

Concentración de cortisol sanguíneo como respuesta a la manipulación recurrente en donadoras de embriones Holstein mestizas

Blood cortisol concentration in response to recurrent manipulation in crossbred Holstein embryo donors

Gabriela Sofía Garay-Peña , Andrés Santiago Jácome-Auca , Jorge Bolívar Dután-Sanango , Ermes Ramiro Rodas-Carpio ,
Luis Eduardo Ayala-Guanga *

Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria. Cuenca, Ecuador.

*Autor para correspondencia: luis.ayala@ucuenca.edu.ec

RESUMEN

Se determinó la respuesta neuro-endócrina de la donadora al reducir el número de aplicaciones de hormona foliculo-estimulante (FSH) como factor de superovulación. Ocho vacas Holstein mestizas fueron distribuidas aleatoriamente en dos tratamientos (T): T1 (n=4) recibieron una dosis de 200 mg de FSH vía epidural (EP) en el día 4 del protocolo de superovulación (SOV), en T2 se administró 300 mg de FSH repartidas en 8 dosis decrecientes vía intramuscular (IM), los días 4; 5; 6 y 7 del protocolo en la mañana y tarde. La concentración de cortisol se determinó a las 0; 2; 4; 6; 24; 26; 28; 30; 48; 50; 52; 64; 72; 74; 76 y 78 horas (h) del día 4. La frecuencia cardíaca (FC), respiratoria (FR) y los niveles de glucosa fueron evaluados el día 4 a las 05h45; 06h05; 08h00; 10h00; 12h00; 17h45 y 18h05. El cortisol a las 0h fue similar en los dos T: T1 ($10,9 \pm 0,24 \mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) y T2 ($10,8 \pm 0,33 \mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) y alcanzó su mayor nivel a las 4h en T1 ($15,8 \pm 1,39 \mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) y en T2 ($16,4 \pm 0,28 \mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) sin diferencia entre T ($P > 0,05$). En las siguientes valoraciones, el cortisol disminuyó a niveles basales en los dos T. La FC a las 05h45, mostró valores similares en T1 ($65,3 \pm 1,65 \text{ pul}\cdot\text{min}^{-1}$) y en T2 ($66,3 \pm 1,43 \text{ pul}\cdot\text{min}^{-1}$); sin embargo, a las 06h05 FC se incrementó en T1 ($74,3 \pm 1,54 \text{ pul}\cdot\text{min}^{-1}$) y en T2 ($84,2 \pm 1,73 \text{ pul}\cdot\text{min}^{-1}$) y disminuyó a partir de las 08h00. Igual comportamiento fue observado con la FR y la glucosa. Se concluye que llevar a la donadora a la manga de sujeción para administrar FSH, constituye un factor estresante que incrementa la FC, FR, cortisol y glucosa, factores que influyen sobre el porcentaje de ovulaciones en los dos T.

Palabras clave: Cortisol; epidural; donadoras; Holstein; superovulación

ABSTRACT

The neuroendocrine response of the donor was determined by reducing the number of applications of follicle-stimulating hormone (FSH) as a superovulation factor. 8 crossbred Holstein cows were randomly distributed in two treatments (T): T1 (n=4) received a dose of 200 mg of FSH via epidural (EP) on day 4 of the superovulation protocol (SOV), in T2: 300 mg of FSH were administered divided into 8 decreasing doses intramuscularly (IM), on days 4; 5; 6 and 7 of the protocol in the morning and afternoon. The Cortisol concentration was determined at 0, 2, 4, 6, 24, 26, 28, 30, 48, 50, 52, 64, 72, 74, 76 and 78 hours (h) of day 4. Heart rate (HR), respiratory rate (RR) and glucose levels were evaluated on day 4 at 05:45; 06:05; 08:00; 10:00 a.m.; 12:00; 5:45 p.m. and 6:05 p.m. Cortisol at 0h was similar in both T: T1 ($10.9 \pm 0.24 \mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) and T2 ($10.8 \pm 0.33 \mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) and reached its highest level at 4h in T1 ($15.8 \pm 1.39 \mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) and at T2 ($16.4 \pm 0.28 \mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) with no difference between T ($P > 0.05$). In the following evaluations, Cortisol decreased to basal levels in the two T. HR at 05:45h showed similar values in T1 ($65.3 \pm 1.65 \text{ pul}\cdot\text{min}^{-1}$) and in T2 ($66.3 \pm 1.43 \text{ pul}\cdot\text{min}^{-1}$); however, at 06:05 HR increased in T1 ($74.3 \pm 1.54 \text{ pul}\cdot\text{min}^{-1}$) and in T2 ($84.2 \pm 1.73 \text{ pul}\cdot\text{min}^{-1}$) and decreased from 08:00. The same behavior was observed with RF and Glucose. It is concluded that taking the donor to the support sleeve to administer FSH is a stressful factor that increases HR, RF, Cortisol and Glucose, factors that influence the percentage of ovulations in the two T.

Key words: Cortisol; epidural; donors; Holstein; superovulation

INTRODUCCIÓN

El estrés es un evento o condición externa que ejerce presión sobre un sistema biológico. La respuesta del organismo puede ser aguda o crónica [1], la forma aguda dura horas y es impulsada por reguladores homeostáticos del sistema neuro-endócrino, y la forma crónica persiste por semanas y es regentada por reguladores homeoréticos del sistema endócrino, ambas respuestas implican alteraciones en el balance energético y metabólico [2].

El manejo rutinario del ganado bovino (*Bos taurus*) requiere de una interacción humano-animal [3], que muchas veces provoca estrés y por consiguiente, cambios comportamentales y fisiológicos que conllevan a la disminución del bienestar animal [4]. Una actividad que ha tomado auge en las ganaderías es la superovulación (SOV), técnica de reproducción asistida que implica manipulación continua de la donadora.

En los protocolos de SOV es común utilizar la hormona folículo-estimulante (FSH), hormona que impulsa el crecimiento y desarrollo de varios folículos secundarios hasta el estadio de dominancia [5], proporcionando mayor número de ovocitos listos para ser fecundados [6]. Sin embargo, la vida media de la FSH (5 horas -h-) crea la necesidad de administrar esta hormona cada 12 h, por 4 días consecutivos [7], principio que obliga a trasladar a la vaca donante mínimo 8 veces al corral de sujeción, manejo excesivo que es responsable de incrementar la tensión y provocar estrés en la donadora [8].

Ante situaciones de estrés agudo, se incrementa los niveles de cortisol y se activa la glicólisis hepática, la gluconeogénesis y aumenta el catabolismo de las proteínas libres [9]; por lo tanto, la concentración del cortisol y los niveles de glucosa en sangre pueden ser marcadores que ayuden a determinar el grado de estrés generado por la manipulación de la donadora [10].

Además, como respuesta al proceso de estrés el sistema simpático suprarrenal libera catecolaminas como respuesta neuro-endocrina [11]. Estas catecolaminas son las encargadas de aumentar la frecuencia cardíaca, provocar vasoconstricción periférica, aumentar la glicemia, generar hiperventilación y aumentar el volumen sanguíneo, factores directos que pueden ser utilizados para medir el efecto del estrés [12].

Por lo antes expuesto, en varios estudios se ha buscado reducir el número de aplicaciones de FSH dentro de protocolos de SOV mediante la administración intramuscular o subcutánea de esta gonadotropina disuelta en agentes de liberación lenta como la polivinilpirrolidona [13] e hidróxido de aluminio en gel (AH-gel) en bovinos [14], o la utilización de la vía epidural, la cual permite una eliminación más lenta de la FSH gracias a la capa de grasa que cubre el conducto vertebral [15]. Sin embargo, la información disponible sobre la respuesta del organismo ante esta reducción de manipulación dentro de los programas de SOV en bovinos es contradictoria. Por lo tanto, el estudio buscó determinar la respuesta neuro-endócrina observada en donadoras al reducir el número de aplicaciones de FSH como factor de superovulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y granja

Se seleccionaron 8 vacas multiparas de genotipo Holstein mestizo, de la granja experimental de Nero, de la Universidad de Cuenca, ubicada a 3.100 metros sobre el nivel del mar (msnm), en el trópico alto del Ecuador. Las vacas fueron divididas al azar en dos tratamientos (T): T1=Epidural-EP (n=4) y T2=Intramuscular-IM (n=4). Los animales

presentaron pesos similares de $541,5 \pm 55,93$ y $547,5 \pm 43,84$ kg, respectivamente, condición corporal (CC) de $2,9 \pm 0,08$ (T1) y $2,8 \pm 0,06$ (T2) en escala de 1-5, de acuerdo a lo determinado por Hoedemaker y col. [16]. Edad media de $6,6 \pm 0,81$ (T1) y $6,5 \pm 0,64$ años (T2), y una producción láctea promedio $19,3 \pm 0,66$ (T1) y $19,2 \pm 0,64$ kg (T2).

Se realizó un diagnóstico ecográfico (Aloka, ProSound 2®, Tokyo-Japón) del aparato reproductivo de los animales previo al experimento. Las vacas seleccionadas fueron determinadas cíclicas, con una morfología cervical adecuada que permita el paso del catéter de recolección (determinado al pasar la sonda de lavado en cada donante, a través de su cérvix), y la ausencia de patologías en el tracto reproductivo [17]. Durante la realización del estudio se tuvo presente la normativa del código sanitario para animales terrestres, capítulo 7.8: "Utilización de animales en la investigación y educación", de la Organización Mundial de Sanidad Animal [18].

Diseño experimental

La investigación fue de tipo experimental, y se valoró el efecto de la manipulación de la donadora sobre la concentración plasmática de cortisol en los días 4; 5; 6 y 7 de dos protocolos de SOV, donde T1 recibió una dosis de 200 mg de FSH vía EP el día 4 del protocolo a las 06h00. A los animales de T2 se administró 300 mg de FSH vía IM repartidos en dosis decrecientes 2 veces al día, durante los 4 días de tratamiento; además, se determinó los niveles de glucosa en sangre y se evaluaron la frecuencia cardíaca (FC) y la frecuencia respiratoria (FR) el día 4 de los protocolos de SOV.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados en Excel y analizados en el programa estadístico SPSS versión 25°. Se realizaron estadígrafos principales de todas las variables. La normalidad fue determinada con la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las concentraciones de cortisol, niveles de glucosa, frecuencia cardíaca y respiratoria, fueron evaluadas mediante la prueba t de Student.

Protocolo epidural (T1)

Las donadoras del protocolo epidural recibieron el día 0 a las 06h00 un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR®; 1,38 g de progesterona; Zoetis, Quito, Ecuador) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®; Zoetis, Quito, Ecuador), por vía IM, y 50 mg de progesterona inyectable (Progesterona®; ERMA, Quito, Ecuador). En la mañana (06h00) del día 4 los animales recibieron 200 mg de FSH (Folltropin-V®, Vetoquinol, Québec, Canada) diluidos en 5 mL de solución salina estéril por vía EP (dosis única), entre la última vértebra sacra y la primera coccígea [19]. El día 6 en la mañana (06h00) y en la tarde (18h00) se aplicó una dosis de 25 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, Lima, Perú). El día 7 en la mañana se retiró el implante de progesterona. Al día siguiente (día 8), a las 06h00 se colocó un parche detector de celo (EstroTECT™, EUA) y en la tarde se aplicaron 0,25 mg de gonadorelina (GnRH®, MSD, Nueva York, EUA). El día 9 en la mañana se realizó la primera IA y en la tarde la segunda IA, la colecta de los embriones se ejecutó en el día 16 del protocolo (FIG. 1).

Protocolo intramuscular de SOV (T2)

Los 4 animales en T2 recibieron 300 mg de FSH repartidas en 8 dosis decrecientes en los días 4; 5; 6 y 7 del protocolo de SOV. El día 0 (06h00) se colocó un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR®; 1,38 g de progesterona; Zoetis, Quito, Ecuador) +

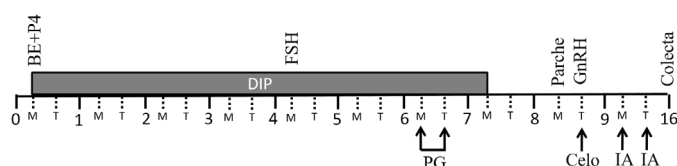


FIGURA 1. Protocolo de superovulación epidural (T1). BE=Benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. DIP=Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH=Hormona folículo-estimulante (200 mg). PG=Prostaglandina. Parche=Parche detector de celo. GnRH=Gonadotropina. IA= inseminación artificial. Colecta=colecta de embriones

2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®; Zoetis, Quito, Ecuador), por vía IM y 50 mg de progesterona inyectable (Progesterona®; ERMA, Quito, Ecuador). A partir del día 4 en la mañana (06h00) y en la tarde (18h00), las donadoras recibieron dosis decrecientes de FSH (Folltropin-V®, Vetoquinol, Québec, Canadá) por cuatro días (60; 60; 40; 40; 30; 30; 20; 20 mg) [19], tal como se indica en FIG. 2. El día 6 en la mañana y la tarde se aplicaron 25 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, Lima, Perú), y el día 7 por la mañana se retiró el implante. El día 8 se detectó el celo por observación directa con ayuda de un parche indicador de estro (EstroTECT™, EUA), en la tarde se administró una dosis de 0,25 mg de gonadorelina (GnRH®, MSD, Nueva York, EUA). En la mañana del día 9 se realizó la primera inseminación artificial (IA) y 12 horas (h) después se efectuó la segunda IA (FIG. 2).

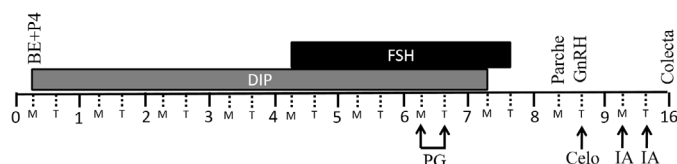


FIGURA 2. Protocolo de superovulación intramuscular (T2). BE=Benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. DIP=Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH=Hormona folículo-estimulante. PG=Prostaglandina. Parche=Parche detector de celo. GnRH=Hormona liberadora de gonadotropina. IA= inseminación artificial. Colecta=colecta de embriones

Valoración de la concentración de cortisol plasmático

Al inicio del protocolo se colocó un catéter intravenoso para animales grandes en la vena yugular de las vacas de T1 y T2, esto facilitó la toma de las muestras de sangre (5 mL) en tubos Vacutainer con ácido etilendiaminatetraacético (EDTA, Vacutainer®). El muestreo inició a las 06h00 del día 4 considerándose a ésta como 0 h, luego se tomaron muestras en las horas descritas en la TABLA I. Estas fueron colocadas en un cooler (Chiller, 16 QT, Coleman®, EUA) con hielo (5°C) y transportadas al laboratorio para ser centrifugadas (Hettich, Micro 200, Alemania) a 3.000 gravedades (G) x 10 min. El sobrenadante fue colectado y congelado a -20°C hasta su análisis (Congelador SMC, CG11HB, China) [20].

La determinación de la concentración de cortisol se realizó por inmunoensayo enzimático colorimétrico (Accubind Elisa Microwells. Código: 3625-300. Monobind). La dosis mínima detectable de cortisol según el fabricante es 0,4 µg·dL⁻¹ - 95 µg·dL⁻¹. Con una sensibilidad del 95% [21].

TABLA I
Protocolo de toma de muestras de sangre

Día 4		Día 5		Día 6		Día 7	
Hora	Muestra	Hora	Muestra	Hora	Muestra	Hora	Muestra
06:00	0 h	06:00	24 h	06:00	48 h	06:00	72 h
08:00	2 h	08:00	26 h	08:00	50 h	08:00	74 h
10:00	4 h	10:00	28 h	10:00	52 h	10:00	76 h
12:00	6 h	12:00	30 h	12:00	54 h	18:00	78 h
18:00	12 h	18:00	36 h	18:00	60 h	18:00	84 h

Hora=hora del día. Muestra=hora determinada en el protocolo. Días 4, 5, 6 y 7=días del protocolo de SOV en los cuales se valoró los niveles de cortisol en sangre

Valoración de constantes fisiológicas y niveles de glucosa en sangre

La frecuencia cardíaca (FC) fue monitoreada mediante auscultación en el tercer espacio intercostal, con ayuda de un fonendoscopio (Estetoscopio Littman Profesional, Ecuador) durante un min. La evaluación de la frecuencia respiratoria (FR) se realizó mediante la observación de los movimientos respiratorios, acompañado de la auscultación traqueal.

La primera evaluación de FC y FR fue evaluada a las 05h45 antes de la administración de la primera dosis de FSH (06h00; día 4 del protocolo; FIG. 1), la segunda a las 06h05. Las muestras 3, 4 y 5 fueron realizadas a las 8h00, 10h00 y 12h00, respectivamente. En la tarde a las 17h45 antes de la administración de la segunda dosis de FSH (18h00) se determinó la sexta valoración. Finalmente, a las 18h05 post aplicación de la hormona se realizó la última valoración.

La glucosa en sangre fue evaluada con un glucómetro (Accu-Chek Guide, Roche, Ecuador), que según descripción de fabricante detecta un valor mínimo de 0,1mg·dL⁻¹, con una sensibilidad de 95%. La valoración se realizó en los siguientes momentos: 05h45, 06h05; 08h00, 10h00 y 12h00, únicamente en el día 4 del protocolo de SOV [22].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de cortisol

Los animales de T1 y T2 fueron llevados a la manga (Brete PLUS, Ecuador) para la administración de la primera dosis de FSH en el día 4 a las 06h00 am (0 h; TABLA I), allí se tomó la primera muestra de sangre y se determinó que la concentración de cortisol fue similar en los dos tratamientos: T1 (10,9±0,24 µg·dL⁻¹) y T2 (10,8±0,33 µg·dL⁻¹), valores que se encuentran dentro del rango determinado como basales en la especie bovina (0-20 µg·dL⁻¹) [23].

Sin embargo, 2 h después de la administración de la hormona en los dos T (segunda valoración), la concentración de cortisol se incrementó a 14,6±2,53 µg·dL⁻¹ en T1 y en T2 (14,1±1,56 µg·dL⁻¹) sin diferencia entre T ($P>0,05$). El cortisol alcanzó su pico más alto 4 h luego de la administración de la FSH (4h) en los dos T: T1 (15,8±1,39 µg·dL⁻¹) y T2 (16,4±0,28 µg·dL⁻¹). Los resultados obtenidos permiten afirmar que el proceso de manejo y la administración de la hormona por vía IM o EP *per se*, son factores que provocan estrés en las donadoras, lo cual se vio reflejado en la concentración de cortisol. Estos valores son concordantes con los observados en animales que fueron llevados a la manga (Brete PLUS, Ecuador) para venopunción, con la

finalidad de obtener muestras de sangre cada 15 min, mostrando un incremento sostenido hasta los 30 min llegando sobre los 10 ng·mL⁻¹; sin embargo, a los 45 y 60 min, la concentración se estabilizó para luego descender [24].

En la cuarta valoración (6 h), las concentraciones en los dos T disminuyeron: T1 (12,4±0,54 µg·dL⁻¹) y T2 (12,9±0,81 µg·dL⁻¹). En la última valoración del día 4 (12h00), tomada antes de la administración de la segunda dosis de FSH (18h00), las concentraciones de cortisol se estabilizaron en los dos T: T1 (12,6±1,37 µg·dL⁻¹) y T2 (13,1±1,49 µg·dL⁻¹). Sin embargo, los valores de la cuarta y quinta valoración son menores respecto a la tercera toma, posiblemente a consecuencia de que el cortisol es una hormona que tiene un ciclo de producción circadiana (FIG. 3), presentando valores más altos en la mañana que en la tarde [1].

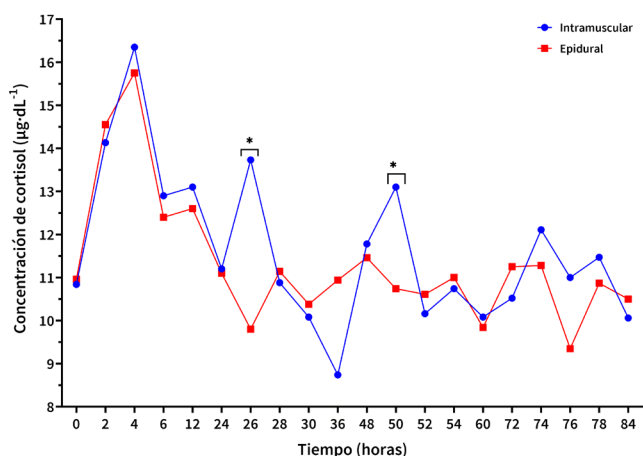


FIGURA 3. Concentración de cortisol valorado a las 0, 2, 4, 6, 12, 24, 26, 28, 30, 36, 48, 50, 52, 54, 60, 72, 74, 76, 78, 84 horas en un protocolo intramuscular y epidural para superovulación. * = diferencia estadística. Prueba t de Student

En otros trabajos se ha descrito que factores estresores como el transporte y el ayuno aumentaron la concentración de cortisol a las 3 h después del estrés, llegando a valores de 3,8 µg·dL⁻¹ para luego descender a 2,8 µg·dL⁻¹ [25]. Este patrón de comportamiento resulta similar al observado en este estudio en el cual el incremento de los valores de cortisol llegó a su máxima expresión a las 4 h para luego bajar sostenidamente; sin embargo, los valores reportados de cortisol son menores a los observados en el presente trabajo.

En la primera valoración del día 5 del protocolo (24 h) las concentraciones de cortisol fueron similares en los dos T: T1 (11,1±1,32 µg·dL⁻¹) y T2 (11,2±0,58 µg·dL⁻¹). Luego de esta valoración solo los animales de T2 recibieron la administración IM de FSH, factor estresor que incrementó la concentración de cortisol en la segunda valoración del día 5 (26 h) en T2 (13,7±0,65 µg·dL⁻¹), a diferencia de lo observado en los animales de T1 (9,8±0,46 µg·dL⁻¹) con diferencia estadística entre tratamientos ($P<0,05$; FIG. 3). Esta elevación de la concentración de cortisol es concordante con el criterio emitido por Uribe y col. [26], quienes indican que los animales sometidos a estímulos nocivos repetitivos alteran su proceso de homeostasis.

Sin embargo, en la 3.^a (28 h; T1=11,1±0,52 µg·dL⁻¹; T2=10,9±0,53 µg·dL⁻¹), 4.^a (30 h; T1=10,4±0,42 µg·dL⁻¹; T2=10,1±0,34 µg·dL⁻¹) y 5.^a (36 h;

T1=10,9±0,56 µg·dL⁻¹; T2=8,7±0,44 µg·dL⁻¹) valoración del día 5, las concentraciones de cortisol fueron similares en los dos T ($P>0,05$).

Comportamiento similar al del día 5 fue observado en las valoraciones del día 6 del protocolo; así, en la primera determinación (48 h) las concentraciones fueron similares en T1 (11,5±0,55 µg·dL⁻¹) y T2 (11,9±0,60 µg·dL⁻¹). Luego de la tercera administración de FSH a los animales de T2 (50 h; 13,1±0,65 µg·dL⁻¹) la concentración de cortisol aumentó comparado con los niveles de T1 (10,7±0,35 µg·dL⁻¹), lo cual ratifica que el estrés causado por la aplicación de la hormona genera incremento del cortisol en plasma. Y como en el día anterior en la 3.^a (52 h; T1=10,6±0,36 µg·dL⁻¹; T2=10,2±0,52 µg·dL⁻¹), 4.^a (54 h; T1=11,0±0,16 µg·dL⁻¹; T2=10,7±0,75 µg·dL⁻¹) y 5.^a (60 h; T1=9,8±0,46 µg·dL⁻¹; T2=10,1±0,43 µg·dL⁻¹) valoración las concentraciones de cortisol fueron similares en los dos tratamientos ($P>0,05$).

Sin embargo, el patrón de comportamiento del cortisol observado los días 4, 5 y 6 del protocolo luego de la administración de la dosis de FSH en los animales de T2, no se replicó en el día 7, llegando a mostrar valores similares ($P>0,05$) de cortisol en los dos T en las valoraciones de las 72 h (T1=11,3±0,87 µg·dL⁻¹; T2=10,5±0,26 µg·dL⁻¹), 74 h (T1=11,3±0,32 µg·dL⁻¹; T2=12,1±0,71 µg·dL⁻¹), 76 h (T1=9,4±0,09 µg·dL⁻¹; T2=11,0±0,77 µg·dL⁻¹), 78 h (T1=10,9±0,42 µg·dL⁻¹; T2=11,5±0,80 µg·dL⁻¹) y 84 h (T1=10,5±0,88 µg·dL⁻¹; T2=10,1±0,50 µg·dL⁻¹).

Los resultados del día 7 muestran que el manejo recurrente y la administración consecutiva de FSH vía IM provocó una habituación del animal ante el factor estresante, característica que va a depender del tipo de estresor, su intensidad, duración y las experiencias individuales previas [26]. En otras especies como la caprina (*Capra hircus*) también se ha observado este patrón de comportamiento del cortisol ante factores exógenos estresantes como la temperatura, el transporte, llegando a mostrar concentraciones en rangos de 12 µg·dL⁻¹ a 14 µg·dL⁻¹ característicos de procesos de estrés agudo.

La respuesta al protocolo de superovulación mostró que la administración de FSH vía epidural (T1) fue tan efectiva como la IM (T2) en la cual los animales recibieron 8 dosis de FSH vía intramuscular durante 4 días consecutivos (datos no mostrados). Sin embargo, los animales de T2 presentaron un porcentaje bajo de ovulación. Esta particularidad está ligada a las altas concentraciones de cortisol que provocan efectos negativos en la fase de desarrollo folicular, pues los glucocorticoides inhiben el desarrollo folicular y la presentación del pico preovulatorio de LH, prolongando la duración del estro y provocando que existan fallos en la ovulación [27]. Particularidad que explicaría el fallo observado en la ovulación de los folículos de la mayoría de los de animales de T2, sumado a la diferencia de las dosis en los T: T1 (200 mg), T2 (300 mg).

Frecuencia cardiaca (FC)

El día 4 del estudio se valoró la FC de los animales sometidos a los dos T de SOV, 5 min antes de la aplicación de la FSH (05h45), se observaron valores similares en T1 (65,3±1,65 pulsaciones·min⁻¹ -pul·min⁻¹-) y en T2 (66,3±1,43 pul·min⁻¹; FIG. 4), los resultados son considerados fisiológicos en la especie bovina, pues Narro y col. [28] determinaron un rango entre 40 a 80 pul·min⁻¹ para animales adultos que se encuentran en condiciones manejo normales sin presencia de estresores.

Cinco min post aplicación de la FSH (06h05) se determinaron valores de FC en T1 (74,3±1,54 pul·min⁻¹) y en T2 (84,2±1,73 pul·min⁻¹), superiores a los establecidos como fisiológicos (54-61 pul·min⁻¹) en bovinos adultos

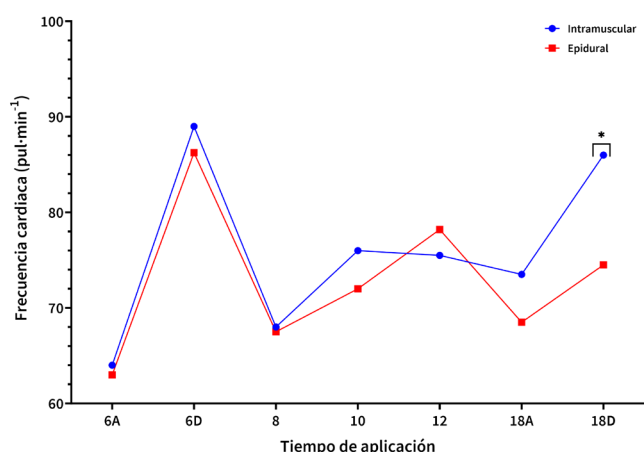


FIGURA 4. Frecuencia cardíaca valorada en el día 4 del protocolo de superovulación intramuscular (IM) y epidural (EP) 5 min, antes de aplicar la FSH (6A), 5 min, después de aplicar la FSH (6D). Luego a las 08h00, 10h00, 12h00. Finalmente, 5 min, antes de aplicar FSH a las 17h45 (18A) y 5 min, después de aplicar la FSH (18D). * = diferencia estadística. Prueba *t* de Student

[29]. Este incremento en el número de pul-min⁻¹ está regulado por el sistema simpático, el cual genera mayores contracciones del músculo cardíaco [30]; además, estimula la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) que son liberadas desde las glándulas adrenales hacia la circulación sanguínea durante la respuesta inicial al estrés (manejo y administración de la FSH), esto eleva la frecuencia cardíaca y la presión arterial [23].

En la tercera valoración del día 4 realizada 2 h (08h00) post exposición al factor estresante, la FC disminuyó a valores basales 68,2 ± 1,67 pul-min⁻¹ (T1) y 67,9 ± 2,05 pul-min⁻¹ para T2. La FC se mantuvo estable en la valoración de las 10:00 (T1=72,8 ± 1,36 y T2=71,7 ± 0,89 pul-min⁻¹) y las 12:00 (T1=73,1 ± 1,23 pul-min⁻¹ y T2=72,1 ± 2,05 pul-min⁻¹). La manipulación y administración de la FSH a las donadoras provocó estrés agudo; sin embargo, el organismo de estos animales restauró la homeostasis en 2 h, regulando los procesos psicológicos y fisiológicos alterados como la FC [31].

En la valoración de la tarde (17h45) 5 min antes de la segunda dosis de FSH, la FC en los dos T fueron similares ($P > 0,05$), T1 (72,3 ± 0,69 pul-min⁻¹) y T2 (72,5 ± 0,84 pul-min⁻¹). Sin embargo, en la última valoración del día 4 realizado 5 min después de la administración de la segunda dosis de FSH (18h05) en los animales de T2, los valores de la FC se incrementaron en 28 puntos porcentuales (92,7 ± 2,15 pul-min⁻¹), comparado con la FC de los animales de T1 (72,3 ± 1,22 pul-min⁻¹) que no fueron expuestos al proceso estresante (administración de FSH).

Estos resultados permiten aseverar que el llevar a los animales a la manga de sujeción para administrar FSH por vía IM (T2), se constituye en factor estresor que altera la FC sobre los valores referenciales [28].

Frecuencia respiratoria (FR)

La FR observada 5 min antes de la aplicación de la FSH (05h45; FIG. 5) fue similar en los dos T: T1 (20,3 ± 1,31 movimientos-min⁻¹) y T2 (21,5 ± 0,86 mov-min⁻¹), valores que se encuentran dentro del rango fisiológico (20 a 25 mov-min⁻¹) descrito por Chen y col. [27], para bovinos en condiciones de tranquilidad.

Sin embargo, 5 min post administración de la FSH (06h05) la FR se vio incrementada a valores de 29,5 ± 2,21 mov-min⁻¹ (T1) y 29,3 ± 0,94 mov-min⁻¹ (T2), esto como respuesta a la exposición del animal al factor estresante que constituye llevar a los animales a la manga de sujeción para administrar FSH vía epidural (T1) e IM (T2), factor que activa la respuesta neuroendocrina, aumentando la ventilación pulmonar [32].

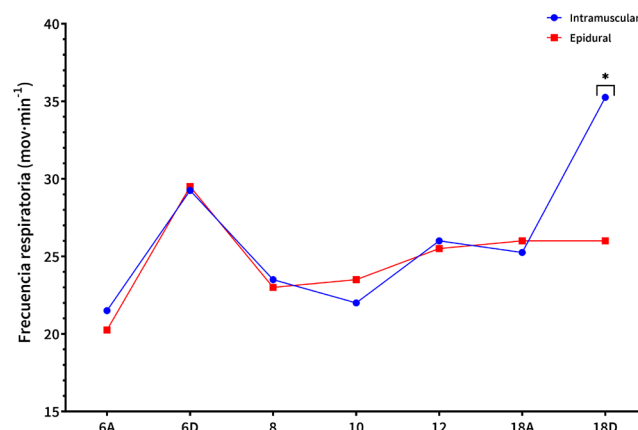


FIGURA 5. Frecuencia respiratoria valorada en el día 4 del protocolo de superovulación intramuscular (IM) y epidural (EP) 5 min, antes (05h45) de aplicar la FSH (6A); 5 min, después (06h05) de aplicar la FSH (6D); luego a las 08h00, 10h00, 12h00. Finalmente, 5 min, antes de aplicar (17h45) FSH (18A) y 5 min, después de aplicar (18h05) la FSH (18D). * = diferencia estadística. Prueba *t* de Student

En la valoración realizada a las 08h00 se observó un descenso de la FR a valores fisiológicos en T1 (23,0 ± 2,38 mov-min⁻¹) y en T2 (23,5 ± 1,25 mov-min⁻¹), la FR se mantuvo en las valoraciones de las 10h00 en T1 (23,5 ± 0,5 mov-min⁻¹) y en T2 (22,0 ± 0,91 mov-min⁻¹), igual patrón fue observado a las 12h00 en T1 (25,5 ± 0,95 mov-min⁻¹) y en T2 (26,0 ± 1,15 mov-min⁻¹) y a las 17h45 antes de aplicar la segunda dosis de FSH a los animales de T2 (T1=26,0 ± 2,58 mov-min⁻¹) y T2 (25,3 ± 1,1 mov-min⁻¹).

5 min luego de la segunda aplicación de la FSH (18h05) la FR de los animales que recibieron la dosis de FSH (T2) incrementaron los valores a 35,3 ± 1,1 mov-min⁻¹, este incremento no fue observado en los animales de T1 (26,0 ± 0,81 mov-min⁻¹), ya que no sufrieron el proceso estresante del manejo para la administración de la dosis de la FSH. Este incremento de la FR está ligado a la liberación de acetilcolina en las vesículas sinápticas que ingresan a la medula suprarrenal, la cual produce carga instantánea de adrenalina y noradrenalina, generando vasoconstricción del músculo cardíaco, aceleración del latido cardíaco y produciendo fatiga del animal frente al proceso estresante, factor que provoca hiperventilación [33].

Concentración de glucosa en sangre

La glucosa en sangre observada 5 min, antes de la administración de la dosis de FSH el día 4 del protocolo (05h45) fue similar en los dos T: T1 (51,3 ± 2,14 mg-dL⁻¹) y T2 (53,8 ± 0,63 mg-dL⁻¹), valores considerados fisiológicos en la especie bovina (FIG. 6).

Sin embargo, 5 min después de la aplicación de la FSH (06h05) se observó un aumento de la glucosa en T1 (64,0 ± 0,71 mg-dL⁻¹) y T2 (65,5 ± 0,96 mg-dL⁻¹), sin diferencia entre T ($P > 0,05$). Este incremento

responde al proceso estresante al cual fueron expuestos los animales de los dos T y está descrito que un factor estresante activa los receptores β adrenérgicos, los cuales estimulan la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa e inhiben la glucógeno sintetasa para aumentar la conversión de glucógeno en glucosa 6 fosfato y de esta manera aumentar la disponibilidad del combustible metabólico (glucosa y ácidos grasos), necesario para enfrentar el factor estresante [33].

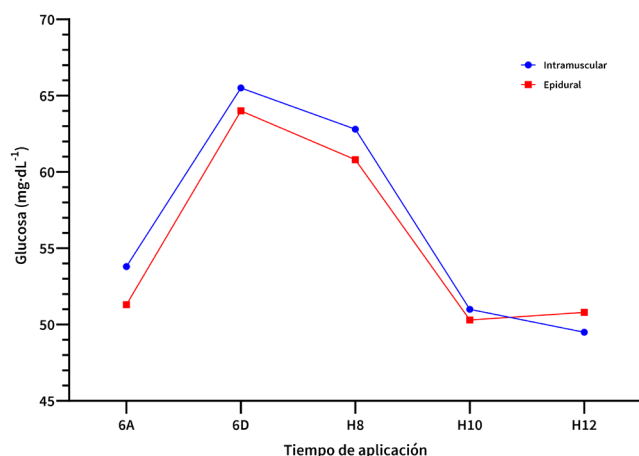


FIGURA 6. Concentración de glucosa valorado en el día 4 del protocolo de superovulación convencional y epidural 5 min, antes de aplicar la FSH (6A), 5 min, después de aplicar la FSH (6D), luego a las 08h00, 10h00 y 12h00 am. * = diferencia estadística. Prueba t de Student

Dos horas (08h00) luego del proceso estresante (administración de la FSH), los niveles de glucosa disminuyen a valores fisiológicos en T1 ($60,8 \pm 0,85$ mg·dL⁻¹) y T2 ($62,8 \pm 0,48$ mg·dL⁻¹), los niveles de glucosa se mantuvieron estables en las valoraciones de las 10h00 ($50,3 \pm 1,55$ mg·dL⁻¹) T2 ($51,0 \pm 3,49$ mg·dL⁻¹) y las 12h00 en T1 ($50,8 \pm 2,46$ mg·dL⁻¹) y T2 ($49,5 \pm 2,22$ mg·dL⁻¹) del día 4 del protocolo.

CONCLUSIONES

Llevar la donadora a la manga de sujeción para administrar hormona foliculo-estimulante por vía intramuscular o epidural, constituye un proceso estresante que incrementa la frecuencia cardiaca, respiratoria, los niveles de cortisol y glucosa, factores que coadyuban negativamente en el porcentaje de ovulación de los folículos que responden a la SOV. Por lo tanto, reducir el número de manipulaciones dentro de un protocolo de SOV mediante la aplicación de la FSH vía epidural disminuye el proceso de estrés al cual están expuestos las donadoras de embriones *in vivo*, con la subsecuente disminución de niveles de cortisol y glucosa circulantes en sangre.

RECOMENDACIONES

Profundizar el estudio de la administración de FSH por vía epidural para la producción de embriones *in vitro* o para la estimulación ovárica necesaria para la obtención de ovocitos mediante aspiración ecogiada (OPU).

Conflicto de interés

Los autores confirman que no existen conflictos de intereses en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kinlein SA, Wilson CD, Karatsoreos IN. Dysregulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis function contributes to altered endocrine and neurobehavioral responses to acute stress. *Front. Psychiatry*. [Internet]. 2015; 6:19-22. doi: <https://doi.org/gk8xqt>
- [2] Collier RJ, Renquist BJ, Xiao Y. A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. *J. Dairy Sci.* [Internet]. 2017; 100(12):10367-10380. doi: <https://doi.org/gcnp5p>
- [3] Sanmiguel RA, Plazas FA, Trujillo DY, Pérez M del R, Sierra LMP, DiGiacinto A. Requirements for the measurement of invasive and non-invasive stress indicators in animal production. *Rev. Inv. Vet. Perú.* [Internet]. 2018; 29(1):15-30. doi: <https://doi.org/ghp59q>
- [4] Mpakama T, Chulayo AY, Muchenje V. Bruising in slaughter cattle and its relationship with creatine kinase levels and beef quality as affected by animal related factors. *Asian Australasian J. Anim. Sci.* [Internet]. 2014; 27(5):717-725. doi: <https://doi.org/f522qq>
- [5] Bautista VM, Jiménez SP, Meza CD, Ramos TI, Toledo JR. FSH in bovine superovulation. *Rev. Bionatura.* [Internet]. 2019; 4(1):812-816. doi: <https://doi.org/mbcc>
- [6] Becaluba F. Factores que afectan la superovulación en bovino. [Internet]. Córdoba, Argentina: Sitio Argentino de Producción Animal. 48.-Transplante Embrionario y Clonación. 2007 [consultado 25 Jul 2023]; 18 p. Disponible en: <https://bit.ly/3NIPPTZ>.
- [7] Bó GA, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenol.* [Internet]. 2014; 81(1):38-48. doi: <https://doi.org/gq4qc9>
- [8] Costa A, Dasso L. Manejo de Bovinos en Sistemas Productivos: Caracterización de dos estilos de manejo y niveles sanguíneos de cortisol. *Rev. Electr. Vet. REDVET* [Internet]. 2007; 8(12B):1-8. Disponible en: <https://bit.ly/47i7RhX>.
- [9] Romero M, Sánchez J. Bienestar animal durante el transporte y su relación con la calidad de la carne bovina. *Rev. MVZ Córdoba.* [Internet]. 2012 [consultado 12 Jun 2023]; 17(1):2936-2944. Disponible en: <https://bit.ly/4al0FNf>.
- [10] Tadich N, Gallo C, Echeverría R, Schaik G. Efecto del ayuno durante dos tiempos de confinamiento y de transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. *Arch. Med. Vet.* [Internet]. 2003; 35:171-85. doi: <https://doi.org/cp4ptj>
- [11] Castaño FA, Rugeles PC, Betancur CA, Ramírez-López CJ. Impacto del estrés calórico sobre la actividad reproductiva en bovinos y consideraciones para mitigar sus efectos sobre la reproducción. *Biosalud.* [Internet]. 2014 [consultado 12 Jun 2023]; 13(2):84-94. Disponible en: <https://bit.ly/47oEb2R>.

- [12] Duval F, González F, Rabia H. Neurobiología del estrés. *Rev. Chil. Neuro-Psiquiat.* [Internet]. 2010; 48(4):307-318. doi: <https://doi.org/fjfd>
- [13] Ratsiri T, Ratchamak R, Chumchai R, Boonkum W, Vongpralub T, Chankitisakul V. A novel route of follicle-stimulating hormone administration with a split-single ischiorectal fossa in Thai-Holstein crossbred superovulation programs under heat stress conditions. *Anim. Sci. J.* [Internet]. 2021; 92(1):13574. doi: <https://doi.org/mbdf>
- [14] Kimura K. Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *J. Reprod. Dev.* [Internet]. 2016; 62(5):1-7. doi: <https://doi.org/f87q3g>
- [15] Sakaguchi K, Ideta A, Yanagawa Y, Nagano M, Katagiri S, Konishi M. Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for in vivo and in vitro embryo production in Japanese black cows. *Reprod. Dev.* [Internet]. 2018; 17(88):1-16. doi: <https://doi.org/mbdg>
- [16] Hoedemaker M, Prange D, Gundelach Y. Body condition change ante- and postpartum, health and reproductive performance in German Holstein Cows. *Reprod. Domest. Anim.* [Internet]. 2009; 44(2):167-73. doi: <https://doi.org/fht8nq>
- [17] Naranjo-Chacón F, Montiel-Palacios F, Canseco-Sedano R, Ahuja-Aguirre C. Embryo production after superovulation of bovine donors with a reduced number of FSH applications and an increased eCG dose. *Theriogenol.* [Internet]. 2020; 141:168-72. doi: <https://doi.org/mbdj>
- [18] Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Código Sanitario para los Animales Terrestres. 25 ed. Vol. I. Paris: OIE. 2016; 474 p.
- [19] Farías-Delgado MG, Zambrano JJ, Jácome-Aucay AS, Dután-Sanango JB, Garay-Peña GS, Ayala-Guanga LE. Efecto de la hormona Foliculo-estimulante administrada vía epidural, sobre la respuesta ovárica y el perfil hormonal en vacas Holstein. *Rev. Cientif. Fac. Cien. Vet.* [Internet]. 2023; 33(2):1-7. doi: <https://doi.org/mbdj>
- [20] Dután J, Samaniego J, Perea F, Hernández-Fonseca H, Pesántez JL, Jácome A, Garay, G, Ayala, L. Relación de la hormona anti-mülleriana con la cantidad y calidad de ovocitos colectados por aspiración ecoguiada en vaquillas Holstein. *Rev. Cientif. Fac. Cien. Vet.* [Internet]. 2023; 33(1):1-7. doi: <https://doi.org/mbdk>
- [21] Maidana P, Bruno OD, Mesch V. [A critical analysis of cortisol measurements: an update]. *Med. (B. Aires)* [Internet]. 2013 [consultado 18 May 2023]; 73(6):579-584. Spanish. Disponible en: <https://bit.ly/3RNemUx>.
- [22] Möstl E, Palme R. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2002;23(1-2):67-74. doi: <https://doi.org/dk3w95>
- [23] Sierra CA. Indicadores de bienestar en bovinos del trópico: una visión desde el estrés y el eje hipotalámico pituitario adrenal. *Rev. Vet.* [Internet]. 2019; 30(2):101. doi: <https://doi.org/mbdm>
- [24] Heinrich M, Müller H, Fieseler H, Steiner A, Gottschalk J, Einspanier A, Spilke J, Mielenz N, Palme R, Baumgartner W, Möbius G, Starke A. [Cortisol concentration before, during and after sham foot trimming in German Holstein cows – the suitability of different matrices]. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere.* [Internet]. 2020; 48(5):291-300. German. doi: <https://doi.org/mbdn>
- [25] Tadich N, Gallo C, Echeverría R, Van Schaik G. Efecto del ayuno durante dos tiempos de confinamiento y de transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. *Arch. Med. Vet.* [Internet]. 2003; 35(2):171-85. doi: <https://doi.org/cp4ptj>
- [26] Uribe-Velásquez LF, Uribe AI, Valencia-Uribe S. Effect of stress due to ultrasonography on plasma cortisol and progesterone (P4) concentrations during oestrous cycle in ewes. *Vet. Zootec.* [Internet]. 2010 [consultado 15 May 2023]; 4(1):9-15. Disponible en: <https://bit.ly/3twYLA>.
- [27] Macfarlane MS, Breen KM, Sakurai H, Adams BM, Adams TE. Effect of duration of infusion of stress-like concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* [Internet]. 2000; 63(3):167-175. doi: <https://doi.org/ch3jbf>
- [28] Cano-Celada JP. Practica 1 Examen Clínico. En: Avila-García J, Cano-Celada JP, Olguín y Bernal A, editores. Manual de prácticas de clínica de los bovinos 1. [Internet]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 2019 [consultado 20 Jun 2023]; p. 5-25. Disponible en: <https://bit.ly/3tDfrpO>.
- [29] Londoño RC, Sánchez MEN, Prada-Sanmiguel GA. Parámetros fisiológicos y valores hematológicos normales en búfalos (*Bubalus bubalis*) del Magdalena Medio colombiano. *Rev. Med. Vet.* [Internet]. 2012 [consultado 15 Abr 2023]; (23):51-64. Disponible en: <https://bit.ly/48pUkGM>.
- [30] Unchupaico P, Bazán L, Quispe C, Ancco E. Environmental temperature and its effect on physiological parameters in Nellore cows and crosses under conditions of the Peruvian tropics. *Rev. Inv. Vet. Perú.* [Internet]. 2020; 31(1):1-7. doi: <https://doi.org/gsfktq>
- [31] Chen Y, Arsenault R, Napper S, Griebel P. Models and methods to investigate acute stress responses in cattle. *Anim.* [Internet]. 2015; 5(4):1268-1295. doi: <https://doi.org/mbdq>
- [32] Romero-Peñuela MH, Uribe-Velásquez LF, Sánchez-Valencia JA. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud.* [Internet]. 2011 [consultado 22 May 2023]; 10(1):71-87. Disponible en: <https://bit.ly/3vmtxwb>.
- [33] Alzina A, Farfán JC, Valencia ER, Yokohama J. Condición ambiental y su efecto en la temperatura rectal y frecuencia respiratoria en bovinos cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*) del estado de Yucatán, México. *Rev. Bioméd.* [Internet]. 2001 [consultado 24 May 2023]; 12(2):112-121. Disponible en: <https://bit.ly/47IZtxS>.