

DETECCION DE FUROSEMIDA Y OTRAS SUBSTANCIAS EN CABALLOS DE CARRERA

FUROSEMIDE AND DETECTION OF FOREIGN SUBSTANCES IN RACE HORSES

(English translation on page 8)

Estefanny Da Silva¹, Valentina Rossini¹, Luis Rivero², Abelardo Morales^{2,3}, Aniceto Mendez³, Kimberly Brewer⁴, Thomas Tobin⁴

¹ Faculty of Pharmacy, Santa Maria University, Caracas-Venezuela,

² Division de Sanidad Animal Hipodromo La Rinconada, Caracas-Venezuela,

³ Department of Anatomy and Comparative Anatomic Pathology, College of Veterinary Medicine. University of Cordoba, Spain.

⁴ Maxwell H. Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington USA.

*Autor de Correspondencia: Abelardo Morales Briceño. Department of Anatomy and Comparative Anatomic Pathology, College of Veterinary Medicine. University of Cordoba, Spain. Teléfono. 0034619307223 Email: aamorales13@gmail.com

RESUMEN

La hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (EIPH) tiene una alta prevalencia en las carreras de caballos Pura Sangre en Venezuela; el tratamiento preventivo más común es la furosemida. Sin embargo, su uso ha causado mucho debate en los círculos ecuestres mundo ya pesar de ser favorable para el tratamiento o la prevención de HPIE, también se ha sugerido que su efecto de dilución urinaria que "enmáscara" la identificación de otras drogas. Esto representa un problema actual; se decidió tratar este asunto para determinar cuál es el efecto de la administración de furosemida en dosis de 0,2 mg, en 6 grupos de dos caballos con el uso concomitante de la acepromacina y dexametasona, en dosis de 0.03mg/kg, 0,08mg /kg, 0.01mg/kg total 15mg respectivamente, 0.01mg/kg triamcinolona y glycopirrolato 1mg/kg. Se colectaron muestras de sangre y orina, y se determinó por ELISA competitiva la detección o no de las sustancias dentro de 72 horas después de la medicación. Todas las sustancias, así como la furosemida se detectaron en la sangre y la orina a lo largo de las 72 horas. En conclusión furosemida no alteró la detección en la sangre y la orina de las sustancias probadas en el primer post medicación 72 horas de la carrera de caballos.

Palabras claves: EIPH, furosemida, acepromacina, dexametasona, triamcinolona.

ABSTRACT

Exercise Induced by Pulmonary Hemorrhage (EIPH) has a high prevalence in Thoroughbred horse racing in Venezuela; the most common preventative treatment is the

diuretic furosemide. However, its use has caused much debate in world equestrian circles since despite being favorable for the treatment or prevention of EIPH, it has also been suggested that its effect urinary dilution which “masks” identification of other drugs. This represents a current problem; it was decided to address this matter to determine what the effect of the administration in 6 group of two horses of furosemide at a dose of 0.2mg/kg on the concomitant use of acepromazine and dexamethasone, at doses of 0.03mg/kg, 0.08mg/kg, 0.01mg/kg to 15mg total respectively, triamcinolone 0.01mg/kg and glycopirrolate 1mg/kg. Samples of blood and urine were collected, which was determined by competitive ELISA the detection or otherwise of the foreign substances in question within 72 hours post medication. Blood and urine samples were collected every hour for 72 hours post medication and the samples were analyzed by a commercial competitive ELISA. All substances as well as furosemide were detected in blood and urine throughout the 72 hours. In conclusion furosemide did not alter the detection in blood and urine of the tested substances in the first 72 hours post medication in the race horse.

Keywords: *EIPH, furosemide, acepromazine, dexamethasone, triamcinolone.*

INTRODUCCIÓN

Los reglamentos de la medicación en las pistas de carreras en el Caribe, en América Central y América del Sur se basan en los de la ARCI (Asociación Internacional Comisionada de Carreras) y AORC (Asociación Oficial de Químicos de Carreras) (25). Algunos países, sin embargo, cuentan con una legislación y una reglamentación específica. Ejemplos de países con legislación específica incluyen Argentina, Brasil, Uruguay y Venezuela. Las Normas Nacionales de Venezuela de la carrera de caballos, en efecto, en 1995, declara: La administración de cualquier medicamento con los caballos inscritos para participar en carreras es prohibida, así como cualquier sustancia química, droga o sustancia de cualquier naturaleza que pretende alterar o modificar de cualquier modo la capacidad de locomoción del caballo. Ningún medicamento puede administrarse a partir de los cinco (5) días antes de la participar en el concurso público hasta que el caballo deja de estar bajo el control de las autoridades hípicas. Excepciones de cumplimiento el tiempo proporcionado en el presente documento, es el uso de furosemida y fenilbutazona, que se puede administrar por prescripción veterinaria bajo la siguiente esquema: La administración de furosemida puede ser de hasta cuatro (4) horas antes de la competición, que incluirá una dosis máxima de 250mg. La administración de fenilbutazona puede ser de hasta veinticuatro (24) horas antes de la competición en la que el animal va a participar, en una la dosis no superior a dos (2) gramos (Reglamento Nacional de Carreras de Caballos, vigente año 1995) (25). En la actualidad en el mundo hípico a nivel mundial ha sido afectado por numerosos casos de detección de sustancias prohibidas en carreras de caballos en países como USA, Inglaterra, España y Venezuela no escapa de esta realidad. Numerosos son los casos al año que reportan el uso de sustancias prohibidas en las carreras de caballos entre los que destacan: En 1992-1993, cuatro caballos del Horse Racing Board de California

USA (fueron positivos a la detección de clenbuterol) en Hollywood Park y Santa Anita (5). En 2008 en los Juegos olímpicos 4 caballos fueron descalificados por el uso de sustancias prohibidas por la Federación Ecuéstre Internacional (específicamente un analgésico identificado como capsaisin, similar en Atenas 2004 fueron descalificados por el uso de fluphenazine and zuclopenthixoly en Sidney 2000 (6,7). En 2009 en el Campeonato Abierto de Polo en Wellington Florida USA, 21 caballos de un equipo representante de Venezuela presentaron muerte súbita asociada con la medicación con selenio (8,9). En los establos de Newmarket en Inglaterra, las Autoridades de Caballos Británicas (BHA), determinaron que 11 caballos dieron positivo en abril de 2013, y más de 20 caballos entrenados en pruebas de resistencia en han estado involucrados en casos de dopaje y sancionados por el tribunal disciplinario de la Federación Ecuéstre Internacional (FEI) desde 2005. Según los archivos de acceso público, 16 de los caballos dieron positivo en la competencia a los esteroides naturales o manufacturados. (estanozolol), según señalan los informes de la FEI (10,11). En 2012 más de 30 caballos han dado positivo por una (demorphin) sustancias ilegales para mejorar el rendimiento (12,13). Recientemente la Asociación de Benevolencia Protectora de Florida Horsemen reporto que son más de 125 pruebas positivas de clenbuterol. Dos casos de muerte después de la carrera asociada mostraron rastros de rodenticidas, pero no del tipo utilizado por los hipódromos de California (14). En Europa: España también fue reportado en caballos pura sangre de carreras de dos casos de dopaje con estanozolol y 16 - B- hydroxystanozonol en 2013. En Milán Italia 2010 las autoridades dieron a conocer un aumento de dopaje de caballos en carreras oficiales, tema relacionado con millones de apuestas ilegales que se mueve el sector ecuestre en ese país. Los animales se someten muchas veces cócteles anabólicos, analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios, agentes citotóxicos, diuréticos, corticosteroide y la hemostasia. Incluso las altas dosis de viagra (Sildenafil) detectados en yeguas. En Sudamérica se han reportado casos de dopaje en los caballos de carrera. En el 1991 la carrera internacional de caballos Clásico del Caribe (Caribe Horse Racing Confederación), Venezuela un caballos fue descalificado por usar drogas prohibidas (fenilbutazona y Lasix). En Argentina se detectó N- Butilescopolamina Bromuro de caballos pura sangre de carreras en 2012 y un caso de acepromacina en Brasil los casos de dopaje pura sangre de carreras de caballos se detectó Flunixin meglumine, en 2009. En Chile en el año 2010 el dopaje por clenbuterol fue detectado en caballos pura sangre de carreras. En Colombia cuatro caballos de paso colombianos fueron positivos a la cafeína y la teofilina en 2010. En México dos casos positivos por clenbuterol en el Hipódromo de las Américas en 2011. En Panamá 14 casos de caballos de dopaje positivo a la cocaína en 2005. Puerto Rico nueve casos un Ethorphine positivo en 2005. En Uruguay 12 casos de dopaje a la cafeína positivo en 2012, 17 casos de dopaje en 2011 y 29 casos de dopaje en 2010. En Arabia Saudita en 2010 dos caballos fueron positivos una fenilbutazona y oxiphenbutazone. En Australia en 2013 entrenador acusado por dopaje del ganador Tamworth Copa prusiana Secret (15). En Hong Kong en 2013, diecisiete caballos de los establos de tres instructores de Hong Kong han dado positivo por la sustancia prohibida zilpaterol, una sustancia que se utiliza para producir el crecimiento muscular en el ganado vacuno (16) y 17 casos de dopaje positivo a clenbuterol Hong Kong Jockey Club (17). El empleo de furosemida, en carreras de caballos permitida por el Reglamento de Carreras, ha generado a lo largo de los años que debido a su efecto de diuresis puede afectar la detección de otras sustancias prohibidas, en los exámenes toxicológicos. En virtud de esta importante área de estudio planteamos como objetivo la detección de furosemida y otras sustancias en caballos de carreras en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron un total de 10 equinos (*Equus caballus*), de raza Pura Sangre de Carreras 5 de sexo macho y 5 hembras. En la División de Sanidad Animal en el Hipódromo “La Rinconada”, Caracas-Venezuela. El peso promedio fue de 450 kg, con una edad comprendida entre 2-4 años. Bajo similares condiciones de manejo, alimentación y en actividad atlética. Los équidos fueron clasificados por grupo de tratamiento como muestra la siguiente tabla (Tabla 1):

1.- Tabla Clasificación de grupos de tratamiento, número de caballos, medicación, dosis y vía de administración:

Una vez establecida la clasificación de los grupos experimentales y la medicación se procedió a realizar la toma de muestras de orina mediante la técnica de la sonda urogenital y la toma de muestras de sangre de la vena yugular izquierda, durante cada hora las primeras 8 horas y posteriormente a las 12 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas. Las muestras de orina y de sangre fueron analizadas mediante el empleo de Kits comerciales para ELISA competitivo: Furosemide ELISA Kit (1042191 NEOGEN Corporation), Dexamethasone ELISA Kit (101519 BIODATA), Triamcinolone ELISA Cat. No.: 5081TRIA, Glycopyrrolate ELISA Kit Glycopyrrolate Drug Detection ELISA Kit 102019 Neogen Corporation, MaxSignal® Acepromazine/Tricyclics ELISA Test Kit BO_5014 MEDIBENA Life Science & Diagnostic Solutions. Los resultados fueron tabulados por hora y posteriormente se analizaron en base a la hora de detección.

RESULTADOS

Grupos de Tratamiento		Número de caballos	Medicación, dosis y vía de administración.
1	Control (-)	1	Solución fisiológica 10ml IV.
2	Control (+) Furosemida	1	Furosemida 0.2mg/kg IV.
3	Furosemida + Acepromacina	2	Furosemida 0.2mg/kg IV. Acepromacina 0.03mg/kg IV.
4	Furosemida + Dexametasona	2	Furosemida 0.2mg/kg IV. Dexametasona 0.08mg/kg IV.
5	Furosemida + Triamcinolona	2	Furosemida 0.2mg/kg IV. Triamcinolona 15mg IV.
6	Furosemida + Glicopirrolato	2	Furosemida 0.2mg/kg IV. Glicopirrolato 0.01mg/kg IV.

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla (Tabla 2). La furosemida fue detectable tanto en sangre como en orina desde la segunda hora y hasta seis horas después de la medicación en todos los casos excepto en el grupo control que no fue administrada. La acepromacina se detectó en sangre y orina desde la hora 1 y hasta la hora 7. La última detección fue en la hora 8 después de la medicación solo en orina. La dexametasona se detectó en sangre y orina en las primeras 5 horas. Solo en un equino fue detectada en sangre

y orina en hasta la hora 8 después de la medicación. La detección del glicopirrolato se realizo en sangre como en orina a partir de la hora 1 y detectada solo hasta la hora 5. 4. La triamcinolona en el equino se detectó por primera vez a la segunda hora, posteriormente a las 24 y 48 horas después de la medicación.

Tabla 2.- Resultados toxicológicos por medicación y por hora de estudio.

H O R A	Grupo Control		Furosemida + Acepromacina		Furosemida + Dexametasona		Furosemida + Glicopirrolato		Furosemida + Triamcinolona	
	Positiv o	Negativo	Equino 2A	Equino 3A	Equino 2D	Equino 3D	Equino 2G	Equino 3G	Equino 2T	Equino 3T
0	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)
1	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (-) Sangre: (-)
2	Orina: (+) Sangre:(+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (-) Sangre: (-)
3	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)
4	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina:(+) Sangre:(+)
5	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)
6	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)
7	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre: (+)	Orina:(+) Sangre: (+)
8	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre: (+)	Orina:(+) Sangre: (+)
12	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre: (+)	Orina:(+) Sangre: (+)
24	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre: (+)	Orina:(+) Sangre: (+)
48	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(-)
72	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)

DISCUSIÓN

El uso de sustancias prohibidas en competencias de caballos es un problema que afecta de manera severamente a la industria equina a nivel mundial. La aplicación ilegal de cualquier sustancia, excepto dieta normal, con la característica de modificar las capacidades naturales y actuales del caballo en el momento de la carrera (27) define a las sustancias prohibidas. A lo largo de los años muchas sustancias prohibidas han sido reportadas a partir de 1962 (1), alcaloides (3) sulpirina, aminopirine, antipirine (22), cafeína (18), la clorpromazina y fenobarbital (19), diazepam (2), corticosteroides (24), anestésicos locales (4), ethorphine (26), morfina (21), betametasona (23), dipirone (20), el cortisol y el clenbuterol y glicopirrolato (25). Estas sustancias presentan múltiples efectos secundarios, con consecuencias directas sobre la salud del caballo y en muchos casos terminan con daños irreversibles e incluso la muerte, o la eutanasia del caballo. Las técnicas de detección de drogas en sangre y orina, cada año son perfeccionadas con el propósito de detectar con alta sensibilidad las sustancias prohibidas, entre las pruebas se destacan la cromatografía de masas, el radioinmunoensayo, la cromatografía líquida (HPLC), que comparativamente con la técnica de ELISA presentan mayor sensibilidad. En general los reglamentos de las carreras de caballos Pura Sangre permiten el uso de dosis terapéuticas de furosemida, reguladas con el fin de prevenir la hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (25). La detección de cada uno de los medicamentos empleados en conjunto con la furosemida coincidió con los reportes en la literatura internacional de la farmacocinética y farmacodinamia (25). En conclusión la medicación con furosemida no altera la detección en la sangre y en la orina de sustancias prohibidas durante las primeras 72 horas post-medicación en los caballos Pura Sangre de Carreras.

AGRADECIMIENTO

Este estudio fue financiado por el Consejo de Desarrollo Humanístico y Científico de la Universidad Central de Venezuela: PG 11-00-6631-06 CDCH-UCV, PI N°11-8150-2011/1 CDCH-UCV y la División de Sanidad Animal del Hipódromo “La Rinconada”.

REFERENCIAS

1. Clarke EG. The doping of racehorses. *Med Leg J.* 1962;30:180-95.
2. Courtot D, Mouthon G, Roux L, Jeanin E. [Effect of tranquilizer doping on the muscular activity of the sport horse. II. -- Diazepam (author's transl)]. *Ann Rech Vet.* 1975;6(2):117-29.
3. Debackere M, Laruelle L. Isolation, detection and identification of some alkaloids or alkaloid-like substances in biological specimens from horses with special reference to doping. *J Chromatogr.* 1968 Jun 4;35(2):234-47.
4. Delbeke FT, Debackere M, Desmet N. Detection of some local anesthetics in horse urine and plasma by gas-liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1981 Feb 27;206(3):594-9.
5. http://articles.latimes.com/1993-01-20/sports/sp-1642_1_racing-board.
6. <http://www.abc.net.au/news/stories/2008/08/22/2343334.htm?site=olympics/2008>

7. <http://www.cbc.ca/news/story/2008/08/21/olympics-equestrian-doping.html>
8. http://www.nytimes.com/2009/04/24/sports/othersports/24polo.html?_r=0
9. http://articles.washingtonpost.com/2009-04-29/sports/36905064_1_polo-horses-frank-s-pharmacy-selenium.
10. <http://www.telegraph.co.uk/sport/horseracing/10042116/Endurance-horses-trained-at-Sheikh-Mohammeds-Dubai-stables-involved-in-doping-scandal.html>.
11. <http://sports.yahoo.com/news/horse-racing-uae-doping-horses-criminal-offence-130208080.html>
12. <http://newsfeed.time.com/2012/06/21/frog-juice-horse-racings-new-doping>
13. <http://newsok.com/oklahoma-horses-doped-with-frog-juice-jumped-to-winners-circle/article/3766705>.
14. http://www.nytimes.com/2013/04/11/sports/california-examines-puzzling-trend-of-horses-sudden-deaths.html?smid=tw-share&_r=1&.
15. <http://www.dailytelegraph.com.au/news/tamworth-cup-winner-prussian-secret-in-doping-scandal-two-arrested-in-new-england/story>
16. <http://www.channelnewsasia.com/news/sport/horse-racing-17-hong-kong/707758.html>.
17. <http://www.best-news.us/news-4649696-Hong-Kong-Jockey-Club-feed-tested-clenbuterol-drug-related-or-caused-to-exit-the-race-Race-canceled.htm>.
18. Fujii S, Inada S, Yoshida S, Kusanagi C, Mima K. [Pharmacological studies on doping drug for race horses. II. Caffeine]. *Nihon Juigaku Zasshi*. 1972 Jun;34(3):135-41.
19. Fujii S, Inada S, Yoshida S, Kusanagi C, Mima K. [Pharmacological studies on doping drugs for race horses. IV. Chlorpromazine and phenobarbital (author's transl)]. *Nihon Juigaku Zasshi*. 1975 Apr;37(2):133-9.
20. Klaus AM, Schlingloff Y, Kleinitz U, Böttcher M, Hapke HJ. Pharmacokinetic study of dipyrone metabolite 4-MAA in the horse and possible implications for doping control. *J Vet Pharmacol Ther*. 1997 Jun;20(3):204-8.
21. McDonald J, Gall R, Wiedenbach P, Bass VD, DeLeon B, Brockus C, Stobert D, Wie S, Prange CA, Ozog FJ, et al. Immunoassay detection of drugs in racing horses. III. Detection of morphine in equine blood and urine by a one step ELISA assay. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1988 Feb;59(2):259-78
22. Momose A, Tsuji T. Studies on doping test by gas liquid chromatography-mass spectrometry. I. Detection and identification of sulpyrine, aminopyrine and their metabolites in the horse urine. *Yakugaku Zasshi*. 1972 Feb;92(2):187-92.
23. Rodchenkov GM, Uralets VP, Semenov VA, Gurevich VA. Gas chromatographic and mass spectral study of betamethasone synthetic corticosteroid metabolism. *J Chromatogr*. 1988 Nov 18;432:283-9.
24. Schubert B. Chromatographic determination of some corticosteroids, with special reference to horse doping. *Z Rechtsmed*. 1977 Mar 23;79(2):97-102.
25. Tobin T, Brewer K, Stirling K. World rules for equine drug testing and therapeutic medication regulation. First edition. Wind publications. Page: 5-303.
26. Woods WE, Weckman T, Wood T, Chang SL, Blake JW, Tobin T. Radioimmunoassay screening for etorphine in racing horses. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1986 May;52(2):237-49.
27. Ungemach FR. Doping control in race horses. *Tierarztl Prax*. 1985;13(1):35-53.

FUROSEMIDE AND DETECTION OF FOREIGN SUBSTANCES IN RACE HORSES

Estefanny Da Silva¹, Valentina Rossini¹, Luis Rivero², Abelardo Morales^{2,3}, Aniceto Mendez³, Kimberly Brewer⁴, Thomas Tobin⁴

¹ Faculty of Pharmacy , Santa Maria University, Caracas , Venezuela ,

² Division of Animal Health La Rinconada Hippodrome , Caracas - Venezuela ,

³ Department of Comparative Anatomy and Anatomic Pathology, College of Veterinary Medicine. University of Cordoba , Spain . H. Gluck Equine Research

⁴ Maxwell Center, University of Kentucky, Lexington , USA .

* Corresponding Author : Abelardo Morales Briceño . Department of Anatomy and Comparative Anatomic Pathology, College of Veterinary Medicine. University of Cordoba, Spain. Phone: 0034619307223 Email: aamorales13@gmail.com

Keywords : EIPH , furosemide, acepromazine , dexamethasone , triamcinolone .

ABSTRACT

Exercise Induced Pulmonary Hemorrhage (EIPH) has a high prevalence in Thoroughbred horse racing in Venezuela. The most common preventative treatment is the diuretic furosemide. However, its use has caused much discussion in world equestrian circles since DESPITE being positive for the treatment or prevention of EIPH, it has also been suggested that its urinary dilution effect which "masks " identification of other drugs. To address this problem it was decided to determine what the effect of the administration of furosemide in six groups of two horses at a dose of 0.2mg/kg on the concomitant use of acepromazine and dexamethasone at doses of 0.03mg/kg , 0.08mg/kg , 0.01 mg to 15 mg total respectively, 0.01 mg triamcinolone and glycopirrolate 1mg/kg. Samples of blood and urine were collected , que by competitive ELISA was determined to the detection or otherwise of the foreign substances in question Within 72 hours post medication. Blood and urine samples were collected for 72 hours very hour post medication and the samples Were Analyzed by a commercial competitive ELISA. All substances as well as furosemide Were detected in blood and urine throughout the 72 hours. In finding furosemide did not alter the detection in blood and urine of the tested substances in the first 72 hours post medication in the horse race.

INTRODUCTION

The rules of medication in racetracks in the Caribbean, Central America and South America are based on the ARCI (International Association of Racing Commissioner and AORC (Association of Official Racing Chemists) (25). Few countries yet have legislation and specific regulations.

Examples of countries with specific legislation include Argentina , Brazil, Uruguay and

Venezuela. The National Standards of Venezuela of horse racing in effect in 1995, states: The administration of any drug to horses entered for racing is prohibited, and any chemical, drug or substance of any kind that seeks to alter or modify in any way the ability of horse locomotion. No medication can be administered from five (5) days prior to participating in the tender until the horse is no longer under the control of horse authorities. Exceptions compliance time provided herein is the use of furosemide and phenylbutazone, which can be administered by veterinary prescription under the following scheme: The administration of furosemide can be up to four (4) hours before the competition, which will include a maximum dose of 250mg. The administration of phenylbutazone can be up to twenty-four (24) hours prior to the competition in which the animal will participate in the no more than two (2) grams (National Horse Racing Regulation, in force 1995) dose (25). Today in worldwide equestrian world has been affected by numerous cases of detection of banned horse racing in countries like USA, England, Spain and Venezuela does not escape this reality substances. Numerous cases are reported per year using banned in horse racing among which substances: In 1992-1993, four horses of the California Horse Racing Board USA (were positive for clenbuterol) at Hollywood Park and Santa Anita (5). In 2008 at the Olympic Games four horses were disqualified for using banned substances by the International Equestrian Federation (specifically identified as an analgesic capsaicin, similar in Athens 2004 were disqualified by using fluphenazine and zuclopenthixoly in Sydney 2000 (6,7). In 2009 the Open Polo Championship in Wellington Florida USA, 21 horses in a representative team of Venezuela presented sudden death associated with medication with selenium (8,9). stables in Newmarket in England, the British Horseracing Authority (BHA), determined that 11 horses tested positive in April 2013, and over 20 trained horses in endurance have been involved in doping cases and punished by the disciplinary tribunal of the International Equestrian Federation (FEI) since 2005. according to the records of public access, 16 horses tested positive competition to natural or manufactured steroids. (stanozolol), as indicated in the reports of the FEI (10,11). In 2012 more than 30 horses have tested positive for one (demorphin) illegal performance enhancing drugs (12,13). Recently Protective Benevolent Association reported that Florida Horsemen are over 125 positive tests for clenbuterol. Two cases of death after the race showed traces of rodenticides associated, but not the kind used by the racetracks of California (14). In Europe, Spain was also reported in thoroughbred racing two cases of doping with stanozolol and 16-B-hydroxystanozonol in 2013 in Milan Italy 2010 the authorities announced an increase in doping horse racing official, related topic. with millions of illegal betting that the equestrian industry moves in that country. The animals are often cocktails anabolic, analgesic, antipyretic, anti-inflammatory, cytotoxic agents, diuretics, cortiscosteroide and hemostasis. Even high doses of Viagra (Sildenafil) detected in mares. In South America there have been cases of doping in racehorses. In 1991 the international race horses Classic Caribbean (Caribbean Horse Racing Confederation), Venezuela one horse was disqualified for using banned drugs (phenylbutazone and Lasix). In Argentina Bromide N-butylscopolamine thoroughbred horse racing in 2012 and a case of acepromazine was detected in Brazil doping cases of Thoroughbred horse racing flunixin meglumine was detected in 2009. In Chile in 2010 clenbuterol was detected in thoroughbred horse racing. In Colombia four horses tested positive for caffeine and theophylline in 2010. Cases in Mexico two positive for clenbuterol at the Hippodrome of the Americas in 2011. Panama 14 cases in horse doping positive for cocaine in 2005. Puerto Rico positive Ethorphine nine cases in 2005. Uruguay 12 cases the

positive doping caffeine in 2012, 17 cases of doping in 2011 and 29 cases of doping in 2010. Saudi Arabia in 2010 two horses and phenylbutazone were positive one oxyphenbutazone. In Australia in 2013 coach accused of doping Tamworth Cup winner Prussian Secret (15). In Hong Kong in 2013 , seventeen horses from the stables of three instructors in Hong Kong have tested positive for the banned substance zilpaterol , a substance that is used to produce muscle growth in cattle (16) and 17 cases of positive doping Hong Kong Jockey Club clenbuterol (17). The use of furosemide in horse racing allowed by the Rules of Racing, has generated over the years due to the effect of diuresis can affect the detection of other banned substances in drug testing . Under this important area of study set as our goal the detection of furosemide and other substances in racehorses in Venezuela.

MATERIALS AND METHODS

A total of 10 horses (*Equus caballus*), Thoroughbred racing 5 male and 5 female sex were studied. The Animal Health Division at the Hippodrome La Rinconada, Caracas, Venezuela. The average weight was 450 kg, age 2-4 years. Under similar conditions of handling, exercise, and athletic activity. The horses were classified by treatment group as shown in the following table:

Treatment groups		Number of horses	Medication , dose, and route of administration
1	Control (-)	1	Solución fisiológica 10ml IV.
2	Control (+) Furosemida	1	Furosemida 0.2mg/kg IV.
3	Furosemida + Acepromacina	2	Furosemida 0.2mg/kg IV. Acepromacina 0.03mg/kg IV.
4	Furosemida + Dexametasona	2	Furosemida 0.2mg/kg IV. Dexametasona 0.08mg/kg IV.
5	Furosemida + Triamcinolona	2	Furosemida 0.2mg/kg IV. Triamcinolona 15mg IV.
6	Furosemida + Glicopirrolato	2	Furosemida 0.2mg/kg IV. Glicopirrolato 0.01mg/kg IV.

Once the classification of the experimental groups and medication was proceeded to the urine sampler by the technique of the urogenital probe and sampling of blood from the left jugular vein , every hour during the first 8 hours and then at 12 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours. Urine samples and blood were analyzed by using commercial competitive ELISA Kits : ELISA Kit Furosemide (1042191 Neogen Corporation) , Dexamethasone ELISA Kit (101519 biokits), Triamcinolone ELISA Cat. No.: 5081TRIA , Glycopyrrolate ELISA Glycopyrrolate Drug Detection Kit ELISA Kit 102019 Neogen Corporation, MaxSignal® Acepromazine / Tricyclics ELISA Test Kit BO_5014 MEDIBENA Life Science & Diagnostic Solutions. The results were tabulated per hour and then analyzed based on the detection time.

RESULTS

The results obtained are presented in the following table (Table 2) . Furosemide was detectable in both blood and urine from the second hour and up to six hours after medication in all cases except in the control group was not administered . Acepromazine was detected in blood and urine from time to time 1 and 7. Detection The last time was in August after medication only in urine. Dexamethasone was detected in blood and urine in the first 5 hours. In only one was detected in equine blood and urine until the hour 8 after medication. Detection of glycopyrrolate was performed in blood and urine from time 1 and detected only up to the time . 5 4 . Triamcinolone in the horse is first detected at the second hour , then at 24 and 48 hours after medication .

Table 2.- Resultados toxicológicos por medicación y por hora de estudio.

H O R A	Grupo Control		Furosemida + Acepromacina	Furosemida + Dexametasona	Furosemida + Glicopirrolato	Furosemida + Triamcinolona					
	Pos	Neg	Equino 2A	Equino 3A	Equino 2D	Equino 3D	Equino 2G	Equino 3G	Equino 2T	Equino 3T	
0	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	
1	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina: (-) Sangre: (-)
2	Orina: (+) Sangre:(+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (-) Sangre: (-)
3	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)
4	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)
5	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina: (+) Sangre: (+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)
6	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)
7	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)
8	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)
12	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)
24	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)
48	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre: (-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina:(+) Sangre:(+)	Orina:(+) Sangre:(+)
72	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina: (-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)	Orina:(-) Sangre:(-)

DISCUSSION

The use of banned substances in horse racing is a problem that severely affects the equine industry at the global level. The application of any illegal substance, except normal diet,

with the feature to modify and existing natural abilities of the horse at the time of the race (27) defines the prohibited substances. Throughout the years many banned substances have been reported since 1962 (1) alkaloids (3) sulpyrine , aminopyryne , antipirine (22), caffeine (18), chlorpromazine and phenobarbital (19), diazepam (2) corticosteroids (24) , local anesthetics (4), ethorphine (26), morphine (21), betamethasone (23), dipyrone (20), cortisol, clenbuterol, and glycopyrrolate (25). These substances have multiple side effects, with direct consequences on the health of the horse and many end up with irreversible damage and even death, or euthanasia of the horse. Techniques for detecting drugs in blood and urine, each year are improved in order to detect with high sensitivity the prohibited substances, the evidence highlights the mass chromatography, radioimmunoassay, liquid chromatography (HPLC), which comparatively ELISA are more sensitive. In general, regulations of Thoroughbred horse racing permit the use of therapeutic doses of furosemide, regulated in order to prevent pulmonary hemorrhage induced by exercise (25). The detection of each of the drugs used in conjunction with furosemide coincided with reports in the international literature on the pharmacokinetics and pharmacodynamics (25). In conclusion medication furosemide did not alter the detection in the blood and urine for banned substances during the first 72 hours post- medication in Thoroughbred horse racing.

THANKS

This study was funded by the Council of Scientific and Humanistic Development of the Universidad Central de Venezuela : UCV - CDCH 11-00-6631-06 PG , PI No. 11-8150-2011 / 1 CDCH -UCV and Animal Health Division Racetrack La Rinconada.