

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE ESTÍMULOS DE DIFERENTE INTENSIDAD DURANTE EL ARREO
SOBRE ALGUNAS VARIABLES SANGUÍNEAS INDICADORAS DE ESTRÉS EN
BOVINOS**

**Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO**

EMILIA YASNA ALVAREZ YERCIC

VALDIVIA – CHILE

2002

A mis padres, con mucho cariño.

ÍNDICE

| | Página |
|-----------------------------------|---------------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. SUMMARY | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODO | 11 |
| 5. RESULTADOS | 14 |
| 6. DISCUSIÓN | 20 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 26 |
| 8. ANEXOS | 29 |

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Néstor Tadich B.

PROFESOR COPATROCINANTE

Dra. Carmen Gallo S.

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Hugo Folch V.

Sr. Bruno Twele W.

FECHA DE APROBACIÓN:

09 Septiembre 2002

1. RESÚMEN

El objetivo del presente estudio fue analizar las concentraciones sanguíneas de cortisol, glucosa, lactato, valores de hematocrito, leucocitos y actividad plasmática de creatinfosfoquinasa como indicadores de estrés en novillos sometidos a diferentes estímulos durante el arreo. El estudio fue dividido en dos experimentos, los cuales fueron realizados en enero y abril de 2002, en un predio ubicado en la provincia de Valdivia, Chile.

En el primer experimento se usaron 40 novillos de raza Frisón Negro con un peso promedio de 450 kg., los cuales fueron divididos en dos grupos de 20 animales cada uno (G_1 y G_2). El arreo de G_1 se realizó utilizando estímulos auditivos y visuales (varas con tiras plásticas de colores). El arreo de G_2 se realizó utilizando estímulos auditivos de mayor intensidad, estímulos visuales (varas con tiras plásticas de colores) y haciendo uso en cada animal dos veces de la picana eléctrica. En el segundo experimento se usaron 40 novillos de similares características a los del experimento anterior, con excepción del peso (350 kg. promedio), los cuales fueron divididos de igual forma que en el primer experimento. El arreo de G_1 se realizó utilizando estímulos auditivos y visuales. El arreo de G_2 se realizó utilizando caballos, estímulos auditivos de mayor intensidad, estímulos visuales (varas con tiras plásticas de colores) y haciendo uso en cada animal cuatro veces de la picana eléctrica.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante veno punción coccígea. La determinación del cortisol se realizó por radioinmunoensayo (RIA); la glicemia mediante la técnica para la glucosa GOD-PAP, sin deproteinización; el VGA y los leucocitos mediante el contador hematológico SYSMEX KX-21N, el lactato mediante el método UV-enzimático y la actividad plasmática de CK mediante el método UV-cinético. El análisis de los resultados se realizó utilizando estadística descriptiva, determinándose la significancia de la diferencia entre las medias mediante el test "t" de Student y test de Mann-Whitney.

En el experimento 1 solo se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en las concentraciones plasmáticas de cortisol y lactato, siendo el cortisol mas elevado en G_1 y el lactato en G_2 . En el experimento 2 no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre G_1 y G_2 . En base a estos resultados es posible concluir que los distintos métodos de arreo, con la intensidad en que fueron utilizados en este estudio, no fueron suficientes para evidenciar diferencias consistentes en las concentraciones plasmáticas de los indicadores de estrés analizados.

Palabras clave: novillos, estrés, arreo, cortisol, glucosa, lactato, hematocrito, leucocitos, creatinfosfoquinasa.

Financiado por Proyecto FONDECYT 101-02-01.

2. SUMMARY

The aim of the present study was to analyze the blood concentrations of cortisol, glucose, lactate, PCV, leukocytes and plasmatic activity of creatine kinase as blood indicators of stress in cattle subjected to different stimulus during the drive. The study was divided in two experiments, which were carried out in January and April of 2002 in a farm located in the province of Valdivia, Chile.

In the first experiment , 40 Friesian steers, with a mean weight of 450 kg., were used. They were divided in two groups of 20 animals each (G_1 and G_2). G_1 was driven using auditive and visual (stick with colored plastic streamers) stimulus. G_2 was driven using stronger auditive stimulus, visual stimulus (stick with colored plastic streamers) and using an electric goad two times in each animal. In the second experiment 40 steers with similar carasteristics of those used in the first experiment, with exception of the mean weight (350 kg.) were used. They were divided in two groups as in the experiment one. G_1 was driven using auditive and visual stimulus. G_2 was driven using horses, stronger auditive stimulus, visual stimulus (stick with colored plastic streamers) and using an electric goad four times in each animal.

Blood samples were obtained from the coccigeus vein. The plasma cortisol concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA); the glucose plasma concentrations by the GOD - PAP test without deprotenization; the lactate concentrations by the UV - enzymatic method; the PCV and leukocytes values by using the SYSMEX KX - 4N haemathologic counter and the CK plasma activity was measured by the UV - kinetic method. For analysing the results descriptive statistic was used. To determine the differences between means, the "t" of Student Test and Mann Whitney Test were used.

In the first experiment, significant differences ($P < 0,05$) were founded in cortisol and lactate concentrations, being cortisol higher in G_1 and lactate higher in G_2 . In the second experiment no significant ($P > 0,05$) differences between G_1 and G_2 were founded. Based in these results, it is possible to conclude that the different driving methods, at the intensity they were used in this study, were not enough to evidence consistent differences in the plasma concentrations of the stress indicators used.

Key words: steers, stress, drive, cortisol, glucose, lactate, hematocrite, leukocytes, creatine kinase.

Funded by FONDECYT 101-02-01

3. INTRODUCCIÓN

3.1. FUNDAMENTACIÓN GENERAL

Dentro de los manejos que se realizan con los bovinos dentro de un predio, el arreo de los animales de un lugar a otro es uno de los más frecuentes y para su realización se utilizan distintos métodos para lograr que los animales circulen en forma rápida hacia el lugar de destino. Es así como en nuestro medio aun se puede observar el uso de perros, palos, gritos y, en algunas ocasiones, de la picana eléctrica para lograr que los bovinos ingresen a los corrales, mangas, salas de ordeña., etc.

A pesar de que estos medios son aparentemente efectivos, su uso indiscriminado puede alterar el comportamiento de los animales, los cuales responderán de distinta manera según el método empleado y la intensidad con que se aplique.

Dentro de las respuestas a estos manejos, se puede observar aumento de la frecuencia respiratoria, mugidos, aumento de la agresividad, lo que es incrementado por el hecho de que, al arrearlos, se obliga a los animales a estar en contacto mas cercano entre ellos de lo que es normal para la especie, etc. Estos signos son indicadores de que el animal está siendo sometido a algún grado de estrés, el cual puede ser evaluado más objetivamente mediante la medición de algunas variables sanguíneas.

La importancia de medir el grado de estrés sufrido por los animales durante estos manejos radica en que se ha determinado que el estrés causa disminución en la producción de leche y consumo de alimento y, por ende, disminución en la ganancia de peso y, en el caso de aquellos animales que van a ser beneficiados, disminuye la calidad de la carne producida. En este sentido también es importante considerar el sufrimiento de los animales, con lo cual se estaría perjudicando el bienestar animal, concepto aun no muy considerado por los consumidores chilenos, pero que en los últimos años ha adquirido gran trascendencia en los países desarrollados, donde los consumidores se interesan en conocer de que forma son tratados los animales cuya carne están consumiendo. Debido a esto, y tomando en cuenta el tratado de libre comercio recientemente firmado con la Unión Europea, es posible predecir que esta conducta puede comenzar a manifestarse en nuestro país, lo cual es un motivo mas para investigar sobre este aspecto del manejo animal.

3.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

3.2.1. Bienestar animal y estrés

Según Broom (2000), en el último tiempo se ha observado un cambio substancial en la actitud de las personas con respecto a los animales como resultado de las publicaciones hechas en los medios de comunicación acerca de su comportamiento y fisiología, las cuales han

revelado su complejidad y similitud con los seres humanos. Según el mismo autor, un mayor conocimiento acerca del grado en que el bienestar de un animal puede ser alterado debido al dolor, temor u otros efectos adversos causados por el hombre o por el ambiente que el ser humano les impone, ha causado el pronunciamiento de líderes protestantes, católicos, musulmanes y budistas sobre las obligaciones de los hombres hacia los animales.

El bienestar de un individuo puede definirse como el estado en que éste se encuentra, en relación a los intentos que hace para hacer frente a su ambiente (Broom, 2000). La ciencia del bienestar animal es la ciencia que se preocupa sobre el sufrimiento y satisfacción de los animales. Ni el sufrimiento ni la satisfacción de un animal pueden ser medidos directamente, pero las consecuencias de las distintas causas de sufrimiento y satisfacción pueden ser comparadas de distinta manera (Gregory, 1998). La evaluación científica del bienestar debe separarse de cualquier forma de juicio moral. El bienestar es una característica de un individuo durante el tiempo en que éste es observado o medido, por lo que puede ser evaluado de una forma completamente objetiva. Una vez que las distintas mediciones de los indicadores de bienestar han sido realizadas la gente puede juzgar si dicho bienestar es aceptable (Broom, 2000).

Existen tres razones para preocuparse acerca del bienestar animal: respeto por los animales, el hecho de que el bienestar deficiente puede llevar a una calidad deficiente del producto y el riesgo de la pérdida de mercados para aquellos productos que adquieran una imagen de bienestar deficiente. La primera razón es de orden moral y cada persona tiene distintos valores y puntos de vista (Gregory, 1998).

El bienestar deficiente puede llevar a una inferior calidad de la carne. En el mercado de la carne fresca esto causa pérdida de dinero y ventas debido al rechazo o devaluación de aquellos productos de inferior calidad (Gregory, 1998).

El manejo brusco es el problema de bienestar mas importante. Es la principal causa de heridas, golpes y estrés. Aquellos que manejan animales deben aprender los principios de comportamiento del ganado para así poder mover a los animales calmada y eficientemente (Grandin, 1987). Algunos de los principios mas importantes es trabajar en el borde de la zona de huida de los animales y pararse por detrás del punto de equilibrio del miembro delantero, para hacer al animal moverse hacia delante (Kilgour y Dalton, 1984; Grandin, 1987). La zona de huida es el espacio personal del animal, ésta varía desde 0 metros para novillos de exposición hasta 30 metros para el ganado salvaje. Entendiendo este principio se puede mover todo tipo de ganado calmadamente. Un animal calmado es mas fácil de mover y es menos probable que se asuste. Para mantener a los animales tranquilos, aquellos que los manejen deben hacer movimientos lentos y cuidadosos, los movimientos repentinos y bruscos causan que los animales se exciten. También debe evitarse el gritar y hacer sonidos fuertes. En muchos casos las picanas eléctricas pueden ser reemplazadas por otros elementos de conducción como varas con banderas plásticas en un extremo . Estas varas deben ser usadas para dirigir a los animales suavemente y no deben ser agitadas (Grandin, 1994).

Probablemente el indicador mas importante y utilizado de bienestar animal es la presencia o ausencia de algún grado de estrés (Mench, 2000).

Según Selye (1954), el estrés es la acción de estímulos nerviosos y emocionales provocados por el ambiente de un animal sobre los sistemas nervioso, endocrino, circulatorio, respiratorio y digestivo, produciendo cambios medibles en los niveles funcionales de estos sistemas. Los receptores sensoriales que perciben estos estímulos son principalmente de tipo auditivo, táctil, olfatorio y visual.

Los estímulos estresantes incluyen tanto los cambios del medio interno (lesión tisular, hipoglicemia, hemorragia, infección, etc.), como del medio externo (frío, calor, agresión, etc.), alteraciones psicológicas (miedo, rabia, ansiedad, sorpresa, etc.) o la combinación de varios estímulos, como puede ser por ejemplo agresión, lesión tisular, dolor y ansiedad. La respuesta fisiológica al estrés da lugar a una serie de ajustes a largo o corto plazo en el sistema cardiovascular, en el metabolismo, sistema inmunitario, neuroendocrino y somatosensorial que permiten que el organismo se adapte a una serie de estímulos tanto físicos como psicológicos (Tresguerres, 1999).

Los animales responden fisiológicamente al estrés de un modo característico. Esta respuesta al estrés tiene dos componentes. La primera es una respuesta de alarma rápida. Ésta fue estudiada por el fisiólogo americano W.B. Cannon en la década del '30, quien se refirió a ella como Síndrome de Emergencia (Warris, 2000). Cannon enfatizó dos tipos de estímulos: (1) la presencia de peligro y (2) la exposición a circunstancias medio ambientales extremas (Stott, 1981). La respuesta del animal a una amenaza, por ejemplo la repentina llegada de un depredador, es preparar al organismo para la "lucha o huída". Esta preparación incluye principalmente la actividad del sistema simpato-adrenal y la secreción de catecolaminas, adrenalina y noradrenalina (Warris, 2000).

Según el mismo autor, el segundo componente de la respuesta al estrés ocurre después de la respuesta de "alarma" y por un periodo de tiempo mayor. Su función es permitir que el animal se recupere de la respuesta de alarma o que se "adapte" a la nueva situación. Fue reconocido por primera vez por el trabajo Hans Selye en la década del '50, quien se refirió a ella como el Síndrome General de Adaptación. Este componente de la respuesta de un animal al estrés involucra principalmente el eje hipófisis-adrenal. Según Stott (1981), el Síndrome General de Adaptación de Selye ocurre cuando hay una exposición gradual o prolongada a algunas de las condiciones medio ambientales adversas u otro tipo de estrés medio ambiental. El síndrome es el mismo para todos los cambios no específicos inducidos en un sistema biológico .

3.2.2. Medición del grado de estrés

La magnitud del estrés ambiental sólo puede ser medida indirectamente a través de las respuestas del animal. (Stott, 1981). La importancia de medir el grado de estrés se basa en que de esta forma se puede decidir cuales procedimientos son mas o menos estresantes y, a partir

de esto, poder hacer recomendaciones acerca de cómo minimizar o controlar el estrés (Gregory, 1998).

Existen al menos dos métodos para cuantificar estrés en animales: la respuestas de comportamiento y la medición de tejidos y fluidos (Shaw y Tume, 1992).

La respuesta inmediata al estrés se encuentra mediada por el hipotálamo, el sistema nervioso autónomo y la médula adrenal y se caracteriza por: aumento de la glicemia, de la frecuencia y fuerza de contracción cardíacas, aumento del flujo sanguíneo en el músculo esquelético, vasoconstricción esplénica y aumento del número de eritrocitos circulantes, aumento de la capacidad respiratoria y dilatación bronquial. Todos estos cambios aseguran la perfusión sanguínea a los órganos vitales como el corazón y el cerebro, así como al pulmón y músculo esquelético. Si el estímulo persiste, se ponen en marcha otros sistemas de respuesta a más largo plazo, entre los que se destaca el aumento de la secreción de cortisol por la corteza adrenal. Los glucocorticoides refuerzan las acciones del sistema nervioso simpático sobre el sistema circulatorio y contribuyen a mantener los niveles de glucosa en la sangre ante una situación de emergencia (Tresguerres, 1999).

La parte del cerebro que causa que el animal presente la respuesta de temor o alarma es la amígdala (Gregory, 1998). Este importante centro cerebral está ubicado en la porción medio dorsal del lóbulo temporal (Carpenter, 1994). La amígdala regula el temor e inicia la mayoría de las respuestas fisiológicas ligadas a él. Las respuestas de estrés que emanan de la amígdala son mediadas principalmente a través del sistema nervioso simpático, médula adrenal, sistema nervioso parasimpático y corteza adrenal. El sistema nervioso simpático y la médula adrenal provocan respuestas muy rápidas, tales como aumento en la frecuencia cardíaca y presión sanguínea, a través de la liberación de adrenalina y noradrenalina, las cuales ingresan a la circulación sanguínea y se distribuyen por el cuerpo. La adrenalina y noradrenalina no son tan útiles como los corticoesteroides como indicadores de estrés debido a que tienen un vida media corta en la circulación, la cual es de tan solo 2 minutos para la noradrenalina (Gregory, 1998).

Adrenalina y noradrenalina son los principales transmisores entre el sistema nervioso simpático y sus receptores. La adrenalina es liberada completamente por la médula adrenal, mientras que la noradrenalina es liberada por la médula adrenal y terminaciones nerviosas simpáticas (Lister y col., 1981)

La corteza adrenal libera corticoesteroides, los cuales tienen efectos más tardíos. La respuesta de los corticoesteroides ha sido particularmente útil para comparar el efecto de diferentes elementos o situaciones estresantes en los animales. Cuando estas respuestas son causadas por temor son mediadas por la amígdala, la cual activa el núcleo paraventricular del hipotálamo, iniciándose la liberación del factor liberador de corticotrofina (CRF). Este neurotransmisor llega a la hipófisis e induce la liberación de hormona adrenocorticotrófica (ACTH) hacia la circulación general. La ACTH es llevada por la sangre hacia la corteza adrenal, donde estimula la liberación de hormonas corticoesteroides. En los bovinos, cerdos y ovinos la principal hormona corticoesteroide es el cortisol. (Gregory, 1998). La liberación de

estas hormonas causa un incremento agudo en la frecuencia cardíaca y presión sanguínea y estimula la glicogenólisis hepática. Esto lleva a un aumento en la disponibilidad de glucosa y a un aumento en minutos de los niveles plasmáticos de glucosa (Grandin, 2000).

Debido a que las respuestas aguda y crónica son medidas a través de las concentraciones séricas es difícil interpretarlas como indicadores de estrés en cualquier momento. Sin embargo, las muestras de suero seriadas tomadas antes, durante y después del estrés en los animales mayores pueden otorgar mucha información acerca de la magnitud del estrés, ya sea agudo o en la fase de adaptación (Stott, 1981).

3.2.2.1. Cortisol. Las hormonas glucocorticoides, liberadas desde la corteza adrenal en respuesta a un amplio rango de estresores, juegan un rol importante en la mediación de la respuesta fisiológica (Grandin, 2000). El cortisol es el principal glucocorticoide secretado en respuesta a la liberación de ACTH por parte de la hipófisis (Shaw y Tume, 1992). La vía que lleva a la liberación del cortisol actúa a través del hipotálamo, hipófisis y corteza adrenal (Grandin, 2000). Debido al rol del cerebro en la liberación de glucocorticoides éstos son usados como medida de la percepción psicológica de las situaciones por parte de los animales.

Los glucocorticoides disminuyen la utilización de glucosa por los tejidos periféricos y producen la movilización de precursores como los aminoácidos desde el músculo esquelético para la síntesis de glucosa en el hígado. Esta gluconeogénesis lleva a una leve hiperglicemia. También producen movilización de grasa periférica. Los glucocorticoides también tienen un efecto negativo en el sistema inmune y en la respuesta inflamatoria. La secreción de glucocorticoides es, en la mayoría de las especies, mayor en las primeras horas de la mañana y menor en la noche (Robinson y Huxtable, 1988). La vida media del cortisol en el torrente sanguíneo es de 20 minutos aproximadamente (Gregory, 1998). Según Radostits y col. (2000), los valores de referencia para el bovino son de 0,47 – 0,75 µg/dl .

Existe evidencia de que, para un amplio rango de especies, los niveles de cortisol aumentan en respuesta al estrés (Shaw y Tume, 1992). La respuesta de los glucocorticoides al estrés es inmediata y se observa que las concentraciones de cortisol aumentan con rapidez para llegar a valores varias veces sobre lo normal en minutos, siendo esta respuesta proporcional a la gravedad del estrés, esto es, los niveles más bajos de estrés dan lugar a una menor producción de cortisol comparado con los niveles altos de estrés (Cunningham, 1999). Si aparecen diferencias significativas cuando dos tratamientos están siendo comparados, entonces se podría asumir que el tratamiento que produce menores niveles de cortisol es menos estresante (Shaw y Tume, 1992).

En un estudio realizado por Mitchell y col. (1988), con novillos en los cuales la sangre se obtuvo por medio de un catéter endovenoso y en los cuales no se realizó ningún manejo estresante se obtuvieron valores promedio de cortisol de $0,75 \pm 0,4$ µg/dl. En un estudio similar, realizado por Oyarce (2002)* se obtuvieron valores promedio de 1,4 µg/dl.

*Memoria de Título en ejecución. Instituto de Ciencias Clínicas, UACH.

3.2.2.2. Glucosa. La glucosa constituye la principal fuente de energía en el organismo, participando también en la síntesis de aminoácidos y ácidos grasos como también formando parte estructural de glicolípidos y glicoproteínas. Es el principal azúcar de la sangre, cuya concentración está controlada por la dieta y hormonas, la insulina que la disminuye y los glucocorticoides que la aumentan (Wittwer y Böhmwald, 1983), es por esto que Shaw y Tume (1992), indican que los niveles de glucosa son un indicador indirecto de estrés.

Kerr (1989), señala que, tanto las catecolaminas como los glucocorticoides afectan las concentraciones de glucosa durante los episodios de estrés. Cunnigham (1999), indica que el cortisol aumenta los niveles circulantes de glucosa debido a su efecto neoglucogénico a nivel hepático y las catecolaminas elevan la glicemia debido su acción glucogenolítica.

Mitchell y col.(1988), determinaron que la glicemia de novillos y vaquillas sometidos a un manejo estresante era mayor que la de aquel grupo que no fue sometido a este tipo de manejo.

Según Wittwer y Böhmwald (1983), los valores promedio en bovinos son de 3,0 - 4,4 mmol/l.

3.2.2.3. Lactato. La ruptura de las fibras de colágeno, como resultado de un esfuerzo muscular extremo, puede llevar a una producción de grandes cantidades de ácido láctico, el cual es liberado al torrente sanguíneo. En consecuencia, elevadas concentraciones de lactato se presentan luego de una actividad muscular excesiva. Adicionalmente, la liberación de catecolaminas como resultado de temor o excitación también puede llevar a una rápida glicogenólisis y, de este modo, a una excesiva producción de lactato (Shaw y Tume, 1992).

Según Gregory (1998), durante episodios cortos de ejercicio violento se produce una rápida ruptura del glicógeno muscular y la producción de grandes cantidades de ácido láctico a través de la vía glicolítica. El lactato y los iones H^+ entran a la circulación y, en los mamíferos, sus niveles sanguíneos son indicadores útiles de la severidad del ejercicio. El glicógeno es transformado a través de la vía glicolítica en piruvato. El piruvato puede ser usado para generar ATP o es convertido en lactato. La conversión de glucosa a lactato ocurre cuando el músculo está hipóxico o cuando existe un exceso de piruvato. La formación de lactato a partir del piruvato no requiere oxígeno.

Mitchell y col. (1988), demostraron que el manejo y el transporte producen un aumento significativo de lactato en el plasma, sin embargo, el mayor aumento fue observado en muestras post faenamiento.

Los valores de referencia para el bovino son, según Radostits y col. (2000), de 0,6 – 2,2 mmol/l.

3.2.2.4. Hematocrito (VGA). El hematocrito (VGA) representa el porcentaje de volumen de sangre que está dado por los eritrocitos, y su valor depende fundamentalmente del número y tamaño de éstos. El VGA, además, constituye la prueba aislada mas útil en hematología por la

información que entrega y por su facilidad, costo y exactitud. El rango promedio en bovinos es de 28-38% (Wittwer y Böhmwald, 1983).

La eritrocitosis relativa es aquella en la cual el hematocrito está elevado, pero el recuento total de eritrocitos es normal. Puede ser causada por la contracción del bazo o por deshidratación. La contracción del bazo puede deberse a excitación, temor, dolor o ejercicio. El aumento de los valores de hematocrito en la sangre se debe a que los valores de hematocrito en el bazo son considerablemente mayores que en la circulación general (Meyer y Harvey, 1998). La principal fuente de reserva de células rojas es el bazo y la contracción esplénica es inducida por la actividad del sistema nervioso simpático o por las catecolaminas circulantes. Por lo general, el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático es acompañado por un aumento de concentración plasmática de noradrenalina (Mitchell y col., 1988).

3.2.2.5. Leucocitos. Leucocitos es un nombre genérico que se da a las células blancas nucleadas de la sangre; incluye a los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos (Wittwer y Böhmwald, 1983). La función de los leucocitos es la defensa del organismo. Los valores de referencia en el bovino son de 4 - 12 mil/ μ l. (Meyer y Harvey, 1998).

El ejercicio muscular y el temor tienen influencia sobre el recuento leucocitario total y diferencial. Una muestra de sangre tomada de un animal que ha sido sometido a un ejercicio excesivo o que halla sufrido disturbios emocionales debido a la sujeción, no es representativo del verdadero estado leucocitario de dicho animal. Si en el proceso de obtención de sangre el animal es maltratado o llevado a hacer un ejercicio violento, como usualmente ocurre cuando se sujeta a un animal, el recuento leucocitario total puede incrementarse y el número de neutrófilos será mayor que el normal debido a su paso desde el pool marginal al circulatorio (Coles, 1986).

El aumento del recuento leucocitario como resultado de ejercicio muscular, excitación, miedo o disturbios emocionales constituye una leucocitosis fisiológica. La leucocitosis fisiológica, que se produce debido a el aumento de los neutrófilos y linfocitos, es considerada un efecto de la adrenalina (Schalm, 1986).

La neutrofilia se produce rápidamente tras la liberación de adrenalina. El recuento leucocitario generalmente no aumenta más allá del doble que lo normal y no ocurren desviaciones hacia la izquierda. Estos efectos sobre el leucograma deben volver a la normalidad dentro de 30 minutos del cese del estímulo estresante (Meyer y Harvey, 1998).

Según Meyer y Harvey (1998), el aumento de los glucocorticoides endógenos también tiene un efecto importante en el número circulante de células blancas, el cual es denominado "leucograma de estrés". Las causas potenciales de esto son el temor, estrés emocional prolongado, temperatura corporal aumentada e hiperadrenocorticismo. La neutrofilia se produce porque los glucocorticoides producen un aumento de la liberación de neutrófilos maduros desde la médula osea y una disminución del paso de neutrófilos desde la sangre hacia los tejidos. También se produce un aumento del porcentaje de neutrófilos en el pool circulante comparado con el pool marginal. El número absoluto de neutrófilos a menudo aumenta más

allá del doble y generalmente no se presentan desviaciones hacia la izquierda. Los glucocorticoides producen linfopenia y eosinopenia en todos los animales domésticos. La magnitud de la neutrofilia va disminuyendo con el tiempo, pero la linfopenia y eosinopenia persisten mientras las concentraciones plasmáticas de glucocorticoides permanezcan elevadas.

3.2.2.6. Creatinfosfoquinasa. La enzima creatinquinasa (también llamada creatinfosfoquinasa) está presente en el músculo, donde hace que el ATP esté disponible para la contracción mediante la fosforilación del ADP a partir del creatinfosfato. Aparece en la circulación plasmática como resultado de daño tisular y es relativamente organoespecífica (Grandin, 2000).

Al existir un aumento en la actividad física se producirá una elevación de la actividad plasmática de CK, en la que la enzima es liberada desde el músculo por cambios de permeabilidad de la membrana celular (Tarrant y Grandin, 1993). Después de un episodio de daño muscular los niveles séricos de CK aumentan hasta llegar a un máximo después de 2 a 12 horas de producido el daño y declinan hasta llegar a los valores normales dentro de 24 a 36 horas. Mientras mas severo sea el daño muscular mayores van a ser los niveles circulantes de CK. Si ocurren repetidos daños en el músculo los niveles circulantes de la enzima permanecerán elevados por un periodo de tiempo mas largo (Doxey, 1983). Esta enzima es, según Lister y col. (1981), un indicador de estrés ampliamente usado en los animales. Los valores de referencia para el bovino son de 35 – 280 U/l (Radostits y col., 2000).

3.3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Ha: Existen diferencias en las concentraciones y valores de algunos indicadores de estrés en novillos sometidos a arreo mediante estímulos visuales y auditivos de moderada intensidad comparados con novillos sometidos a arreo mediante estímulos visuales, auditivos de elevada intensidad y estímulos físicos.

3.4. OBJETIVOS

3.4.1. Objetivo general

Determinar el efecto de dos tipos de arreo sobre los valores y concentraciones de algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos.

3.4.2. Objetivos específicos:

Determinar el efecto de un arreo mediante estímulos visuales y auditivos de moderada intensidad sobre las concentraciones sanguíneas de cortisol, glucosa, lactato, valores de hematocrito, leucocitos y actividad de creatinfosfoquinasa en novillos.

Determinar el efecto de un arreo con estímulos visuales, auditivos de elevada intensidad y estímulos físicos sobre las concentraciones sanguíneas de cortisol, glucosa, lactato, valores de hematocrito, leucocitos y actividad de creatinfosfoquinasa en novillos.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. EXPERIMENTO 1

El presente trabajo se llevo a cabo en un predio ubicado en la provincia de Valdivia en enero de 2002.

4.1.1. Material

Para la realización del experimento se usaron 40 novillos de similares características en cuanto a raza (Frisón Negro), procedencia, edad y peso (450 kg. promedio aproximadamente).

Para la obtención de sangre se utilizaron tubos con heparina y con NaF.

Para efectuar los arrees se utilizaron varas con tiras plásticas de colores, picana eléctrica y elementos sonoros (tarros metálicos con piedras en su interior).

4.1.2. Método

Los novillos fueron divididos dentro del potrero en cuatro grupos de 10 animales cada uno. El primer grupo fue llevado en forma calmada hacia los corrales a través de un camino de aproximadamente 200 m. Luego de un periodo de descanso de aproximadamente 5 minutos se procedió a realizar el arreo, el cual consistió en hacerles dar dos vueltas completas por el corral para luego introducirlos a la manga. Esto se realizó usando estímulos auditivos (voces) y visuales (varas con tiras plásticas de colores). Una vez en la manga se tomaron muestras de sangre vía punción de la vena coccígea. El proceso de obtención de sangre demoró en total 15 minutos.

El segundo grupo fue llevado hacia los corrales en forma similar al grupo anterior, y luego de un descanso de 5 minutos se procedió a realizar el arreo, el cual consistió en hacerlos dar dos vueltas completas por el corral para luego introducirlos a la manga. Esto se realizó utilizando estímulos auditivos de mayor intensidad (gritos, silbidos y el uso de los tarros con piedras) y estímulos visuales (varas con tiras plásticas de colores). Una vez dentro de la manga se aplicó la picana eléctrica (estímulo físico) dos veces en cada animal. Posteriormente se tomaron muestras de sangre desde la vena coccígea. El tiempo total ocupado en la aplicación de la picana y la obtención de las muestras fue de 15 minutos.

Estos dos manejos se repitieron con el tercer y cuarto grupo, respectivamente, obteniéndose al final dos grupos de 20 animales para cada tipo de arreo: G₁, que fue arreado mediante estímulos visuales y auditivos de moderada intensidad y G₂, que fue arreado mediante el uso de estímulos visuales, auditivos de alta intensidad y estímulos físicos.

4.2. EXPERIMENTO 2

Este experimento se realizó en el mismo predio que el experimento 1, en el mes de abril de 2002.

4.2.1. Material

Para la realización del experimento se utilizaron 40 novillos de similares características en cuanto a raza (Frisón Negro), procedencia, edad y peso (350 kg. en promedio aproximadamente).

Para la obtención de sangre se utilizaron tubos con heparina y con NaF.

Para efectuar los arreos se utilizaron varas con tiras plásticas de colores, picana eléctrica, elementos auditivos (tarros metálicos con piedras en su interior) y uso de caballos.

4.2.2. Método

Los novillos fueron divididos dentro del potrero en dos grupos de 20 animales cada uno (G_1 y G_2).

El G_1 fue llevado en forma calmada hacia los corrales a través de un camino de aproximadamente 200 m. Luego de un periodo de descanso de aproximadamente 5 minutos se procedió a realizar el arreo, el cual consistió en hacerles dar cuatro vueltas completas por el corral para luego introducirlos a la manga. Esto se realizó usando estímulos auditivos de baja intensidad (voces suaves) y mediante el uso de coligues como extensión de los brazos, los cuales fueron usados sólo como estímulos visuales. Una vez en la manga se tomaron muestras de sangre vía punción de la vena coccígea. El proceso de obtención de muestras demoró en total 20 minutos.

El G_2 fue llevado hacia los corrales en forma similar al grupo anterior, y luego de un descanso de 5 minutos se procedió a realizar el arreo, el cual consistió en hacerles dar cuatro vueltas completas por el corral para luego introducirlos a la manga. Esto se realizó utilizando estímulos auditivos de mayor intensidad (gritos, silbidos y el uso de los tarros con piedras), estímulos visuales (varas con tiras plásticas de colores) y uso de caballos. Una vez dentro de la manga se aplicó la picana eléctrica (estímulo físico) cuatro veces en cada animal. Posteriormente se tomaron muestras de sangre desde la vena coccígea. El tiempo ocupado en la aplicación de la picana eléctrica y el proceso de obtención de las muestras fue de 25 minutos.

4.3. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES SANGUÍNEAS

4.3.1. Determinación de la concentración sanguínea de cortisol

Se usaron tubos con heparina para la obtención de plasma. La determinación de los niveles de cortisol se realizó mediante radioinmunoensayo (RIA) en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Concepción.

4.3.2. Determinación de los valores de hematocrito (VGA) y leucocitos

La obtención de sangre entera se realizó mediante la utilización de tubos con heparina. La determinación del VGA y leucocitos se realizó mediante el contador hematológico SYSMEX KX-21N.

4.3.3. Determinación de la concentración sanguínea de glucosa

La obtención de sangre y posteriormente plasma se realizó mediante el uso de tubos con NaF. La determinación se hizo en base al procedimiento de la prueba para la glucosa GOD-PAP (Liquid), sin deproteinización (GL 2623, RANDOX), la determinación de la glucosa se realizó tras una oxidación enzimática con glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona, por catálisis de la peroxidasa, con el fenol y el 4-aminofenasona para formar un color rojo violeta como indicador. Este análisis se realizó mediante el uso del espectrofotómetro COBAS MIRA PLUS de Roche.

4.3.4. Determinación de la concentración sanguínea de lactato

La determinación se realizó mediante una reacción enzimática que transforma el lactato en piruvato. Posteriormente, el peróxido de hidrógeno producido en esta reacción es usado en una nueva reacción enzimática, la cual genera color. El análisis se realizó por el espectrofotómetro COBAS MIRA PLUS de Roche a una temperatura de 37°C. El reactivo usado es el 1822837 de Roche.

4.3.5. Determinación de la actividad plasmática de la creatinfosfoquinasa.

La determinación se hizo mediante el método UV-cinético, a 340 nm y 37°C, optimizado según Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. Se emplearon reactivos de Roche y un espectrofotómetro COBAS MIRA PLUS de Roche.

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan en gráficos utilizando estadística descriptiva en base a promedios y desviaciones estándar. La normalidad de los datos se analizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Para determinar la existencia de diferencias significativas en el comportamiento de las características de interés la significancia de la diferencia entre medidas se determinó utilizando el test de "t" de Student o Mann-Whitney, según fuera necesario. Para ello se utilizó el programa computacional GraphPad Prism 3.0.

5. RESULTADOS

5.1. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CORTISOL

En el experimento 1 las concentraciones plasmáticas de cortisol fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) en el grupo de animales sometidos a arreo mediante el uso de estímulos visuales y auditivos de moderada intensidad (G_1) que en el grupo de animales sometidos a arreo mediante estímulos visuales, auditivos de elevada intensidad y estímulos físicos (G_2) (Gráfico 1). En el experimento 2 no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre G_1 y G_2 (Gráfico 2).

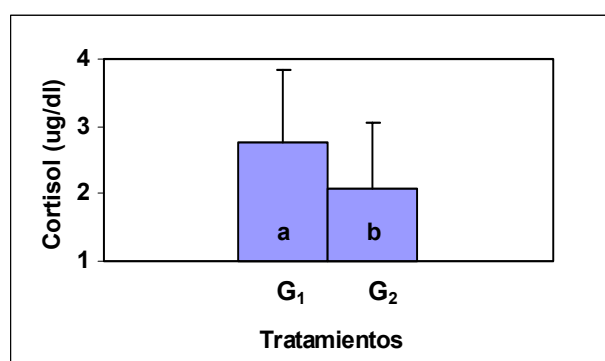


Gráfico 1. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en las concentraciones plasmáticas de cortisol ($\mu\text{g/dl}$) entre G_1 y G_2 en el experimento 1.

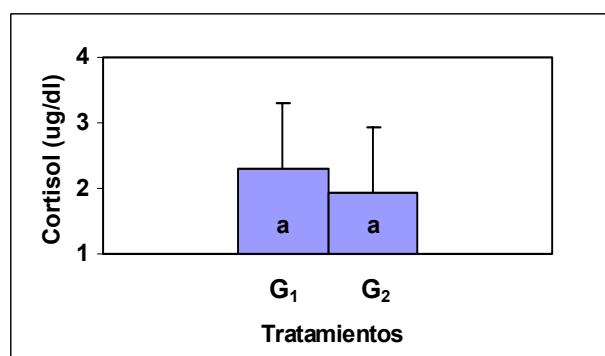


Gráfico 2. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en las concentraciones plasmáticas de cortisol ($\mu\text{g/dl}$) entre G_1 y G_2 en el experimento 2.

* Letras distintas indican que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos

5.2. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE GLUCOSA

En el experimento 1 (Gráfico 3) y experimento 2 (Gráfico 4), no se encontraron diferencias significativas ($P>0,05$) en las concentraciones plasmáticas de glucosa entre el grupo de animales sometidos a arreo mediante estímulos visuales y auditivos de moderada intensidad (G_1) y el grupo de animales sometidos a arreo mediante estímulos visuales, auditivos de elevada intensidad y estímulos físicos (G_2).

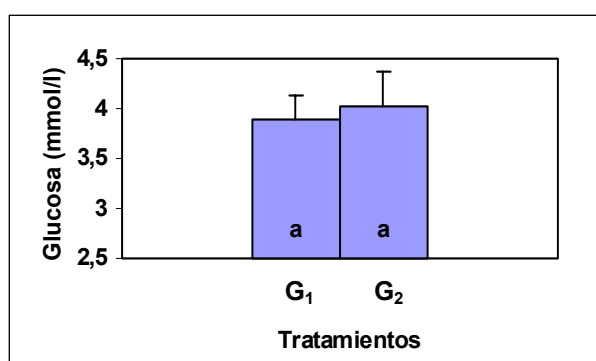


Gráfico 3. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en las concentraciones plasmáticas de glucosa (mmol/l) entre G_1 y G_2 en el experimento 1.

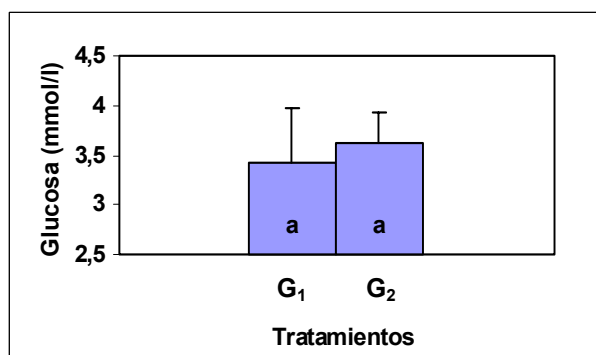


Gráfico 4. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en las concentraciones plasmáticas de glucosa (mmol/l) entre G_1 y G_2 en el experimento 2.

*Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$) entre tratamientos.

5.3. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LACTATO

En el experimento 1 las concentraciones plasmáticas de lactato fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) en el grupo de animales sometidos a arreo mediante el uso de estímulos visuales, auditivos de alta intensidad y estímulos físicos (G_2), que las correspondientes al grupo de animales sometidos a arreo mediante estímulos visuales y auditivos de moderada intensidad (G_1) (Gráfico 5). En el experimento 2 no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre G_1 y G_2 , pero se observa la misma tendencia que en el experimento 1 (Gráfico 6).

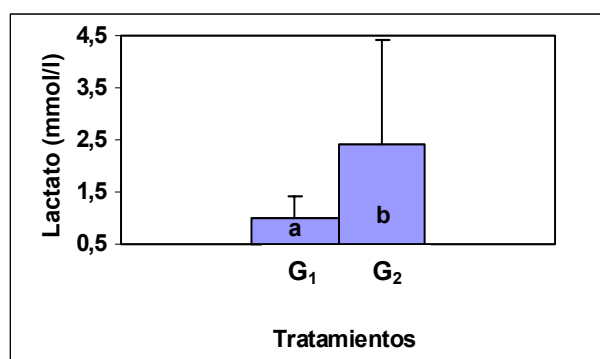


Gráfico 5. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en las concentraciones plasmáticas de lactato (mmol/l) entre G_1 y G_2 en el experimento 1.

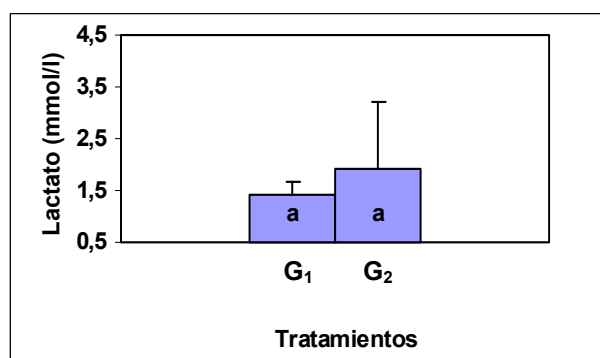


Gráfico 6. valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en las concentraciones plasmáticas de lactato (mmol/l) entre G_1 y G_2 en el experimento 2.

*Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

5.4. VALORES DE HEMATOCRITO

En el experimento 1 (Gráfico 7) y experimento 2 (Gráfico 8), no se encontraron diferencias significativas ($P>0,05$) en los valores de hematocrito (VGA) entre el grupo de animales sometidos a arreo mediante estímulos visuales y auditivos de moderada intensidad (G_1) y el grupo de animales sometidos a arreo mediante estímulos visuales, auditivos de elevada intensidad y estímulos físicos (G_2).

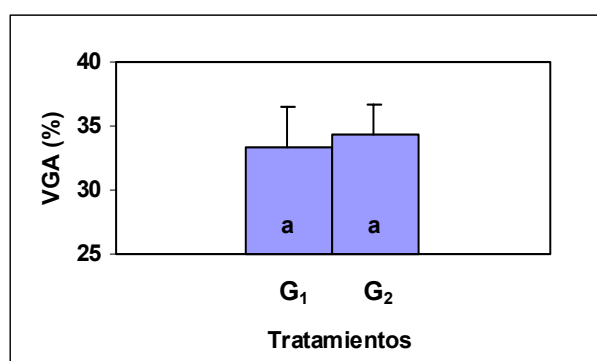


Gráfico 7. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en los valores de hematocrito (%) entre G_1 y G_2 en el experimento 1.

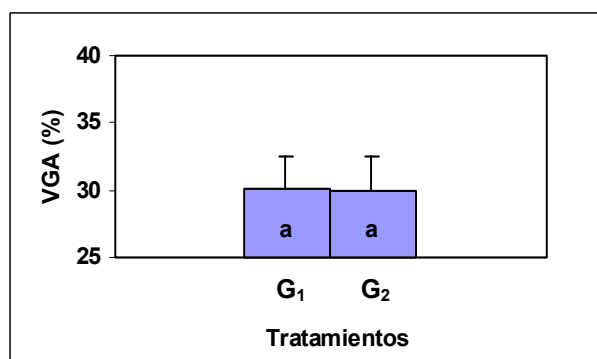


Gráfico 8. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en los valores de hematocrito (%) entre G_1 y G_2 en el experimento 2.

*Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$) entre tratamientos.

5.5. VALORES SANGUÍNEOS DE LEUCOCITOS

En el experimento 1 (Gráfico 9) y experimento 2 (Gráfico 10), no se encontraron diferencias significativas ($P>0,05$) en los valores sanguíneos de leucocitos entre el grupo de animales sometidos a arreo mediante estímulos visuales y auditivos de moderada intensidad (G_1) y el grupo de animales sometidos a arreo mediante estímulos visuales, auditivos de elevada intensidad y estímulos físicos (G_2).

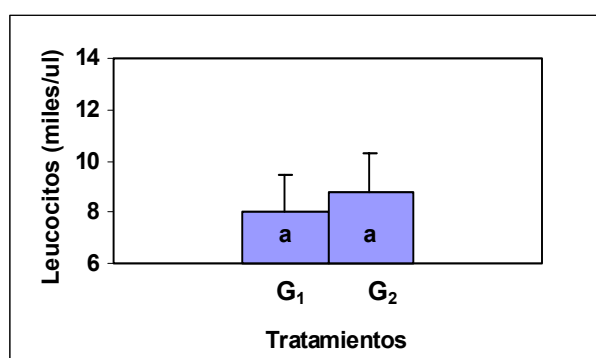


Gráfico 9. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en las concentraciones plasmáticas de leucocitos (miles/ μ l) entre G_1 y G_2 en el experimento 1.

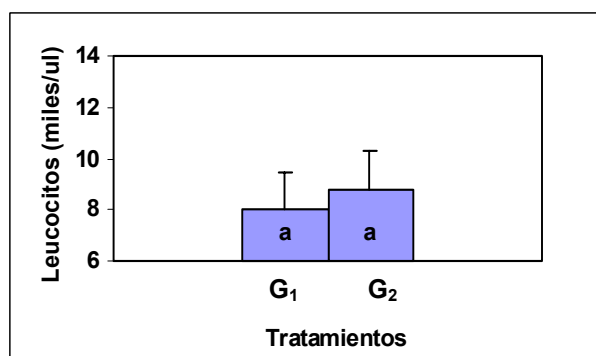


Gráfico 10. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en las concentraciones plasmáticas de leucocitos (miles/ μ l) entre G_1 y G_2 en el experimento 2.

*Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P>0,05$) entre tratamientos.

5.6. ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE CK

En el experimento 1 (Gráfico 11) y experimento 2 (Gráfico 12), no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la actividad plasmática de CK entre el grupo de animales sometidos a arreo mediante estímulos visuales y auditivos de moderada intensidad (G_1) y el grupo de animales sometidos a arreo mediante estímulos visuales, auditivos de elevada intensidad y estímulos físicos (G_2).

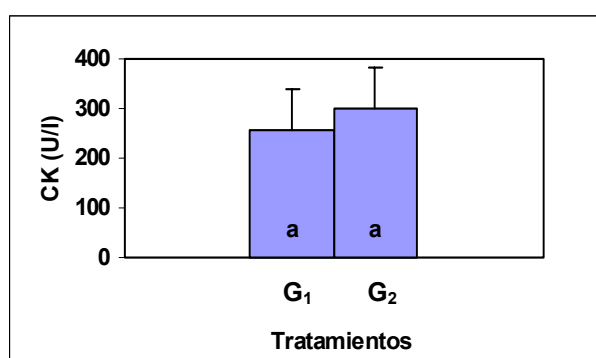


Gráfico 11. Valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en la actividad plasmática de CK (U/l) entre G_1 y G_2 en el experimento 1.

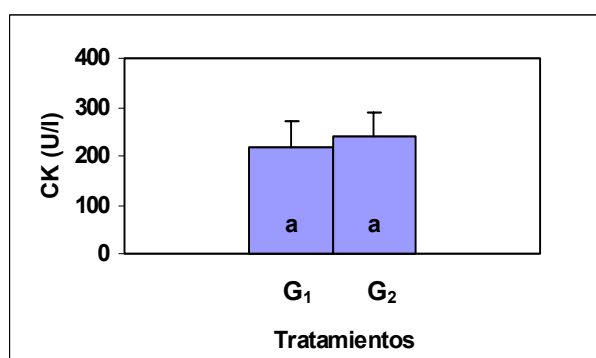


Gráfico 12. valores promedio \pm d.e y significancia estadística de las diferencias en la actividad plasmática de CK (U/l) entre G_1 y G_2 en el experimento 2.

*Letras iguales indican que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos.

6. DISCUSIÓN

6.1. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CORTISOL.

Las significativamente mayores ($P < 0,05$) concentraciones plasmáticas de cortisol obtenidas en el experimento 1 en el grupo de animales que recibieron menos estímulos durante el arreo (G_1) fueron inesperadas. Según Shaw y Tume (1992), si existen diferencias significativas en las concentraciones sanguíneas de cortisol cuando dos tratamientos están siendo comparados se podría asumir que el tratamiento que produce menores valores es menos estresante. Basándose en esto, se podría asumir que el método de arreo usado en el G_2 resultó menos estresante para los animales que el usado en G_1 . Este resultado no concuerda con lo señalado por Broom (2000), quien manifiesta que el uso de la picana eléctrica a menudo tiene un efecto muy severo sobre el animal y que su uso es inhumano e inaceptable, tampoco con lo señalado por Gregory (1998), con respecto a que la picana eléctrica es desagradable y dolorosa para los animales.

No se encontraron antecedentes en la literatura consultada acerca del efecto de distintos métodos de arreo sobre las concentraciones sanguíneas de cortisol, sin embargo, Cockram y Corley (1991), encontraron que, a medida que el ganado era golpeado en mayor número de ocasiones con un tubo de plástico, menores eran las concentraciones plasmáticas de cortisol. Los autores manifiestan que este resultado fue inesperado y no dan una explicación para ello.

Una posible teoría para explicar los resultados obtenidos en el experimento 1 es que, producto del estrés sufrido por los animales, se produjo un rápido paso del cortisol circulante hacia los tejidos blanco, disminuyendo así su concentración en el plasma antes de que se produjera el aumento de éste debido a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Es probable que la muestra de sangre, que fue tomada en cada animal antes de que transcurrieran 5 minutos del uso de la picana, no haya alcanzado a reflejar el aumento de la concentración sanguínea de cortisol. Lamentablemente, no se encontraron antecedentes en la literatura consultada acerca de la velocidad del paso del cortisol desde la circulación hacia los tejidos producto del estrés. Tampoco se encontraron antecedentes acerca de cuantos minutos se requieren para que el aumento de las concentraciones sanguíneas de cortisol se haga evidente en el bovino posterior a una situación estresante. Al respecto, Lister y col. (1981), manifiestan que la velocidad de la respuesta varía en las diferentes especies; en los ovinos el tiempo que transcurre entre la aplicación de un estímulo estresante y el máximo nivel sanguíneo de cortisol es de 30-40 minutos, mientras en cerdos es de aproximadamente 15 minutos. Basándose en estos antecedentes es posible inferir que el tiempo que transcurrió entre los estímulos y la obtención de la muestra pudo haber sido insuficiente para que se evidenciara un aumento del cortisol en la sangre.

Es importante destacar que, en ambos experimentos, las concentraciones sanguíneas de cortisol, en G_1 y G_2 , se encuentran por sobre los valores normales dados por Radostits y col. (2000), para la especie. También son mayores a las encontradas por Mitchell y col. (1988), y por Oyarce (2002),* en animales no estresados, por lo que es probable que el manejo completo realizado en ambos grupos (separación de los grupos, arreo desde el potrero, arreo dentro de los corrales y hacia la manga), haya provocado cierto grado de estrés en los animales. Esto concuerda con lo señalado por Mitchell y col. (1988), quienes encontraron que las concentraciones de cortisol aumentaban en forma significativa tras el procedimiento de manejo que consistía en introducir animales en una manga y obtener sangre por medio de punción yugular comparado con aquellos animales que estaban acostumbrados a ese tipo de manejo y en los cuales la sangre se obtuvo a partir del uso de un catéter endovenoso.

En el experimento 2, a pesar de no observarse diferencias significativas ($P>0,05$), se observa la misma tendencia que en el experimento 1. En este experimento se observaron diferencias en el comportamiento de los animales entre ambos grupos. En el grupo en el que se utilizaron caballos y estímulos auditivos de alta intensidad (G_2) se observó una mayor resistencia de los animales a entrar en la manga, notándose un aumento de las vocalizaciones, movimientos en círculos, intentos por escapar y resistencia a avanzar. Estas manifestaciones probablemente indican que los animales percibieron este tipo de manejo como un estímulo estresante. Un resultado similar obtuvo Moberg (1987), quien encontró diferencias en el comportamiento entre dos grupos de corderos frente a una situación estresante, pero no encontró diferencias en las concentraciones plasmáticas de cortisol entre ambos grupos.

6.2. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE GLUCOSA

En el experimento 1 los valores de glucosa en G_1 y G_2 se encuentran dentro de los rangos de referencia para la especie y son similares a los reportados por Mitchell y col. (1988), en animales no estresados en los cuales la sangre se obtuvo por medio de un catéter endovenoso. Los mismos autores encontraron valores mas altos a los obtenidos en este estudio en animales que se mantuvieron en promedio 15 minutos en una manga y en los cuales se obtuvo sangre vía punción yugular. Los valores obtenidos en el presente estudio son similares a los encontrados por Oyarce (2002),* en novillos en reposo en los cuales la sangre se obtuvo mediante un catéter endovenoso. Estos antecedentes hacen posible asumir que los estímulos aplicados a los animales no tuvieron influencia sobre la glicemia.

Según Currie (1988), la descarga del sistema nervioso simpático, producto del estrés, induce un aumento en la secreción de hormonas adrenomedulares, las cuales provocan hiperglicemia. Según el mismo autor, el estrés también provoca la estimulación del eje hipotálamo- hipófisis- corteza adrenal, con lo cual se libera cortisol, el cual favorece la hiperglicemia. Basándose en estos antecedentes es posible suponer que, debido a que los valores de glucosa obtenidos están dentro de los rangos, los estímulos aplicados no fueron suficientes para activar el sistema nervioso simpático ni el eje hipotálamo -hipófisis- corteza adrenal o que la activación de ellos no fue de la magnitud suficiente para influir en la glicemia

*Memoria de Título en ejecución. Instituto de Ciencias Clínicas, UACH.

Es importante destacar el hecho de que los valores de cortisol encontrados en todos los grupos están por sobre los valores dados por Radostits (2000), para la especie, por lo cual, a pesar de no contar con un grupo control para comparar, se puede inferir de que sí hubo una estimulación de la corteza adrenal. Sin embargo, no se observó un efecto del cortisol sobre la glicemia. Una posible explicación para esto es que el aumento del cortisol no fue de una magnitud suficiente o que el tiempo requerido para que el cortisol provoque un aumento de la glicemia sea superior al transcurrido entre la aplicación del estímulo estresante y la obtención de sangre en este experimento. Lamentablemente no se encontraron antecedentes al respecto en la literatura consultada.

En el experimento 2 las concentraciones plasmáticas de glucosa en G_1 y G_2 están dentro de los rangos de referencia para la especie y son similares a las encontradas en el experimento 1; por lo que se puede inferir que la percepción del estímulo por parte de los animales fue similar en ambos grupos.

6.3. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LACTATO

En el experimento 1 la mayor concentración plasmática de lactato ($P < 0,05$) en el grupo de animales que fueron más estimulados durante el arreo (G_2) puede explicarse por la gran variación individual de los valores obtenidos en dicho grupo (Anexo 1). En el experimento 2, a pesar de no observarse diferencias significativas ($P > 0,05$) se observa la misma tendencia.

Según Gregory (1998), durante cortos episodios de ejercicio fuerte hay una gran degradación del glucógeno muscular y producción de grandes cantidades de ácido láctico, el cual entra a la circulación. Según el mismo autor la glicogenólisis en el músculo puede deberse al ejercicio o al efecto de la adrenalina liberada desde la médula adrenal. Basándose en estos antecedentes y considerando que en ambos grupos la actividad física realizada por los animales fue similar, es posible suponer que en el presente estudio las altas concentraciones de lactato que presentaron algunos animales dentro de G_2 son debido a que algunos animales de dicho grupo percibieron los manejos realizados como un estímulo estresante, produciéndose en dichos animales una mayor liberación de adrenalina al torrente sanguíneo. Es importante destacar que, en ambos experimentos, las variaciones individuales fueron mayores en G_2 (Anexos 1 y 2), es decir, a medida que el estímulo aumentó la respuesta de los animales se hizo mas variable, lo cual indica que no todos los animales reaccionaron de la misma manera ante un mismo estímulo.

Los resultados de este experimento son similares a los obtenidos por Mitchell y col. (1988), quienes encontraron que las concentraciones plasmáticas de lactato eran significativamente mayores después de realizar un procedimiento de manejo estresante comparadas con las encontradas en los animales en los que no se realizó este tipo de manejo.

6.4. VALORES DE VGA.

Debido a que en ninguno de los experimentos se encontraron diferencias significativas entre G_1 y G_2 , y a que en todos los grupos los valores están dentro de los rangos dados por Wittwer y Böhmwald (1983), para la especie, es posible inferir que ninguno de los manejos realizados fue un estímulo para que se produzca un aumento de los valores de VGA.

En un experimento similar Mitchell y col. (1988), encontraron que los valores de VGA eran significativamente mayores en los animales que recibieron un manejo estresante al obtenerse sangre vía punción yugular y permanecer 20 minutos dentro de una manga que en aquellos animales en los cuales se obtuvo sangre vía catéter endovenoso. El aumento en los valores de VGA fue atribuido a la activación del sistema nervioso simpático. En el presente experimento es probable que ninguno de los manejos realizados a los animales haya sido un estímulo para el aumento de la actividad de dicho sistema y, por ende, no se produjo una liberación de noradrenalina por lo cual no hubo contracción esplénica y de este modo los valores de VGA no se alteraron.

Los valores obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos por Oyarce (2002)*, en novillos en reposo en los cuales la sangre se obtuvo por medio de un catéter endovenoso.

6.5. VALORES SANGUÍNEOS DE LEUCOCITOS.

Debido a que no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los valores sanguíneos de leucocitos entre G_1 y G_2 en ninguno de los dos experimentos y a que los valores encontrados en todos los grupos están dentro de los rangos descritos por Wittwer y Böhmwald (1983), para la especie, es posible asumir que los manejos realizados en el presente estudio no fueron suficientes para inducir cambios en los valores sanguíneos de leucocitos.

Los valores obtenidos son similares a los encontrados por Oyarce (2002)*, en novillos en los cuales se obtuvo la sangre mediante un catéter endovenoso y en los cuales no se aplicó ningún estímulo estresante. Según Meyer y Harvey (1998), la adrenalina es la responsable de la neutrofilia y monocitosis que se producen en situaciones estresantes o de dolor. Basándose en estos antecedentes, se asume que en el presente estudio los estímulos aplicados a los animales no fueron suficientes para estimular la liberación de adrenalina o que, de haberse producido, no fue de la magnitud suficiente para influir en los valores sanguíneos de leucocitos. Según los mismos autores, la liberación de glucocorticoides, producto de dolor o estrés emocional, también induce neutrofilia, la cual es acompañada de linfopenia y eosinopenia. En el presente estudio las concentraciones de cortisol están por sobre los rangos de referencia, sin embargo no se observa un efecto sobre los leucocitos totales, lo cual puede deberse a que las concentraciones de cortisol encontradas no son suficientes para producir neutrofilia o a que se requiere de más tiempo para que ésta se produzca.

*Memoria de Título en ejecución. Instituto de Ciencias Clínicas, UACH.

6.6. ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE CK

Debido a que en ninguno de los experimentos se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la actividad plasmática de CK entre G_1 y G_2 es posible inferir que los distintos manejos realizados con los animales no influyeron en forma diferente en la actividad plasmática de dicha enzima. Los valores obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos por Oyarce (2002),* en novillos en reposo. Según Tarrant y Grandin (1993), al existir un aumento en la actividad física se producirá una elevación de la actividad plasmática de CK, en la que la enzima es liberada desde el músculo por cambios de permeabilidad de la membrana celular. Basándose en estos antecedentes se puede inferir que el ejercicio físico realizado por los animales en el presente estudio, no fue de la suficiente magnitud para influir en la actividad plasmática de CK.

Doxey (1983), manifiesta que, después de producido un daño muscular, los niveles plasmáticos de CK alcanzan su mayor concentración después de 2 a 12 horas de producido el daño. En el presente estudio las muestras de sangre fueron obtenidas dentro de 30 minutos de iniciados los arros dentro del corral, por lo cual, de haberse producido algún daño muscular, es poco probable que hayan alcanzado a manifestarse cambios en la actividad plasmática de CK.

6.7. DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de haber encontrado diferencias significativas ($P < 0,05$) en las concentraciones plasmáticas de cortisol entre G_1 y G_2 en el experimento 1, éstas diferencias no se repitieron en el experimento 2, aun cuando en éste experimento se aumentó la intensidad del estímulo en G_2 . Lo mismo ocurrió con las concentraciones plasmáticas de lactato. Debido a esto, y a la ausencia de diferencias significativas en las otras variables estudiadas, no es posible afirmar que haya habido una percepción distinta de los distintos tipos de arreo por parte de los animales.

El hecho de que las concentraciones plasmáticas de cortisol obtenidas en todos los grupos hayan sido mayores a los valores que se encuentran en la literatura y a las obtenidas por Oyarce* en novillos no estresados, indica que ambos tipos de arreo provocaron algún grado de estrés en los animales, sin embargo, no se observó un efecto del cortisol sobre otras variables como la glicemia, valores de VGA o leucocitos. Esto puede deberse a que las concentración plasmática de cortisol obtenidas en este estudio no fueron de la suficiente magnitud para inducir cambios en dichas variables o a que es necesario un lapso de tiempo mayor para que el cortisol induzca un alza en los valores plasmáticos de ellas.

A pesar de que las diferencias encontradas en las concentraciones plasmáticas de lactato pueden ser atribuibles a la acción de la adrenalina, no se obtuvieron resultados similares para los valores de VGA y leucocitos, en los cuales no se presentaron diferencias

*Memoria de Título en ejecución. Instituto de Ciencias Clínicas, UACH.

atribuibles a la acción de dicha hormona. Una posible explicación para ello es que el lactato sea más sensible a la acción de la adrenalina o que ésta produzca cambios en su concentración plasmática más rápidamente que en los valores sanguíneos de VGA y leucocitos.

Debido a que las muestras de sangre fueron tomadas transcurrido un periodo muy corto de tiempo desde la aplicación de los estímulos, especialmente de el uso de la piana eléctrica, la cual fue aplicada a cada animal dentro de la manga pocos minutos antes de la obtención de la muestra, es posible de que no alcanzaran a manifestarse cambios en los valores plasmáticos de las variables analizadas. Debido a esto, sería interesante repetir el presente estudio, pero realizando muestreos seriados desde la aplicación de los estímulos hasta varias horas después. Esto permitiría analizar los cambios en los valores sanguíneos de las variables estudiadas y establecer el verdadero impacto de los manejos realizados.

6.8. CONCLUSIONES

1. Bajo las condiciones experimentales utilizadas se rechaza la hipótesis de que existirían diferencias significativas entre las concentraciones plasmáticas de cortisol, glucosa, lactato, valores de VGA, leucocitos y actividad plasmática de CK de novillos sometidos a arreo mediante estímulos visuales y auditivos de moderada intensidad y novillos sometidos a arreo mediante estímulos visuales, auditivos de elevada intensidad y estímulos físicos.
2. En el experimento 1 los animales más estimulados durante el arreo presentaron concentraciones plasmáticas de cortisol significativamente menores que el grupo menos estimulado. Esta diferencia no se repitió en el experimento 2, por lo que, en base a los resultados obtenidos para esta variable, no es posible afirmar que el arreo con menos estímulo haya resultado más estresante.
3. En el experimento 1 los animales más estimulados durante el arreo presentaron concentraciones plasmáticas de lactato significativamente mayores que el grupo menos estimulado. Esta diferencia no se repitió en el experimento 2, por lo que, en base a los resultados obtenidos para esta variable, no es posible afirmar que el arreo con más estímulo haya resultado más estresante.
4. En todos los grupos las concentraciones plasmáticas de cortisol fueron mayores a los valores dados por la literatura. Esto indica que ambos tipos de arreo produjeron algún grado de estrés en los animales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- BROOM, D.M. 2000.** Welfare Assesment and Welfare Problem Areas During Handling and Transport. En: GRANDIN, T. Livestock Handling and Transport. CABI Publishing, Oxon. England.
- CARPENTER, M.B. 1994.** Neuroanatomia; Fundamentos. 4 ed. Editorial Panamericana, Buenos Aires. Argentina.
- COCKRAM, M.S., K.T.T. CORLEY. 1991.** Effect of pre-slaughter handling on the behaviour of beef cattle. *B. Vet. J.*, 147: 444-454.
- COLES, E.H. 1986.** Veterinary Clinical Pathology. 4 ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. USA.
- CUNNINGHAM, J.G. 1999.** Fisiología veterinaria. 2 ed. Interamericana McGraw-Hill, México.
- CURRIE, W.B. 1988.** Structure and Function of Domestic Animals. Butterworths, Boston. USA.
- DOXEY, D. 1983.** Clinical Pathology and Diagnostic Procedures. 2 ed. Bailliere Tindall. London. England.
- GRANDIN, T. 1987.** Animal handling. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 3: 323-338.
- GRANDIN, T. 1994.** Farm animal welfare during handling, transport and slaughter. *Javma.*, 204:372.
- GRANDIN T. 2000.** Livestock Handling and transport. 2 ed. Department of Animal Sciences. Colorado state University. CABI Publishing, Fort Collins. USA
- GREGORY, N.G. 1998.** Animal Welfare and Meat Science. CABI Publishing, Oxon. England.
- KERR, M.G. 1989.** Veterinary Laboratory Medicine; Clinical Biochemistry and Haematology. Blackwell Scientific Publications, Oxford. England.
- KILGOUR, R., C. DALTON. 1984.** Livestock behaviour, a practical guide. Westview Press, Boulder. Colorado.

- LISTER, D., N.G. GREGORY, P.D. WARRIS. 1981.** Developements in meat science. Applied Science Publishers, London. England.
- MENCH, J.A. 2000.** The Biology of animal stress. Basic principles and Implications for animal welfare. CABI Publishing, Oxon. England.
- MEYER, D., J. HARVEY. 1998.** Veterinary Laboratory Medicine; Interpretation and Diagnosis. 2 ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. USA.
- MITCHELL, G., J. HATTING, M. GANHAO. 1988.** Stress in cattle assessed after handling, after transport and after slaughter. *Veterinary Record.*, 123: 201-205.
- MOBERG, G.P. 1987.** A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. *J. Anim. Sci.*, 65: 1228-1235.
- RADOSTITS, O.M., C.C. GAY, D.C. BLOOD, K.W. HINCHCLIFF. 2000.** Veterinary Medicine; A textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 9 ed. W.B. Saunders Company, London. England.
- ROBINSON, W.F., C.R. HUXTABLE. 1988.** Clinicopathologic Principles for Veterinary Medicine. Cambridge University Press, Cambridge. England.
- SCHALM, O.W. 1986.** Schalm's Veterinary Hematology. 4 ed. Lea & Febiger, Philadelphia. USA.
- SELYE, H. 1954.** Fisiología y Patología de la exposición al Estrés. Ed. Científico Médica, Barcelona. España.
- SHAW, F.D., R.K. TUME. 1992.** The Assesment of preslaughter and slaughter treatments of livestock by measurementof plasma constitutents; A review of recent work. *Meat Science.*, 32: 311-329.
- STOTT, G.H. 1981.** What is animal stress and how is it measured?. *J. Anim. Sci.*, 52: 150-153.
- TARRANT, P.V., T. GRANDIN. 1993.** Cattle Transport. En: GRANDIN, T. Livestock Handling and Transport. CABI Publishing, Oxon. England.
- TRESGUERRES, J.A.F. 1999.** Fisiología humana. 2 ed. Mc Graw-Hill, Madrid. España.
- WARRIS, P.D. 2000.** Meat Science; An Introductory Text. CABI Publishing, Oxon. England.

WITTWER, F., H. BÖHMWALD. 1983. Manual de Patología Clínica Veterinaria. Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

8. ANEXOS

Anexo 1. Valores individuales de cortisol, glucosa, lactato, VGA, leucocitos y CK para animales del experimento 1.

| Muestras | Cortisol | Glucosa | Lactato | VGA | Leucocitos | CK |
|----------|----------|---------|---------|------|------------|-----|
| A-1 | 2,13 | 3,69 | 0,59 | 40,5 | 10,80 | 204 |
| A-2 | 1,9 | 3,7 | 0,69 | 33,6 | 6,8 | 220 |
| A-3 | 1,59 | 3,85 | 0,61 | 32,4 | 12,4 | 195 |
| A-4 | 3,18 | 4,24 | 0,87 | 29,9 | 10,8 | 202 |
| A-5 | 3,05 | 3,6 | 1,2 | 36,1 | 11,6 | 186 |
| A-6 | 3,3 | 4,29 | 2,2 | 37,8 | 10,4 | 313 |
| A-7 | 2,27 | 3,72 | 0,81 | 36 | 8,8 | 250 |
| A-8 | 2,52 | 3,94 | 1,61 | 37,5 | 7,6 | 461 |
| A-9 | 4,47 | 4,18 | 0,65 | 31,7 | 12,0 | 168 |
| A-10 | 1,65 | 3,65 | 1,29 | 32 | 6,8 | 204 |
| A11 | 2,61 | 3,68 | 0,63 | 29,6 | 8,0 | 182 |
| A12 | 1,73 | 4,4 | 0,73 | 30,8 | 11,6 | 220 |
| A13 | 1,83 | 3,85 | 0,92 | 30,3 | 7,2 | 236 |
| A14 | 4,49 | 3,89 | 1,05 | 29,6 | 7,6 | 269 |
| A15 | 5,32 | 4,03 | 0,73 | 35 | 10,0 | 335 |
| A16 | 4,04 | 3,7 | 0,88 | 34,5 | 13,6 | 214 |
| A17 | 2,48 | 4,01 | 0,98 | 30,8 | 11,6 | 341 |
| A18 | 2,18 | 3,98 | 0,9 | 30,5 | 10,4 | 253 |
| A19 | 1,69 | 3,85 | 0,64 | 32,8 | 11,2 | 231 |
| A20 | 3,05 | 3,76 | 1,78 | 35,8 | 8,4 | 453 |
| B-1 | 0,93 | 4,14 | 0,57 | 34,2 | 10,8 | 218 |
| B-2 | 0,78 | 3,75 | 1 | 35,2 | 13,2 | 372 |
| B-3 | 1,89 | 3,91 | 1,99 | 33,5 | 8,8 | 433 |
| B-4 | 3,23 | 3,58 | 2,37 | 32,9 | 7,2 | 216 |
| B-5 | 1,14 | 3,8 | 1,26 | 32,8 | 11,6 | * |
| B-6 | 2,9 | 4,03 | 2,31 | 31,1 | 10,0 | 204 |
| B-7 | 2,5 | 3,71 | 2,57 | 31,2 | 10,8 | 249 |
| B-8 | 3,09 | 3,9 | 1,29 | 34,5 | 8,8 | 280 |
| B-9 | 2,27 | 3,86 | 1,14 | 34,7 | 10,8 | 203 |
| B-10 | 2,69 | 3,9 | 0,78 | 32,5 | 9,2 | 343 |
| B11 | 3,28 | 3,62 | 3,12 | 34,9 | 7,2 | 262 |
| B12 | 0,87 | 4,93 | 4,84 | 34,1 | 13,6 | 279 |
| B13 | 1,48 | 4,38 | 1,98 | 40,9 | 10,4 | 286 |
| B14 | 1,45 | 4,02 | 1,56 | 33 | 6,8 | 301 |
| B15 | 2,83 | 3,83 | 2,52 | 37,4 | 8,0 | 314 |
| B16 | 1,3 | 3,98 | 1,83 | 37,2 | 11,2 | 302 |
| B17 | 0,97 | 4,14 | 1,29 | 35,1 | 11,6 | 226 |
| B18 | 3,54 | 4,65 | 8,48 | 35,8 | 10,4 | 538 |
| B19 | 1,18 | 3,71 | 0,81 | 30,7 | 10,4 | 337 |
| B20 | 3,43 | 4,58 | 6,47 | 34,4 | 11,6 | 345 |

Anexo 2. Valores individuales de cortisol, glucosa, lactato, VGA, leucocitos y CK para animales del experimento 2.

| Muestras | Cortisol | Glucosa | Lactato | VGA | Leucocitos | CK |
|----------|----------|---------|---------|------|------------|-----|
| A1 | 0,95 | 3,28 | 1,26 | 31,9 | 8,8 | 227 |
| A2 | 2,35 | 3,9 | 0,83 | 33,2 | 9,6 | 191 |
| A3 | 3,28 | 3,51 | 0,93 | 27,9 | 10 | 295 |
| A4 | 4,1 | 3,27 | 1,48 | 34,2 | 8,4 | 165 |
| A5 | 2,23 | 3,51 | 1,24 | 32,6 | 8,8 | 203 |
| A6 | 1,16 | 2 | 1,15 | 30,1 | 8,8 | 172 |
| A7 | 3,9 | 4,23 | 1,55 | 26,6 | 10,4 | 284 |
| A8 | 2,44 | 3,56 | 1,52 | 29 | 9,2 | 221 |
| A9 | 1,97 | 3,46 | 1,37 | 30,9 | 6,8 | 178 |
| A10 | 3,77 | 3,46 | 0,97 | 28,7 | 6,8 | 242 |
| A11 | 2,59 | 3,73 | 1,16 | 26,7 | 10 | 200 |
| A12 | 2,24 | 4,03 | 1,37 | 27,5 | 6,4 | 217 |
| A13 | 3,38 | 3,68 | 1,06 | 28,9 | 6,4 | 207 |
| A14 | 2,07 | 2,82 | 1,18 | 30,8 | 6,8 | 191 |
| A15 | 1,37 | 3,5 | 1,69 | 30,4 | 7,2 | 176 |
| A16 | 1,66 | 3,49 | 2,69 | 32,2 | 11,6 | 207 |
| A17 | 0,95 | 3,44 | 1,24 | 32,2 | 8,4 | 214 |
| A18 | 3,13 | 3,97 | 2,63 | 31,6 | 9,2 | 334 |
| A19 | 1,13 | 3,68 | 1,79 | 25,5 | 8,4 | 315 |
| A20 | 1,18 | 2,27 | 1,64 | 30,5 | 6,4 | 142 |
| B1 | 1,7 | 3,51 | 2,35 | 34,9 | 8 | 309 |
| B2 | 0,85 | 3,82 | 1,94 | 32,4 | 10,4 | 256 |
| B3 | 2,59 | 3,46 | 1,75 | 31,1 | 8 | 263 |
| B4 | 3,22 | 3,3 | 1,28 | 32,2 | 8,4 | 183 |
| B5 | 2,28 | 3,63 | 0,95 | 29 | 9,6 | 183 |
| B6 | 2,7 | 4,06 | 1,81 | 31,3 | 7,6 | 279 |
| B7 | 0,65 | 3,57 | 0,97 | 30,8 | 8,4 | 161 |
| B8 | 2,11 | 3,6 | 1,18 | 29 | 8,8 | 304 |
| B9 | 2,19 | 3,49 | 0,95 | 27,4 | 10,4 | 202 |
| B10 | 2,02 | 3,24 | 1,37 | 35,1 | 10,4 | 268 |
| B11 | 2,78 | 3,71 | 1,7 | 31,3 | 6,8 | 244 |
| B12 | 4,23 | 3,93 | 2,74 | 31,5 | 13,2 | 320 |
| B13 | 2,29 | 3,97 | 3,76 | 29,1 | 8 | 215 |
| B14 | 0,5 | 4,37 | 5,59 | 32,8 | 7,2 | 207 |
| B15 | 2,83 | 3,65 | 2,11 | 30,7 | 9,2 | 304 |
| B16 | 1,82 | 3,34 | 0,9 | 29,8 | 7,6 | 190 |
| B17 | 0,5 | 3,76 | 1,18 | 28,4 | 8,8 | 266 |
| B18 | 0,9 | 3,52 | 1,17 | 34,3 | 8 | 239 |
| B19 | 0,51 | 3,68 | 2,46 | 29,7 | 7,6 | 205 |
| B20 | 1,77 | 3,1 | 2,35 | 36,9 | 9,2 | 239 |

Anexo 3. Promedios \pm d.e de las concentraciones sanguíneas de cortisol, glucosa, lactato, valores de VGA, leucocitos y actividad plasmática de CK para los diferentes tipos de arreo (G₁ y G₂) en el experimento 1 y experimento 2.

| | Experimento 1 | Experimento 2 |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Cortisol (ug/dl) | Promedio \pm d.e. | Promedio \pm d.e. |
| Grupo 1 | 2,77 \pm 1,08 a | 2,29 \pm 1,02 a |
| Grupo 2 | 2,08 \pm 0,98 b | 1,92 \pm 1,02 a |
| Glucosa (mmol/l) | Promedio \pm d.e. | Promedio \pm d.e. |
| Grupo 1 | 3,90 \pm 0,23 a | 3,43 \pm 0,54 a |
| Grupo 2 | 4,02 \pm 0,36 a | 3,63 \pm 0,29 a |
| Lactato (mmol/l) | Promedio \pm d.e. | Promedio \pm d.e. |
| Grupo 1 | 0,98 \pm 0,43 a | 1,43 \pm 0,49 a |
| Grupo 2 | 2,40 \pm 2,01 b | 1,92 \pm 1,13 a |
| VGA (%) | Promedio \pm d.e. | Promedio \pm d.e. |
| Grupo 1 | 33,36 \pm 3,15 a | 30,07 \pm 2,4 a |
| Grupo 2 | 34,30 \pm 2,38 a | 29,96 \pm 2,47 a |
| Leucocitos (miles/ul) | Promedio \pm d.e. | Promedio \pm d.e. |
| Grupo 1 | 9,88 \pm 2,06 a | 7,98 \pm 1,51 a |
| Grupo 2 | 10,12 \pm 1,89 a | 8,78 \pm 1,48 a |
| CK (U/l) | Promedio \pm d.e. | Promedio \pm d.e. |
| Grupo 1 | 256,85 \pm 83,75 a | 219,05 \pm 51,36 a |
| Grupo 2 | 300,42 \pm 84,30 a | 241,85 \pm 47,4 a |

9. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todos quienes colaboraron para hacer posible este trabajo, especialmente a:

Dr. Néstor Tadich, Profesor Patrocinante, por la ayuda y tiempo dedicado a la elaboración de este trabajo.

Dra. Carmen Gallo, por su ayuda y material facilitado.

Dr. Hedio Bustamante, por su colaboración en el análisis estadístico.

Italo Mencarini, por su apoyo y compañía durante la realización de este trabajo.

Mi amiga Claudia Lopetegui, por su valiosa ayuda.