <https://dle.rae.es/hematología>. Published 2021. Accessed.
12. Fink NE. Automatización en hematología. *Hematología La Plata (AR): Universidad Nacional de La Plata*. 2005;9(1):4-16.
13. Crosland-Taylor P. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*. 1953;171(4340):37-38.
14. Walton RM. *Equine clinical pathology*. John Wiley & Sons; 2013.
15. England J. Automated blood cell counters. In: *Recent advances in haematology*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996.
16. Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's veterinary hematology*. John Wiley & Sons; 2011.
17. Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. In: *Proceedings of the National Electronics Conference*. 1956.
18. Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. John Wiley & Sons; 2012.
19. Romero S. Sistema de Hematología ADVIA 120/2120 [Presentación de PowerPoint]. <https://dokumen.tips/download/link/principios-advia-120-2120-grau>. Published 2010. Accessed.
20. Sysmex. Analizador hematológico Sysmex XT-2000i™. <https://www.sysmex.com/la/es/Products/Hematology/XTSeries/Pages/XT-2000-Hematology-Analyzer.aspx>. Published 2022. Accessed.
21. Vives-Corróns J-L, Besson I, María Jou J, Gutiérrez G. Evaluation of the Abbott Cell-DYN 3500 hematology analyzer in a university hospital. *American journal of clinical pathology*. 1996;105(5):553-559.
22. URIT Global Diagnostic Supplier. Equipos veterinarios. <http://www.urit.com/xby/cpjifa/list.aspx?lcid=36>. Published 2018. Accessed.

23. Lavín González S, Mora Igual FJ, Viñas Borrell L. Análisis cuantitativo del buffy coat en medicina veterinaria canina. *Clínica veterinaria de pequeños animales*. 1990;10(4):0013-0019.
24. Levine RA, Hart AH, Wardlaw SC. Quantitative buffy coat analysis of blood collected from dogs, cats, and horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1986;189(6):670-673.
25. Dotson MA. Multiparameter hematology instrument. In: *Clinical hematology: principles, procedures, correlations*. Lippincott Williams & Wilkins; 1998:519-551.
26. Medical Subject Headings MeSH. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>. Published 2022. Accessed.
27. Pusterla N, Higgins J. *Interpretation of equine laboratory diagnostics*. John Wiley & Sons; 2017.
28. Satué K, Hernández A, Muñoz A. Physiological factors in the interpretation of equine hematological profile. *Hematology—science and practice*. 2012;24:573-596.
29. Persson S. The circulatory significance of the splenic red cell pool. In: *Proceeding of the 1st International Symposium on Equine Hematology*. 1975.
30. Schalm O, Carlson G. The blood and the blood forming organs. Equine Medicine and Surgery. In: *American Veterinary Publications*; 1982.
31. Satué K, Gardón J, Muñoz A. Interpretation of platelets in the horse. *J Hematology Res*. 2017;4:19-25.
32. Satué K, Muñoz A, Gardón J. Interpretation of the equine leukogram. *J Hematology Res*. 2014;1(1):27-35.
33. Carakostas MC, Moore WE, Smith JE. Intravascular neutrophilic granulocyte kinetics in horses. *American journal of veterinary research*. 1981;42(4):623-625.
34. Cowell RL, Tyler RD. *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. Elsevier Health Sciences; 2001.
35. Muñoz A, Riber C, Trigo P, Castejón F. Hematology and clinical pathology data in chronically starved horses. *Journal of equine veterinary science*. 2010;30(10):581-589.
36. Mair TS. Update on infectious respiratory diseases of the horse. *Equine Veterinary Education*. 1996;8(6):329-335.
37. Tan RHH, Crisman MV, Clark SP, Gagea M, Zimmerman K. Multicentric Mastocytoma in a Horse. *Journal of veterinary internal medicine*. 2007;21(2):340-343.
38. Latimer KS. *Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology*. John Wiley & Sons; 2011.
39. Fleming KA, Barton MH, Latimer KS. Iron deficiency anemia in a neonatal foal. *Journal of veterinary internal medicine*. 2006;20(6):1495-1498.
40. Steven L. Stockham D, MS. Interpretation of equine serum biochemical profile results. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*. 1995;11(391-413).
41. Díaz NA, Ruiz JAB, Reyes EF, et al. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Universidad de Córdoba*. 2010:1-8.
42. García RD. Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro. 2018.
43. Amorós Sánchez M, Barrero Cuevas L. *Análisis bioquímico*. Madrid: Síntesis; 2016.
44. Kerr MG. *Veterinary laboratory medicine: Clinical biochemistry and haematology*. John Wiley & Sons; 2008.
45. Barrelet A, Ricketts S. Haematology and blood biochemistry in the horse: a guide to interpretation. *In Practice*. 2002;24(6):318-327.
46. Blackmore D, Henley M, Mapp B. Colorimetric measurement of albumin in horse sera. *Equine veterinary journal*. 1983;15(4):373-374.

47. Riond B, Wenger-Riggenbach B, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Serum protein concentrations from clinically healthy horses determined by agarose gel electrophoresis. *Veterinary clinical pathology*. 2009;38(1):73-77.
48. Evans GO. *Animal clinical chemistry: a practical handbook for toxicologists and biomedical researchers*. CRC Press; 2009.
49. Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Second edition ed: John Wiley & Sons; 2008.
50. Kirschvink N, Lekeux P. Oxidative stress in equine medicine-Current knowledge. *Pferdeheilkunde*. 2002;18(6):569-573.
51. Kirschvink N, de Moffarts B, Lekeux P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 2008;177(2):178-191.
52. Cheeseman K, Slater T. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*. 1993;49(3):481-493.
53. de Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26(1):202-226.
54. Soffler C. Oxidative stress. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2007;23(1):135-157.
55. Wong DM, Moore RM, Brockus CW. Mechanisms of oxidative injury in equine disease. *Compend Contin Educ Vet*. 2012;34:E6.
56. Smith P, Stubley D, Blackmore DJ. Measurement of superoxide dismutase, diamine oxidase and caeruloplasmin oxidase in the blood of thoroughbreds. *Research in veterinary science*. 1983;35(2):160-164.
57. Jaeschke G, Keller H. The ascorbic-acid status of the horse. 1. Methods and normal values. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*. 1978;91(14):279-286.
58. Stowe HD, Herdt TH. Clinical assessment of selenium status of livestock. *Journal of animal science*. 1992;70(12):3928-3933.
59. Steiss JE, Traber MG, Williams MA, Kayden HJ, Wright JC. Alpha tocopherol concentrations in clinically normal adult horses. *Equine veterinary journal*. 1994;26(5):417-419.
60. Escribano BM, Molina A, Valera M, et al. Genetic analysis of haematological and plasma biochemical parameters in the Spanish purebred horse exercised on a treadmill. *Animal : an international journal of animal bioscience*. 2013;7(9):1414-1422.
61. Kusano K, Yamazaki M, Kiuchi M, Kaneko K, Koyama K. Reference range of blood biomarkers for oxidative stress in Thoroughbred racehorses (2-5 years old). *J Equine Sci*. 2016;27(3):125-129.
62. Wanderley EK, Manso-Filho HC, Manso HECC, Melo SKM, Abreu JMG, D'Araújo JA. Diurnal Rhythm of Antioxidant Biomarkers in Equines. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 2013;03(01):52-57.
63. N. Georgieva GB. Changes in blood antioxidant status of hanoverian horses during four year seasons. *Trakia Journal of Sciences*. 2011;9(3):39-44.
64. Räsänen LA, Wiitanen PA, Lilius E-M, Hyyppä S, Pösö AR. Accumulation of uric acid in plasma after repeated bouts of exercise in the horse. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 1996;114(2):139-144.
65. Górecka R, Sitarska E, Kluciński W. Antioxidant parameters of horses according to age, sex, breed and environment. *Polish journal of veterinary sciences*. 2002;5(4):209-216.
66. Castejón F, Trigo P, Muñoz A, Riber C. Uric acid responses to endurance racing and relationships with performance, plasma biochemistry and metabolic alterations. *Equine veterinary journal*. 2006;38(S36):70-73.
67. Villasante A, Aranedo OF, Behn C, Galleguillos M, Adarmes H. Antioxidant capacity and oxidative damage determination in synovial fluid of chronically damaged equine metacarpophalangeal joint. *Veterinary research communications*. 2010;34(2):133-141.

68. Bailey SR, Habershon-Butcher JL, Ransom KJ, Elliott J, Menzies-Gow NJ. Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. *American journal of veterinary research*. 2008;69(1):122-129.
69. Bolfă PF, Leroux C, Pinteă A, et al. Oxidant–antioxidant imbalance in horses infected with equine infectious anaemia virus. *The Veterinary Journal*. 2012;192(3):449-454.
70. Kirschvink N, Art T, de Moffarts B, et al. Relationship between markers of blood oxidant status and physiological variables in healthy and heaves-affected horses after exercise. *Equine veterinary journal Supplement*. 2002(34):159-164.
71. Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free radicals in diagnostic medicine*. 1994:43-58.
72. Seljeskog E, Hervig T, Mansoor MA. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin Biochem*. 2006;39(9):947-954.
73. Rey AI, Segura J, Arandilla E, Lopez-Bote CJ. Short- and long-term effect of oral administration of micellized natural vitamin E (D-alpha-tocopherol) on oxidative status in race horses under intense training. *Journal of animal science*. 2013;91(3):1277-1284.
74. Brummer M, Hayes S, Dawson K, Lawrence L. Interrelationships among selenium status, antioxidant capacity and oxidative stress in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2013;5(33):332.
75. Niedzwiedz A, Jaworski Z. Oxidant-antioxidant status in the blood of horses with symptomatic recurrent airway obstruction (RAO). *Journal of veterinary internal medicine*. 2014;28(6):1845-1852.
76. Marlin DJ, Fenn K, Smith N, et al. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *The Journal of nutrition*. 2002;132(6 Suppl 2):1622S-1627S.
77. Balogh N, Gaal T, Ribiczeyne PS, Petri A. Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. *Veterinary clinical pathology*. 2001;30(4):214-218.
78. El-Ashker M, El-Khodery S, Metwally N, Hussein H, El-Boshy M. Prognostic significance of oxidative stress markers in colitis associated with phenylbutazone administration in draft horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2012;32(3):146-152.
79. Wessely-Szponder J, Belkot Z, Bobowiec R, Kosior-Korzecka U, Wójcik M. Transport induced inflammatory responses in horses. *Polish journal of veterinary sciences*. 2015;18(2).
80. Andriichuk A, Tkachenko H, Tkachova I. Oxidative Stress Biomarkers and Erythrocytes Hemolysis in Well-Trained Equine Athletes Before and After Exercise. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2016;36:32-43.
81. Ducharme NG, Fortier LA, Kraus MS, et al. Effect of a tart cherry juice blend on exercise-induced muscle damage in horses. *American journal of veterinary research*. 2009;70(6):758-763.
82. Palazzo M, Vizzarri F, Cinone M, D'Alessandro AG, Martemucci G, Casamassima D. Dietary effect of lemon verbena extract on selected blood parameters and on plasma oxidative profile in Avelignese horses. *Animal science journal*. 2019;90(2):222-228.
83. Smarsh D, Williams C. The effects of acute exercise on oxidative stress in the skeletal muscle and blood of yearling and mature horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2013;5(33):324.
84. Bażanów BA, Chełmecka E, Romuk E, Stygar DM. Basic Studies on the Oxidative Stress Markers in Two Types of Horse Breed: Semi-isolated Population of Huculs Is Different from Commercially Used Arabian Horses. *BioMed research international*. 2020;2020:1-10.
85. Holbrook TC, McFarlane D, Schott HC, 2nd. Neuroendocrine and non-neuroendocrine markers of inflammation associated with performance in endurance horses. *Equine veterinary journal Supplement*. 2010(38):123-128.

86. Radakovic M, Davitkov D, Borozan S, et al. Oxidative stress and DNA damage in horses naturally infected with *Theileria equi*. *The Veterinary Journal*. 2016;217:112-118.
87. Neville RF, Hollands T, Collins SN, Keyte FV. Evaluation of urinary TBARS in normal and chronic laminitic ponies. *Equine veterinary journal*. 2004;36(3):292-294.
88. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004;37(4):277-285.
89. Calamari L, Abeni F, Bertin G. Metabolic and hematological profiles in mature horses supplemented with different selenium sources and doses. *Journal of animal science*. 2010;88(2):650-659.
90. Žak A, Siwińska N, Chełmecka E, et al. Effects of Advanced Age, Pituitary Pars Intermedia Dysfunction and Insulin Dysregulation on Serum Antioxidant Markers in Horses. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(5):444.
91. MacNicol JL, Lindinger MI, Pearson W. A time-course evaluation of inflammatory and oxidative markers following high-intensity exercise in horses: a pilot study. *J Appl Physiol (1985)*. 2018;124(4):860-865.
92. Padalino B, Raidal SL, Carter N, et al. Immunological, clinical, haematological and oxidative responses to long distance transportation in horses. *Research in veterinary science*. 2017;115:78-87.
93. Di Minno A, Turnu L. 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Levels and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Literature. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2016;24(10):548-555.
94. Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol Reprod*. 2014;91(3):77.
95. Shono S, Gin A, Minowa F, Okubo K, Mochizuki M. The Oxidative Stress Markers of Horses—the Comparison with Other Animals and the Influence of Exercise and Disease. *Animals (Basel)*. 2020;10(4).
96. Niedzwiedz A, Borowicz H, Januszewska L, Markiewicz-Gorka I, Jaworski Z. Serum 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a marker of DNA oxidative damage in horses with recurrent airway obstruction. *Acta veterinaria Scandinavica*. 2016;58(1):38.
97. Yamazaki M, Kusano K, Ishibashi T, Kiuchi M, Koyama K. Intravenous infusion of H₂-saline suppresses oxidative stress and elevates antioxidant potential in Thoroughbred horses after racing exercise. *Scientific reports*. 2015;5:15514-15514.
98. Grasbeck R. Establishment and use of normal values. *Scand J Clin Invest*. 1969;110:1-15.
99. Sunderman Jr FW. Current concepts of "normal values", "reference values", and "discrimination values" in clinical chemistry. In: *Oxford University Press*; 1975.
100. Benn DM, McKeown DB, Lumsden JH. Hematology and biochemistry reference values for the ranch fox. *Canadian journal of veterinary research*. 1986;50(1):54-58.
101. Friendship RM, Lumsden JH, McMillan I, Wilson MR. Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine. *Canadian journal of comparative medicine*. 1984;48(4):390-393.
102. Lumsden JH, Mullen K, McSherry BJ. Canine hematology and biochemistry reference values. *Canadian journal of comparative medicine*. 1979;43(2):125-131.
103. Lumsden JH, Mullen K, Rowe R. Hematology and biochemistry reference values for female Holstein cattle. *Canadian journal of comparative medicine*. 1980;44(1):24-31.
104. Lumsden JH, Mullen K. On establishing reference values. *Canadian journal of comparative medicine*. 1978;42(3):293-301.
105. Lumsden JH, Rowe R, Mullen K. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. *Canadian journal of comparative medicine*. 1980;44(1):32-42.

106. PetitClerc C, Solberg HE. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *Clin Chim Acta*. 1987;170:S1-S11.
107. Solberg HE, PetitClerc C. Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *Clin Chim Acta*. 1988;177:S1-S12.
108. Solberg HE, Stamm D. IFCC recommendation: The theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *The Journal of automatic chemistry*. 1991;13(5):231-234.
109. Solberg HE. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clin Chim Acta*. 1987;170:S13-S32.
110. Dybkaer R. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. *Clin Chim Acta*. 1987;170:S33-S42.
111. Lumsden JH, Jacobs RM. Clinical chemistry. In-clinic analysis, quality control, reference values, and system selection. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 1989;19(5):875-897.
112. Harris EK, Boyd JC. *Statistical bases of reference values in laboratory medicine*. CRC Press; 1995.
113. Farver TB. Concepts of normality in clinical biochemistry. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*. Elsevier; 1997:1-19.
114. Lumsden JH. "Normal" or reference values: questions and comments. *Veterinary clinical pathology*. 1998;27(4):102-106.
115. Gräsbeck R. The evolution of the reference value concept. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2004;42(7):692-697.
116. Henny J, Petitclerc C, Fuentes-Arderiu X, et al. Need for revisiting the concept of reference values. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2000;38(7):589-595.
117. Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: an update. *Clinica Chimica Acta*. 2003;334(1-2):5-23.
118. Henny J, Petersen PH. Reference values: from philosophy to a tool for laboratory medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2004;42(7):686-691.
119. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guidelines*. PA: CLSI2008.
120. Solberg HE. RefVal: a program implementing the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry on the statistical treatment of reference values. *Computer methods and programs in biomedicine*. 1995;48(3):247-256.
121. Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2004;42(7):710-714.
122. Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: a user's guide. *American Association for Clinical Chemistry*, Incorporated; 2005.
123. Horowitz GL. Reference Intervals: Practical Aspects. *Ejifcc*. 2008;19(2):95-105.
124. Geffre A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: a review. *Veterinary clinical pathology*. 2009;38(3):288-298.
125. Geffre A, Braun JP, Trumel C, Concordet D. Estimation of reference intervals from small samples: an example using canine plasma creatinine. *Veterinary clinical pathology*. 2009;38(4):477-484.
126. Geffré A, Concordet D, Braun JP, Trumel C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Veterinary clinical pathology*. 2011;40(1):107-112.

127. ASVCP, Quality Assurance and Laboratory Standards Committee QALS. Guidelines for the Determination of Reference Intervals in Veterinary Species and other related topics: SCOPE. 2012.
128. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary clinical pathology*. 2012;41(4):441-453.
129. Ozarda Y, Ichihara K, Barth JH, et al. Protocol and standard operating procedures for common use in a worldwide multicenter study on reference values. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(5):1027-1040.
130. Koerbin G, Sikaris KA, Jones GR, et al. Evidence-based approach to harmonised reference intervals. *Clin Chim Acta*. 2014;432:99-107.
131. Lerner H, Berzell M. Reference values and the problem of health as normality: a veterinary attempt in the light of a one health approach. *Infect Ecol Epidemiol*. 2014;4(1):24270.
132. Henny J, Vassault A, Boursier G, et al. Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54(12):1893-1900.
133. Walton RM. Subject-based reference values: biological variation, individuality, and reference change values. *Veterinary clinical pathology*. 2012;41(2):175-181.
134. Wright ME, Croser EL, Raidal S, et al. Biological variation of routine haematology and biochemistry measurands in the horse. *Equine veterinary journal*. 2019;51(3):384-390.
135. Satué K, Hernández Á, Lorente C, Fazio E, Medica P. Age- and Sex-Related Modifications of Hematology in Spanish Purebred Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2020;93:103219.
136. Koterba AM, Drummond WH, Kosch PC. *Equine clinical neonatology*. Lea and Febiger; 1990.
137. Ralston S, Nockels C, Squires E. Differences in diagnostic test results and hematologic data between aged and young horses. *American journal of veterinary research*. 1988;49(8):1387-1392.
138. Satue K, Blanco O, Munoz A. Age-related differences in the hematological profile of Andalusian broodmares of Carthusian strain. *Veterinarni Medicina*. 2009;54(4):175-182.
139. Schnabel CL, Steinig P, Schuberth HJ, et al. Influences of age and sex on leukocytes of healthy horses and their ex vivo cytokine release. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2015;165(1-2):64-74.
140. Harvey J, Asquith R, Patel M, Kivipelto J, Chen C, Ott E. Haematological findings in pregnant, postparturient and nursing mares. *Comparative Haematology International*. 1994;4(1):25-29.
141. Bayly WM. The interpretation of clinicopathologic data from the equine athlete. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 1987;3(3):631-647.
142. Muñoz A, Santisteban R, Rubio M, Agüera E, Escribano B, Castejón F. Locomotor, cardiocirculatory and metabolic adaptations to training in Andalusian and Anglo-Arabian horses. *Research in veterinary science*. 1999;66(1):25-31.
143. Poškienė I, Juozaitienė V, Noreika A, et al. Responses for blood morphological indices in a 60-km horse endurance race depending on the season. *Acta Veterinaria Brno*. 2019;88(2):177-185.
144. Snow D, Kerr M, Nimmo M, Abbott E. Alterations in blood, sweat, urine and muscle composition during prolonged exercise in the horse. *Veterinary Record*. 1982;110(16):377-384.
145. Snow D. Post-race blood biochemistry in thoroughbreds. *Equine exercise physiology*. 1983.
146. Robert C, Goachet AG, Fraipont A, Votion DM, Van Erck E, Leclerc JL. Hydration and electrolyte balance in horses during an endurance season. *Equine veterinary journal*. 2010;42:98-104.
147. Messer NT. The Use of Laboratory Tests in Equine Practice. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 1995;11(3):345-350.

148. Kerr M, Snow D. Alterations in hematocrit, plasma-proteins and electrolytes in horses following the feeding of hay. *Veterinary Record*. 1982;110(23):538-540.
149. Sharif MT, Mahabadi MA, Moshfeghi S, Sharifi H, Hoseini SM, Alavi SM. Artfactual changes in hematological variables in equine blood samples stored at different temperatures and various anticoagulants. *Comparative Clinical Pathology*. 2012;21(4):449-452.
150. Allen B. Relationships between the erythrocyte sedimentation rate, plasma proteins and viscosity, and leucocyte counts in thoroughbred racehorses. *The Veterinary Record*. 1988;122(14):329-332.
151. Gill J, Rastawicka M. Diurnal changes in the hematological indices in the blood of racing Arabian horses. *Polskie archiwum weterynaryjne*. 1986;26(1-2):169-179.
152. Greppi G, Casini L, Gatta D, Orlandi M, Pasquini M. Daily fluctuations of haematology and blood biochemistry in horses fed varying levels of protein. *Equine veterinary journal*. 1996;28(5):350-353.
153. Allen B, Powell D. Effects of training and time of day of blood sampling on the variation of some common haematological parameters in normal thoroughbred racehorses. *Equine exercise physiology Snow DH, Persson SGB, Rose RJ (eds) Granta Editions, Cambridge*. 1983:327-335.
154. Satué K, Muñoz A. Seasonal variations in the erythrogram in pregnant Carthusian mares. *Veterinary clinical pathology*. 2011;40(4).
155. Gill J. Seasonal changes in erythrocyte, hemoglobin and leukocyte indexes in pregnant mares of thoroughbred horses. *Bulletin de l'Academie polonaise des sciences. Serie des sciences biologiques*. 1979;27(2):143-148.
156. Wickler SJ, Anderson TP. Hematological changes and athletic performance in horses in response to high altitude (3,800 m). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000;279(4):R1176-R1181.
157. Berlin D, Aroch I. Concentrations of ionized and total magnesium and calcium in healthy horses: Effects of age, pregnancy, lactation, pH and sample type. *The Veterinary Journal*. 2009;181(3):305-311.
158. Engelking L. Equine fasting hyperbilirubinemia. *Advances in veterinary science and comparative medicine*. 1993;37:115-125.
159. Bos A, Compagnie E, Lindner A. Effect of racing on blood variables in Standardbred horses. *Veterinary clinical pathology*. 2018;47(4):625-628.
160. Trigo P, Castejon F, Riber C, Muñoz A. Use of biochemical parameters to predict metabolic elimination in endurance rides. *Equine veterinary journal*. 2010;42:142-146.
161. Zobba R, Ardu M, Niccolini S, et al. Physical, Hematological, and Biochemical Responses to Acute Intense Exercise in Polo Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2011;31(9):542-548.
162. McGowan C. Clinical Pathology in the Racing Horse: The Role of Clinical Pathology in Assessing Fitness and Performance in the Racehorse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2008;24(2):405-421.
163. Ada AO, Joshua IP, Chukwunonso AB. Stability of some clinical biochemistry parameters in equine serum/plasma stored at refrigerator and room temperatures: a preliminary study. *Comparative Clinical Pathology*. 2017;26(2):465-469.
164. Fayolle P, Lefebvre H, Braun J. Effects of incorrect venepuncture on plasma creatine-kinase activity in dog and horse. *The British veterinary journal*. 1992;148(2):161-162.
165. Avellini L, Chiaradia E, Rueca F, Spaterna A, Gaiti A, Fruganti G. Oxidative stress during exercise in racehorses: Relationships between nutrition, training and biochemical defences against free radicals. *Pferdeheilkunde*. 1996;12(4):557-560.
166. Andriichuk A, Tkachenko H, Kurhaluk N. Gender Differences of Oxidative Stress Biomarkers and Erythrocyte Damage in Well-Trained Horses During Exercise. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2014;34(8):978-985.

167. Dias D, Rocha JdS, Mello F, El-Bachá RdS, Ayres MJRBdCV. Influence of exercise on hemogram, muscular injuries markers enzymes and indice of biomolecules peroxidation in equine submitted to show jumping activity. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 2011;18(1):36-42.
168. Li Y-S, Kawasaki Y, Watanabe S, Ootsuyama Y, Kasai H, Kawai K. Diurnal and day-to-day variation of urinary oxidative stress marker 8-hydroxy-2¹-deoxyguanosine. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2020:19-105.
169. Demografía y población. Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.es>. Published 2022. Accessed.
170. Cartografía y datos geográficos. Instituto Geográfico Nacional. <http://www.ign.es/web/ign/portal/cbg-area-cartografia>. Published 2022. Accessed.
171. Chazarra A, Flórez García E, Peraza B, et al. Mapas climáticos de España (1981-2010) y ETO (1996-2016). 2018.
172. Lueso M, Subdirección General de Productos Ganaderos MAPAMA. El sector equino en cifras. In: Retos del sector equino en España; 2018; Madrid.
173. Cuadro Resumen del Total de Licencias Deportivas Hípicas. Real Federación Hípica Española. <https://rfhe.com/>. Published 2021. Accessed.
174. Welsh CE, Duz M, Parkin TDH, Marshall JF. Prevalence, survival analysis and multimorbidity of chronic diseases in the general veterinarian-attended horse population of the UK. *Preventive veterinary medicine*. 2016;131:137-145.
175. Oliver I. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochemical Journal*. 1955;61(1):116.
176. Rosalki SB. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967;69(4):696-705.
177. Szasz G, Gruber W, Bernt E. Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clinical chemistry*. 1976;22(5):650-656.
178. Henry RJ, Chiamori N, Golub OJ, Berkman S. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. *American journal of clinical pathology*. 1960;34(4_ts):381-398.
179. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. 1986;24(7):497-508.
180. Szasz G. Reaction-rate method for gamma-glutamyltransferase activity in serum. *Clinical chemistry*. 1976;22(12):2051-2055.
181. Rosalki S, Rau D, Lehmann D, Prentice M. Determination of serum γ -glutamyl transpeptidase activity and its clinical applications. *Annals of clinical biochemistry*. 1970;7(6):143-147.
182. Rand RN, Pasqua Ad. A new diazo method for the determination of bilirubin. *Clinical chemistry*. 1962;8(6):570-578.
183. Golub M. An automated method for the determination of serum bilirubin. *Clinical chemistry*. 1964;10(5):399-405.
184. Talke H, Schubert G. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klinische Wochenschrift*. 1965;43(3):174-175.
185. Tiffany T, Jansen J, Burtis C, Overton J, Scott C. Enzymatic kinetic rate and end-point analyses of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer. *Clinical Chemistry*. 1972;18(8):829-840.
186. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of biological chemistry*. 1949;177(2):751-766.
187. Schulz F. Eine einfache Bewertungsmethode von Leberparenchymschäden (volumetrische Fibrinogenbestimmung). *Acta hepat-plendl*. 1955:9-10.

188. Goodwin JF. An evaluation of technics for the separation and estimation of plasma fibrinogen. *Clinical chemistry*. 1965;11(1):63-73.
189. Low EM, Bradley Hill H, Searcy RL. Simple method for detection of abnormal plasma fibrinogen levels. *American Journal of Clinical Pathology*. 1967;47(4_ts):538-540.
190. Daly JA, Ertingshausen G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "CentrifiChem". *Clinical chemistry*. 1972;18(3):263-265.
191. Gamst O, Try K. Determination of serum-phosphate without deproteinization by ultraviolet spectrophotometry of the phosphomolybdic acid complex. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1980;40(5):483-486.
192. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry*. 1974;20(4):470-475.
193. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical chemistry*. 1982;28(10):2077-2080.
194. Trinder P. Enzymatic method of triglycerides. *Annals of clinical biochemistry*. 1969;6:24-27.
195. Reed SM, Bayly WM, Sellon DC. *Equine Internal Medicine-E-Book*. Elsevier Health Sciences; 2017.
196. Bioestadística, Reference Value Advisor. Escuela Nacional Veterinaria de Toulouse. <http://www.biostat.envt.fr/reference-value-advisor/>. Published 2015. Accessed.
197. Soporte de Minitab. Temas de apoyo. Distribuciones. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/probability-distributions-random-data-and-resampling-analyses/>. Published 2022. Accessed.
198. Kirichenko D. Distribuciones de probabilidad estadística en MQL5. <https://www.mql5.com/es/articles/271>. Published 2014. Accessed.
199. Rossdales L. Reference ranges: Adult Non-Thoroughbred Horses. <https://www.rossdales.com/assets/files/Adult-Non-Thoroughbred-Horses.pdf>. Published 2016. Accessed.
200. Giordano A, Rossi G, Pieralisi C, Paltrinieri S. Evaluation of equine hemograms using the ADVIA 120 as compared with an impedance counter and manual differential count. *Veterinary clinical pathology*. 2008;37(1):21-30.
201. Köller G, Gieseler T, Schusser GF. Hematology and serum biochemistry reference ranges of horses of different breeds and age measured with newest clinico-pathological methods. *Pferdeheilkunde*. 2014;30(4):381-393.
202. Hardman ACL. *Equine nutrition*. Michael Joseph; 1980.
203. Luxmoore K. *Introduction to equestrian sports*. Csiro Publishing; 2008.
204. Real Federación Hípica Española CSdD. *Nota sobre la Vacunación de Influenza equina*. 2019.
205. Sistema de información zoonosanitaria de la OIE, OIE-WAHIS. Situación de la enfermedad. <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>. Published 2022. Accessed.
206. Warren LK, Vineyard KR. Fat and fatty acids. *Equine applied and clinical nutrition*. 2013:136-155.
207. Dunnett CE. Ration evaluation and formulation. *Equine Applied and Clinical Nutrition* Elsevier, Edinburgh. 2013:405-424.
208. The British Horse Society. Horse Health and Fitness. Developing a Fitness Programme. <https://www.bhs.org.uk/advice-and-information/horse-care/horse-health-and-fitness>. Published 2021. Accessed.
209. Padalino B, Raidal SL. Effects of transport conditions on behavioural and physiological responses of horses. *Animals*. 2020;10(1):160.
210. Papich MG. *Saunders handbook of veterinary drugs-e-book: small and large animal*. Elsevier Health Sciences; 2015.
211. Plumb DC. *Manual de farmacología veterinaria/Plumb's veterinary drug handbook*. 2006.

212. Kim E-T, Pak S-I. Evaluation of Reference Intervals of Some Selected Chemistry Parameters using Bootstrap Technique in Dogs. *Journal of Veterinary Clinics*. 2007;24(4):509-513.
213. Rossdales L. Hematology. <https://www.rossdales.com/laboratories/tests-and-diseases/haematology>. Published 2022. Accessed.
214. Goldmann F, Bauer N, Moritz A. Comparison of the ProCyte Dx analyzer with the ADVIA 2120 and the manual differential for validation of equine and bovine hemograms. *Comparative Clinical Pathology*. 2013;22(5):855-868.
215. Knottenbelt DC, Malalana F. *Saunders Equine Formulary E-Book*. Elsevier Health Sciences; 2014.
216. Papasouliotis K, Tennant KV, Dodkin S, Mason J. Comparison of measurements of 12 analytes in equine blood samples using the in-practice Falcor 350 and the reference KoneLab 30i analysers. *International Scholarly Research Notices*. 2012;2012.
217. Siekmann L, Bonora R, Burtis CA, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 C. Part 1. The concept of reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes. 2002.
218. Allen K, van Erck-Westergren E, Franklin S. Exercise testing in the equine athlete. *Equine Veterinary Education*. 2016;28(2):89-98.
219. Piercy RJ, Rivero J. Muscle disorders of equine athletes. *Equine Sports Medicine and Surgery E-Book*. 2013:109.
220. McClatchey KD. *Clinical Laboratory Medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
221. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Resolución de la dirección general de producciones y mercados agrarios, por la que se aprueba el programa de cría del caballo de Pura Raza Española (PRE) y el programa de difusión de la mejora. In: *BOE*. 2020.
222. Clayton HM. *Conditioning sport horses*. Sport Horse Publications Mason; 1991.
223. Ravindra Sarode M. The University of Texas Southwestern Medical Center. Components of Blood. <https://www.msmanuals.com/home/blood-disorders/biology-of-blood/components-of-blood>. Published 2021. Accessed.
224. Shen Y, Huang X, Zhang W. Platelet-to-lymphocyte ratio as a prognostic predictor of mortality for sepsis: interaction effect with disease severity—a retrospective study. *BMJ open*. 2019;9(1):e022896.
225. Pierini A, Gori E, Lippi I, Lubas G, Marchetti V. Are Leukocyte and Platelet Abnormalities and Complete Blood Count Ratios Potential Prognostic Markers in Canine Sepsis? *Frontiers in veterinary science*. 2020;7:Article 578846.
226. Yuki K, Murat D, Kimura I, Tsubota K. Increased serum total antioxidant status and decreased urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in patients with normal-tension glaucoma. *Acta Ophthalmologica*. 2010;88(7):e259-e264.
227. Zarrindast S, Ramezanzpour MR, Moghaddam MG. Effects of eight weeks of moderate intensity aerobic training and training in water on DNA damage, lipid peroxidation and total antioxidant capacity in sixty years sedentary women. *Science & Sports*. 2021;36(3):e81-e85.
228. Kolgiri V, Patil V, Nagar V. Correlation of total antioxidant status (TAS) with DNA damage in HIV/AIDS patients. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2016;8(6):240-244.
229. Kumazawa S, Taniguchi M, Suzuki Y, Shimura M, Kwon MS, Nakayama T. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(2):373-377.
230. Dokumaci B, Akdogan E, Cerrah AO, Cakir-Atabek H. Relationship between oxidative stress indices and aerobic/anaerobic capacity in u17 soccer players. *Fres Envir Bull*. 2018;27(4):2449-2455.

231. Fuller G, Hamilton J, Allard S. DNA Damage as a Potential Non-Invasive Indicator of Welfare: A Preliminary Study in Zoo-Housed Grizzly Bears (*Ursus arctos horribilis*). *Journal of Zoological and Botanical Gardens*. 2021;2(3):316-334.
232. Andriichuk A, Tkachenko H. Effect of gender and exercise on haematological and biochemical parameters in Holsteiner horses. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2017;101(5):e404-e413.
233. Fan YK, Hsu JC, Peh HC, et al. The Effects of Endurance Training on the Hemogram of the Horse. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2002;15(9):1348-1353.
234. de Souza AF, Signor J, Schade J, Saito ME, Muller TR, Fonteque JH. Seasonal variation in haematological parameters in crossbred horses used for urban traction from lages, Sc, Brazil. *Archives of Veterinary Science*. 2018;23(3):56-62.
235. Gill J, Kompanowska-Jeziarska E, Jakubow K, Kott A, Szumska D. Seasonal changes in the white blood cell system, lysozyme activity and cortisol level in Arabian brood mares and their foals. *Comparative biochemistry and physiology A, Comparative physiology*. 1985;81(3):511-523.
236. Satué K, Gardón JC, Muñoz A. Influence of the month of the year in the hematological profile in carthusian broodmares. *Hematology and Leukemia*. 2013;5:8.
237. Schalm O. Leukocyte responses to disease in various domestic animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1962;140:557-563.
238. Maes M, Stevens W, Scharpe S, et al. Seasonal variation in peripheral blood leukocyte subsets and in serum interleukin-6, and soluble interleukin-2 and-6 receptor concentrations in normal volunteers. *Experientia*. 1994;50(9):821-829.
239. Kasten-Jolly J, Lawrence DA. Differential blood leukocyte populations based on individual variances and age. *Immunologic Research*. 2022:1-15.
240. Touitou Y, Haus E. *Biologic rhythms in clinical and laboratory medicine*. Springer Science & Business Media; 2012.
241. Altinsaat ÇJKÜVFD. The effects of age and gender on blood parameters in Arabian horses. 2008;14(2).
242. McFarlane D, Sellon D, Gaffney D, Hedgpeth V, Papich M, Gibbs S. Hematologic and serum biochemical variables and plasma corticotropin concentration in healthy aged horses. *American journal of veterinary research*. 1998;59(10):1247-1251.
243. Ruiz G, Rosenmann M, Cortes A. Thermal acclimation and seasonal variations of erythrocyte size in the Andean mouse *Phyllotis xanthopygus rupestris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2004;139(4):405-409.
244. Persson S, Ullberg L. Blood volume in relation to exercise tolerance in trotters. *Journal of the South African Veterinary Association*. 1974;45(4):293-299.
245. Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ. *Equine Sports Medicine and Surgery E-Book*. Elsevier Health Sciences; 2013.
246. McKeever KH, Schurg WA, Jarrett SH, Convertino VA. Exercise training-induced hypervolemia in the horse. *Medicine and science in sports and exercise*. 1987;19(1):21-27.
247. McKeever KH. Exercise and rehabilitation of older horses. *Veterinary Clinics: Equine Practice*. 2016;32(2):317-332.
248. Harris PA, Snow DH, Greet TRC, Rosedale PD. Some factors influencing plasma AST/CK activities in Thoroughbred racehorses. *Equine veterinary journal*. 1990;22(S9):66-71.
249. Mack S, Kirkby K, Malalana F, McGowan C. Elevations in serum muscle enzyme activities in racehorses due to unaccustomed exercise and training. *Veterinary Record*. 2014;174(6):145-145.
250. Kingston JK. Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training. *Equine exercise physiology Philadelphia: Saunders Elsevier*. 2008:398-409.

251. Padalino B, Rubino G, Centoducati P, Petazzi F. Training versus Overtraining: Evaluation of Two Protocols. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2007;27(1):28-31.
252. Tyler-McGowan CM, Golland LC, Evans DL, Hodgson DR, Rose RJ. Haematological and biochemical responses to training and overtraining. *Equine veterinary journal Supplement*. 1999(30):621-625.
253. Masini AP, Tedeschi D, Baragli P, Sighieri C, Lubas G. Exercise-induced intravascular haemolysis in standardbred horses. *Comparative Clinical Pathology*. 2003;12(1):45-48.
254. Muñoz A, Riber C, Santisteban R, Lucas R, Castejón F. Effect of training duration and exercise on blood-borne substrates, plasma lactate and enzyme concentrations in Andalusian, Anglo-Arabian and Arabian breeds. *Equine veterinary journal*. 2002;34(S34):245-251.
255. Lacerda L, Campos R, Sperb M, et al. Hematologic and biochemical parameters in three high performance horse breeds from Southern Brazil. 2006;11(2):40.
256. Azarpeykan S, Dittmer K, Gee E, et al. Influence of blanketing and season on vitamin D and parathyroid hormone, calcium, phosphorus, and magnesium concentrations in horses in New Zealand. *Domestic animal endocrinology*. 2016;56:75-84.
257. Burlikowska K, Bogusławska-tryk M, Szymeczko R, Piotrowska A. Haematological and biochemical blood parameters in horses used for sport and recreation. *Journal of Central European Agriculture*. 2015.
258. Evans DL, Priddle TL, Davie AJ. Plasma lactate and uric acid responses to racing in pacing Standardbreds and relationships with performance. *Equine veterinary journal*. 2002;34(S34):131-134.