



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTOS DE LA CARGA DE TRABAJO SOBRE
INDICADORES SANGUÍNEOS DE BIENESTAR ANIMAL
EN MULAS (*Equus asinus x Equus caballus*)**

BÁRBARA STEPHANIE PALMA MORENO

Memoria para optar al

Título Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Fomento de la Producción Animal

PROFESOR GUÍA: TAMARA ALEJANDRA TADICH GALLO

FINANCIAMIENTO: FONDECYT 1191068

SANTIAGO, CHILE

2022



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTOS DE LA CARGA DE TRABAJO SOBRE
INDICADORES SANGUÍNEOS DE BIENESTAR ANIMAL
EN MULAS (*Equus asinus x Equus caballus*)**

BÁRBARA STEPHANIE PALMA MORENO

Memoria para optar al

Título Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Fomento de la Producción Animal

NOTA FINAL:

	Nota	Firma
Nota Profesor Guía: Tamara Tadich
Profesor Corrector: Iván Núñez
Profesor Corrector: Cristian Torres

Santiago, Chile

2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis padres Myriam y Ruperto; gracias a ustedes he podido concluir esta etapa tan importante para mi vida, gracias a su apoyo, esfuerzo, compromiso y amor, hoy estoy a punto de ser una profesional. También agradecer a mi hermano David por su apoyo y compañía. Los amo mucho.

Agradecer a Geraldine y Rafaela, mis amigas incondicionales, gracias por su amistad, sus risas, su compañía y su apoyo. La universidad no hubiese sido lo mismo sin ustedes, y espero que esta amistad que nació desde el primer día de universidad continúe por muchos años más.

Agradecer al Doctor Víctor Villablanca y a todo el equipo de la consulta Gabriela, gracias por transmitirnos sus conocimientos sin recelo, y siempre motivarnos a ser mejores profesionales.

Gracias a la Dra. Tamara por darme la oportunidad de realizar esta tesis con ella, por su tiempo y disposición para responder todas mis dudas. Muchas gracias Profesora.

Agradecer a Fernanda, Camila y Daniel por su amistad, también fueron parte de este proceso.

Finalmente, y no menos importante, agradecer a mis perritos, Weñita, Weñito y Patitas, mi motivación para empezar y terminar esta carrera. Agradezco cada día que me acompañaron en las largas noches de estudio, en ser mi público oyente cuando ensayaba presentaciones y en las épocas más estresantes de estudio. Son amor puro y me renuevan de energías todos los días. También agradecer a mis gatos, que me han acompañado por 14 años de mi vida y han estado presente en las etapas más importantes de mi vida. Los amo.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
RESULTADOS.....	9
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIÓN.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Frecuencia Cardíaca.....	10
Figura 2: Frecuencia Respiratoria.....	11
Figura 3: Temperatura rectal.....	11
Figura 4: Recuento Glóbulos Rojos	12
Figura 5: Recuento Glóbulos Blancos	13
Figura 6: Relación neutrófilo:linfocito.....	14
Figura 7: Cortisol.....	14
Figura 8: Glucosa.....	15
Figura 9: Lactato.....	16
Figura 10: Potasio.....	17
Figura 11: Glutación Peroxidasa.....	18
Figura 12: Amiloide Sérico A.....	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diferencias significativas en enzimas musculares CK, LDH y AST...	18
----------------------------------------------------------------------------	----

RESUMEN

Se realizó un estudio para evaluar el efecto de la carga en mulas y como la intensidad de trabajo puede afectar algunos parámetros sanguíneos que son indicadores de bienestar animal. Doce mulas adultas, pertenecientes del Ejército de Chile fueron seleccionadas para realizar cuatro trayectos de 2 km con carga al lomo. En cada trayecto, 4 mulas transportaron una carga leve (80 kg), 4 mulas una carga moderada (105 kg) y 4 mulas una carga intensa (130 kg), más un viaje control sin carga. En cada ensayo se midió FC, FR y T° Rectal, y se tomaron muestras de la vena yugular para analizar parámetros hematológicos y bioquímicos. Todos estos parámetros se midieron en 7 tiempos de muestreo, antes del recorrido (basal), a la llegada, 10 minutos post-trabajo, 2 horas post-trabajo, un día post-trabajo, tres días post-trabajo y cinco días post-trabajo. Los resultados arrojaron aumentos significativos ($p < 0,05$) en variables a corto plazo como lo son FC, FR, y concentración plasmática de cortisol; para el resto de las variables se observaron alteraciones esperables de una respuesta de estrés, las cuales se normalizaron dentro de los tiempos esperados. Las enzimas musculares CK, LDH y AST presentaron incrementos leves asociados al ejercicio físico, y no fue indicativo de daño muscular. La enzima antioxidante GPx mantuvo sus concentraciones estables durante todos los tiempos confirmando que el trabajo no generó estrés oxidativo, mientras que el Amiloide Sérico A (SAA) medido en terrero, demostró que la carga más intensa generó una inflamación leve en las mulas, la cual a los cinco días empezó a disminuir. Este estudio es una de las primeras aproximaciones a la respuesta fisiológica al trabajo en mulas, basándose en intervalos de referencias (IR) propios de esta especie, y demostró ser un trabajo de baja intensidad que no provocó daño muscular ni impactó negativamente el bienestar animal.

Palabras clave: mulas, bienestar animal, carga de trabajo, parámetros hematológicos, parámetros bioquímicos, enzimas musculares, glutatión peroxidasa, amiloide sérico a.

ABSTRACT

A study was carried out to evaluate the effect of load on mules and how work intensity can affect some blood parameters that are indicators of animal welfare. Twelve adult mules, belonging to the Chilean Army were selected to carry out four 2-km trips carrying different amounts of loads on their backs. On each trip, 4 mules transported a light load (80 kg), 4 mules a moderate load (105 kg) and 4 mules a heavy load (130 kg), plus a control trip without load. In each test, HR, RR and rectal T° were measured, and samples were taken from the jugular vein to analyze the hematological and biochemical parameters. All these parameters were measured at 7 sampling times, before the trip (baseline), on arrival, at 10 minutes post-work, 2 hours post-work, one day post-work, three days post-work and five days post-work. The results showed significant increases ($p < 0.05$) in short-term variables such as HR, RR, and plasma cortisol; for the remaining variables, expected alterations for a stress response were observed, that were normalized within the expected times. Muscle enzymes CK, LDH and AST showed slight increases associated with physical exercise, and it was not indicative of muscle damage. The GPx antioxidant enzyme maintained stable concentrations during all sampling times, confirming that the work did not generate oxidative stress. Serum Amyloid A (SAA) measured in the field, showed that the heaviest load, generated a mild inflammation in the mules, which after five days began to decrease. This study is one of the first approaches to working conditions in mules, based on reference intervals (RI) typical of this species, and it proved to be a low-intensity work that did not cause muscle damage and did not affect animal welfare.

Key words: mules, animal welfare, workload, hematological parameters, biochemical parameters, muscle enzymes, glutathione peroxidase, serum amyloid a.

INTRODUCCIÓN

La mula corresponde a un híbrido que resulta de la cruce entre un burro macho (*Equus asinus*) y una yegua (*Equus caballus*) y se utiliza generalmente como animal de carga. Se describe que su conformación es una combinación de los mejores rasgos de ambos padres (Silva *et al.*, 2018), y se caracterizan por ser superiores a los equinos en función a su resistencia, calidad de las pezuñas, requisitos de alimentación y longevidad de vida (Hameed *et al.*, 2016). Debido a que aún muchas personas en el mundo dependen de los équidos de trabajo, ha surgido la necesidad de evaluar su bienestar animal, en especial el de las mulas, ya que muchas veces las condiciones en las que trabajan no son las adecuadas (Hameed *et al.*, 2016), pudiendo afectar su calidad de vida y bienestar animal. Este último aspecto puede ser evaluado mediante indicadores directos como parámetros fisiológicos, hematológicos y bioquímicos.

El ejercicio o trabajo es un estímulo estresante que inicia una respuesta fisiológica dirigida a la recuperación de la homeostasis (Ishizaka, 2017). Esta respuesta involucra la activación de múltiples sistemas, entre ellos el respiratorio, cardiovascular y musculo-esquelético (McKeever, 2011). Esto incluye respuestas a corto plazo como aumento en la frecuencia cardiaca, y secreción de epinefrina, cortisol y glucosa; y a largo plazo se inducen cambios en la función inmune y el estado oxidativo (González *et al.*, 2018). El tipo y el alcance de los cambios que ocurren durante el ejercicio influyen en el tiempo necesario para que un animal se recupere (Hyypä, 2005). Las consecuencias fisiológicas que provoca el ejercicio han sido ampliamente estudiadas en los equinos, sin embargo, en el caso de las mulas, la información es escasa debido a la falta en los intervalos de referencia (IR) de parámetros sanguíneos para esta especie híbrida y se tienden a comparar con los IR de equinos, lo que puede llevar a errores diagnósticos (Lagos y Tadich, 2019). Por esto, es importante generar información que muestre las repercusiones que tiene la intensidad del trabajo a nivel fisiológico en estos animales y cómo afecta a su posterior recuperación. Considerando estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la carga de trabajo con distintos pesos sobre indicadores directos de bienestar animal en mulas a través de parámetros fisiológicos, hematológicos y bioquímicos, y evaluar el tiempo de recuperación después de realizado el trabajo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los équidos han sido ampliamente utilizados por los humanos desde hace muchos años atrás, ya sea para alimentarse, trabajar, desplazarse, con fines militares, entre otros. Con respecto a la función militar, los equinos han sido mayormente utilizados en el campo de batalla, mientras que las mulas han dado un excelente resultado para la carga de materiales, sobre todo para el transporte en montañas (Loren, 2015).

La mula (*Equus asinus x Equus caballus*) es un animal híbrido que resulta de la cruce entre un burro macho y una yegua (*Equus asinus x Equus caballus*) (Hameed *et al.*, 2016). Se describe que esta cruce genera vigor híbrido donde la conformación de las mulas sería la combinación de los mejores rasgos de ambos padres, siendo consideradas superiores a los equinos en función de su resistencia y calidad de pezuñas (Silva *et al.*, 2018). Las mulas pueden llevar más peso que los equinos; además, sus cascos compactos y resistentes, los hace muy equilibrados y seguros en terrenos accidentados (Sekhar *et al.*, 2018). Estas características hacen a las mulas excelentes animales de carga, especialmente para zonas montañosas y de difícil acceso.

En la actualidad, los equinos de trabajo son importantes para las comunidades de escasos recursos, tanto en zonas rurales como urbanas, ya que proporcionan energía de tracción y servicios de transporte de bajo costo (Seid *et al.*, 2015). Sin embargo, los equinos de trabajo, que incluyen a los equinos, burros y mulas, trabajan en condiciones ambientales difíciles, a menudo con equipo, alimentos y agua inapropiados, lo que provoca agotamiento, malnutrición, deshidratación, y lesiones en los cascos (Seid *et al.*, 2015). Algunos estudios han demostrado que las mulas y los burros son los animales más descuidados dentro de este grupo (Hameed *et al.*, 2016). Es por esto que, surge la necesidad de priorizar el bienestar de estos animales, especialmente las mulas, y evaluar cómo las condiciones de trabajo pueden repercutir en su salud y bienestar.

Broom (1986) define el bienestar animal como “el estado de un animal en lo que respecta a sus intentos de hacer frente a su entorno”, por lo que cualquier exposición del animal a un estresor gatilla una respuesta fisiológica dirigida a la recuperación de la homeostasis (Ishizaka, 2017). El ejercicio o trabajo es uno de los estímulos fisiológicos más estresantes

que un animal puede sufrir, induciendo cambios en los parámetros fisiológicos, hematológicos y bioquímicos (Arfuso *et al.*, 2020). Estos parámetros han sido ampliamente estudiados en equinos dedicados al deporte o al trabajo, y para el caso de las mulas, los estudios existentes se basan en intervalos de referencia (IR) de parámetros equinos, lo que puede llevar a tratamientos y diagnósticos erróneos (Lagos *et al.*, 2019). Sumado a lo anterior, tienden a compararse las mulas con los equinos en cuanto a comportamiento y fisiología, pero estas comparaciones son inválidas debido a que las mulas tienen respuestas fisiológicas únicas y un comportamiento muy diferente (Silva *et al.*, 2018). Debido a lo anterior, es importante estudiar la respuesta fisiológica en mulas que han sido sometidas a un trabajo o ejercicio mediante la evaluación de parámetros sanguíneos, guiándose por los IR propios de esta especie, y de esta forma determinar como la intensidad del trabajo puede repercutir en su bienestar y posterior recuperación.

La realización de un trabajo o ejercicio es un desafío fisiológico importante, que implica una alteración de la homeostasis, involucrando una respuesta integradora de múltiples sistemas y órganos (McKeever, 2011). Frente a una situación de estrés se activan el sistema nervioso autónomo y el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal. La activación de estos sistemas induce aumentos rápidos en los niveles circulantes de adrenocorticotropina (ACTH), catecolaminas (epinefrina, noradrenalina) y cortisol, lo que permite que la medición de estas hormonas se utilice en la evaluación del estrés inducido por el ejercicio (Hyypä, 2005). Las catecolaminas aumentan la frecuencia cardíaca, la contractilidad cardíaca y el gasto cardíaco y también están involucradas en la respuesta respiratoria, aumentando el suministro de oxígeno frente al ejercicio (McKeever, 2011).

Las catecolaminas, junto con el cortisol, inducen hiperglicemia al activar el catabolismo del glucógeno y la gluconeogénesis (Hyypä, 2005). Además, el cortisol actúa como un agente antiinflamatorio y suprime la función inmunitaria (McKeever, 2011), produciendo un aumento en la relación neutrófilo:linfocito, generando neutrofilia y linfopenia. Esta relación es una de las formas de medir la respuesta al estrés, pudiendo ser relacionado con la intensidad del estresor y con la concentración de glucocorticoides circulantes (Guevara *et al.*, 2015).

Las respuestas plasmáticas de ACTH y catecolaminas durante el ejercicio son indicadores sensibles de la intensidad del ejercicio y se correlacionan con las concentraciones plasmáticas de lactato (McKeever, 2011). Esto debido a que cuando el ejercicio o trabajo alcanza cierto nivel, el metabolismo anaeróbico proporciona energía produciéndose un flujo de salida de ácido láctico desde las células a la sangre, aumentando el lactato sanguíneo (Art y Lekeux, 2005).

Un ejercicio muy intenso también se verá evidenciado en un aumento de la concentración plasmática de potasio (Harris, 1988), debido a que durante el ejercicio el potasio se mueve desde el músculo al plasma, y durante un ejercicio intenso este puede alcanzar valores tan altos como 8mmol/L en el plasma o más (Muriel, 2007). Para el caso de las mulas, no se cuenta con esta información.

La inducción de estrés oxidativo se asocia a un ejercicio intenso que puede tener una influencia negativa en la salud (Brkljača *et al.*, 2018). Cuando el equino realiza un ejercicio máximo, su consumo de oxígeno aumenta 60 veces por encima del valor basal, lo que desencadena la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fazio *et al.*, 2016). Es muy probable que estos ejemplares experimenten estrés oxidativo, el cual se produce por un desbalance entre mecanismos antioxidantes y la producción de moléculas oxidantes (Art y Lekeux, 2005). Este desbalance puede dañar los componentes celulares, especialmente el ADN, los lípidos y las proteínas (Brkljača *et al.*, 2018), y contribuir a cambios degenerativos asociados con el envejecimiento (Williams, 2016).

El ejercicio que resulta en daño muscular también inicia una respuesta organizada que finalmente concluye en la reparación del tejido dañado, de manera similar a una condición de infección, donde se genera una secuencia de reacciones de defensa, conocida como respuesta de fase aguda (APR). El inicio de un APR se correlaciona con la duración e intensidad del ejercicio físico (Arfuso *et al.*, 2020). Dentro de la APR se encuentra el Amiloide Sérico A (SAA), una proteína de fase aguda que a concentraciones elevadas puede indicar enfermedad, inflamación, trauma o estrés (Kay *et al.*, 2019).

Considerando estas respuestas fisiológicas diversas, es que se propone evaluarlas en un grupo de mulas sometidas a un ejercicio de rutina con distintos niveles de carga al lomo. Esto permitirá comprender la intensidad de la respuesta y la capacidad de recuperación de las mulas en el tiempo.

HIPÓTESIS

Al trasladar mayor carga, a igual distancia recorrida, las mulas presentarán un aumento de la concentración de variables hematológicas y bioquímicas indicadoras de estrés y daño muscular, además de una prolongación de su tiempo de recuperación a valores basales en comparación con mulas no cargadas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la carga de trabajo sobre indicadores sanguíneos de bienestar animal en mulas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de distintas cargas de trabajo sobre parámetros fisiológicos, hematológicos y bioquímicos antes y después de realizado el trabajo.
- Determinar el tiempo de recuperación de las mulas después del trabajo realizado a través del análisis de parámetros fisiológicos, hematológicos y bioquímicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de animales

Para este estudio se utilizaron 12 mulas adultas entre 8 y 13 años, machos y hembras, pertenecientes al Ejército de Chile, las cuales son empleadas para el transporte de carga y provisión de suministros. Los animales fueron seleccionados de acuerdo a las categorías establecidas en el estudio de Lagos *et al.* (2022), en el cual se realizó un análisis de componentes principales (PCA) según las medidas morfométricas y proporciones de las mulas. Estos índices morfométricos se elaboraron para evaluar la capacidad de carga de las mulas según su conformación física.

2. Evaluación del impacto del trabajo sobre parámetros hematológicos, bioquímicos y fisiológicos

Para poder evaluar el impacto del trabajo sobre parámetros hematológicos, bioquímicos y fisiológicos, se considerarán rangos preestablecidos descritos por Lagos y Tadich (2019), en el cual se construyeron intervalos de referencia (IR) con 170 mulas sobre 5 años de edad provenientes del Ejército. Estos IR fueron establecidos de acuerdo a las normas de la Sociedad Americana de Patología Clínica Veterinaria (ASVCP) y la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) (Lagos y Tadich, 2019).

Todos los animales en este ensayo recibieron su ración de heno de alfalfa en los horarios establecidos por el ejército. Además, se registró la temperatura y humedad ambiental, así como la altitud y pendiente del recorrido en cada ensayo, para lo cual se utilizó un equipo GPS (Garmin® forerunner 645) y un anemómetro (Benetech® GM816).

Se realizó un diseño experimental de cuadrado latino donde cada mula pasó por los 4 tratamientos a evaluar. Cada mula realizó cuatro viajes de 2 km transportando tres tipos de carga: leve, moderada e intensa de 80 kg (P1), 105 kg (P2) y 130 kg (P3) respectivamente, más un viaje control sin carga (P0). Estos viajes se efectuaron con intervalos de a lo menos 3 semanas entre ensayos para evitar sobreponer los efectos del ejercicio anterior. Para los

viajes con carga, en cada viaje participaron 4 mulas con 80 kg, 4 con 105 kg y 4 con 130 kg. Las que luego alternaron las cargas en los ensayos sucesivos.

3. Obtención de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la vena yugular y se dividieron en tubos con anticoagulante EDTA para la obtención de plasma y tubos sin aditivos para obtención de suero.

Debido a la rápida utilización y consumo de glucosa por parte de las células sanguíneas (Newmann, 2020), la glicemia se midió en terreno a través de tiras reactivas con el glucómetro Accutrend plus de Roche® validado para equinos.

Para el caso del lactato, el transporte y procesamiento de la muestra puede ser demasiado larga, pudiendo alterar los valores (Hauss *et al.*, 2014). Por este motivo, se midió en terreno mediante el dispositivo Accutrend plus de Roche® validado en equinos.

Las muestras se obtuvieron en diferentes tiempos pre y post trabajo, considerando un total de 7 tiempos de muestreo:

- En descanso y antes de comenzar el trabajo de carga (T0)
- Inmediatamente al término del trabajo (T1)
- Diez minutos después de terminado el trabajo (T2)
- Dos horas después de terminado el trabajo (T3)
- Al día siguiente de terminado el trabajo (T4)
- Tres días después de terminado el trabajo (T5)
- Cinco días después de terminado el trabajo (T6)

Los parámetros hematológicos y bioquímicos que se analizaron fueron:

- Variables hematológicas: Recuento de glóbulos rojos (RGR), recuento total de glóbulos blancos (RGB), linfocitos, neutrófilos y relación N:L

- Variables bioquímicas: Cortisol, glucosa, lactato, potasio, creatinina quinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), glutatión peroxidasa (GPx) y proteína amiloide sérica A (SAA),

Para las variables hematológicas RGR, RGB, linfocitos, neutrófilos y relación N:L, se realizaron recuentos diferenciales de leucocitos y morfología de eritrocitos en frotis teñidos con tinción de Romanowski (Corzap 1, Hemograma R) a $1000 \times$ (Olympus CX31R).

Las actividades plasmáticas de creatinina quinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH) y aspartato aminotransferasa fueron analizadas mediante kits humanos (Human R); y glutatión peroxidasa (GPx) de Ranser (Randox R). Todos los análisis bioquímicos se cuantificaron utilizando un autoanalizador (Metrolab 2300 R, Wiener Lab). El cortisol se determinó mediante radioinmunoensayo. El amiloide sérico A (SAA) se midió in situ con el kit de ELISA semicuantitativo EquiChek de Accuplex diagnostics, que detecta esta proteína en sangre. Los resultados de este test se interpretaron de la siguiente manera:

- 4 líneas visibles: Normal. Sin condición inflamatoria activa o significativa.
- 3 líneas visibles: Inflamación leve
- 2 líneas visibles: Inflamación leve a moderada
- 1 línea visible: Inflamación clínicamente significativa

4. Medición de variables fisiológicas

Se evaluó la frecuencia cardíaca (FC), frecuencia respiratoria (FR) y temperatura rectal (TR), y fueron registrados en los tiempos T0, T1, T2 y T3.

La frecuencia cardíaca se tomó mediante la auscultación con fonendoscopio; la frecuencia respiratoria se registró mediante la observación de la caja torácica y abdomen de la mula; y la temperatura rectal se registró con un termómetro digital.

5. Análisis de datos

Los datos fueron ingresados a una planilla Excel para efectos de estadística descriptiva, donde se calculó el promedio y desviación estándar (DS) de las 12 mulas. Luego se determinó si los datos tienen distribución normal mediante la prueba de Shapiro Wilk ($P > 0,05$). Se realizó ANOVA para medidas repetidas para evaluar diferencias en los parámetros entre los distintos tiempos. En caso de datos no paramétricos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Para evaluar las diferencias entre cargas se utilizó un ANOVA o Kruskal-Wallis según corresponda. Se estableció una significancia de $P < 0,05$. Todos los análisis fueron realizados con el programa Statistix, versión 8.0 para Windows.

Este estudio contó con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile. Certificado número 19263-VET-UCH.

RESULTADOS

Los ensayos se realizaron en los meses de noviembre y diciembre de 2019 con una temperatura que fluctuó entre los 32 y 39°C, humedad relativa promedio de 24% y a una altitud de entre 856 y 878 msnm. Los trayectos eran de 2 km cada uno y la marcha se realizó a una velocidad promedio de 4,6 km/h con un ritmo de 12,4 min/km.

1. Constantes fisiológicas

Para la frecuencia cardíaca (Fig.1) se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) para los 80 kg, 105 kg y 130 kg a la llegada, comparado con el tiempo basal y las dos horas post ejercicio. Entre cargas se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el tratamiento control (P0) y los 130 kg, siendo mayor en esta última, a la llegada del recorrido.

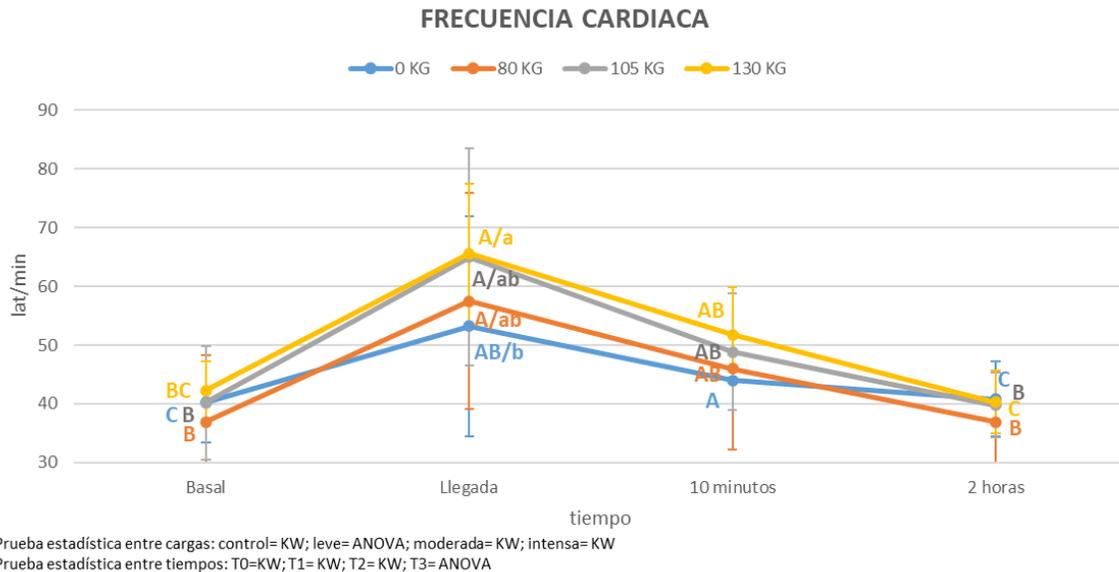


Figura 1: Cambios en la frecuencia cardiaca (FC) promedio (lat/min) de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestreo (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio y T3= 2 horas post ejercicio) para cada uno de los 4 tratamientos (control, 80kg, 105kg y 130kg). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

Para la frecuencia respiratoria (Fig.2) hubo un aumento significativo ($p < 0,05$) a la llegada para todos los tratamientos, recuperando sus valores basales a las dos horas.

Con respecto a la temperatura rectal (Fig.3), para el tratamiento control se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) a los 10 minutos comparado con el tiempo basal, mientras que, para los 80 kg se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) a la llegada y a los 10 minutos, comparados con el basal.

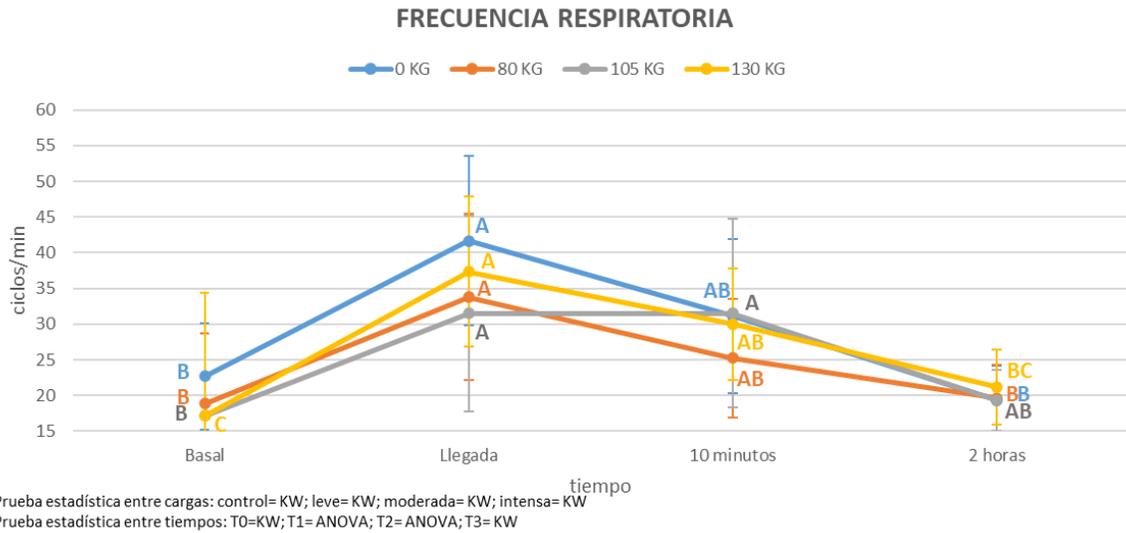


Figura 2: Cambios en la frecuencia respiratoria (FR) promedio (ciclos/min) de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestreo (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio y T3= 2 horas post ejercicio) para cada uno de los 4 tratamientos (control, 80kg, 105kg y 130kg). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

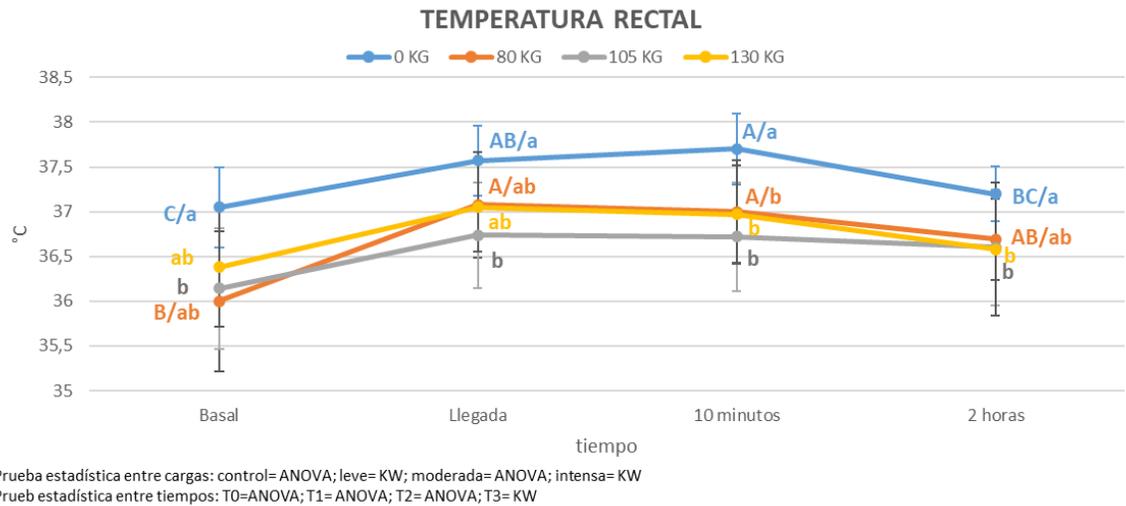


Figura 3: Cambios en la temperatura rectal (TR) promedio ($^{\circ}\text{C}$) de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestreo (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio y T3= 2 horas post ejercicio) para cada uno de los 4 tratamientos (control, 80kg, 105kg y 130kg). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

2. Variables hematológicas

Para el RGR (Fig. 4) y RGB (Fig. 5) no se observaron diferencias significativas entre tiempos ($p>0,05$) ni entre cargas ($p>0,05$) y sus concentraciones se mantuvieron dentro de los rangos fisiológicos. Para la relación neutrófilo:linfocito (Fig. 6) no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre tiempos, mientras que entre cargas hubo una diferencia significativa ($p<0,05$) para las cargas con peso (80kg, 105 kg y 130 kg) comparadas con el tratamiento control al día siguiente de terminado el trabajo, siendo mayor para las primeras.

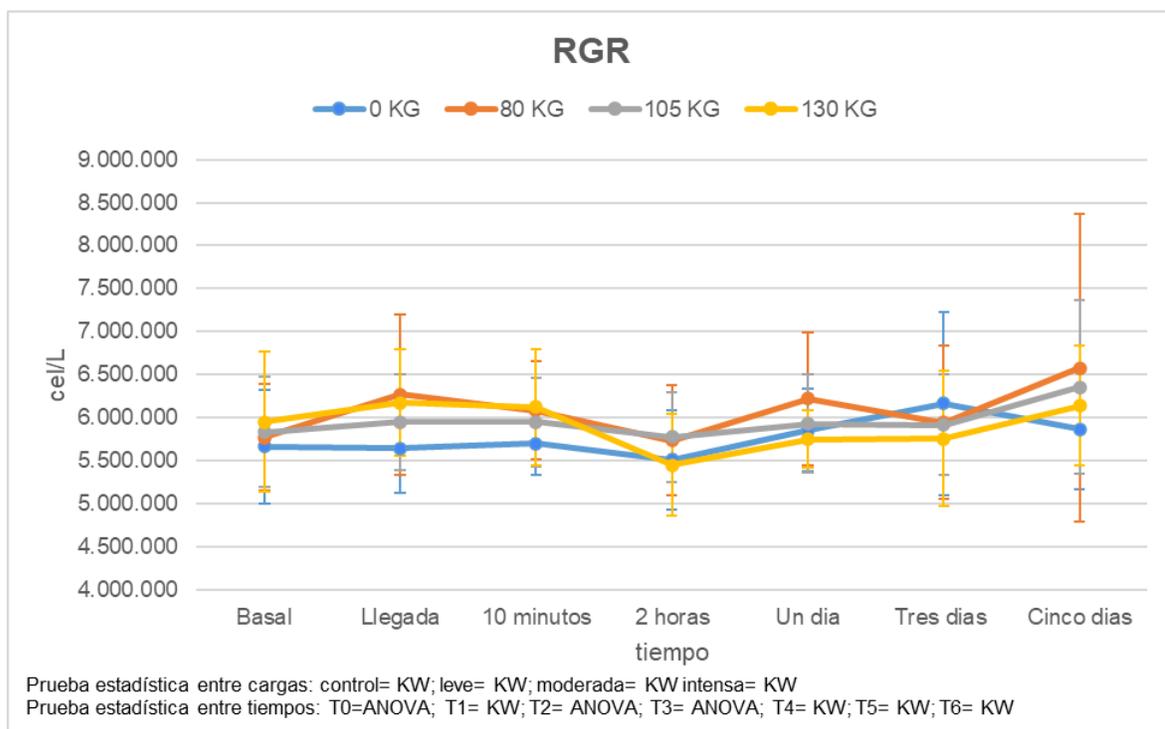


Figura 4: Cambios en el recuento de glóbulos rojos (RGR) promedio de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestreo (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio, T3= 2 horas post ejercicio, T4= 1 día post ejercicio, T5= 3 días post ejercicio, T6= 5 días post ejercicio) para cada uno de los 4 tratamientos (control, 80kg, 105kg y 130kg). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

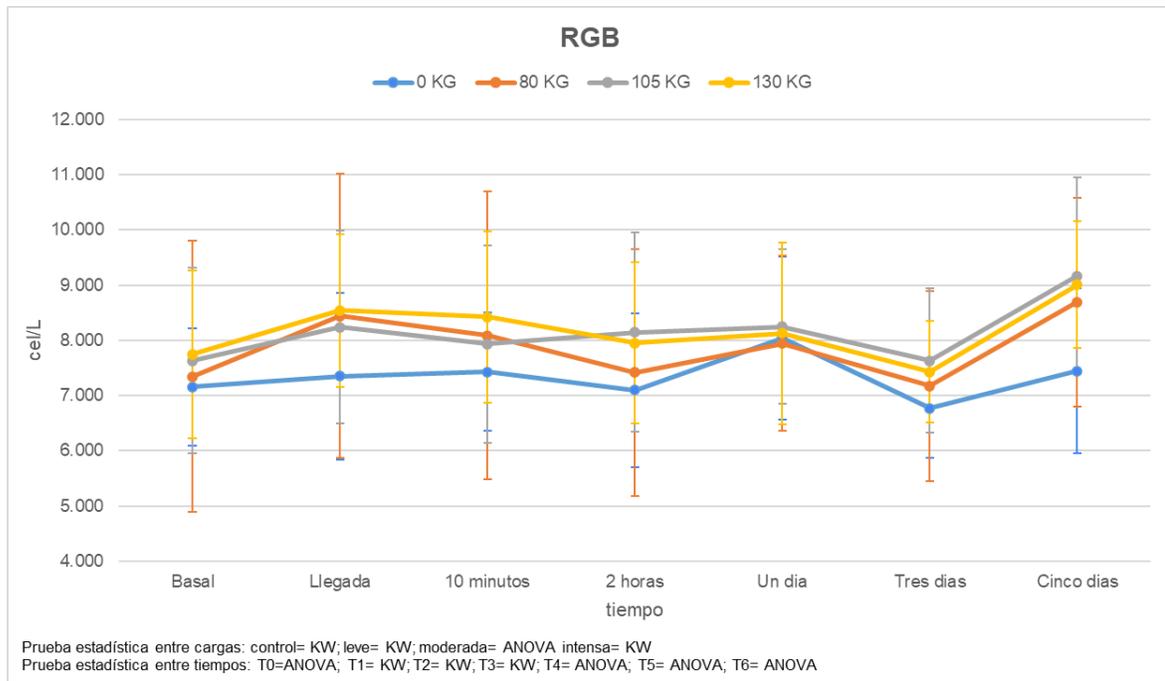


Figura 5: Cambios en el recuento de glóbulos blancos (RGB) promedio de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestreo (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio, T3= 2 horas post ejercicio, T4= 1 día post ejercicio, T5= 3 días post ejercicio, T6= 5 días post ejercicio) para cada uno de los 4 tratamientos (control, 80kg, 105kg y 130kg). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

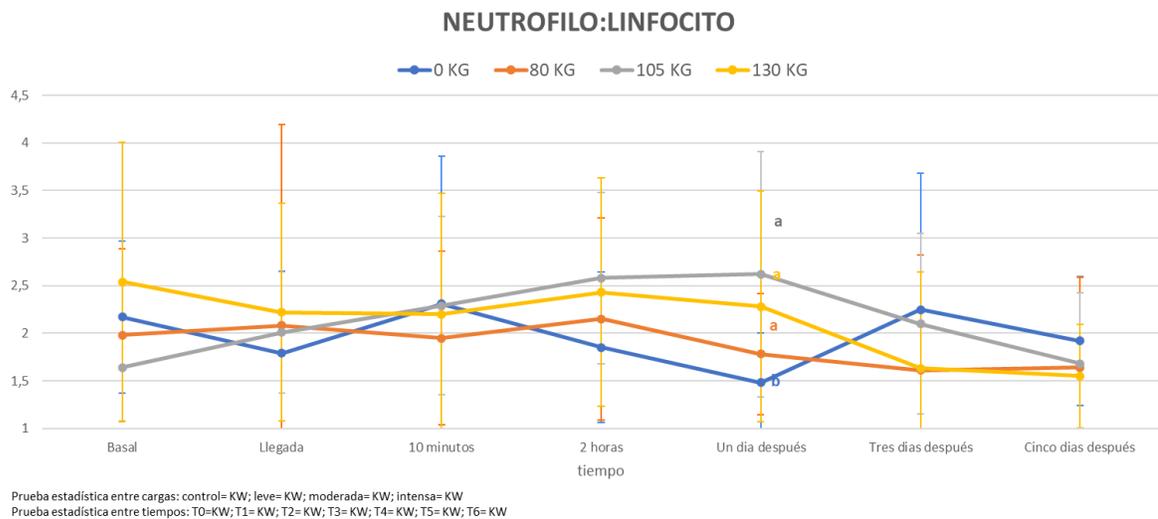
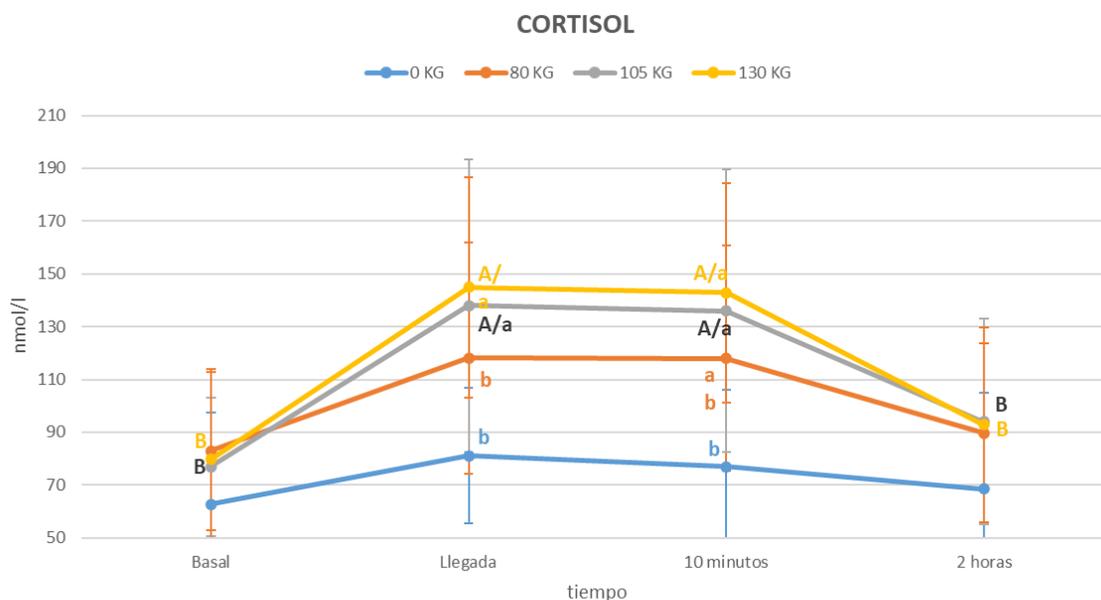


Figura 6: Cambios en la relación N:L promedio de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestreo (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio, T3= 2 horas

post ejercicio, T4= 1 día post ejercicio, T5= 3 días post ejercicio, T6= 5 días post ejercicio) para cada uno de los 4 tratamientos (control, 80kg, 105kg y 130kg). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

3. Variables bioquímicas

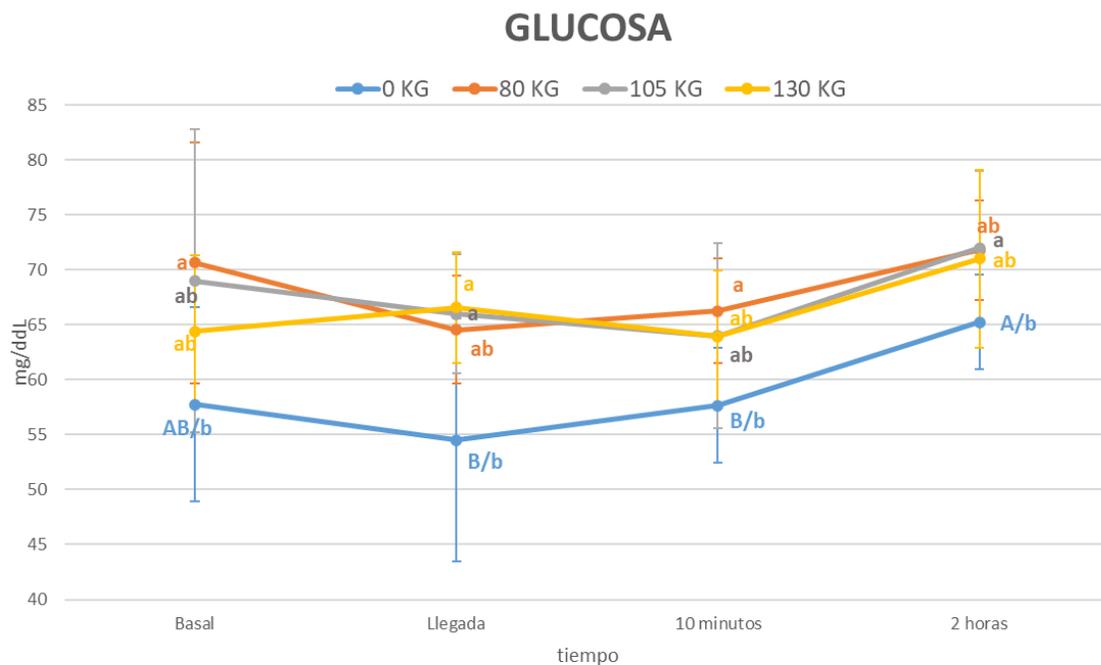
Para el cortisol (Fig.7), entre tiempos se observó un aumento significativo ($p<0,05$) para la carga moderada y carga intensa a la llegada y a los 10 minutos comparados con el basal y a las 2 horas de terminado el trabajo. Entre cargas hubo una diferencia significativa ($p<0,05$) a la llegada y a los 10 minutos, observándose concentraciones mayores para las cargas intensa y moderada versus el control.



Prueba estadística entre cargas: control= KW; leve= KW; moderada= KW; intensa= KW
 Prueba estadística entre tiempos: T0=KW; T1= KW; T2= KW; T3= KW

Figura 7: Cambios en el cortisol promedio de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestreo (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio y T3= 2 horas post ejercicio) para cada uno de los 4 tratamientos (control, 80kg, 105kg y 130kg). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

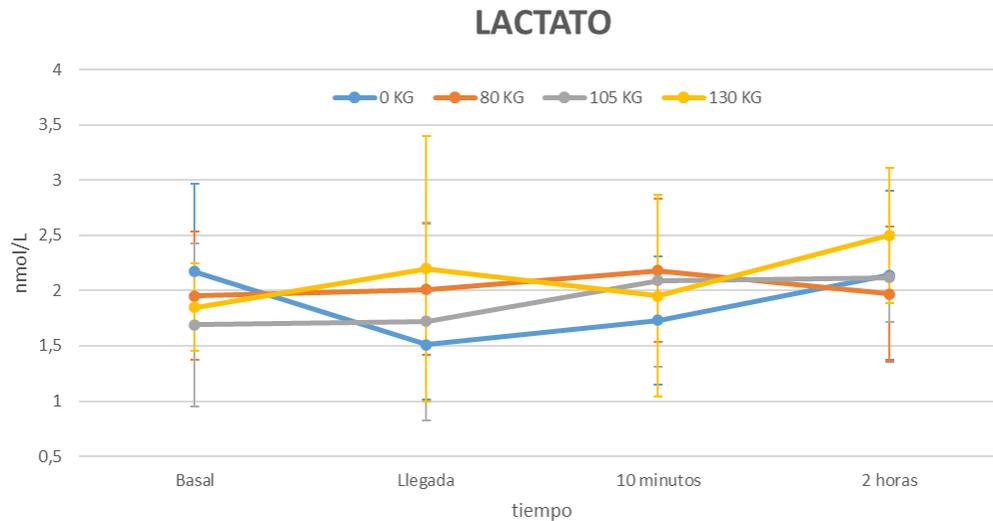
Para la glucosa (Fig.8), entre tiempos para el tratamiento control se observó una disminución significativa ($p<0,05$) a la llegada y a los 10 minutos comparados con las 2 horas de terminado el trabajo. Entre cargas, a la llegada del recorrido la concentración de glucosa fue significativamente mayor ($p<0,05$) para las cargas más pesadas (105 kg y 130 kg) comparadas con el control. A los 10 minutos la carga leve presenta una concentración significativamente mayor ($p<0,05$) que el tratamiento control.



Prueba estadística entre cargas: control= KW; leve= ANOVA; moderada= KW; intensa= ANOVA
 Prueba estadística entre tiempos: T0=KW; T1= KW; T2= ANOVA; T3= ANOVA

Figura 8: Cambios en las concentraciones de glucosa promedio de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestreo (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio y T3= 2 horas post ejercicio) para cada uno de los 4 tratamientos (control, 80kg, 105kg y 130kg). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

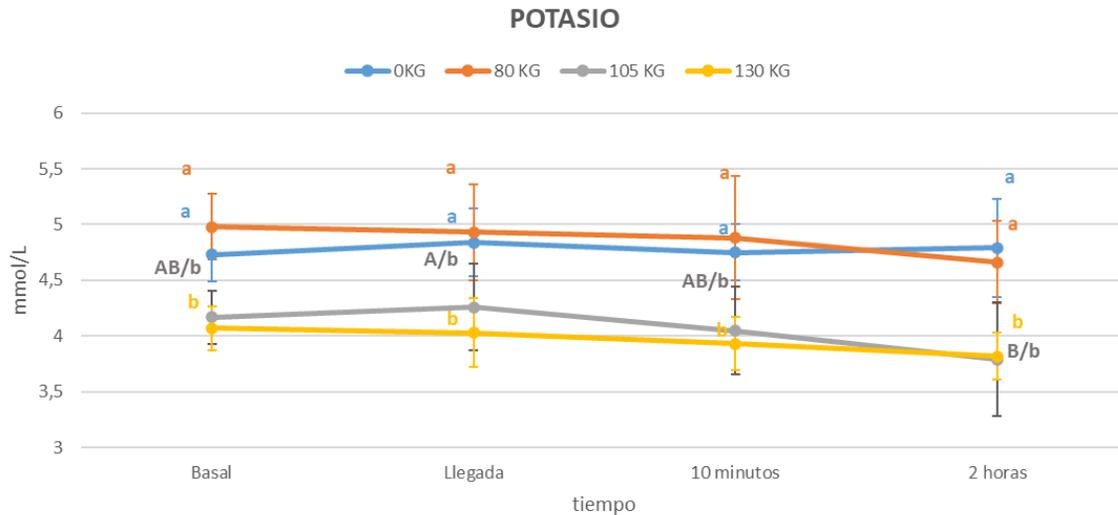
Para el lactato (Fig.9) no se observaron diferencias significativas entre tiempos ($p>0,05$) ni entre cargas ($p>0,05$). Los valores se mantuvieron dentro de los rangos fisiológicos.



Prueba estadística entre cargas: control= KW; leve= ANOVA; moderada= ANOVA; intensa= KW
 Prueba estadística entre tiempos: T0=ANOVA; T1= KW; T2= ANOVA; T3= ANOVA

Figura 9: Cambios en las concentraciones de lactato promedio de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestreo (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio y T3= 2 horas post ejercicio) para cada uno de los 4 tratamientos (control, 80kg, 105kg y 130kg). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

Para el potasio (Fig. 10) entre tiempos para la carga moderada se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la llegada del recorrido comparada con las dos horas, siendo mayor para el primero. Entre cargas, hubo una diferencia significativa ($p < 0,05$) en las concentraciones de potasio siendo más alto en el control y carga leve versus la carga moderada e intensa, en todos los tiempos. Estas diferencias significativas no sobrepasaron los rangos fisiológicos establecidos.



Prueba estadística entre cargas: control=KW; leve=KW; moderada=KW; intensa=ANOVA
 Prueba estadística entre tiempos: T0=KW; T1= ANOVA; T2= ANOVA; T3= ANOVA

Figura 10: Cambios en las concentraciones de potasio promedio de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestreo (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio y T3= 2 horas post ejercicio) para cada uno de los 4 tratamientos (control, 80kg, 105kg y 130kg). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

Con respecto a las enzimas musculares, en la Tabla Nro. 1 se muestran los promedios y desviación estándar (DS) de las concentraciones de CK, LDH y AST. Entre tiempos, para el tratamiento control se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en las concentraciones de CK, siendo más alta en los primeros tres tiempos (T0, T1 y T2) comparados con los cinco días después (T6); y para la carga leve, a la llegada del recorrido la concentración de CK fue significativamente más alta comparada con el T4 y T5, mientras que, entre cargas a los tres días se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) para la carga intensa comparado con la carga leve. Para la LDH, entre tiempos las concentraciones fueron significativamente más altas ($p < 0,05$) hasta los 10 minutos para la carga leve, comparadas con el día después del recorrido. También se observó que para el tratamiento control la concentración de LDH fue significativamente más alta ($p < 0,05$) a la llegada y a los 10 minutos, comparados con los tres días después. Entre cargas, a los tres días después del trabajo la LDH aumenta para la carga intensa, siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) comparada con el resto de las cargas. Por último, para la AST se observaron diferencias significativas entre cargas ($p < 0,05$), siendo mayores las concentraciones para el tratamiento control y la carga leve comparadas con la

carga moderada e intensa, durante todos los tiempos. Para todas las enzimas, las concentraciones se mantuvieron dentro de los rangos fisiológicos establecidos.

Tabla 1: Promedio y desviación estándar (DS) de las concentraciones de Creatinin Kinasa (CK), Lactato Deshidrogenasa (LDH) y Aspartato Aminotransferasa (AST). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tiempos dentro de una misma carga ($p < 0,05$). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre cargas para un mismo tiempo ($p < 0,05$). Última fila debajo de cada enzima indica prueba estadística utilizada entre tiempos dentro de una misma carga. Última columna indica prueba estadística utilizada entre cargas para un mismo tiempo.

Parámetro	Tratamientos	Basal (T0)	Llegada (T1)	10 Min. (T2)	2 horas (T3)	Un día (T4)	Tres días (T5)	Cinco días (T6)	Entre cargas
CK (UI/l)	Control	238,2±54,3 A	233,8±87,6 A	233,3±64,1 A	183,1±41,7 AB	186,3±37,6 AB	171,6±44,5 AB/ab	174,2±108,1 B	Kruskal Wallis
	80 kg	216,1±39,6 A	229,2±41,3 A	209,1±361 AB	202,6±35,8 AB	141±46 B	142±72,3 B/b	199,3±101,6 AB	Kruskal Wallis
	105 kg	228±146	241±111,7	215±105	179±99,7	210±93,2	218,8±109,6 ab	334,6±480,5	Kruskal Wallis
	130 kg	287,9±152,2	323,9±199,8	307,3±144,2	222,1±126,1	200±80	247,7±111,2 a	182,3±60,9	Kruskal Wallis
	Entre tiempos	Kruskal Wallis	Kruskal Wallis						
LDH (UI/L)	Control	792±88,5 AB	823,3±145,8 A	808,8±143,2 A	654,8±120,8 BC	587,6±124,8 C	482,3±104 D/b	465,4±110,1 D	ANOVA
	80 kg	685,3±215,7 A	716±174,6 A	674,2±189,6 A	544,6±191,8 AB	436,2±104,2 B	354,3±136 B/b	424,5±125,1 B	ANOVA
	105 kg	499±176,7	559±196,2	411±101,6	417±78,3	499±174,5	520,9±138,7 b	538,7±181	Kruskal Wallis
	130 kg	782±271	790±243	805,3±235,4	627,6±203,2	601,5±192,6	719,8±212,3 b	575±172,5	ANOVA
	Entre tiempos	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA	Kruskal Wallis	
AST (UI/L)	Control	296,5±26,8 a	303,6±52,5 a	295,0±28,3 ab	287,7±36,6 ab	292,5±23,3 ab	304,5±31 a	321,8±50,7 a	Kruskal Wallis
	80 kg	289,5±47,5 a	305,8±50,4 a	302,6±50,5 a	305,3±49,3 a	296,6±46,1 a	282,9±69,6 ab	303,4±54,4 ab	Kruskal Wallis
	105 kg	227,3±20,2 b	229,3±34 b	245±56 bc	241,8±47,2 b	241,7±44,0 b	230,6±59,9 b	224±18,9 bc	Kruskal Wallis
	130 kg	226,4±38,8 b	222,9±67,1 b	239,6±49,0 c	243,8±61±5 ab	243,1±44,9 ab	234±38,3 b	241,7±30,5 c	Kruskal Wallis
	Entre tiempos	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA	Kruskal Wallis	

Para la enzima antioxidante Glutación peroxidasa (GPx) entre cargas las concentraciones fueron significativamente más altas ($p < 0,05$) para los 105 kg durante todos los tiempos. A pesar de estas diferencias significativas, los valores para esta enzima se encontraban dentro de los rangos fisiológicos (Fig.11).

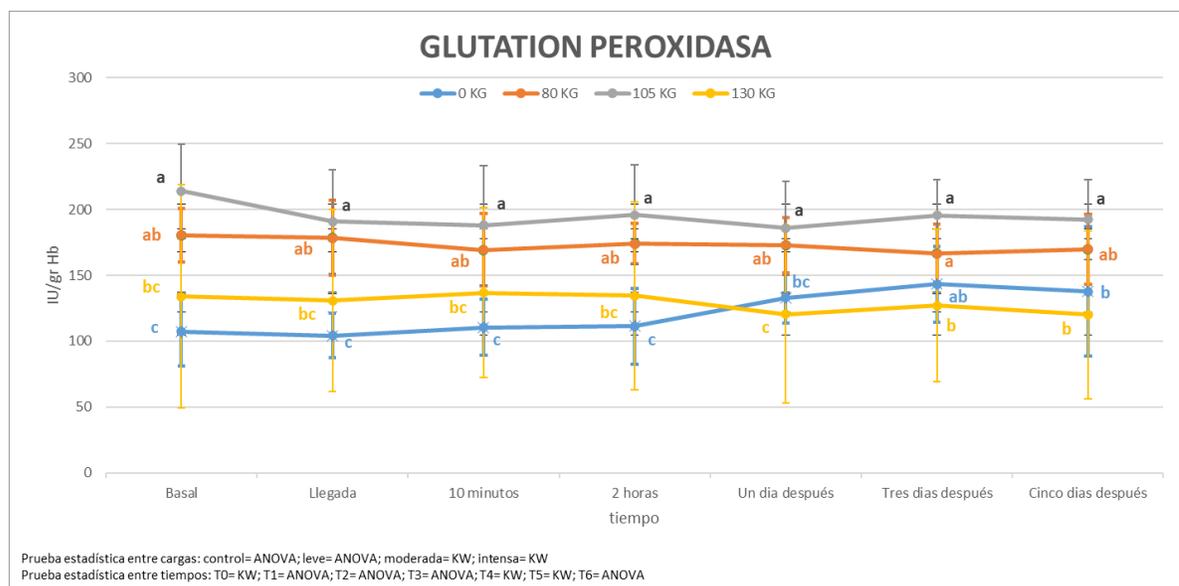


Figura 11: Cambios en las concentraciones promedio de GPx de las 12 mulas evaluadas de acuerdo al tiempo de muestro (T0= basal, T1= a la llegada, T2= 10 minutos post ejercicio y T3= 2 horas post ejercicio, T4= 1 día post ejercicio, T5= 3 días post ejercicio, T6= 5 días post ejercicio). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

Por último, para la proteína amiloide sérica A, entre tiempos se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para la carga intensa, presentando mayores concentraciones a los tres días de terminado el trabajo comparado con el basal. Para el resto de las cargas, no se encontraron diferencias significativas entre tiempos ($p > 0,05$) ni entre cargas ($p > 0,05$) (Fig.12).

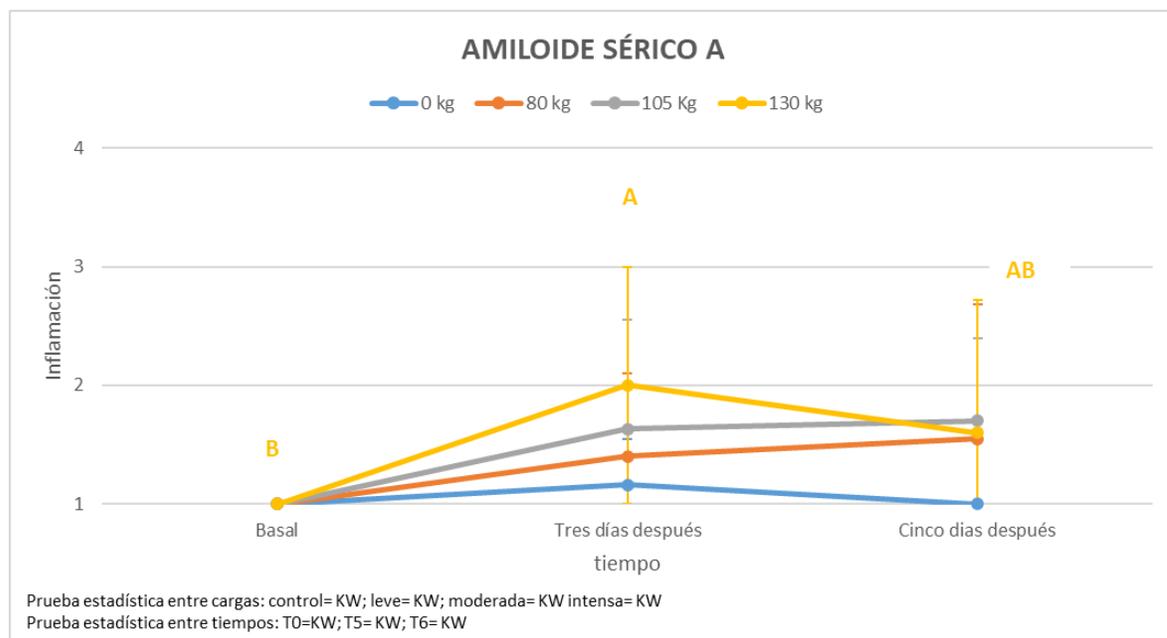


Figura 12: Grado de inflamación promedio de las 12 mulas evaluadas a través de la concentración de Amiloide Sérico A, según tiempo de muestreo. (1=Normal (<20 ug/ml); 2= Inflamación leve ([20-75 ug/ml]); 3= Inflamación moderada ([75-200 ug/ml]); 4= Inflamación significativa (>200 ug/ml)). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos dentro de una misma carga. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cargas en un mismo tiempo.

DISCUSIÓN

Variables fisiológicas

Para la frecuencia cardiaca (Fig.1), se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) a la llegada del recorrido comparado con el basal y a las dos horas para todos los tratamientos. Es probable que este aumento de FC este asociado con la actividad simpática y a la liberación de catecolaminas, que se incrementa con el aumento del trabajo (Babusci y López, 2007), y como se observó en este caso, hubo un leve incremento de la FC a medida que aumentaba la intensidad de carga, siendo significativo esta diferencia a la llegada ($p < 0,05$). Se ha descrito que en ejercicios de resistencia con un trabajo submáximo, la FC cardiaca alcanza valores de 120 lat/min (Babusci y López, 2007), tal como se observó en el estudio de Vergara y Tadich (2015) para equinos de tiro urbano sobre variables fisiológicas y sanguíneas en condiciones de campo, donde a la llegada de los recorridos se observaron promedios de FC similares a los obtenidos en el presente estudio. Una vez terminado el ejercicio se pudo observar un descenso rápido de la FC, lo que es coherente con otros estudios que han demostrado una disminución de este parámetro a los 30 segundos (Cabezas *et al.*, 1994), seguido por un descenso lento hasta alcanzar sus valores basales a los 25-30 minutos post-ejercicio (Babusci y López, 2007). Para el caso de las mulas, se observó esta tendencia en la disminución de la FC y a las dos horas sus valores estaban en rango basal. Se ha sugerido que aquellos equinos que presentan FC inferiores a 60 lat/min dentro de los 30 minutos de haber finalizado su actividad física no muestran signos de deshidratación y de lesión muscular (Cabezas *et al.*, 1994; Babusci y López, 2007). Por lo tanto, los datos obtenidos para la FC dan cuenta de que las mulas fueron expuestas a un esfuerzo de características submaximales, que concuerda con el resto de los resultados observados.

Con respecto a la frecuencia respiratoria (Fig. 2), entre tiempos se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) a la llegada del recorrido para todos los tratamientos. Este aumento significativo coincide con el incremento de la FC para el mismo tiempo (T1) lo cual demuestra la inducción de una mayor demanda de oxígeno y el necesario incremento de la ventilación alveolar para eliminar el aumento de dióxido de carbono producido (Vergara y Tadich, 2015). Si bien se evidenció un aumento numérico de la FR a la llegada del recorrido

entre cargas, el cual fue mayor a medida que aumentaba la carga, este no fue significativo ($p > 0,05$). No obstante, es importante mencionar que en el tiempo basal (T0) y a la llegada (T1) la FR fue más alta para el control, lo cual puede deberse a factores psicogénicos por parte de las mulas, ya que estos son animales de hábitos, y los cambios en las rutinas los harán desconfiar de la situación y, en ocasiones, se volverán más difíciles de manejar (McLean *et al.*, 2019). La manipulación por parte de personas desconocidas, el traslado al lugar del ensayo y el atalaje durante el primer ensayo son factores estresantes que se manifiestan sistémicamente con aumentos en la FC, FR, temperatura y cambios de comportamiento (McLean *et al.*, 2019). La misma situación se observó para la temperatura (Fig. 3) en la carga control, la cual fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la carga moderada, lo que puede ser explicado por los motivos anteriores ya que el recorrido control fue el primero en realizarse. Entre tiempos se observó un leve aumento de la temperatura a la llegada del recorrido (T1) para todos los tratamientos siendo significativo este incremento ($p < 0,05$) solo para la carga liviana. Aproximadamente el 75 - 80% de la energía producida durante la conversión de energía química a mecánica es perdida en forma de calor (González y Naranjo, 2015), calor que se debe disipar para evitar un aumento de la temperatura corporal que ponga en peligro la vida. El equino controla este aumento principalmente por evaporación del sudor, vasodilatación y polipnea térmica (Art y Lekeux, 2005). En ejercicios de alta intensidad, el ritmo de producción de calor es mayor al de disipación de este, lo cual resulta en un incremento de la temperatura muscular, mientras que en ejercicios de baja intensidad o submaximales, los mecanismos de disipación de calor logran disminuir la temperatura corporal (González y Naranjo, 2015). Los ensayos descritos aquí demostraron que, a mayor intensidad de carga, hay un mayor esfuerzo físico por parte de las mulas que se ve reflejado en incrementos en las FC y FR, debido a una mayor demanda metabólica del sistema músculo esquelético. A pesar de estos incrementos, las mulas pudieron compensar el aumento de temperatura corporal, hecho que se constata mediante la sudoración de los animales y que se expresa en disminuciones en las concentraciones de potasio mencionadas más adelante. Estos resultados sugieren que el trabajo realizado en este estudio fue de baja intensidad.

Variables hematológicas

El ejercicio tiene efectos variables en el hemograma dependiendo de la intensidad del trabajo y generalmente resulta en la movilización de eritrocitos esplénicos, lo que aumenta la capacidad de transporte de oxígeno (Kingston, 2008). La liberación de eritrocitos esplénicos está bajo la influencia de catecolaminas, y tanto la intensidad como la duración del ejercicio son importantes para determinar la magnitud de la respuesta a estas (Kingston, 2008). Para el caso de los leucocitos, en ejercicios de resistencia se puede presentar neutrofilia, linfopenia y leucocitosis, debido probablemente a un aumento en los corticoesteroides circulantes (Warwick y Kline, 2007; Kingston, 2008). En el presente estudio, se observó un leve aumento en el recuento de glóbulos rojos (RGR) (Fig.4) para las cargas leve, moderada e intensa a la llegada del recorrido (T1). Además, se observó que la cantidad de eritrocitos fue mayor en las cargas con peso, comparadas con el control. Estas variaciones no fueron significativas entre tiempos ($p > 0,05$) ni entre cargas ($p > 0,05$). Al igual que para los eritrocitos, los leucocitos (RGB) (Fig. 5) no se afectaron frente a la intensidad de carga, y no se observaron diferencias significativas entre tiempos ($p > 0,05$) ni entre cargas ($p > 0,05$), por lo tanto, la intensidad de carga no causó alteraciones significativas en estos dos parámetros.

Variables bioquímicas

La liberación de cortisol en el equino parece verse afectada tanto por la intensidad y duración del ejercicio (McKeever y Gordon, 2008), y tal como lo demuestra el presente estudio, a medida que aumentó la intensidad de carga, las concentraciones plasmáticas de cortisol también aumentaron, observándose una diferencia significativa ($p < 0,05$) en relación con el control. Los aumentos excesivos en las concentraciones de cortisol y tiempos prolongados en su recuperación después de un esfuerzo puede ser un indicador de demasiado ejercicio, así como las concentraciones plasmáticas excesivamente altas o bajas pueden ser marcadores de sobreentrenamiento en el caballo (McKeever y Gordon, 2008). Para el caso de las mulas, el cortisol no superó el rango superior establecido (473,6 nmol/L); adicionalmente, las concentraciones más altas se presentaron a la llegada y los 10 minutos; y a las 2 horas de terminado el trabajo sus concentraciones ya estaban normalizándose. Estos hallazgos coinciden con lo descrito en la literatura, donde se indica que el “peak” de cortisol ocurre

entre los 5 a 30 minutos post ejercicio (Guevara *et al.*, 2015). Esta leve variación del cortisol observada en el presente estudio es concordante con lo ya descrito, y apunta a que el trabajo fue de baja magnitud. Una situación similar se observó en el estudio de Vergara y Tadich (2015) en donde no se observaron variaciones sobre este parámetro a distintas cargas de trabajo en caballos de tiro. Además, la relación N:L (Fig. 6) tampoco tuvo aumentos significativos ($p < 0,05$) entre tiempos, tal como se visualizó en las mulas, ya que, si bien se observó un aumento en la relación N:L para la carga leve, moderada e intensa a las 2 horas, este aumento no fue significativo entre tiempos ($p > 0,05$). Si bien entre cargas hubo una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la carga moderada ($2,62 \pm 1,28$) y la carga control ($1,48 \pm 0,52$) al día después de realizado el trabajo, este aumento puede estar relacionado a la leve alza de cortisol, pero al no superar los rangos fisiológicos, se deduce que fue un ejercicio que no produjo una situación lo suficientemente estresante para generar cambios en este parámetro. En general, la relación N:L es un indicador más confiable que el cortisol para medir estrés (Vergara y Tadich, 2015), y en condiciones fisiológicas normales varía entre 0,8-2,8. Cuando esta relación alcanza valores de 10:1 y existe desviación a la izquierda (mayor número de neutrófilos inmaduros que maduros) es indicadora de agotamiento, estrés y exceso de entrenamiento (Warwick y Kline, 2007).

El ejercicio físico, en cualquiera de sus formas, consiste en la conversión de energía química en movimiento (Pérez *et al.*, 1992). Por lo tanto, la cantidad de movimiento que puede ser aplicada a un peso determinado depende principalmente del nivel de energía disponible y la rapidez con que las reservas energéticas son movilizadas para mantenerlo (Pérez *et al.*, 1992). El valor de glicemia generalmente aumenta con cualquier forma de ejercicio, debido a la estimulación de la glucogenólisis hepática. Sin embargo, ante un ejercicio prolongado la concentración de glucosa disminuye, debido a una disminución del glucógeno hepático (Osorio, 2008), hecho que se observó a la llegada del recorrido (T1) para el tratamiento control, carga leve (80 kg) y carga moderada (105 kg), mientras que para la carga intensa (130 kg) hubo un descenso de la glucosa a los 10 minutos (T2), sin ser cambios significativos entre tiempos ($p > 0,05$) (Fig. 8). Esta disminución tardía de la glucosa para la carga intensa pudo deberse a una mayor duración e intensidad del trabajo muscular realizado (Pérez *et al.*, 1992). Al comparar entre cargas, se observaron valores significativamente más altos ($p < 0,05$) para las cargas más pesadas comparadas con el control a la llegada del recorrido (T1). Este

aumento en la glucosa para las cargas más pesadas coincide con los resultados obtenidos en el estudio de Pérez *et al.* (1992) en donde se observaron aumentos significativos de glucosa para la carga mediana y pesada de equinos de tiro sometidos a una tracción prolongada, lo que sugiere que los niveles de glicemia varían de acuerdo a un mayor esfuerzo físico al aumentar la intensidad de carga.

Para el lactato (Fig. 9) no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre tiempos ni entre cargas. Se observó un leve aumento para la carga intensa ($2,2 \pm 1,2$ mmol/L) a la llegada (T1) sin superar el rango superior (4mmol/L). Se observó un comportamiento similar para el lactato en el estudio realizado por Vergara y Tadich (2015), el cual no tuvo grandes variaciones relacionadas a la carga de trabajo, esto se debe a que este tipo de trabajo de tiro tiene características de un ejercicio de resistencia de baja intensidad y con un esfuerzo submaximal (Vergara y Tadich, 2015), similar al trabajo realizado por las mulas. El trabajo de resistencia es por naturaleza aeróbico, y cuando los requerimientos de energía superan la capacidad de suministro a través del metabolismo aeróbico, el animal recurre a la glicólisis anaeróbica como fuente productora de energía; en consecuencia, se produce la salida de ácido láctico desde las células a la sangre, y aumenta el lactato sanguíneo (Art y Lekeux, 2005; Pérez *et al.*, 1992). Es probable que este ligero incremento en el lactato para la carga más intensa se deba a una mayor demanda de energía por parte de la musculatura, que involucra la participación de mecanismos anaeróbicos de obtención de energía (Pérez *et al.*, 1992).

Durante la contracción muscular, el potasio plasmático (K^+) se pierde de las células musculares y esto se refleja en un aumento de la concentración plasmática de K^+ (Art y Lekeux, 2005), por lo que este leve aumento para la carga moderada indica un mayor esfuerzo físico comparado con el resto de los tratamientos. El K^+ usualmente aumenta durante e inmediatamente después del esfuerzo, para disminuir en las dos horas siguientes paralelamente al aumento de glucosa y la recuperación de fluidos (Trigo, 2006). Para los tratamientos con carga que requerían de mayor esfuerzo físico, se observó una disminución del potasio a las dos horas que puede deberse a la pérdida de potasio a través del sudor (Pérez *et al.*, 1992). Adicionalmente, una fracción significativa de esta caída también se debe a la recaptación que se produce hacia el interior de la célula muscular, los eritrocitos y el hígado, gatillada por la unión de catecolaminas a receptores β -adrenérgicos y la activación de la

bomba de Na⁺-K⁺ (Valdés *et al.*, 2010). También se observó que entre cargas hubo una diferencia significativa ($p < 0,05$) en las concentraciones del catión, siendo mayor para las cargas con menos peso (control y leve) en todos los tiempos de muestreo. A pesar de estas diferencias, las concentraciones se mantuvieron siempre dentro de los rangos fisiológicos establecidos, por lo que hay que tener presente que las concentraciones séricas de los electrolitos pueden variar considerablemente entre individuos y podrían evidenciarse valores muy distintos según la dieta, edad y nivel de actividad del animal (Warwick y Kline, 2007). Por último, en equinos la concentración de K⁺ está relacionada con la carga de trabajo, y un esfuerzo de alta intensidad puede conducir a una concentración superior a 10 mmol/L (Art y Lekeux, 2005). Lo anterior corrobora que estos ensayos con carga no significaron un gran esfuerzo físico por parte de las mulas, ya que los valores nunca superaron el rango superior de 6,4 mmol/L.

En cuanto a las enzimas musculares (Tabla 1), se observó un leve aumento en las concentraciones de CK y LDH para los 130 kg, a la llegada del recorrido (T1) y a los 10 minutos (T2), sin embargo, este aumento no fue significativo ($p > 0,05$). Con respecto a la AST, se observó que entre cargas para todos los tiempos hubo una diferencia significativa ($p < 0,05$) en las concentraciones, siendo mayor para el control y los 80 kg. El estudio de estas tres enzimas en conjunto es utilizado para el diagnóstico de miopatías en equinos. Estas enzimas no son específicas del tejido muscular, pero el aumento de sus concentraciones asociadas a la sintomatología clínica puede aportar valor diagnóstico (Aliquo, 2016). Según Warwick y Kline (2007), equinos con rabdomiólisis por esfuerzo pueden presentar una concentración de CK plasmática entre 10 y 900 veces mayor, mientras que para la AST se presentan concentraciones entre 5 y 100 veces mayor. La intensidad y duración del ejercicio es clave en la actividad plasmática de estas enzimas (Vergara y Tadich, 2015), y para este estudio se observó que para la carga más intensa (130 kg) el aumento de CK y LDH fue mayor. Sin embargo, estos valores no superaron los valores fisiológicos máximos para las tres enzimas, por lo tanto, este aumento puede ser explicado por un incremento en la permeabilidad del sarcolema que contiene a las enzimas frente al incremento de la actividad celular durante el ejercicio (Aliquo, 2016) y no indicarían daño muscular.

Con respecto a la Glutatión Peroxidasa (Fig.11), esta es una enzima selenio dependiente que se relaciona funcionalmente con la vitamina E participando en la defensa de la célula contra el daño oxidativo producido por especies reactivas del oxígeno (ROS). El Selenio forma parte de la estructura de esta enzima, y en equinos se ha demostrado que existe una correlación entre la actividad sanguínea de GPx y la concentración de Se en sangre (Rioseco *et al.*, 2013). La expresión de esta enzima antioxidante se eleva de una forma dependiente del nivel de los ROS (Carvajal, 2019). En este estudio las concentraciones de GPx no presentaron cambios significativos entre tiempos ($p>0,05$) para las diferentes cargas, mientras que entre cargas se observó una diferencia significativa ($p<0,05$) entre la carga moderada y el control, alcanzando las concentraciones más altas para la carga moderada. A pesar de estas diferencias significativas, las concentraciones de esta enzima se mantuvieron dentro del rango establecido para los tratamientos con carga (80 kg, 105 kg y 130 kg), mientras que para el tratamiento control se observó que antes de empezar el recorrido (T0) y a la llegada (T1) las concentraciones de GPx se encontraban por debajo del rango inferior (110,5-268,8 IU/gr Hb), lo que podría sugerir un déficit de selenio en la alimentación (Montero, 2016). Sin embargo, se debe tener en consideración que aún no hay valores de referencia de GPx en suero para mulas que permitan determinar la existencia de un déficit de selenio (Lagos y Tadich, 2019), por lo que se debe ser cauteloso al relacionar ambos elementos. Salvo estas disminuciones de GPx en el tratamiento control, para el resto de las cargas se mantuvieron dentro de rango, lo que sugiere que el trabajo realizado no produjo estrés oxidativo.

Por último, el amiloide sérico A es la principal proteína de fase aguda en los equinos, reconocida como el indicador más sensible de la respuesta de fase aguda en esta especie (Witkowska-Piłaszewicz *et al.*, 2019). Las concentraciones plasmáticas normales de SAA en caballos son prácticamente indetectables; si las concentraciones aumentan en un rango de 10 a 1000 veces durante la respuesta de fase aguda, pueden indicar alguna forma de inflamación o daño tisular (Kay *et al.*, 2019). Su concentración aumenta tan pronto como 6 horas después de la estimulación con infección o lesión tisular y dentro de las 24-48 horas puede ser de hasta 1000 veces la concentración inicial. Cuando se resuelve la inflamación, la concentración de SAA cae dentro de las 12 horas (Witkowska-Piłaszewicz *et al.*, 2019). Para este estudio se observó (Fig.12) un aumento significativo ($p<0,05$) en las concentraciones de SAA a los tres días de terminado el trabajo para la carga más intensa, predominando una

inflamación leve (75-200 ug/ml), y a los cinco días (T6) la inflamación empieza a disminuir. Para el tratamiento control y carga leve la recuperación fue más rápida y a los cinco días de terminado el trabajo (T6) todas las mulas presentaban concentraciones del SAA dentro de los rangos normales (<20 ug/ml). Es importante mencionar que se ha visto que la respuesta inflamatoria de las mulas puede ser menor que la de los equinos y burros, tal como lo demuestra Kay *et al.*, (2019), donde compararon los valores de SAA en équidos de trabajo, incluidas mulas, burros y caballos, esto puede deberse a que las características específicas de una especie híbrida pueden afectar la tasa de respuesta inflamatoria o la concentración de SAA con el tiempo.

Los resultados obtenidos para el SAA en el presente estudio dan cuenta de que el esfuerzo realizado fue de baja intensidad, si bien se observó una ligera tendencia a aumentar la inflamación a medida que aumenta la intensidad de carga, esta inflamación fue leve mostrando una recuperación adecuada por parte de las mulas. Se sugiere para estudios posteriores establecer rangos para las concentraciones de SAA en mulas clínicamente sanas y de esta manera evitar posibles sesgos al compararlas con las de equinos.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio dan cuenta de que el esfuerzo realizado por parte de las mulas fue de baja intensidad y las alteraciones observadas en algunos parámetros son cambios esperables frente a un estímulo estresante. La intensidad de carga implica un mayor esfuerzo por parte de las mulas lo que se ve reflejado en alteraciones significativas de algunos parámetros, pese a estos cambios significativos, el trabajo realizado no fue indicativo de fatiga y daño muscular, manifestándose con tiempos de recuperación adecuados sin perjuicios en su bienestar animal. Lo anterior demuestra que las mulas del ejército no son sometidas a exceso de carga, aunque se sugiere evaluar estas mismas variables frente a trayectos más largos. Por último, este estudio es una de las primeras aproximaciones a la evaluación de parámetros sanguíneos y hematológicos con intervalos de referencia (IR) adecuados para esta especie híbrida, lo que nos permite tener una visión más objetiva de los cambios que se presenten frente a condiciones estresantes (o patológicas) y evitar errores diagnósticos al ser comparados con equinos.

BIBLIOGRAFÍA

ALIQUO, K. 2016. Evaluación de la integridad y metabolismo energético muscular en equinos en entrenamiento para prueba completa. Tesis Doctor en Ciencias Veterinarias. Montevideo, Uruguay. U. de la República. Fc. de Veterinaria. 72p

ARFUSO, F.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; PANZERA, F.; PICCIONE, G. 2020. Training program intensity induces an acute phase response in clinically healthy horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 88: 102986

ART, T.; LEKEUX, P. 2005. Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. *Livestock Production Science* 92:101– 111

BABUSCI, M.; LÓPEZ, E. 2007. Sistema Cardiovascular. In: Boffi, F. (ed). Fisiología del ejercicio en Equinos. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. pp 123-132

BRKLJACA, N.; GOTIC, J.; SURAN, J.; BROZIC, D.; KLOBUCAR K.; KRUNOSLAV, B.; ZORAN, V. 2018. Effect of prolonged submaximal exercise on serum oxidative stress biomarkers (d-ROMs, MDA, BAP) and oxidative stress index in endurance horses. *BMC Veterinary Research* 14(216): 1-10

BROOM, D.M. 1986. Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal* 142(6): 524-526

CABEZAS, I.; VALENZUELA, S.; MERINO, V.; RIQUELME, J.; GARCÍA, M.; HETZ, E.; PÉREZ, R. 1994. Rendimiento físico, requerimientos energéticos y adaptación fisiológica del caballo de tiro en faenas de aradura. *J. Vet Med A.* 39: 215-222

CARVAJAL, C. 2019. Especies reactivas del oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal de Costa Rica.* 36(1): 91-100

FAZIO, F.; CECCHINI, S.; SAOCA, C.; ROCCHINA, A.; LANCELLOTTI, M.; PICCIONE, G. 2016. Relationship of some oxidative stress biomarkers in jumper horses after regular training program. *Journal of Equine Veterinary Science* 47:20–24

GONZÁLEZ, D.; NARANJO, T. 2015. Evaluación de lactato sistémico y CK en caballos sometidos a diferentes tipos de ejercicio. [en línea]. <
http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4640/1/UDLA-EC-TMVZ-2015-11.pdf?fbclid=IwAR0_AS-me7rf4StMZC_ildamKhSDQgBvm78dwTMntWyKnDFdyATA_daymM1g >
[consulta: 26-04-2022]

GONZÁLEZ, I.; TORRES, C.; CHIHUAILAF, R.; NEIRA, V. 2018. Differences in blood parameters associated to stress response between Chilean rodeo horses and Chilean urban working horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 73:110-114

GUEVARA, F.; RAMIREZ, A.; URQUIETA, B.; GODOY, A. 2015. Determinación de Algunas variables sanguíneas y su relación con el ejercicio en Equinos Fina Sangre de Carrera en entrenamiento competitivo. *Avances en Ciencias Veterinarias* 30(1-2):10-16

HAMEED, A.; TARIQ, M.; ASIM, M. 2016. Assessment of Welfare of Working Donkeys and Mules Using Health and Behavior Parameters. *Journal of Agricultural Science and Food Technology* 2(5): 69-74

HARRIS, P.; SNOW, DH. 1988. The effects of high intensity exercise on the plasma concentration of lactate, potassium and other electrolytes. *Equine Veterinary Journal* 20(2): 109-113.

HAUSS, A.; STABLEIN, C.; FISHER BS, A.; GREENE, H.; YVETTE, S. 2014. Validation of the Lactate Plus Lactate Meter in the Horse and Its Use in a Conditioning Program. *Journal of Equine Veterinary Science* 34:1064-1068.

HYPPA, S. 2005. Endocrinal responses in exercising horses. *Livestock Production Science* 92:113– 121

ISHIZAKA, S.; AURICH, J.; ILLE, N.; AURICH, C.; NAGEL, C. 2017. Acute Physiological Stress Response of Horses to Different Potential Short-Term Stressors. *Journal of Equine Veterinary Science* 54:81-86

KAY, G.; TLIGUI, N.; SEMMATE, NOHA.; AZRIB, R.; NAVAS, F.J.; BRIZGYS, L.; MCLEAN, A. 2019. Determining factors and interspecific modeling for serum amyloid a concentrations in working horses, donkeys, and mules. *Research in Veterinary Science* 125: 256–265

KINGSTON, J. 2008. Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training. *In:* Hinchkliff, K.; Geor, R.; Kaneps, A. (Eds.). *Equine Exercise Physiology: The science of exercise in the athletic horse*. Elsevier Health Sciences. Philadelphia, Estados Unidos. pp 398-409

LAGOS, J; TADICH, T. 2019. Hematological and Biochemical Reference Intervals for Mules in Chile. *Frontiers in Veterinary Science* 6(400):1-7

LAGOS, J.; ROJAS, M., TADICH, T. 2022. Morphological Characteristics, Preferences, and Perceptions of the Ideal Working Mule. *J Equine Vet Sci.* 108:103821

LOREN, G. 2015. Los animales y la guerra. [en línea] <<https://www.historiaveterinaria.org/update/articulo-los-animales-y-la-guerra-glg-1457348304.pdf>> [consulta: 06-09-2020]

MCKEEVER, K. 2011. Endocrine Alterations in the Equine Athlete: An Update. *Veterinary Clinics: Equine Practice* 27:197–218

MCKEEVER, K.; GORDON, M. 2008. Endocrine alteractions in the equine athlete. *In:* Hinchkliff, K.; Geor, R.; Kaneps, A. (Eds.). *Equine Exercise Physiology: The science of exercise in the athletic horse*. Elsevier Health Sciences. Philadelphia, Estados Unidos. Pp 274-299

MCLEAN, A.; NAVAS, F.; CANISSO, I. 2016. Donkey and Mule Behavior. *Vet. Clin. Equine.* 35:575-588

MONTERO, R. 2016. Relación del estatus de selenio de caballos Pura Raza Chilena con su resultado de competencia de rodeo. Memoria de Título Médico Veterinario. Valdivia, Chile. U. Austral de Chile. Fc. Cs Veterinarias. 24p

MURIEL, M. 2007. Equilibrio Hidroelectrolítico. *In:* Boffi, F, (ed). Fisiología del ejercicio en Equinos. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. pp 133-143

NEWMANN, A. 2020. Practical Tips on Sample Handling for Hematology, Chemistry, and Cytology Testing for Equine Patients: Getting More Bang for your Buck. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 36:1-14

OSORIO, J. 2008. Cambios fisiológicos de variables sanguíneas como respuesta a la competencia de salto en equinos atletas. [en línea] < https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/161 > [consulta: 03-05-2022]

PÉREZ, R.; RECARREN, S.; ISLAS, A.; JARA, C.; VALDÉS, P.; JETZ, E. 1992. Glucosa, ácido láctico y equilibrio ácido-base en equinos de tiro sometidos a ejercicio de tracción prolongada. *Arch. Med. Vet.* 24(1): 43-51

RIOSECO, M.; NORO, M.; CHIHUAILAF, R.; WITWER, F. 2013. Estatus de selenio en equinos Criollo-Chileno a pastoreo y su respuesta a la suplementación. *Rev. MVZ Córdoba* 18(3): 3822-3828

SEID, G.; LEGESSE, S.; ANDUALEM, T. 2015. A review on welfare and management practices of working equines. *Global Journal of Animal Science, Livestock Production and Animal Breeding* 3(6):203-209.

SEKHAR, V.; WONG, E.; ELHASSAN, HA.; SINGH, N. 2018. Moffett's muted mules: the science of laryngology in the art of war. *The Journal of Laryngology & Otology* [en línea] <<https://doi.org/10.1017/S0022215118001950>> [consulta: 06-09-2020]

SILVA, G.; RODRIGUES, L.; MONTEIRO, B.; SOUZA, V.; MANSO, H.; COELHO, C. 2018. Effect of a March Field Test on Some Blood and Electrocardiographic Parameters of Mules. *Journal of Equine Veterinary Science* 70:42-47

TRIGO, P. 2011. Fisiopatología del ejercicio en el caballo de Resistencia. Tesis Doctor en Ciencias Veterinarias. Córdoba, España. U. de Córdoba. 128p

VALDÉS, C.; RESTREPO, J.; TRIANA, J.; MENDOZA, G.; MUTIS, C.; RAMÍREZ, E.; GALINDO, C. 2010. Determinación de los valores fisiológicos del sodio, el potasio y el ión calcio en plasma, con su variación pre y postejercicio en caballos de paso fino en la sabana de Bogotá. *Revista de Medicina Veterinaria*. 20:71-80

VERGARA, F.; TADICH, T. 2015. Effect of the Work Performed by Tourism Carriage Horses on Physiological and Blood Parameters. *Journal of Equine Veterinary Science*. 35(3): 213-218

WARWICK, B.; KLINE, K. 2007. Hematología y bioquímica. In: Boffi, F. (ed). *Fisiología del ejercicio en Equinos*. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. pp 145-151

WILLIAMS, CA. 2016. Horse Species Symposium: The effect of oxidative stress during exercise in the horse. *Journal of Animal Science*. 94:4067–4075.

WITKOWSKA-PILASZEWICZ, O.; ŻMIGRODZKA, M.; WINNICKA, A.; MIŚKIEWICZ, A.; STRZELEC, K.; CYWIŃSKA, A. 2019. Serum amyloid A in equine health and disease. *Equine Vet J*. 51(3): 293-298