

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIA ANIMAL

**CAMBIOS EN INDICADORES SANGUÍNEOS DE BIENESTAR ANIMAL EN
CABALLOS CRIOLLO CHILENO SOMETIDOS AL EJERCICIO DE RODEO**

Memoria de título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

MARÍA FERNANDA SOLAR CORTEZ

VALDIVIA-CHILE

2012

PROFESOR PATROCINANTE:

Carmen Gallo St.

PROFESOR COPATROCINANTE:

Juan Sebastián Galecio N.

PROFESORES CALIFICADORES:

Gabriel Morán R.

Mirela Noro

FECHA DE APROBACIÓN: 24 de Enero de 2012

ÍNDICE

Capítulos	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
5. RESULTADOS.....	12
6. DISCUSIÓN.....	17
7. REFERENCIAS.....	23
8. ANEXOS.....	25
9. AGRADECIMIENTOS	28

1. RESUMEN

El rodeo es considerado deporte nacional en Chile, y es reconocido como actividad deportiva, cultural y económica en nuestro país. Sin embargo, se cree que este deporte podría generar un impacto negativo sobre el bienestar de los caballos y novillos que participan en él. En el presente estudio se utilizaron diferentes variables sanguíneas como indicadores directos de bienestar animal, para evaluar el impacto que produce el ejercicio de rodeo en el caballo Criollo Chileno.

El estudio se realizó de manera experimental en los criaderos de procedencia de los caballos, y los muestreos fueron realizados a 13 equinos luego de someterlos a tres diferentes situaciones, simulando el ejercicio que realizan cuando se encuentran en competencia. El primer muestreo fue en la mañana con el caballo en reposo (E1), el segundo muestreo fue a la mañana siguiente y se realizó 5-10 minutos post ejercicio sin novillo (E2), este ejercicio consistió en aproximadamente 5 minutos de caminata, 5 minutos de trote y 10 minutos de trote en “postura” (caballo en movimiento hacia los lados cruzando sus extremidades), y el tercer muestreo fue una semana después, y se realizó 5-10 minutos post ejercicio con novillo (E3), el que consistió en aproximadamente 5 minutos de caminata, 5 minutos de trote y 10 minutos de trote en “postura” arreando a un novillo. Se evaluaron las variaciones en las concentraciones de cortisol, volumen globular aglomerado (VGA), proteínas totales, fibrinógeno, razón neutrófilo:linfocito (N:L) y enzimas creatin kinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST) y glutatión peroxidasa (GSH-Px).

La media de las concentraciones de cortisol y de fibrinógeno se encontró dentro de los intervalos de referencia para la especie en reposo y en E2, sin embargo, sobrepasó levemente el límite superior en E3 sin existir diferencias ($P > 0,05$) entre los tres muestreos. La media del VGA excedió los intervalos de referencia en E2 y E3, siendo diferentes ($P < 0,05$) a la media en E1. Las proteínas totales se mantuvieron dentro del intervalo de referencia, sin embargo se observó un aumento ($P < 0,05$) en E3. La actividad sérica de CK se observó sobre los valores de referencia en los tres tiempos de muestreo, incluyendo el muestreo en reposo. Las medias para la razón N:L, para la actividad sérica de AST y para GSH-Px se mantuvieron dentro de los intervalos de referencia para la especie y no presentaron diferencias ($P > 0,05$) entre los tres tiempos de muestreo.

Se concluye, tomando en cuenta sólo los resultados de este estudio, que las variaciones de los constituyentes sanguíneos analizados representan una respuesta común del caballo de deporte frente al ejercicio y no reflejan un impacto negativo que comprometa su bienestar físico. La incorporación del novillo pudo haber generado algún grado de excitación en algunos equinos, sin ser necesariamente un evento estresante para todos ellos.

Palabras clave: equino, rodeo, bienestar animal, variables sanguíneas.

2. SUMMARY

CHANGES IN BLOOD INDICATORS OF ANIMAL WELFARE IN CHILEAN CREOLE HORSES SUBMITTED TO THE EXERCISE OF RODEO

The rodeo is a national sport in Chile and it is recognized as a cultural, sport and economic activity in our country. However, it is believed that this sport could generate a negative impact on the welfare of horses and steers that participate in it. In the present study blood variables were used as direct indicators of animal welfare, for the evaluation of the impact that this sport produces during rodeo exercise in the Chilean Creole horse.

The study was conducted experimentally on the farms from where the horses belonged, and sampling was performed to 13 horses after three different situations, simulating the exercise that they perform when they are in competition. The first sampling was taken in the morning with the horse at rest (E1), the second one the next morning, and was conducted between 5-10 minutes post exercise without a steer (E2), this exercise consisted of approximately 5 minutes of walk, 5 minutes of trot and 10 minutes of canter in "postura" (horse moving sideways crossing its limbs), and the third sampling was after a week, and was conducted between 5-10 minutes post exercise with a steer (E3), which consisted of approximately 5 minutes of walk, 5 minutes of trot and 10 minutes of canter in "postura" while following a steer. The variation of the concentrations of cortisol, packed cell volume (PCV), total protein, fibrinogen, neutrophil:lymphocyte ratio (N:L), creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were assessed.

The average concentrations of cortisol and fibrinogen was within the reference interval for the specie at rest and in E2, however, slightly exceeded this interval in E3 without differences ($P>0,05$) between the three samples. PCV averages exceeded the reference interval in E2 and E3, being different ($P<0,05$) from the average in E1. Total proteins were within the reference interval, however there was a increase ($P<0,05$) in E3. Serum CK activity was severely increased in the three sampling times, including sampling at rest. Mean values for N:L ratio, AST and GSH-Px remained within the reference interval for the specie and no differences ($P>0,05$) between the three sampling times were observed.

Based on the results of this study, it was concluded that the variations of the blood constituents analyzed represent a common response from the sport horses towards exercise and do not reflect a negative impact compromising their physical welfare. The incorporation of the steer may have generated some degree of excitement in some horses, not necessarily signifying a negative stressful event for them.

Key words: equine, rodeo, animal welfare, blood variables.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 RODEO CHILENO

En Chile el rodeo es considerado deporte nacional, reconocido como actividad deportiva por la Dirección de Deportes y Recreación (Pinochet 1980). En este deporte destaca la participación del caballo Criollo Chileno, su tipo es de un caballo musculoso, rápido y ágil en sus movimientos, debe tener además un sello racial de conjunto que completen el estándar zootécnico dirigido a un ejemplar de buenas aptitudes de silla y condiciones vaqueras (Pinochet 1980).

El rodeo representa para el caballo Criollo Chileno un notable esfuerzo muscular de corta duración, pero de alta intensidad, el cual puede ser intermitente y repetitivo dependiendo del número de series en las cuales puede participar y del nivel de rendimiento que logre durante el transcurso de la competencia. En este sentido, en el primer día de competencia cada collera de caballos puede correr un mínimo de tres animales (si clasifica en su primera participación) o un máximo de 9 novillos si no clasifica en ninguna serie (Pérez y col 1997).

El esfuerzo físico principal que desarrolla durante el rodeo es el de arrear y atajar un novillo de 320 kg de peso aproximadamente, transportando sobre su dorso un peso equivalente al 24% de su peso corporal a velocidades que fluctúan entre los 5 a 8 m/s sobre una pista blanda y circular. Por lo tanto, el rodeo constituye un ejercicio de fuerza, velocidad y resistencia (Pérez y col 1997), que podría generar algún impacto negativo en los caballos participantes de este deporte, afectando de esta manera su bienestar.

3.2 BIENESTAR ANIMAL

Bienestar animal, es una de las ciencias biológicas más completas, ya que es una disciplina que abarca la salud, el comportamiento, evolución, neurociencia, genética, ciencia cognitiva, e incluso la conciencia (Dawkins 2006). Se define como “el estado de un animal en relación a sus intentos por adaptarse al medio ambiente”: El animal puede adaptarse de manera exitosa, necesitar de un mayor esfuerzo para adaptarse o simplemente fallar en sus intentos de adaptación, lo cual puede incluso llevar a la muerte del individuo. La definición de bienestar animal tiene varias implicancias, entre ellas el ser una característica inherente al animal y no algo que se le entrega, el de poder variar de muy bueno a muy pobre y el de poder ser medible de manera científica e independiente a consideraciones de tipo moral (Broom 1991).

En 1993 el Consejo Británico para el Bienestar de los Animales de Granja publicó las cinco libertades de los animales, las que describen las condiciones mínimas en que los animales debieran ser mantenidos y han sido utilizadas como un acercamiento básico al momento de evaluar bienestar animal (Tadich y Araya 2010). Éstas consideran que el animal debería estar: 1) Libre de

sed, hambre y malnutrición, 2) Libre de incomodidad, 3) Libre de dolor, injurias y enfermedad, 4) Libre de expresar su comportamiento normal y 5) Libre de miedo y distrés (FAWC 1993).

Estas libertades identifican los elementos necesarios para que el animal pueda promover su estado de bienestar y dan un lineamiento básico de las necesidades de los animales (Tadich y Araya 2010). Si un animal tiene una necesidad, su estado motivacional se ve afectado de manera que se generan respuestas fisiológicas y de comportamiento para satisfacer esa necesidad (Broom 1991).

El sufrimiento y un pobre bienestar a menudo se presentan juntos; el sufrimiento se produce cuando sentimientos desagradables son agudos o bien continúan durante mucho tiempo, ya que el animal es incapaz de llevar a cabo normalmente sus acciones (Broom 1991). Además del sufrimiento mental que pueden manifestar los animales mediante conductas anormales, se han mencionado otras consecuencias físicas y fisiológicas que acompañan a estas conductas y que también tienen implicancias sobre el estado de bienestar de los equinos. Entre ellas se pueden mencionar la pérdida de condición corporal, problemas de salud, dolor crónico, automutilaciones y elevación de las concentraciones de cortisol (Tadich y Araya 2010). Por lo tanto, pese a que sabemos poco acerca de los sentimientos de los animales, podemos reconocer respuestas fisiológicas y de comportamiento, para así medir y evaluar el bienestar de los animales (Broom 1991).

El bienestar animal se puede medir usando una variedad de indicadores, tanto directos (basados en el animal) como indirectos (basados en el ambiente). El comportamiento (indicador directo) tiene la ventaja de que puede ser estudiado de forma no invasiva y puede dar una visión de la situación desde la perspectiva del animal. Por otro lado, las medidas fisiológicas (indicador directo) de bienestar que se han utilizado hasta ahora han sido respuestas autónomas, tales como aumento de la frecuencia cardíaca y aumento de las concentraciones de hormonas tales como los corticoesteroides (hormonas de estrés). Además un mal estado de salud física, causado por enfermedad, lesión u otro, es relativamente fácil de reconocer y a menudo puede ser útil como indicador de un bienestar animal pobre (Dawkins 2006).

3.3 VARIABLES FISIOLÓGICAS, INDICADORES DIRECTOS DE BIENESTAR ANIMAL

Un posible indicador de bienestar animal es la ausencia de estrés, pero no existe sistema único para medirlo, por lo tanto, se necesitan diferentes parámetros para su detección (Möstl y Palme 2002). El estrés como mecanismo fisiológico, no es intrínsecamente malo. El estrés involucra estímulos que en sí no son dañinos para el animal, sino que generan respuestas que son beneficiosas para la mantención de su bienestar y de su estado de homeostasis. Por otra parte está el distrés, respuesta que de por sí tampoco es dañina para el organismo, pero que evoca respuestas que interfieren con el bienestar del animal, ya que pueden generar cambios patológicos. El estado de distrés resulta de un periodo prolongado de estrés, sin embargo existen estímulos estresores capaces de iniciar directamente un estado de distrés, particularmente aquellos relacionados con incomodidad o dolor (Breazile 1987).

#

3.3.1 Cortisol

El descubrimiento de los mecanismos metabólicos, inmunológicos y neuroendocrinos hace posible describir la reacción de estrés en términos fisiológicos. Una serie de hormonas (por ejemplo, hormona adrenocorticotropina (ACTH), glucocorticoides, catecolaminas, prolactina, etc.) están involucradas en la respuesta al estrés. Las glándulas suprarrenales tienen un papel clave en las reacciones de estrés, ya que están involucrados tanto en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) como en el sistema simpático-adreno-medular (Möstl y Palme 2002). El eje HHA puede ser activado por una amplia variedad de estímulos internos y externos (Mormède y col 2007). Estos estímulos son transformados en señales que actúan en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) en donde se sintetizan los neuropéptidos vasopresina (AVP) y hormona liberadora de corticotropina (CRH) que son liberados al sistema de circulación portal hipotálamo-hipofisiario actuando de manera directa sobre la porción anterior de la hipófisis, la cual en respuesta produce la hormona adrenocorticotropica (ACTH) que actúa sobre la corteza adrenal para que se libere como producto final el cortisol (Mormède y col 2007). A su vez, el cortisol ejerce un efecto de retroalimentación negativa en distintos componentes del eje HHA haciendo que las concentraciones de cortisol vuelvan al estado basal en que se encontraba antes de que se desencadenara el estímulo (Mormède y col 2007).

La concentración de cortisol en sangre se utiliza ampliamente como un indicador de estrés, aunque se recomienda precaución, ya que no se produce un aumento con cada tipo de factor estresante (Möstl y Palme 2002). Además, es sólo después de unos minutos desde el inicio de un evento estresante que las concentraciones de corticosteroides aumentan en la sangre e incluso si el estímulo desencadenante se mantiene, las concentraciones séricas de cortisol suelen disminuir después de la respuesta aguda (Mormède y col 2007).

Hay que tener en cuenta que en los equinos, al igual que en otras especies, el cortisol presenta un ciclo circadiano en donde el punto de concentración más alto es entre las 06:00-09:00 horas y el más bajo entre las 19:00-23:00 horas (Irvine y Alexander 1994).

Por otro lado, el eje HHA está implicado en la regulación de flujos de energía en el cuerpo, por lo que es sensible a diversos estímulos ambientales desafiando el equilibrio energético del cuerpo, tales como la ingesta de alimentos, la regulación de la temperatura, entre otros. Además, durante el ejercicio tanto el sistema nervioso simpático como el eje HHA se activan, lo que aumenta las concentraciones circulantes de adrenocorticotropina (ACTH), cortisol, adrenalina y noradrenalina (Hyyp 2005). Por lo tanto los datos neuroendocrinos siempre deben ser interpretados según el contexto, no existiendo una correlación simple entre las concentraciones de cortisol en plasma y el estrés percibido. Por lo anterior, es importante tener toda la información necesaria cuando se trata de la interpretación de datos experimentales en el contexto de la evaluación del bienestar animal (Mormède y col 2007).

3.3.2 Volumen globular aglomerado (VGA)

El VGA se define como el porcentaje de la sangre que está compuesto por eritrocitos. Es una herramienta útil para la evaluación de alteraciones en fluidos y electrolitos. Los valores de esta

variable pueden aumentar por deshidratación y en el caso de la especie equina, por contracción esplénica inducida por actividad nerviosa simpática o por catecolaminas circulantes (Werner 2006). La movilización de eritrocitos desde las reservas esplénicas en respuesta a excitación, dolor o liberación de catecolaminas puede resultar en una marcada variabilidad en el VGA, recuento de eritrocitos o concentración de hemoglobina, ya que al menos un tercio del total de eritrocitos en caballos se encuentra almacenado en el bazo (Werner 2006).

3.3.3 Proteínas totales y fibrinógeno

Durante el ejercicio hay un aumento de las proteínas totales en el plasma; este incremento es el resultado de cambios del líquido intercompartimental, con mayores aumentos asociados a ejercicio intenso. El aumento de las proteínas totales es importante para determinar el estado de hidratación en los caballos y puede ser particularmente importante durante el período de recuperación después del ejercicio intenso o en condiciones de calor (McGowan 2008).

Las proteínas de fase aguda (PFA) son más importantes como marcadores de la inflamación (McGowan 2008), y la respuesta de fase aguda (RFA) es una respuesta inflamatoria inespecífica, compleja y altamente organizada generada para minimizar los daños, mejorar el proceso de reparación y restaurar la homeostasis después de la infección, traumatismo o estrés. Ésta incluye cambios en las concentraciones de las PFA, las que pueden proporcionar una medida objetiva de la gravedad y el alcance de la afección subyacente. Las PFA que se miden más frecuentemente en la práctica equina son el fibrinógeno, el amiloide sérico A y la haptoglobina (Crisman y col 2008).

El fibrinógeno fue una de las primeras PFA reconocidas. Es una glucoproteína plasmática soluble sintetizada por el hígado. Se considera una PFA positiva moderada, con aumento de las concentraciones de 1 a 10 veces más entre las 24 y las 72 horas después de la inducción de la inflamación. Aunque la determinación de la concentración plasmática de fibrinógeno se ha utilizado para la detección de enfermedades inflamatorias en caballos, su respuesta relativamente lenta después de un insulto inflamatorio dificulta seriamente su utilidad clínica. Sin embargo, la medición de fibrinógeno es relativamente fácil y barata, y este hecho probablemente ha asegurado su amplio uso continuado de la medicina veterinaria (Crisman y col 2008).

3.3.4 Razón neutrófilo:linfocito (N:L)

Los neutrófilos son producidos y almacenados en la médula ósea hasta que son necesitados y liberados a la circulación periférica. Neutropenia es la disminución del número de neutrófilos circulantes y puede ser aguda o crónica, mientras que la neutrofilia es el aumento del número de neutrófilos circulantes. Muchas de las mismas alteraciones relacionadas con la neutropenia pueden asociarse, como una alternativa, con neutrofilia. Los glucocorticoides endógenos o exógenos, la excitación, el ejercicio o el estrés pueden producir neutrofilia, así como también cualquier infección o inflamación, a su vez, muchas condiciones neoplásicas se acompañan también de neutrofilia periférica (Sellon 2004).

Los linfocitos son los mediadores primarios de la respuesta inmune humoral y mediada por células. Se originan a partir de células progenitoras de la médula ósea, y en su mayoría residen en el bazo, los linfonódulos y otros tejidos linfoides del cuerpo. La linfopenia está asociada con la administración de glucocorticoides, el estrés y muchas infecciones virales (Sellon 2004).

El cortisol liberado debido al estrés puede llevar a neutrofilia y linfopenia, aumentando el cociente N:L. El mecanismo responsable de la linfopenia involucra la marginación y redistribución de los linfocitos dentro del sistema linfático, además de una marcada y acelerada apoptosis. La neutrofilia durante una inflamación sistémica es causada por la demarginación de neutrófilos, disminución en la apoptosis de neutrófilos y la estimulación de células madres a través de factores de crecimiento. Se ha reportado que el cociente N:L sería un indicador más confiable de estrés que la concentración de cortisol (Zahorec 2001).

3.3.5 Creatin kinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST) y glutatión peroxidasa (GSH-Px)

La adaptación al ejercicio se puede medir de acuerdo al daño muscular que sufren los caballos después de realizar un ejercicio determinado. La CK es una enzima específica del tejido muscular y cerebral, de vida media corta y de bajo peso molecular. La actividad sérica usual de CK varía entre 50 y 200 UI/L, hay variaciones en estos valores normales atribuidos a la edad, sexo y actividad física. Las tasas plasmáticas son muy sensibles al daño muscular, así que un daño muscular débil es suficiente para producir un alza en la concentración plasmática de esta enzima, con una disminución rápida una vez finalizada la alteración muscular (antes de 72 horas) (Gómez y col 2004).

AST es una enzima inespecífica, que se encuentra en muchos tejidos y órganos, y posee alta actividad en el hígado. La actividad de esta enzima en los caballos es muy superior a la de otros animales; además de la especie, raza y edad, la actividad de AST está influenciada por el daño muscular. El aumento de AST, por tratarse de una enzima mitocondrial y citosólica, es más tardío que el aumento de CK, ya que su salida hacia la circulación generalmente requiere de la presencia de daño celular (Gómez y col 2004).

GSH-Px es una enzima selenio dependiente que ayuda a proteger a las células contra los radicales libres, los cuales se forman por la reducción del oxígeno molecular durante el proceso oxidativo normal. Esta enzima actúa disminuyendo la producción de radicales hidroxilos por medio de la reducción de hidroperóxidos a alcohol como parte de un sistema cíclico reformador de glutatión. Dentro de los eritrocitos, actúa como una parte integral del sistema, protegiéndolo contra la conversión de hemoglobina a metahemoglobina por los hidroperóxidos. La deficiencia de selenio ha sido implicada en problemas musculares en varias especies; en el caso de los caballos el mecanismo preciso que conduce a la lesión muscular y a la fatiga durante el ejercicio es dudoso, aunque es posible que los radicales libres o el oxígeno reactivo puedan tener un papel importante. Después de un ejercicio fuerte, la producción de radicales libres puede exceder la capacidad natural de los mecanismos de defensa celulares, conduciendo a la lesión de la célula muscular. Los factores que pueden predisponer a los caballos a una deficiencia de selenio incluyen alimentos rancios, almacenamiento prolongado de granos, heno de mala calidad y pastos jugosos. Los pastos

asociados con suelos mal aireados y ácidos, suelos con alto contenido en sulfuros, o roca volcánica tienen una mayor probabilidad de provocar deficiencias en selenio (MacLeay 2004).

En definitiva, la medición del bienestar requiere la evaluación de una serie de indicadores, para obtener información acertada. Esta información debe ser combinada en una evaluación general de bienestar (Broom 1991). Una buena estrategia es tomar la suma de tantas medidas como sea posible, combinando medidas de comportamiento, salud y fisiológicas (Dawkins 2006).

El rodeo chileno representa un deporte de carácter tradicional y masivo para nuestro país, motivo por el cual se ha convertido en el principal estímulo para la crianza del caballo de raza Criolla chilena, dado el auge que ha tenido al ser considerado como el deporte nacional que representa parte importante de nuestra cultura y tradiciones. Sin embargo, hasta el día de hoy está en cuestionamiento el impacto que podría generar el rodeo sobre el bienestar físico y psicológico, tanto del caballo como del novillo utilizado para poder llevar a cabo esta actividad deportiva. Por lo anterior, resulta necesario generar más estudios científicos que otorguen información acerca de cómo se ve afectado el bienestar de los animales, para dar respuesta a todos aquellos cuestionamientos que se producen acerca de nuestro deporte nacional, y en caso de verse realmente afectado el bienestar, generar cambios que logren revertir la situación a favor de los animales.

3.4 HIPÓTESIS

El bienestar animal del caballo Criollo Chileno se ve afectado durante el ejercicio de rodeo, produciéndose una variación en los constituyentes sanguíneos indicadores de estrés y daño muscular.

3.5 OBJETIVOS

3.5.1 Objetivo general:

Evaluar el impacto que produce el ejercicio realizado durante el rodeo chileno sobre algunos parámetros sanguíneos indicadores de daño muscular y estrés en caballos Criollos Chilenos.

3.5.2 Objetivos específicos:

- Evaluar y comparar cambios en los valores de las variables sanguíneas: VGA, proteínas totales, fibrinógeno, relación N:F y cortisol, en caballos Criollos chilenos en reposo y después del ejercicio con y sin novillo.

- Evaluar y comparar cambios en las enzimas musculares AST y CK como indicadores de daño muscular en caballos Criollos Chilenos en reposo y después del ejercicio con y sin novillo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES:

4.1.1 Material biológico y ubicación:

Se utilizaron 13 equinos raza caballo Criollo Chileno, 5 hembras, 6 machos enteros y 2 machos castrados, pertenecientes a 2 criaderos de la XIV Región. Los caballos tenían entre 4 y 10 años de edad, con un peso aproximado de 320 a 380 Kg, y se encontraban clínicamente sanos. No fue utilizado ningún criterio de muestreo predeterminado ya que dependió exclusivamente de la disposición de los propietarios.

4.1.2 Material inerte:

Para la evaluación del hemograma y de glutatión peroxidasa (GSH-Px) se utilizaron tubos con sal sódica del ácido etilendiamino-tetracético (EDTA). Para creatinquinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST) y cortisol se utilizaron tubos sin aditivos. Además se utilizaron 39 jeringas de 10 ml, 39 agujas de 18G de 1,5 pulgadas, 39 microtubos de 1,5 ml, porta objetos y microcapilares.

Para el VGA se utilizó la centrífuga Haraeus Biofuge haemo y una tabla de microhematocrito, para el hemograma automático se utilizó un contador hematológico marca Sysmex KX 21 N.

Para medir CK se requirió un autoanalizador Metrolab 2300, Wiener Lab para el análisis. Para AST se necesitó un autoanalizador Metrolab 2300, Wiener Lab para el análisis. GSH-Px se analizó con el autoanalizador Metrolab 2300, Wiener Lab.

4.2 METODOLOGÍA:

4.2.1 Obtención de muestras sanguíneas:

Se realizaron muestreos mediante punción yugular con jeringas estériles de los 13 caballos. En cada muestreo se extrajo un volumen de 10 mL de sangre por caballo, de los cuales 7 fueron depositados en un tubo sin aditivo y almacenados a temperatura ambiente, y los 3 mL restantes se depositaron en un tubo con anticoagulante EDTA y se almacenaron a una temperatura de refrigeración entre 2 – 6° C.

Los muestreos se realizaron en el criadero al que pertenecía cada equino, luego de someterlos a tres situaciones (E1, E2 y E3), simulando de forma experimental el ejercicio que realizan habitualmente en el rodeo chileno durante el proceso de entrenamiento y competencia:

E1: Muestreo en reposo, realizado a las 9:00 AM del día 1 (Fig. 1).

E2: Muestreo 5-10 min. post ejercicio intenso, realizado a las 9:00 AM del día 2. El ejercicio consistió en aproximadamente 5 minutos de caminata, 5 minutos de trote y 10 minutos de trote en “postura” (caballo en movimiento hacia los lados cruzando sus extremidades), sin presencia del novillo (Figura 2).

E3: Muestreo 5-10 min. post ejercicio intenso más el estresor (novillo), realizado a las 9:00 AM del día 9. El ejercicio consistió en aproximadamente 5 minutos de caminata, 5 minutos de trote y 10 minutos de trote en “postura” arreando a un novillo (Figura 3).



Figura 1. Situación en E1.



Figura 2. Situación en E2.



Figura 3. Situación en E3.

4.2.2 Realización de hemograma y frotis sanguíneo:

El hemograma se realizó de forma automática mediante un contador hematológico marca Sysmex KX 21 N, a partir de una muestra de sangre con EDTA. Luego se midió de forma manual el VGA mediante una tabla de microhematocrito.

Al frotis sanguíneo de cada una de las muestras se le hizo tinción con la técnica de CORZAP para obtener la razón neutrófilos/linfocitos mediante recuento diferencial de células blancas.

4.2.3 Medición de cortisol:

Las muestras de suero se enviaron en microtubos de 1,5 mL a la Universidad de Concepción donde se analizaron mediante el método de radioinmunoanálisis (RIA) con kits comerciales Diasource (Bélgica) validado para uso en animales. Con un nivel de detectabilidad de 1 ug/dL y un coeficiente de variación intraensayo de menos de 5%.

4.2.4 Fibrinógeno y proteínas totales:

El fibrinógeno se determinó mediante precipitación por calor, centrifugando un tubo de microhematocrito con sangre a 16128 g/min, luego se incubó a 56° C por 3 minutos y se centrifugó por 2 minutos a 16128 g/min; la medición se hizo sobre el sedimento que quedó sobre la capa flogística. La medición de proteínas totales se realizó con plasma del mismo tubo microcapilar con que se midió el VGA manualmente. Esto se realizó con refractómetro.

4.2.5 Análisis enzimáticos:

La CK se midió utilizando el método cinético según International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) y European Committee on Clinical Laboratory Standards (ECCLS); GSH-Px mediante método cinético según Paglia y Valentine y AST con el método cinético según IFCC.

4.2.6 Valores de referencia utilizados:

Cuadro 1: Valores de referencia para la especie equina utilizados en cada variable.

Variable	Valor	Referencia
Cortisol	1,26-8,69 µg/dL	FISENLAB, Universidad Concepción ¹
VGA	27-42 %	Laboratorio Patología Clínica, UACH ²
Proteínas Totales	68-84 g/L	Laboratorio Patología Clínica, UACH
Fibrinógeno	<5 g/L	Laboratorio Patología Clínica, UACH
Razón N:L	0,8-2,8	Werner (2006)
CK	40-140 U/L	Laboratorio Patología Clínica, UACH
AST	140-480 U/L	Laboratorio Patología Clínica, UACH
GSH-Px	130-270 U/g Hb	Laboratorio Patología Clínica, UACH

4.2.7 Análisis estadístico:

Los datos se ingresaron a una planilla Excel para efectos de estadística descriptiva. Se determinó el tipo de distribución para las variables utilizando la prueba Shapiro-Wilk. Las variables que no tuvieron distribución normal se sometieron a una transformación logarítmica. Aquellas que luego de transformadas lograron una distribución normal se sometieron a un análisis de varianza para medidas repetidas, para las restantes sus valores originales se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis ANOVA. Las pruebas de comparación múltiple, se realizaron con la prueba de Tukey y Kruskal-Wallis según correspondiera. El nivel de significancia establecido fue $P < 0,05$. Se utilizó el programa Statistix, versión 8.0 para Windows.

¹ FISENLAB, Laboratorio de Fisiología Animal y Endocrinología, Departamento de ciencias Pecuarias, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Concepción.

² Laboratorio Patología Clínica, Instituto de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias. UACH.

5. RESULTADOS

Como se observa en el cuadro 2, los valores de las medias del VGA se encontraron por sobre el intervalo de referencia para la especie tanto en E2 como en E3, siendo diferentes al valor de la media en reposo (E1) ($P < 0,05$). Las proteínas totales se encontraron dentro del límite de referencia, pero a su vez se incrementó ($P < 0,05$) en E3. El fibrinógeno sobrepasa levemente el intervalo de referencia en E3, lo cual no es significativo respecto a los otros dos tiempos ($P > 0,05$). En cuanto a las concentraciones de cortisol, el valor de la media en E3 se encontró levemente por sobre el límite superior, sin embargo no se observa diferencia respecto al reposo y a E2 ($P > 0,05$). La actividad sérica de CK se encuentra por sobre el intervalo de referencia en los tres tiempos de muestreo, sin presentar diferencias entre ellos ($P > 0,05$). El resto de las variables presentadas en el cuadro 1, no presentaron diferencias entre los tres tiempos de muestreo ($P > 0,05$) y las medias se encontraron dentro del intervalo de referencia para la especie.

Cuadro 2: Resumen de los valores de las medias y desviaciones estándar de las variables sanguíneas de caballos Criollo chileno en reposo (E1) y posterior al ejercicio sin (E2) y con novillo (E3) e intervalos de referencia correspondientes.

Var. Sanguíneas	Intervalo ref.	E1	E2	E3
VGA (%)	27-42%	42 ± 7,4 ^b	51,3 ± 5,07 ^a	54 ± 6,8 ^a
Proteínas Totales (g/L)	68-84 g/L	70,2 ± 4,9 ^b	71,5 ± 3,7 ^b	77,3 ± 4,7 ^a
Fibrinógeno	<5 g/L	4,8 ± 1,4 ^a	4,7 ± 1,8 ^a	5,5 ± 0,8 ^a
Neutrófilo:Linfocito	0,8-2,8	1,3 ± 0,6 ^a	1,3 ± 0,6 ^a	1,1 ± 0,4 ^a
Cortisol (µg/dL)	1,26-8,69 µg/dL	7,4 ± 1,8 ^a	8,5 ± 1,7 ^a	9 ± 2,6 ^a
AST (U/L)	140-480 U/L	304 ± 78 ^a	294 ± 39 ^a	294 ± 35 ^a
CK (U/L)	40-140 U/L	516 ± 837 ^a	757 ± 1670 ^a	372 ± 313 ^a
GSH-Px (U/g Hb)	130-270 u/g Hb	262 ± 75 ^a	237 ± 61 ^a	234 ± 66 ^a

5.1 CORTISOL

Los valores de las medias de la concentración sérica de cortisol (gráfico 1) tanto en E1 (reposo) como en E2 (post ejercicio) se mantuvieron dentro del intervalo de referencia para la

especie (1,26-8,69 ug/dL), encontrándose en E2 valores más cercanos al límite superior de este intervalo; por el contrario en E3 (post ejercicio con novillo) el valor de la media excedió el límite superior de referencia a pesar de no encontrarse diferencias ($P > 0,05$). Tanto en E1 como en E2 y E3 se evidenciaron individuos con concentraciones de cortisol por sobre el intervalo de referencia.

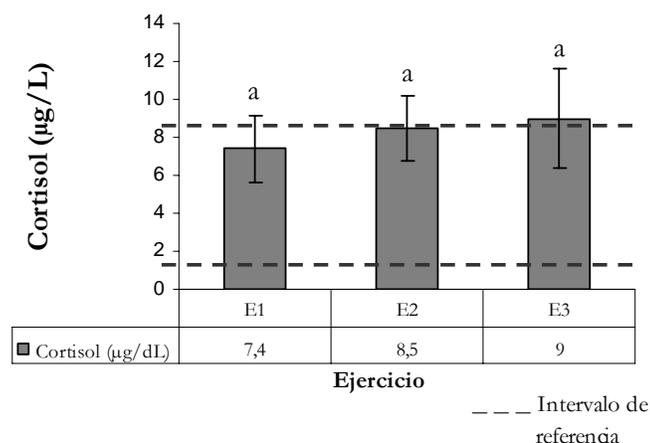


Gráfico 1: Valores de la media y D.E. de la concentración sérica de cortisol en caballos Criollo Chileno en reposo (E1) y posterior al ejercicio sin (E2) y con novillo (E3) (N= 13).

(*) Letras iguales representan que no existen diferencias ($P > 0,05$) entre muestreos (Prueba estadística utilizada: ANOVA para medidas repetidas).

5.2. VOLUMEN GLOBULAR AGLOMERADO (VGA), PROTEÍNAS TOTALES, FIBRINÓGENO y RAZÓN NEUTRÓFILOS:LINFOCITOS (N:L)

El valor de la media del VGA (gráfico 2) en E1 (reposo) se mantuvo dentro del intervalo de referencia para la especie (27-42%). En E2 (post ejercicio) y E3 (post ejercicio con novillo) los valores de la media sobrepasaron este intervalo, siendo más altos que en E1 ($P < 0,05$). En todos los tiempos de muestreo se evidenciaron individuos con porcentajes de VGA por sobre el límite superior de referencia para la especie.

Se observa (gráfico 3) que a pesar de que el valor de la media de las proteínas totales en E3 (post ejercicio con novillo) fue más alto que en E1 (reposo) y E2 (post ejercicio) ($P < 0,05$) todas las medias se mantuvieron dentro del intervalo de referencia para la especie durante los tres muestreos (68-84 g/L).

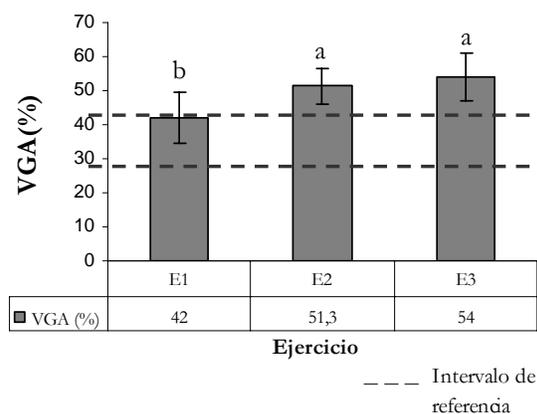


Gráfico 2: Valores de la media y D.E. del porcentaje de VAG en caballos Criollo Chileno en reposo (E1) y posterior al ejercicio sin (E2) y con novillo (E3) (N= 13).

(*) Letras distintas representan diferencias ($P < 0,05$) entre muestreos (Prueba estadística utilizada: ANOVA para medidas repetidas).

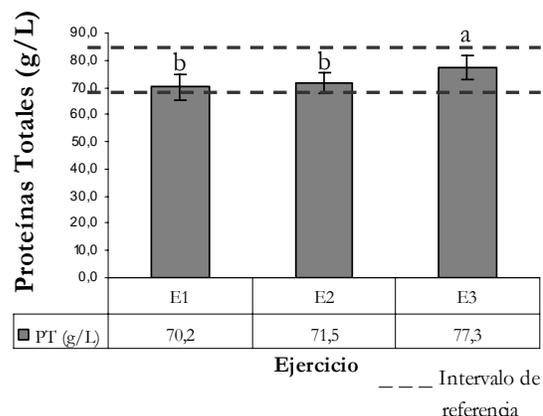


Gráfico 3: Valores de la media y D.E. de las concentraciones plasmáticas de Proteínas totales en caballos Criollo Chileno en reposo (E1) y posterior al ejercicio sin (E2) y con novillo (E3) (N= 13).

(*) Letras distintas representan diferencias ($P < 0,05$) entre muestreos (Prueba estadística utilizada: ANOVA para medidas repetidas).

Los valores de la media para la concentración plasmática de fibrinógeno (gráfico 4) se mantuvieron dentro del intervalo de referencia para la especie (< 5 g/L) tanto en reposo (E1) como en E2 (post ejercicio); sin embargo, en el caso de E3 (post ejercicio con novillo) el valor promedio sobrepasó levemente el límite superior de referencia, sin observarse diferencias ($P > 0,05$). En todos los tiempos de muestreo se observaron caballos que sobrepasaban el límite de referencia.

Los valores de la media para la razón N:L (Gráfico 5) en los tres tiempos de muestreo se mantuvieron dentro del intervalo de referencia para la especie (0,8-2,8) y no se evidencian diferencias entre E1 (reposo), E2 (post ejercicio) y E3 (post ejercicio con novillo) ($P > 0,05$). Sin embargo, en los tres ejercicios se observaron al menos dos individuos presentando valores de la razón N:L por debajo del límite inferior de referencia para la especie.

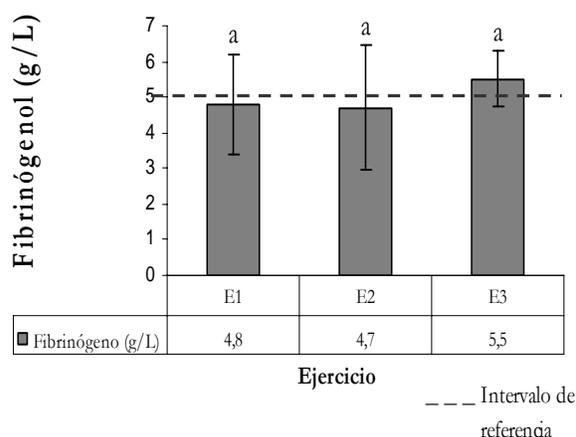


Gráfico 4: Valores de la media y D.E. de la concentración plasmática de fibrinógeno en caballos Criollo Chileno en reposo (E1) y posterior al ejercicio sin (E2) y con novillo (E3) (N= 13).

(* Letras iguales representan que no existen diferencias ($P > 0,05$) entre muestreos (Prueba estadística utilizada: ANOVA para medidas repetidas).

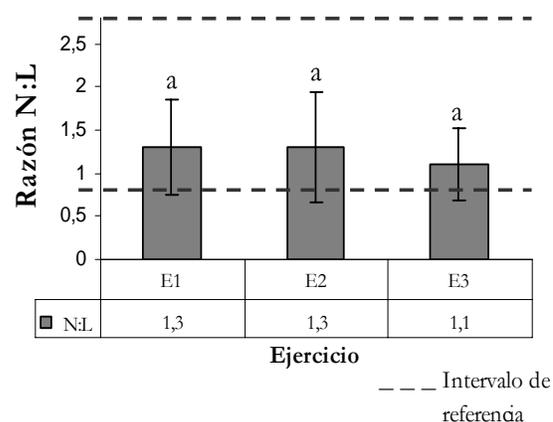


Gráfico 5: Valores de la media y D.E. de la razón Neutrófilos:Linfocitos en caballos Criollo Chileno en reposo (E1) y posterior al ejercicio sin (E2) y con novillo (E3) (N= 13).

(* Letras iguales representan que no existen diferencias ($P > 0,05$) entre muestreos (Prueba estadística utilizada: ANOVA para medidas repetidas).

5.3 ENZIMAS ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST), CREATIN KINASA (CK) Y GLUTATIÓN PEROXIDASA (GSH-Px)

Los valores de la media para la actividad sérica de CK (gráfico 6) se observaron por sobre el límite superior de referencia para la especie (40-140 U/L) en los tres muestreos, sin presentar diferencias entre sí ($P > 0,05$). Al analizar individualmente los valores, se observó que todos los equinos muestreados superaban los parámetros de referencia para la especie.

Los valores de la media para la actividad sérica de AST (gráfico 7) se mantuvieron dentro del intervalo de referencia para la especie (140-480 U/L) tanto en reposo como en los dos tipos de ejercicios. No se observaron diferencias ($P > 0,05$) entre E1 (reposo), E2 (post ejercicio) y E3 (post ejercicio con novillo).

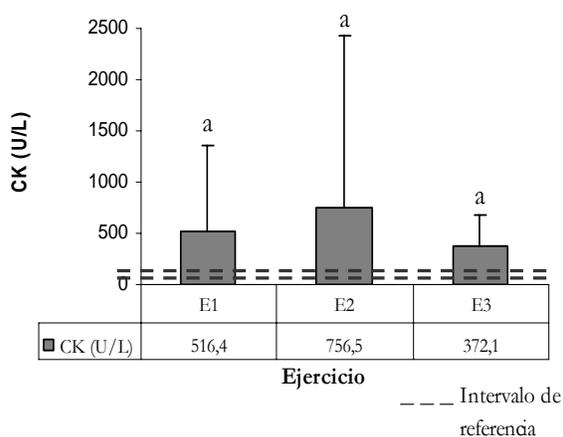


Gráfico 6: Valores de la media y D.E. de la actividad sérica de CK en caballos Criollo Chileno en reposo (E1) y posterior al ejercicio sin (E2) y con novillo (E3) (N= 13).

(*). Letras iguales representan que no existen diferencias ($P>0,05$) entre muestreos (Prueba estadística utilizada: ANOVA para medidas repetidas).

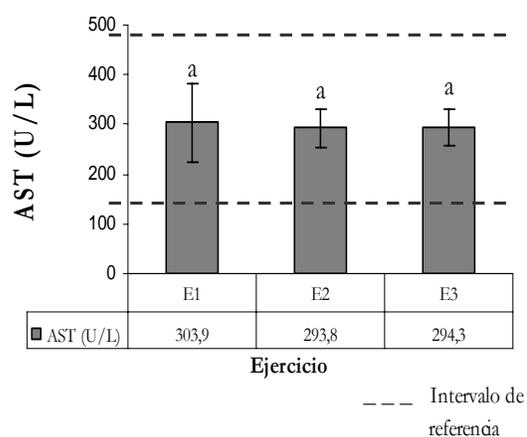


Gráfico 7: Valores de la media y D.E de la actividad sérica de AST en caballos Criollo Chileno en reposo (E1) y posterior al ejercicio sin (E2) y con novillo (E3) (N= 13).

(*). Letras iguales representan que no existen diferencias ($P>0,05$) entre muestreos (Prueba estadística utilizada: ANOVA para medidas repetidas).

Los valores de la media de GSH-Px (gráfico 8) se encontraron dentro del intervalo de referencia para la especie (130-270 U/g Hb) durante todos los muestreos, pero al analizar individualmente estos valores, sólo un equino presentó valores por debajo del límite inferior de referencia.

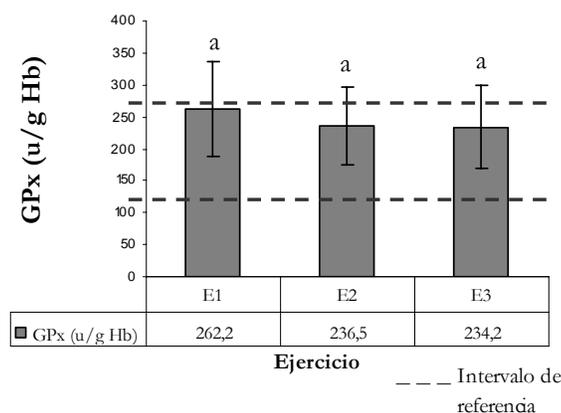


Gráfico 8: Valores de la media de GSH-Px en caballos Criollo Chileno en reposo (E1) y posterior al ejercicio sin (E2) y con novillo (E3) (N= 13).

6. DISCUSIÓN

6.1 CORTISOL

Los resultados para esta variable (gráfico 1) se podrían deber a que las muestras en los 3 tiempos fueron obtenidas en el transcurso de la mañana, entre las 8:00 y las 11:00 horas. Tal como describe Irvine y Alexander (1994), se ha observado un ritmo circadiano en las concentraciones plasmáticas de glucocorticoides en muchas especies, incluyendo seres humanos, monos y ratas. Además describen que en los caballos, algunos estudios han encontrado un ritmo circadiano con un pico entre las 6:00 y las 9:00 horas y un mínimo entre las 19:00 y las 23:00 horas. Por otro lado, aquellos caballos que presentaron valores que sobrepasaron levemente el intervalo de referencia incluso estando en reposo, podrían haberse visto afectados por una mediación estrictamente psíquica (respuesta condicionada) producto de una excitación producida por anticipación al ejercicio, o bien por el manejo previo a obtener la muestra (Colborn y col 1991).

Asociado a lo anterior, Mormède y col (2007) describen que el eje HHA se activa durante la exposición a cualquier situación aversiva, como puede ser la extracción de sangre mediante punción yugular, tal como mencionan Möstl y Palme (2002), ya que la obtención de muestras a menudo implica el confinamiento o la manipulación de los animales, lo que puede ser estresante por sí mismo y puede confundir los resultados. Sin embargo, en este caso los animales se muestrearon fácilmente, de manera rápida y sin ningún inconveniente.

En este estudio no se evidenciaron diferencias significativas en los valores de la media de la concentración sérica de cortisol entre E1, E2 y E3 ($P > 0,05$, gráfico 1), lo que se podría deber a que los equinos estaban finalizando la temporada deportiva, por lo cual fueron sometidos a entrenamiento durante un largo período de tiempo, produciéndose así una adaptación fisiológica al ejercicio. Marc y col (2000) reportaron que al muestrear equinos post ejercicio se ha observado que las concentraciones de cortisol alcanzan valores más altos en caballos no entrenados, o menos aptos para el ejercicio, sin embargo pese a no existir diferencias ($P > 0,05$) entre los tres tiempos, en E3 se observó que el valor de la media de la concentración sérica de cortisol excedió el límite superior de referencia para la especie, por lo que la incorporación del novillo al ejercicio pudo haber sido un factor levemente estresante y a su vez pudo haber generado algún grado de excitación en algunos caballos.

Si bien es cierto, en los dos tipos de ejercicio existieron aumentos en la concentración sérica de cortisol, estos incrementos fueron moderados y parecen reflejar el esfuerzo que representa el ejercicio al cual fueron sometidos los caballos. Tal como describe García y col (1999) es conocido que el aumento en la concentración de cortisol representa una respuesta común del atleta equino al trabajo o ejercicio y su magnitud parece reflejar tanto la intensidad como la duración del trabajo realizado. Por lo anterior, podría concluirse para esta variable según este estudio, el cual fue similar al de García y col (1999), que tanto el ejercicio realizado en el rodeo apropiadamente tal como el entrenamiento del caballo Criollo Chileno en los criaderos constituye un

esfuerzo físico de intensidad moderada, producto de las bajas velocidades desarrolladas y de la corta duración del ejercicio, los cuales tienen por objetivo principal lograr en los caballos una mayor destreza en la postura y en los mandos con las riendas, manteniendo como objetivo secundario el lograr en ellos una aptitud física acorde con las exigencias deportivas del rodeo.

6.2 VOLUMEN GLOBULAR AGLOMERADO Y PROTEÍNAS TOTALES

Los valores obtenidos para esta variable podrían ser el resultado de una contracción esplénica inducida por la actividad nerviosa simpática o por catecolaminas circulantes al inicio del ejercicio, ya que al menos un tercio del total de eritrocitos en caballos se encuentra almacenado en el bazo (Werner 2006). Por otro lado, también podrían ser producto de una deshidratación causada por una sudoración excesiva o por privación de agua (Lording 2008), de ser esta última la situación, se esperaría que las proteínas totales también se encontrasen incrementadas, lo que no se evidenció, ya que tanto en E1 como en E2 y E3 los valores promedio de las proteínas se mantuvieron dentro del intervalo de referencia para la especie (68-84 g/L, gráfico 3). Consecuentemente se descartaría que el aumento del VGA fuera debido a una hemoconcentración por deshidratación.

Lording (2008) describe que la contracción del bazo transfiere rápidamente glóbulos rojos a la circulación sistémica en respuesta a la excitación (manipulación, punción venosa, contracciones nerviosas) y al ejercicio vigoroso y además señala que la magnitud de los cambios debidos a la contracción esplénica es influenciada por la variación individual, la edad, el nivel de condición física del caballo y la intensidad y duración del ejercicio físico; esto podría explicar la variación individual que se observa entre los caballos y los resultados de los valores de la media obtenidos.

Como se mencionó anteriormente, las concentraciones plasmáticas de las proteínas totales se mantuvieron dentro del intervalo de referencia para la especie tanto en E1 como en E2 y E3 (gráfico 3), pero a su vez se observó que en E3 el valor de la media de las proteínas totales fue más alto que en E1 y E2 ($P < 0,05$). Estos resultados son similares a los observados en un estudio realizado por Pérez y col (1997) en caballos Chilenos de rodeo, en donde se evidenciaron aumentos significativos del VGA posterior a la corrida del animal que estuvieron asociados a incrementos en la concentración de proteínas; sin embargo ese incremento representó un bajo porcentaje respecto al valor en reposo, mientras que el VGA aumentó en un porcentaje mayor respecto al valor en reposo, lo que se asemeja a lo observado en el presente estudio. Por lo tanto el aumento significativo de la concentración de proteínas en E3 sería el resultado de la salida de líquidos hacia el compartimiento intersticial y el líquido intracelular, mientras que la proporción significativa de la hemoconcentración observada tanto en este estudio, como en el de Pérez y col (1997) sería atribuible a la movilización de la reserva de eritrocitos desde el bazo. La movilización de eritrocitos estaría destinada a favorecer la capacidad transportadora de oxígeno de la sangre, para satisfacer la mayor demanda metabólica producida por el aumento de trabajo muscular (Pérez y col 1997), o bien en respuesta a la excitación, o liberación de catecolaminas, a consecuencia de la adición de un factor estresante (ejercicio con novillo), desencadenando así un marcado aumento en los valores del VGA.

6.3 FIBRINÓGENO

Los valores de la media de la concentración plasmática de fibrinógeno obtenidos en este estudio se encontraron dentro del intervalo de referencia para la especie (< 5 g/L) en E1 (reposo) y en E2 (post ejercicio), en tanto en el caso de E3 (post ejercicio con novillo) la media sobrepasó levemente el límite superior de referencia (gráfico 4), sin ser significativamente diferente a los otros dos tiempos de muestreo ($P > 0,05$). Sin embargo, al observar las concentraciones de fibrinógeno en forma individual se puede observar que los caballos que exceden el límite superior de referencia son 6, los cuales superan este intervalo tanto en el muestreo en reposo, como en los otros dos tiempos de muestreo; por lo tanto, se descartaría que este incremento fuese producto del ejercicio al que fueron sometidos los equinos, ya que, tal como se mencionó anteriormente, en reposo también se encontraron concentraciones de fibrinógeno aumentadas. Los valores elevados podrían ser atribuidos a algún proceso inflamatorio previo, puesto que, según lo descrito por Jacobsen y col (2005), al analizar las concentraciones de fibrinógeno previo y posterior a una castración, obtuvieron los valores máximos recién al octavo día después de la cirugía; por lo tanto, ésta es una proteína de fase aguda (PFA) menor en equinos, que está presente en concentraciones relativamente altas en plasma de caballos sanos y aumenta sólo de 1 a 3 veces durante la respuesta de fase aguda. Al utilizarse como un marcador de inflamación, el fibrinógeno tiene la desventaja de ser una PFA de reacción lenta, ya que sus concentraciones plasmáticas aumentan lentamente (24-72 horas) en respuesta a la lesión tisular, alcanzando el pico 1-2 semanas después de la estimulación (Jacobsen y col 2005).

Según lo descrito anteriormente, tal vez hubiese sido óptimo realizar muestreos acordes al tiempo que demora la concentración de fibrinógeno en aumentar, sin embargo debido a su naturaleza no específica, el fibrinógeno no sirve para proporcionar un diagnóstico exacto, ni el momento preciso cuando se produjo el proceso inflamatorio, por lo tanto, sería recomendable en futuros estudios considerar otra proteína de fase aguda como amiloide sérico A, la cual es una PFA más sensible a la inflamación, y por lo tanto más adecuada para el monitoreo en tiempo real de la actividad de la enfermedad que el fibrinógeno (Jacobsen y col 2005).

6.4 RAZÓN NEUTRÓFILO:LINFOCITO (N:L)

Los valores de la media de la razón N:L se mantuvieron dentro del intervalo de referencia para la especie (0,8-2,8) durante los tres muestreos (gráfico 5). En caso de existir algún factor estresante para el caballo se habría esperado que asociado al leve aumento de cortisol que existió en este estudio en E3 y en algunos caballos en E1 y E2 (gráfico 1) también hubiese aumentado la razón N:L, ya que como describen Stull y Rodiek (2000) la liberación de cortisol debido al estrés puede conducir a una neutrofilia y linfopenia, y así aumentar la razón N:L, aumento descrito también por Zahorec (2001).

Pese a lo anteriormente descrito por Stull y Rodiek (2000) y Zahorec (2001), en este estudio no sucedió lo mismo y los valores para la razón N:L se mantuvieron dentro del intervalo de referencia para la especie, pese al leve aumento de la concentración sérica de cortisol, lo que

podría explicarse mediante lo también descrito por Zahorec (2001) quien en un estudio clínico prospectivo y de laboratorio de 90 pacientes de la unidad de cuidados intensivos (UCI) demostró que se manifestó una marcada neutrofilia y linfopenia en un plazo de 4 a 8 horas después de la agresión. Similar a lo descrito por Rossdale y col (1982) en un estudio en donde evaluaron la razón N:L y cortisol antes y después de la administración de ACTH1-24 en equinos, concluyeron de las concentraciones plasmáticas de cortisol aumentaron significativamente dentro de los 60 minutos de la administración de ACTH1-24; además la media de la razón N:L se alteró significativamente a los 240 minutos después de la administración de ACTH1-24 y a los 180 minutos después de realizar un galope de entrenamiento. Por lo tanto, según lo descrito por ambos autores, se esperaba que la razón N:L aumentara después de cierto lapso de tiempo; sin embargo en el presente estudio se muestrearon los caballos 5-10 minutos post ejercicio, por ende, puede que no haya sido el tiempo suficiente para evidenciar un aumento en el cociente N:L.

Por otro lado, Zahorec (2001) también menciona que tanto la neutrofilia como la linfopenia reflejan la fuerza e intensidad de la situación estresante, así como la resistencia y la adaptabilidad del sistema inmunológico; por ende, la situación reflejada en este estudio podría deberse a que no existió un factor realmente estresante para desencadenar un aumento de la razón N:L.

6.5 CREATIN KINASA (CK)

Los valores de la media de la actividad sérica de CK se observaron muy por sobre el intervalo de referencia para la especie (40-140 U/L) tanto en reposo como en los ejercicios con y sin novillo, sin encontrarse diferencias entre los tres ejercicios ($P > 0,05$) (gráfico 6). Sin embargo, al observar los valores en forma individual, se evidenció que uno de los equinos presentó valores muy incrementados tanto en E1 como en E2 (3226 U/L y 6292 U/L respectivamente), y por otro lado, en E3 presentó un valor dentro del intervalo de referencia (120 U/L); además se encontró otro caballo que presentó un valor muy elevado en E3 (1257 U/L) y en E1 y E2 los valores se encontraron levemente por sobre el límite superior de referencia (152 U/L y 150 U/L respectivamente). Por lo tanto, según lo mencionado anteriormente, los valores de la media para la actividad sérica de CK se observaron muy incrementados producto de los valores que arrojaron los dos caballos anteriormente mencionados, uno para E1 y E2 y el otro para E3. En ambos casos, el aumento de dichos valores no se puede atribuir al ejercicio al que fueron sometidos los individuos en este estudio, ya que en el caso del primer caballo descrito, una de las alzas fue observada cuando el animal estaba en reposo, encontrándose dentro del intervalo normal luego del tercer ejercicio, y en el caso del segundo caballo descrito, el notable aumento que se observó fue sólo luego del tercer ejercicio siendo considerablemente mayor que en el segundo ejercicio. Por lo tanto, los resultados podrían deberse a un error en el análisis de laboratorio, a algún daño muscular producido por algún factor externo al ejercicio al cual fueron sometidos los caballos en este estudio, ya que un daño muscular débil es suficiente para producir un alza en la concentración sérica de esta enzima (Gómez y col 2004), o también podría ser producto de alguna patología que haya presentado el equino al momento de ser muestreado que incrementara la concentración de CK de manera significativa, como por ejemplo rabdomiólisis; sin embargo, esta patología se descarta, ya que la actividad sérica de AST se mantuvo dentro de los intervalos de referencia para

la especie y además no se observó la signología clínica correspondiente a esta patología en ninguno de los caballos.

A su vez, los demás caballos presentaron aumentos moderados de la actividad sérica de CK observándose valores por sobre el intervalo de referencia para la especie tanto en E1 como en E2 y E3, presentando en la mayoría de los casos un aumento en E2 y E3 con respecto al muestreo en reposo. Según lo descrito por MacLeay (2004) el aumento fisiológico de la actividad sérica de CK después del ejercicio es causado por un cambio en la permeabilidad de la membrana celular, posiblemente debido a hipoxia celular, aunque es probable que estén implicados otros factores. Además el mismo autor menciona que los efectos del ejercicio sobre la actividad sérica de esta enzima dependen del estado de entrenamiento del animal y de la intensidad y duración del ejercicio al cual es sometido el animal.

Pérez y col (1997) realizaron un estudio en donde se evidenció un aumento significativo de la actividad sérica de CK sobre los valores de reposo en caballos sometidos a la competencia de rodeo, y de acuerdo a las variaciones observadas en ese estudio, los aumentos se observaron a los 15 minutos post ejercicio para las medias de actividad de CK; sin embargo, debido a que los incrementos observados en la actividad de esta enzima fueron moderados, se presumió que dicho aumento fue una consecuencia fisiológica producto de la intensidad del ejercicio, similar a lo que pudo haber ocurrido en el presente estudio. Al igual que lo descrito por Pérez y col (1997), no se puede descartar completamente la posibilidad de que en algunos caballos el aumento de la actividad de las enzimas esté asociado a daño celular como consecuencia de un mayor esfuerzo muscular.

6.6 ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST)

En relación a los valores de la media para la actividad sérica de AST, estos se mantuvieron dentro del intervalo de referencia para la especie (140-480 U/L) tanto en E1 (reposo) como en los otros dos ejercicios (E2 post ejercicio y E3 post ejercicio con novillo) y no se observaron diferencias ($P > 0,05$) entre los tres diferentes tiempos de muestreo (gráfico 7) a diferencia del estudio realizado por Pérez y col (1997) en donde sí se encontraron aumentos significativos post ejercicio respecto al reposo, observándose concentraciones de actividad que fluctuaban en rangos de 136 a 693 U/L. Esta diferencia se puede deber a que la actividad de AST, al tratarse de una enzima mitocondrial y citosólica su presencia en el plasma es más tardía que CK, ya que su salida hacia la circulación general requiere de la presencia de daño celular (Pérez y col 1997). Por lo tanto, al tomar en cuenta que los muestreos en este estudio fueron realizados 5-10 minutos post ejercicio, el hecho de que no se hayan encontrado valores incrementados de la actividad sérica de AST puede ser producto de que no haya transcurrido el tiempo suficiente para que la actividad de esta enzima aumente, a diferencia del estudio realizado por Pérez y col (1997) en donde AST presentó incrementos a las 24 horas post ejercicio. Por lo tanto, habría sido óptimo para el caso de esta enzima, muestrear a los caballos luego de transcurridas 24 horas después de cada ejercicio.

6.7 GLUTATIÓN PEROXIDASA (GSH-Px)

Los caballos que fueron utilizados para realizar este estudio son habitantes de la Región de los Ríos, la cual es una zona selenio deficiente (Oblitas y col 2000), por lo que se encontró apropiado incluir el análisis de la actividad de GSH-Px. Una baja actividad de esta enzima ha sido asociada a una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo que afecta de diversas formas al organismo, asociándose a diversos síndromes y patologías musculares (MacLeay 2004), por lo tanto resultaba importante incluirla dentro de las variables a analizar y así contribuir a la discusión de las variables CK y AST.

Sin embargo, ningún caballo resultó ser selenio deficiente. Todos los valores de las medias para la actividad de GSH-Px (gráfico 8) se encontraron dentro del intervalo de referencia para la especie (130-270 U/g Hb).

6.8 CONCLUSIONES

Según las variables que fueron analizadas, se rechaza la hipótesis postulada, puesto que al evaluar conjuntamente los indicadores sanguíneos de estrés y daño muscular, se evidencia que el rodeo constituye un esfuerzo físico de intensidad moderada; las variaciones obtenidas en los constituyentes sanguíneos utilizados en este estudio estarían representando una respuesta común del caballo de deporte frente al ejercicio y su magnitud refleja que tanto la duración como la intensidad no comprometen el bienestar físico, por lo tanto, el ejercicio realizado durante el rodeo no produciría un impacto negativo sobre el bienestar físico del caballo Criollo Chileno, según los parámetros sanguíneos utilizados, en cuanto al estrés y daño muscular.

El entrenamiento paulatino, responsable y constante del caballo Criollo chileno en los criaderos es fundamental para que se produzca una adaptación fisiológica del animal frente al ejercicio. Los factores externos al ejercicio, como el manejo y el ambiente, sumado al factor individual que permite a algunos caballos enfrentarse de mejor manera al ejercicio de rodeo, son importantes y muy necesarios de considerar al momento de evaluar el bienestar animal, por lo que hubiese resultado óptimo realizar en este estudio un seguimiento del entrenamiento y el manejo que se le proporciona a cada caballo, para así complementar de mejor manera el análisis del bienestar de estos caballos.

Por lo tanto, el cortisol, el VGA, las proteínas totales, el fibrinógeno, las enzimas musculares (CK y AST) y la razón N:L, parámetros bioquímico-sanguíneos utilizados en este estudio, son útiles como indicadores de bienestar animal sólo si son analizados en conjunto y resultarían aún más confiables para la evaluación del bienestar si se analizan de manera complementaria con otros indicadores, tanto directos como indirectos.

7. REFERENCIAS

- Broom DM. 1991. Animal welfare: concepts and measurement. *J Anim Sci* 69, 4167-4175.
- Breazile JE. 1987. Physiologic basis and consequences of distress in animals. *JAVMA* 191, 1212-1215. Obtenido de Flores DC. 2010. Indicadores de estrés post quirúrgico en caballos tratados con analgesia preventiva a base de Tramadol o Fenilbutazona. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Colborn DR, DL Thompson, TL Roth, JS Capehart, KL White. 1991. Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. *J Anim Sci* 69, 2556-2562.
- Crisman MV, WK Scarratt, KL Zimmerman. 2008. Blood proteins and inflammation in the horse. *Vet Clin Equine* 24, 285-297.
- Dawkins MS. 2006. A user's guide to animal welfare science. *Trends in Ecology and Evolution* 21, 77-82.
- FAWC, Farm Animal Welfare Council. 1993. *Second report on priorities for research and development in farm animal welfare*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, UK.
- García M, R Guzmán, I Cabezas, V Merino, C Palma, R Pérez. 1999. Evaluación del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno de rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas. *Arch Med Vet* 31, 167-176.
- Gómez C, P Petró, M Andaur, R Pérez, R Matamoros. 2004. Medición post-ejercicio de variables fisiológicas, hematológicas y bioquímicas en equinos de salto Holsteiner. *Revista Científica FCV-LUZ* 14, 244-253.
- Hypp S. 2005. Endocrinal responses in exercising horses. *Livest Prod Sci* 92, 113-121.
- Irvine CHG, SL Alexander. 1994. Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domest Anim Endocrinol* 11, 227-238.
- Jacobsen S, JJC Jensen, S Frei, AL Jensen, MB Thoenner. 2005. Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine vet J* 37, 552-556.
- Lording PM. 2008. Erythrocytes. *Vet Clin Equine* 24, 225-237.
- MacLeay JM. 2004. Disorders of the musculoskeletal system. In: Reed SM, WM Bayly, DC Sellon (ed). *Equine internal medicine*. 3 era ed. Saunders elsevier, St. Louis, USA, 488-544.

- Marc M, N Parvizi, F Ellendorff, E Kallweit, F Elsaesser. 2000. Plasma cortisol and ACTH concentrations in the warmblood horse in response to a standardized treadmill exercise test as physiological markers for evaluation of training status. *J Anim Sci* 78, 1936-1946.
- McGowan C. 2008. Clinical pathology in the racing horse: The role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the racehorse. *Vet Clin Equine* 24, 405-421.
- Mormède P, S Andanson, B Aupérin, B Beerda, D Guémené, J Malmkvist, X Manteca, G Manteuffel, P Prunet, CG van Reenen, S Richard, I Veissier. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* 92, 317-39.
- Möstl E, R. Palme. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 67-74.
- Oblitas F, PA Contreras, H Böhmwald, F Wittwer. 2000. Efecto de la suplementación con selenio sobre la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) y ganancia de peso en bovinos selenio deficientes mantenidos a pastoreo. *Arch Med Vet* 32. 55-62.
- Pérez R, M García, I Cabezas, R Guzmán, V Merino, S Valenzuela, C González. 1997. Actividad física y cambios cardiovasculares y bioquímicos del caballo chileno a la competencia de rodeo. *Arch Med Vet* 29, 221-234.
- Pinochet J L. 1980. Estudio hipométrico y morfológico del caballo de raza criolla chilena y su posible cambio tipológico. *Tesis*. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile, Chile.
- Rossdale PD, PN Burguez, RSG Cash. 1982. Changes in blood neutrophil/lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse. *Equine vet J* 14, 293-298.
- Sellon DC, 2004. Disorders of the hematopoietic system. In: Reed SM, WM Bayly, DC Sellon (ed). *Equine Internal medicine*. 3 ed. Saunders elsevier, St. Louis, USA 730-777.
- Stull CL, AV Rodiek. 2000. Physiological responses of horses to 24 hours of transportation using a commercial van during summer conditions. *J Anim Sci* 78, 1458-1466.
- Tadich TA, O Araya. 2010. Conductas no deseadas en equinos. *Arch Med Vet* 42, 29-41.
- Werner MP. 2006. Efectos del transporte y manejo pre-sacrificio sobre las concentraciones de algunos constituyentes sanguíneos relacionados con estrés en equinos. *Tesis de Magíster*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Zahorec R. 2001. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts – rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl lek Listy* 102, 5-14.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Antecedentes de los 13 equinos utilizados en este estudio.

Número	Nombre	Sexo	Edad
1	Cantero	Macho entero	6 años
2	Pregonos	Macho entero	5 años
3	Despistado	Macho castrado	5 años
4	Figurón	Macho entero	10 años
5	Carpincho	Macho entero	7 años
6	Rockero	Macho entero	5 años
7	Melodía	Hembra	4 años
8	Hojarasca	Hembra	5 años
9	NN Coipa	Hembra	6 años
10	Bandá	Hembra	4 años
11	Ramada	Hembra	5 años
12	Coipito	Macho castrado	7 años
13	Martirio	Macho entero	6 años

ANEXO 2: Valores de los siguientes constituyentes sanguíneos: cortisol, VGA, Proteínas totales, fibrinógeno, razón N:L, CK, AST y GSH-Px obtenidos en cada equino, en los tres diferentes tiempos de muestreo (E1: reposo, E2: post ejercicio, E3: post ejercicio con novillo).

Caballo	Muestra	Cortisol (µg/dL)	VGA (%)	Proteínas Totales (g/L)	Fb (g/L)	Razón N:L	CK (U/L)	AST (U/L)	GSH-Px (U/g Hb)
1	E1	8,3	58	76	3	1,69	187	378	284
	E2	9,4	59	76	3	2,83	155	341	279
	E3	8,3	61	80	4	1,94	167	331	263
2	E1	9,5	47	74	6	2,31	259	310	234
	E2	9,8	44	70	5	1,82	197	284	230
	E3	13,0	57	87	6	1,36	337	321	219
3	E1	8,5	51	62	3	1,72	140	230	345
	E2	11,0	55	62	3	1,21	306	248	339
	E3	10,5	65	80	5	1,54	257	273	270
4	E1	7,1	37	70	3	1,26	152	329	298
	E2	5,8	52	70	3	1,57	150	324	245
	E3	9,4	55	78	5	1,58	1257	313	241
5	E1	8,8	46	74	3	1,16	122	513	320
	E2	9,4	54	72	3	0,60	522	335	292
	E3	9,2	59	80	5	0,90	436	322	307
6	E1	5,5	42	74	5	1,37	207	332	267
	E2	7,1	52	72	3	1,69	368	331	276
	E3	7,9	42	78	5	1,09	257	350	342
7	E1	5,9	34	72	6	0,92	3206	255	104
	E2	8,0	45	72	6	1,13	6292	275	130
	E3	4,3	47	76	7	0,87	120	255	125
8	E1	6,0	44	66	5	1,37	263	257	149
	E2	9,8	60	74	5	0,92	251	280	164

	E3	6,8	59	76	5	0,49	714	268	172
9	E1	7,7	32	70	5	0,67	241	271	367
	E2	10,0	46	76	3	0,48	250	283	306
	E3	10,7	52	82	5	1,33	248	301	317
10	E1	9,2	37	66	7	0,69	738	278	232
	E2	9,6	50	72	7	0,51	252	284	213
	E3	9,3	48	72	6	0,63	485	279	211
11	E1	9,9	37	62	6	0,98	187	294	259
	E2	8,0	46	68	6	1,66	285	331	202
	E3	12,3	45	70	6	0,83	155	311	199
12	E1	5,9	36	70	5	2,33	204	202	325
	E2	6,6	52	72	7	1,21	149	207	222
	E3	10,7	57	74	6	1,46	139	221	234
13	E1	4,3	45	76	6	0,83	807	302	224
	E2	5,8	52	74	7	0,96	658	297	177
	E3	4,8	55	72	6	0,90	265	281	144

9. AGRADECIMIENTOS

A mi madre, gracias por caminar siempre junto a mi... Sólo tú sabes lo que nos costó, pero eso lo hizo especial. Este logro no es sólo mío, es el de ambas.

A mi padre, gracias por entregarme fortaleza de donde quiera que estés.

A las profesoras que me acompañaron y guiaron para hacer esto posible, muchas gracias doctora Tamara Tadich y doctora Carmen Gallo.

A todos los profesores que me ayudaron a crecer, tanto espiritual como profesionalmente.

A las secretarías y auxiliares que aportaron el granito de arena necesario para lograr llegar hasta el final.

A quien me acompañó durante todo este último período, gracias por estar siempre ahí cuando te necesité, tenías razón... Somos un buen equipo.

A mis amigos de Valdivia, gracias por ser mi gran familia durante estos últimos años.

A mis amigos de Coyhaique, gracias por permanecer junto a mí pese a la distancia y darme fortaleza cuando la necesité.

A quien convivió conmigo durante cuatro inolvidables años, gracias por el apoyo, compañía y amor que me entregaste todo ese tiempo.

A quien estuvo junto a mí de inicio a fin, fuiste lo que necesité para llegar hasta aquí.