

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS CLINICAS VETERIARIAS

**CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DE INDICADORES DE ESTRÉS EN
NOVILLOS EN REPOSO Y TRANSPORTADOS DURANTE 12 HORAS VIA
TERRESTRE.**

Memoria de Título presentada como
Parte de los requisitos para optar al
TITULO DE MEDICO VETERINARIO

JORGE ANDRES OYARCE KRUGER

VALDIVIA – CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE

Néstor Tadich B.

Nombre

Firma

PROFESOR CO-PATROCINANTE

Carmen Gallo S.

Nombre

Firma

PROFESOR COLABORADOR

Héctor Uribe

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Ricardo Vidal M.

Nombre

Firma

Fernando Wittwer M.

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN: 17 de junio de 2005

ÍNDICE

Capítulo		Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSIÓN	24
7. BIBLIOGRAFIA	29
8. ANEXOS	34
9. AGRADECIMIENTOS	41

A la vida, al amor a quienes forman parte de ello.
Mis padres, mi esposa, mi hijo y mis amigos.
A la que por estos años fue mi gran familia
La Universidad y Valdivia
Gracias y Alegrémonos

Gaudeamus Igitur

*Vivat Academia,
vivant professores.
Vivat membrum quodlibet,
vivant membra quaelibet,
semper sint in flore*

*Alma Mater floreat
quae nos educavit,
caros et commilitones
dissitas in regiones
sparsos congregavit.*

1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar las concentraciones de algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés en novillos en reposo y sus variaciones durante un transporte terrestre de 12 horas.

El estudio fue llevado a cabo entre los meses de julio y octubre de 2002 en el Hospital Veterinario de la Universidad Austral de Chile, y dividido en dos experimentos. En el experimento 1, se utilizaron 5 novillos de similares características en cuanto a raza (Frisón Negro), edad (dientes de leche o 2 dientes), peso (280-350kg), provenientes del mismo predio. Posterior a un período de estabulación y acostumbramiento de 7 días, los 5 animales fueron canulados en la vena yugular utilizando cánulas comerciales heparinizadas las que se mantuvieron en su posición durante la duración del experimento. Las muestras de sangre fueron obtenidas 4 veces al día durante tres días. El segundo experimento consistió en el transporte de cuatro de ellos durante 12 horas; en este lapso se les extrajo muestras de sangre cada tres horas.

Las muestras fueron enviadas al laboratorio donde se obtuvo plasma el cual fue congelado a -20°C hasta su posterior análisis. Se determinó Cortisol por radioinmunoensayo (RIA); glucosa mediante la técnica para la glucosa GOD-PAP, sin deproteinización; el VGA y leucocitos mediante el contador hematológico SYSMEX KX-21N, lactato mediante el método UV-enzimático y la actividad plasmática de CK mediante el método UV-cinético. Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva y se presentan como promedios geométricos, desviaciones estándar y coeficientes de variación.

En los novillos en reposo las concentraciones plasmáticas promedio (\pm D.E.) de cortisol fueron $0,91\pm 0,59$ $\mu\text{g/dl}$, glucosa $3,97\pm 0,25$ mmol/L y lactato $0,6\pm 0,3$ mmol/L ; β -HBA $0,43\pm 0,1$; valores de VGA $32,6\pm 2,72\%$ y leucocitos $7.480\pm 2.520/\mu\text{l}$; y la actividad enzimática de CK 234 ± 113 U/L. Durante el transporte se determinó un aumento de las concentraciones plasmáticas de cortisol, glucosa y lactato y de los valores de hematocrito y actividad enzimática de CK. Por otra parte se observó una disminución en la concentración de β -HBA y valores de leucocitos.

Se concluye que, en los animales en reposo, los constituyentes sanguíneos estudiados estuvieron dentro de los rangos descritos para la especie en la literatura. Por otra parte el transporte produjo un cambio en las concentraciones y valores de los constituyentes sanguíneos estudiados.

Palabras clave: novillos, estrés, transporte terrestre, constituyentes sanguíneos.

Financiado por Proyecto FONDECYT 101-02-01.

2. SUMMARY

BLOOD CONCENTRATION OF SOME CONSTITUENTS INDICATOR OF STRESS IN STEERS AT REST AND ROAD TRANSPORTED FOR 12 HOURS.

The objective of this study was to determine the blood concentrations of some constituents indicator of stress in cattle at rest and to determinate their changes during a road transportation of 12 hours. The study was divided in two experiments, which were carried out in May of 2002 at the Department of Clinical Science, University Austral of Chile, at Valdivia province, Chile.

In the first experiment, 5 Friesian steers from the same farm and of similar age (milks teeth or 2 teeth), weight range of 280-350 kg, were used. After a period of seven days of housing were they become accustomed to the management they were canulated into the jugular vein using commercial heparinized canules which were kept in place during the duration of the experiment. Blood samples were obtained four times a day every eight hours during three consecutive days. In the second experiment four steers were road transported during 12 hours and blood samples were obtained every three hours.

Blood samples were sent to the Clinical pathology laboratory to be centrifuged and plasma was obtained and kept frozen at -20°C for posterior analysis. Plasma cortisol concentration was determine by radioimmunoassay (RIA), glucose concentration by the GOD-PAP test without deprotenization (GL 2623 RANDOX), lactate concentrations by the UV-enzyme method; β -HBA by using the enzyme technique that uses the β -hydroxibutirate deshydrogenase enzyme for the pass from NAD^{+} to NADH ; PCV and leucocytes values by using the SYSMEX KX-4N haematological counter and the CK plasma activity was measured by the UV kinetic method. The results were analyzed using descriptive statistics and presented as geometric means, standard deviations and coefficient of variation.

In the steers at rest the mean plasmatic concentrations of cortisol were $(0.91 \pm 0.59 \mu\text{g/dl})$, glucose $(3.97 \pm 0.25 \text{ mmol/L})$ and lactate $(0.6 \pm 0.3 \text{ mmol/L})$; β -HBA (0.43 ± 0.1) ; PCV values $(32.6 \pm 2.72 \%)$ and leucocytes $(7,480 \pm 2,520 \text{ per } \mu\text{l})$; the enzymatic activity of CK was $(234 \pm 113 \text{ U/L})$. During transport it was observed an increase in the plasmatic concentrations of cortisol, glucose and lactate and in the values of PCV and enzymatic activity of CK. On the other hand there was a decrease in the plasmatic concentration of β -HBA and values of leucocytes.

It can be concluded that for the animals at rest the blood constituents studied were inside the ranges given for cattle in the literature. The road transport of the steers produced changes in the plasmatic concentration and values of the blood constituents studied.

Key words: Steers, stress, road transport, blood constituents.

Funded by Project FONDECYT 101-02-01.

3. INTRODUCCIÓN

El manejo y trabajo con el ganado bovino ha sido tema de estudio en los últimos años, con el fin de optimizar y aumentar la eficiencia de los procesos productivos relacionados con ellos (producción de carne y/o de leche). Los procedimientos de manejo, como la restricción de movimientos en una manga, por lo general no causan dolor, pero el puede ocasionar un estrés psicológico al ganado que ha sido criado bajo métodos extensivos. Algunos resultados, aparentemente contradictorios, de distintos estudios pueden ser explicados si se tienen en cuenta las variaciones en los niveles de estrés psicológico y físico que se producían en cada uno de ellos. Las respuestas de miedo en cada situación particular son difíciles de predecir, porque dependen de la forma en que un animal percibe la experiencia de manejo o de transporte (Grandin 1997).

De acuerdo con Navarro-Beltrán (1984) el estrés se define como “el producto de reacciones (biológicas y psicológicas) que se desencadenan en un organismo cuando se enfrenta de una forma brusca con un agente nocivo, cualquiera que sea su naturaleza”. Desde el punto de vista biológico es una respuesta inespecífica del organismo ante cualquier demanda externa cuando los animales se encuentran sujetos a condiciones ambientales adversas que interfieren con su bienestar (Stott 1981).

Según Selye (1973) el estrés muestra una relación positiva entre la agresividad del medio externo y la magnitud de la respuesta del individuo. Dicha respuesta incluye a estructuras somáticas, viscerales, alteraciones metabólicas endocrinas y nerviosas (Caballero y Sumano 1993). Esto se refleja en las variaciones de algunos componentes sanguíneos, los que podemos encontrar al realizar los exámenes correspondientes. El estrés es un estado sistémico que aparece como consecuencia de una exposición prolongada a factores perturbadores que son percibidos por receptores como el oído, la vista, el olfato, el tacto y la relación que puedan tener estos con la “memoria” del animal.

El miedo es una causa de estrés, y la variación en los resultados de los estudios sobre manejo y transporte puede deberse a diferencias en los niveles de estrés psicológico. Algunos ejemplos son la inmovilización, el contacto con la gente o la exposición a situaciones nuevas. Tanto las experiencias previas como los factores genéticos que afectan el temperamento interactúan de maneras complejas para determinar cuánto miedo va a sentir un animal cuando se lo maneje o transporte. El ganado vacuno entrenado y habituado a pasar por una manga puede tener los niveles de los constituyentes sanguíneos indicadores de estrés normales y mantenerse en calma al ser inmovilizado, en tanto que otros animales, criados extensivamente, pueden tener niveles elevados de dichas constantes en la misma situación. La manga, por lo tanto, es percibida como neutral y carente de amenazas en un caso, mientras que en el otro puede desencadenar un miedo intenso, lo mismo ocurre en el caso de vacas de lechería. La novedad es otro factor causante de estrés, cuando el animal es súbitamente expuesto a la misma. Para evaluar con exactitud la reacción de un animal, se debe hacer una combinación

de mediciones del comportamiento y fisiológicas que proveerán una mejor medida general de la incomodidad que está sufriendo (Grandin 1997).

En Chile, una de las características de la industria ganadera es la distancia entre las áreas de producción y las de consumo. El número de cabezas de ganado bovino en Chile en 1997 era de 4.098.438, de éstas el 55,4% se encontraban en las IX y X regiones (Chile 2001); sin embargo el 44% del consumo de éstas se concentra en la Región Metropolitana (Chile 2001). Por lo tanto, gran parte de los animales que se sacrifican en los principales centros urbanos del país deben ser transportados desde las IX y X regiones a los principales centros de consumo. El año 2000 se faenaron 940.734 cabezas de ganado bovino, un 43,2% de éstas se realizaron en la Región Metropolitana y sólo un 28 % en las IX y X regiones (Chile 2001).

En el transporte, desde el arreo en el predio hasta el noqueo en la planta de faenamiento, se conjugan numerosos factores de perturbación para el animal, como son: la exposición a un nuevo ambiente, la ubicación con animales desconocidos, el hacinamiento, el ruido, los movimientos del vehículo, el hambre y la sed (Dantzer y Mormede 1984). El miedo es un gran factor de estrés y los bovinos al igual que otras especies herbívoras y/o de manada son animales de presa y es éste el que los mueve en masa y no como individuos, para buscar refugio. El miedo puede elevar las hormonas asociadas con el estrés a valores más altos que muchos factores físicos adversos (Grandin 2000).

En el caso del transporte de ganado los cambios o efectos más evidentes de éste son el estrés psicológico y el daño tisular (producto de los bruscos movimientos de los animales) (Grandin 1997). También, actúan algunos mecanismos de adaptación como los que tienden a mantener la homeostasis y activar o desactivar reacciones inmunes.

El transporte de animales existe, prácticamente, desde el momento en que los animales fueron domesticados, siendo el arreo su primera manifestación, la que ha evolucionado hasta nuestros días en que el traslado de animales se efectúa con vehículos especializados de carga. En Europa (Knowles 1999) y en Chile (Gallo y col 1995; Matic 1997) el ganado es transportado preferentemente por carreteras, donde son llevados desde los centros de producción al los centros de consumo. En algunos casos el ganado también es comercializado como “animal vivo” con lo cual éstos animales son cargados y descargados en camiones en varias oportunidades y puestos en ambientes poco familiares y con otros animales ajenos a su entorno normal (Knowles 1999). Todos estos factores afectan a los animales de muchas y variadas maneras. Por ejemplo, la carga y descarga de ellos está particularmente asociada con daño físico y heridas (Knowles 1999). Es posible, entonces, pensar que durante todo este proceso el animal está sometido a alteraciones, por lo que, podemos asumir que se está produciendo daño, tanto al animal como al producto final. Y es el estrés una de las muestras más evidentes de estas afirmaciones y la capacidad de adaptación del animal.

La capacidad de adaptación y la complejidad de las respuestas fisiológicas de un individuo al enfrentarse a situaciones nuevas o extremas implican un sinnúmero de reacciones en el animal. Claude Bernard en 1878 fue uno de los primeros en observar y evaluar la

importancia de que el organismo mantuviera relativamente estable el medio interno independientemente de lo que suceda en el medio externo, indicando que el cuerpo constantemente trabaja para mantener la temperatura corporal, la presión y el flujo sanguíneos, la disponibilidad de energía la concentración de oxígeno, etc.; más tarde, Cannon en 1929, llamó a esto homeostasis. Hoy sabemos que todos estos procesos están regulados por actividad del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) que en respuesta a un agente estresante, real o percibido, causa la liberación de la “hormona liberadora de corticotropina” (CRH) la cual actúa sobre la hipófisis anterior para que esta sintetice adrenocorticotropina (ACTH) la cual es difundida al torrente sanguíneo y causa la liberación de los glucocorticoides (GC) en la corteza adrenal y las catecolaminas (CA) en la médula adrenal. Éstos, principalmente los GC, actúan para aumentar la glucosa disponible en el cuerpo, debido a la degradación de proteínas, glicógeno y grasas (Dantzer y Mormede 1984) y a la estimulación de la glicólisis en el hígado (Currie 1988). La cantidad y proporción de estas hormonas depende del tipo de estrés experimentado (Johnson y col 1976; Axelrod y col 1984).

Así de alguna forma podemos cuantificar el nivel de estrés al que son sometidos los animales y 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).

El nivel de cortisol en la sangre es una de las mediciones más clásicas del estrés, aun cuando un aumento en la concentración de éste no necesariamente involucra procesos claros de estrés (Moberg 1987). El cortisol es la principal hormona que se secreta en la corteza adrenal en respuesta a la acción de la hormona adenocorticotrófica (ACTH) producida en la hipófisis (Shaw y Tume 1992). Finalmente el cortisol es reducido principalmente en el hígado produciendo esteroides inactivos que por acción enzimática en el hígado son conjugados en compuestos hidrosolubles que son excretados por el riñón, a través de la orina.

Los valores de cortisol plasmático tienen una relación directa con el estrés por transporte (Shaw y Tume 1992). Se ha evidenciado una elevación de su concentración durante el transporte, durante el embarque y el principio del trayecto, para luego tender a normalizarse, al parecer, por una adaptación de los animales al medio hostil disminuyendo su concentración en el plasma. (Warriss y col 1995).

Existe una relación estrecha y proporcional entre los niveles de cortisol y los de glucosa en el plasma, debido a que producto de los niveles de cortisol, se activa la gluconeogénesis y la liberación de reservas de glucosa del parénquima hepático (glicólisis). Evidenciando así el rol importante de la glucosa como reserva energética para su uso ante situaciones de emergencia o en que se prevea una amenaza a la vida (Currie 1988).

La concentración de glucosa en el plasma (glicemia) es influenciada por muchos elementos, como hormonas, que producto del estrés, se liberan y actúan estimulando el aumento de ésta, principalmente a través de la gluconeogénesis y glicólisis. Algunos de estos elementos son los glucocorticoides y las catecolaminas, como cortisol y adrenalina, respectivamente y otras hormonas específicas del proceso de regulación de la glucosa, como el

glucagón y la insulina. Por lo tanto, la glucosa se puede considerar como un buen indicador indirecto de estrés, en caso de que no exista un desbalance entre el consumo y la eliminación de ésta, como sería en el caso del estrés alimenticio (Shaw y Tume, 1992). En el caso del transporte, el ganado experimenta un ayuno producto de las horas que significa el viaje, pero las variaciones en los niveles de glucosa son lo suficientemente claras como para diferenciar el aumento producido por el estrés de ayuno y el estrés del transporte siendo más elevados en el caso de animales que sufrieron ayuno y transporte (Galyean y col 1981).

Como respuesta al ayuno en el animal se desarrollan variadas reacciones, podemos destacar el ciclo del ácido cítrico, la gluconeogénesis y otros procesos metabólicos para el aprovechamiento y/o eliminación de desechos o subproductos de esos ciclos bioquímicos. Ya mencionamos el caso de la glucosa que para compensar la disminución de esta o producto del efecto de glucocorticoides se activa la glucógenolisis. Sin embargo, si no se aumenta la entrada de acetyl CoA en el ciclo de Krebs cuando se incrementa la provisión de acetyl CoA, se acumula esta última y se forma más acetoacetato en el hígado. Producto de estos cuerpos cetónicos que no pueden ser degradados se produce cetosis (Ganong 1993). De estas cetonas una de las más importantes es el β -hidroxibutirato (β -HBA) que de manera indirecta puede indicar estrés (Knowles 1997). El transporte y el ayuno producen un aumento en los niveles plasmáticos de β -HBA como respuesta a un aumento en la movilización de grasas corporales como fuente de energía (Warriss y col 1995).

Por otra parte ante una alta demanda de nutrientes y de oxígeno, la musculatura del cuerpo produce un excedente en la liberación de ácido láctico (Lactato), ya que, tanto el músculo esquelético como el cardíaco están bajo un régimen de alta actividad y el piruvato formado a partir de glucosa no entra al ciclo de los ácidos tricarbónicos y se convierte como residuo en lactato (Ganong 1993). La determinación de lactato en la sangre es un indicador secundario de estrés, ya que no es lo suficientemente específica.

A la vez durante el ejercicio sostenido, producto de un aumento de la actividad física, se requieren moléculas de ATP las cuales son obtenidas a partir de una molécula de reserva la fosforilcreatina que es hidrolizada formando creatina y grupos fosfatos liberando gran cantidad de energía. Para este proceso se necesita de una enzima que se encuentra en el músculo y es secretada para cumplir dicho objetivo, ésta es la Creatinfosfoquinasa (CK) (Ganong 1993) que, por lo tanto, y como los compuestos anteriores sería un indicador indirecto de estrés. La CK es liberada por el músculo esquelético como respuesta a cambios en la permeabilidad de la membrana celular (Warriss y col 1995) llegando en pulsos a la circulación desde el tejido muscular dañado durante un ejercicio vigoroso o poco común o como resultado de contusiones musculares (Tarrant y Grandin 1993) o mantener la postura del animal en un vehículo en movimiento (Warriss y col 1995). La determinación de esta enzima posee un carácter inespecífico ya que estaría asociada más que nada a un aumento en la actividad muscular producto del transporte y a daño de tejidos, también como consecuencia del traslado de los animales (Warriss 1990; Knowles 1999)

El estrés produce efectos específicos en órganos como el bazo, estómago, mesenterios y piel en donde se produce, respectivamente, contracción, disminución de la motilidad y desvío de la sangre hacia los músculos lo que lleva a variaciones del hematocrito (VGA). Debemos destacar el efecto de las catecolaminas en la contracción esplénica que provoca un aumento en el VGA al liberar eritrocitos en el plasma (hiperemia absoluta). Contrariamente a lo que podamos pensar el efecto de la deshidratación, que sería una hiperemia relativa, no es lo suficientemente significativo (Warriss y col 1995).

Según Meyer y Harvey (2000), 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 ósea 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.

Cuadro 1 Resumen de valores referenciales de constituyentes sanguíneos en bovinos [Wittwer y Böhmald 1983⁽¹⁾; Radostits y col 2000⁽²⁾]

Cortisol	Glucosa	β -HBA	Lactato	CK	VGA	Leucocitos
⁽²⁾ 0.47-0.75 μg/dL	⁽¹⁾ 3,0-4,4 mmol/L	⁽¹⁾ < 0,46 ⁽²⁾ 0,35-0,47 mmol/L	⁽²⁾ 0.6 – 2.2 mmol/L	⁽¹⁾ < 94 ⁽²⁾ 35-280 U/L	⁽¹⁾ 26-38%	⁽¹⁾ 5.000- 10.000 /μl

El efecto del transporte en el animal puede ser evaluado, como se mencionó anteriormente, en la intensidad del estrés provocado y el reflejo de éste en los constituyentes sanguíneos. El manejo pre-sacrificio ha sido descrito como uno de los procesos más estresantes que viven los animales (Cockram y Corley 1991).

La intensidad del efecto de estos factores en el animal va a estar determinada principalmente por el tiempo durante el cual los animales van a estar expuestos a ellos, pero también son importantes otros aspectos especialmente durante el trayecto sobre el camión la densidad de carga, las condiciones del camión (especialmente ventilación), las características del recorrido, el clima, las características propias del conductor del camión (Eicher 2001), ruidos, estímulos visuales o “novedades súbitas. (Grandin 2000).

Sin embargo, la densidad de carga sería después del tiempo de transporte el inductor de estrés más importante ya que conlleva variados factores como la ventilación

(disponibilidad de oxígeno y termorregulación del grupo), el apoyo entre los animales (que tiende a mantener el balance para evitar caídas) y el espacio disponible para rotaciones o para que los vacunos se tiendan (Tarrant 1993). Estos aspectos pueden tener efectos positivos o negativos sobre los individuos implicando que una densidad de carga muy baja favorece el daño tisular en animales producto de caídas y de golpes entre ellos, en cambio una densidad alta disminuye la ventilación y la capacidad para regular la temperatura corporal. Se puede concluir de esto que una densidad ideal sería un punto intermedio entre los dos hechos indicados anteriormente y en la literatura encontramos las densidades ideales entre los 380 y 550 kilos por m² (Tarrant y Col. 1988, Tarrant 1993; Knowles 1999).

En el marco de los proyectos FONDECYT 101-02-01, en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, se han llevado a cabo diversas investigaciones que evaluaron variables físicas causantes de estrés, relacionadas con el transporte, y la carga de animales (principalmente densidad y tiempo de transporte) y el efecto de éstas sobre indicadores sanguíneos de estrés. Los valores referenciales de los constituyentes sanguíneos estudiados siempre han sido obtenidos de la literatura internacional (principalmente inglesa) obviándose en cierta manera posibles variaciones inespecíficas que pueden ser causadas por diferencias fisiológicas o de manejo entre el ganado inglés y el de la X Región de Chile y la influencia de dichas bases fisiológicas en la respuesta endocrina específica de cada uno de los animales utilizados en los estudios antes mencionados. Se consideró, por lo tanto, importante establecer valores de referencia originados de fuentes locales, para así incorporar, a dichos estudios y a los venideros, estos valores de los constituyentes sanguíneos de animales. Para validar, comparar los datos extranjeros y nacionales y así poder determinar el efecto real del estrés por transporte y ayuno en nuestro país.

De acuerdo a los antecedentes se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos:

3.1. Hipotesis de trabajo

3.1.1 Experimento 1

H_{1a}: Los valores de hematocrito y leucocitos y las concentraciones sanguíneas de cortisol, glucosa lactato y β -Hidroxibutirato y actividad plasmática de creatinfosfoquinasa obtenidos de novillos canulados y en reposo son similares a los valores referenciales de la literatura.

3.1.2 Experimento 2

H_{2a}: Los valores de hematocrito y leucocitos y las concentraciones sanguíneas de cortisol, glucosa lactato y B-Hidroxibutirato y actividad plasmática de creatinfosfoquinasa obtenidos de novillos canulados aumentan durante el transporte de estos.

3.2 Objetivo general

Analizar las concentraciones sanguíneas de algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés en bovinos determinando sus valores basales y variaciones durante el transporte.

3.3. Objetivos específicos

3.3.1 Experimento 1

Determinar los valores de hematocrito (VGA) y leucocitos, las concentraciones sanguíneas de cortisol glucosa, lactato, β -HBA y la actividad enzimática de creatinfosfoquinasa en novillos canulados, en reposo

3.3.2 Experimento 2

Analizar la evolución de los valores de hematocrito (VGA) y leucocitos y las concentraciones sanguíneas de cortisol glucosa, lactato, β -HBA y la actividad enzimática de creatinfosfoquinasa en novillos canulados y transportados durante 12 horas con una densidad de carga de 400 kgs/m².

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Instituto de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile en la ciudad de Valdivia, entre julio y octubre del 2002.

4.1. Experimento 1

4.1.1.-Materiales

Se utilizaron 5 novillos de similares características en cuanto a raza (Frisón Negro), edad (Dientes de leche o 2 dientes), peso (280-350 kg) y provenientes de un predio de la provincia de Valdivia.

Para la obtención de las muestras de sangre se usaron cánulas heparinizadas de 14 G CERTOFIX[®] (B/Braun) y tubos al vacío con NaF y heparina.

4.1.2.-Métodos

Posterior a un período de estabulación en corrales y acostumbramiento de 7 días los animales fueron canulados en la vena yugular derecha utilizando cánulas comerciales heparinizadas las que se mantuvieron en su posición durante la duración del experimento. Las muestras fueron obtenidas con jeringa desde cada cánula cuatro veces al día durante tres días (excepto el primero en el cual se obtuvieron 3) y colocadas en tubos con NaF y heparina. Una vez obtenidas Las muestras fueron enviadas al laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la Facultad de Cs. Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, en un lapso no mayor a una hora, donde después de determinar los valores de VGA y leucocitos, se centrifugaron y el plasma se almacenó a -20 °C para su posterior análisis, determinándose los siguientes constituyentes sanguíneos: cortisol, glucosa, lactato, B-HBA y CK.

4.1.3.- Análisis de las Muestras

Las muestras de sangre para la determinación cortisol, β -HBA, CK, VGA y leucocitos se obtuvieron utilizando tubos al vacío con heparina. Para la determinación de glucosa y lactato se utilizaron tubos al vacío con NaF. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la Facultad de Cs. Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, en un lapso no mayor a una hora, donde después de determinar los valores de VGA, se centrifugaron y el plasma se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

La determinación de Cortisol plasmático se realizó mediante radio inmuno análisis (RIA) en el laboratorio de Fisiología y Endocrinología la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción.



Imagen 1 y 2: Depilado de cuello previo a la postura de la cánula



Imagen 3 y 4: Colocación de la cánula y fijación definitiva.



Imagen 5 y 6: Toma de muestras

El VGA y recuento de leucocitos fueron determinados con un contador hematológico Sysmex KX-21N.

La determinación de la concentración sanguínea de glucosa se realizó mediante la prueba para glucosa GOD-PAP, sin deproteinización (GL 2623, RANDOX®) luego se midió la coloración utilizando un espectrofotómetro Hitachi 2040.

La concentración de Lactato se determinó mediante la técnica basada en el test UV enzimático (Boehringer Mannheim N° 149993) y con un espectrofotómetro Cobas Mira Plus (Roche®).

La concentración sanguínea de β -HBA fue determinada mediante una técnica enzimática que consiste en la oxidación de β -hidroxibutirato por medio del NAD⁺ (Nicotinamida adenin dinucleótido) mediante la enzima 3 HBDH (3-hidroxibutirato deshidrogenasa) a acetoacetato (FAO/IAEA, 1993). La cantidad de NAD⁺ reducido se midió con un espectrofotómetro HITACHI 4020.

La determinación de la actividad plasmática de la creatínfosfoquinasa (CK) se realizó mediante el método UV-cinético, a 340nm y 37°C, optimizado según la Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. Se emplearon reactivos Boehringer Mannheim (MPR 2 1442376) y un espectrofotómetro Cobas Mira Plus (Roche®).

4.2 Experimento 2

4.2.1.-Materiales

Se utilizaron 4 novillos de los 5 novillos utilizados en el experimento 1

Para la obtención de las muestras de sangre se usaron cánulas heparinizadas y tubos al vacío con NaF y heparina.

Para el transporte se utilizó un camión que cumplía con las características exigidas por la reglamentación actual para el transporte de animales (Chile, 1993).

4.2.2.-Método

Los animales fueron transportados vía terrestre durante 12 horas con períodos continuos de transporte de tres horas cada uno con una densidad de carga de 400Kgs per metro cuadrado. Las muestras fueron obtenidas en tubos con NaF y heparina cada 3 horas al interior del camión, especialmente acondicionado para cumplir con las mencionadas características de densidad y que permita el manejo para la obtención de las muestras con una jeringa desde cada cánula previa sujeción del animal. Esto se realizó cuatro veces durante el transporte cada 3

horas con el camión estacionado en las dependencias del hospital veterinario de la universidad. Una vez obtenidas las muestras fueron trasladadas en un lapso no mayor a 20 minutos posterior a su obtención al laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, donde fueron procesadas y se determinaron los siguientes constituyentes sanguíneos: Cortisol, VGA, Leucocitos, Glucosa, Lactato, B-HBA, CK

4.2.3.- Análisis de las Muestras

El proceso de análisis se realizó de manera similar al del anterior experimento

4.2.4.- Análisis estadístico

Para ambos experimentos los datos fueron introducidos en una planilla MS EXCEL y analizados mediante estadística descriptiva y los resultados presentados como promedios geométricos, desviaciones estándar y coeficientes de variación.

5. RESULTADOS

5.1.-Experimento 1

Debido al efecto de la colocación de las cánulas los resultados obtenidos durante el primer muestreo fueron eliminados y junto a ellos por la misma causa fueron eliminados las muestras 9 del novillo 1 y la 4 del segundo animal.

5.1.1.-Concentraciones Plasmáticas de Cortisol

La concentración plasmática promedio de Cortisol durante los tres días de muestreo fue de $0,91 \pm 0,59 \mu\text{g/dL}$. Después del primer muestreo las concentraciones plasmáticas de cortisol (Gráfico 1) permanecieron estables durante el transcurso de toda la etapa de muestreo en corral con rangos promedio de 0,64 y 1,43 $\mu\text{g/ml}$.

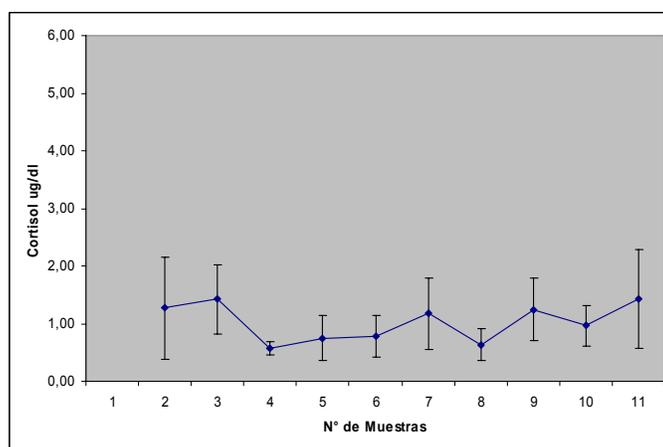


Gráfico 1. Valores promedios (\pm DE) de las concentraciones plasmáticas de cortisol ($\mu\text{g/dl}$) en novillos en estado de reposo, para los diferentes períodos de muestreo.

5.1.2.- Hematocrito

El promedio del Hematocrito durante los tres días de muestreo fue de $32,6 \pm 2,72\%$ y se mantuvo constante durante todo el experimento, con un rango promedio inferior de 32% y rango promedio superior de 34%.

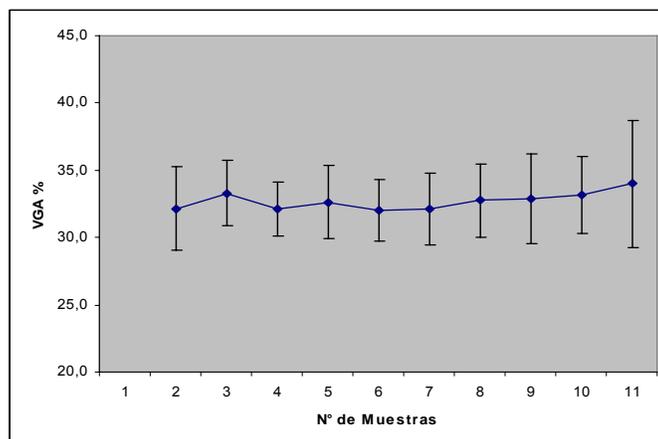


Gráfico 2. Valores promedios (\pm DE) del hematocrito (%) en novillos en reposo, para los diferentes períodos de muestreo.

5.1.3.- Concentraciones plasmáticas de Glucosa

La concentración plasmática promedio de Glucosa durante los tres días de muestreo fue de $3,99 \pm 0,24$ mmol/L. siendo similares en el periodo reconociéndose una curva estable con una pendiente muy cercana a cero (0,009), y con una desviación estándar pequeña, con rangos promedio de entre 3,8 y 4,2 mmol/l. Al igual que en los casos anteriores se han eliminado las muestras que introducen sesgos a los resultados obtenidos.

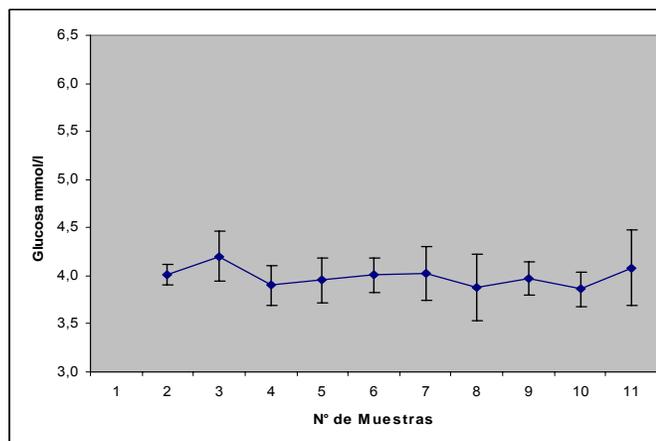


Gráfico 3. Valores promedios (\pm DE) de las concentraciones plasmáticas de glucosa (mmol/l) en novillos en reposo, para los diferentes períodos de muestreo.

5.1.4.- Concentraciones plasmáticas de Lactato

La concentración plasmática promedio de Lactato durante los tres días de muestreo fue de $0,6\pm 0,3$ mmol/L. Se observó una tendencia a disminuir durante el período de muestreo. Los rangos promedio fluctuaron entre 0,89 y 0,32 mmol/l al principio y al final del muestreo respectivamente.

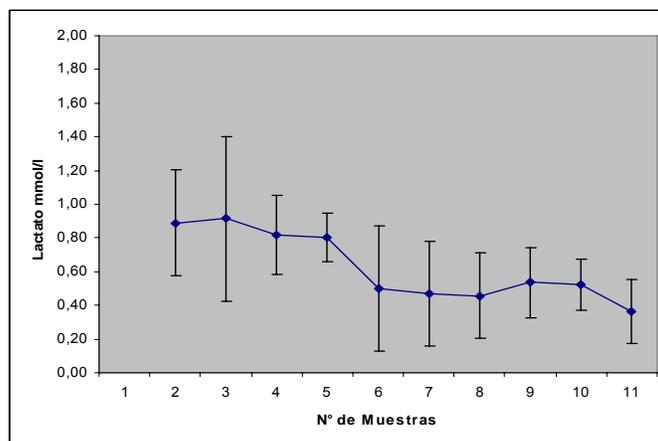


Gráfico 4. Valores promedios (\pm DE) de las concentraciones plasmáticas de lactato (mmol/l) en novillos en estado de reposo para los diferentes períodos de muestreo.

5.1.5.- Concentraciones plasmáticas de β -Hidroxibutirato

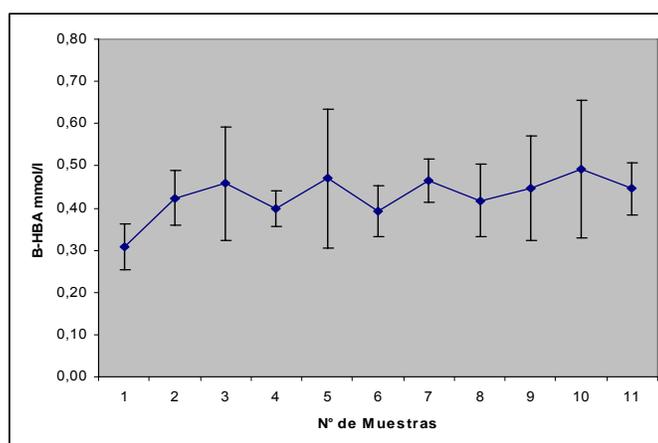


Gráfico 5.- Valores promedios (\pm DE) de las concentraciones plasmáticas de β -HBA (mmol/l) en novillos en estado de reposo para los diferentes períodos de muestreo.

La concentración plasmática promedio de β -HBA durante los tres días de muestreo fue de $0,42 \pm 0,11$ mmol/L. Después del primer muestreo las concentraciones se mantuvieron estables durante el período de muestreo fluctuando en rangos promedio de entre 0,39 y 0,47 mmol/l.

5.1.6.- Actividad enzimática de Creatinfosfoquinasa

El valor promedio de CK durante los tres días de muestreo fue de 247 ± 136 U/L. Los promedios de la actividad enzimática de CK mostraron un descenso desde el segundo muestreo donde los valores se encontraban en 383 UI/l hasta el último en que los valores disminuyeron a 192 UI/l. Se observó una amplia DE. de los valores.

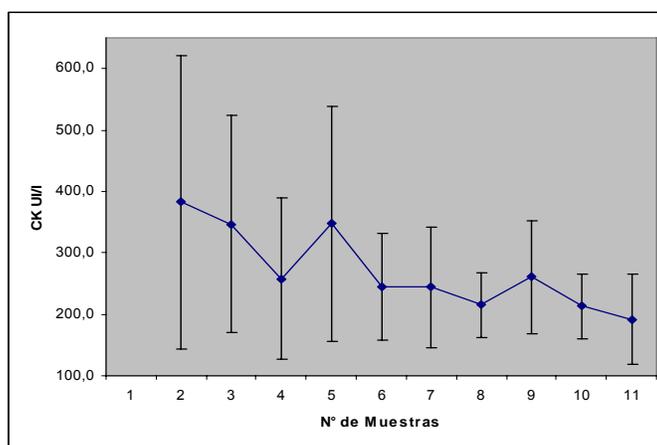


Gráfico 6. Valores promedios (\pm DE) de la actividad enzimática de creatinfosfoquinasa (UI/l) en novillos en reposo, para los diferentes períodos de muestreo.

5.1.7.- Valores de Leucocitos

El valor promedio de leucocitos durante los tres días de muestreo fue de $7.800 \pm 2.520/\mu\text{l}$. En este caso de los leucocitos los valores tuvieron una tendencia muy definida y con un rango amplio con una desviación estándar de 2,52 miles/ μl , y rangos promedio 7,1 y 8,4 mil/ μl .

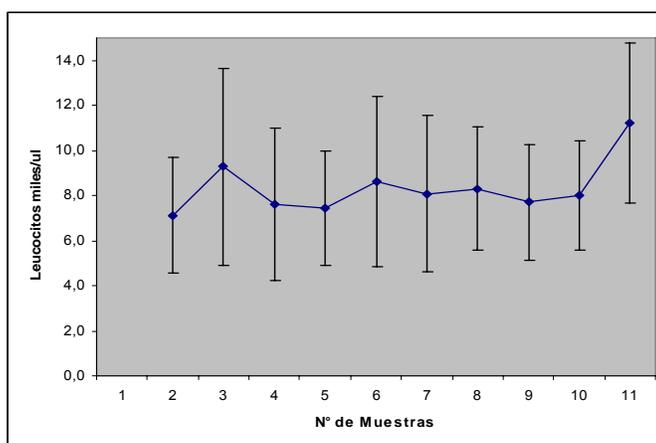


Gráfico 7. Valores promedios (\pm DE) de concentración de leucocitos (mil/ μl) en novillos en estado de reposo para los diferentes períodos de muestreo.

5.2 Experimento 2

5.2.1 Evolución de las concentraciones plasmáticas de cortisol

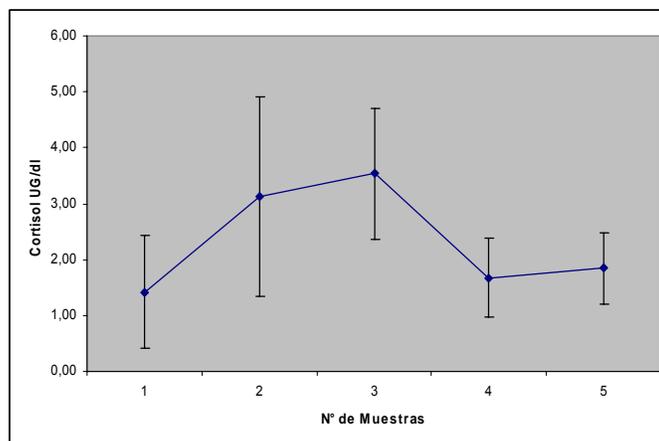


Gráfico 8. Valores promedio (\pm DE) de Cortisol (ug/dl) plasmáticos durante los distintos períodos de muestreo, durante el transporte comenzando del último valor previo al transporte.

Se observó un aumento de los valores de cortisol desde el inicio hasta las 6 horas de transporte para posteriormente descender y mantenerse constante hasta finalizar el transporte.

5.2.2 Evolución del Hematocrito

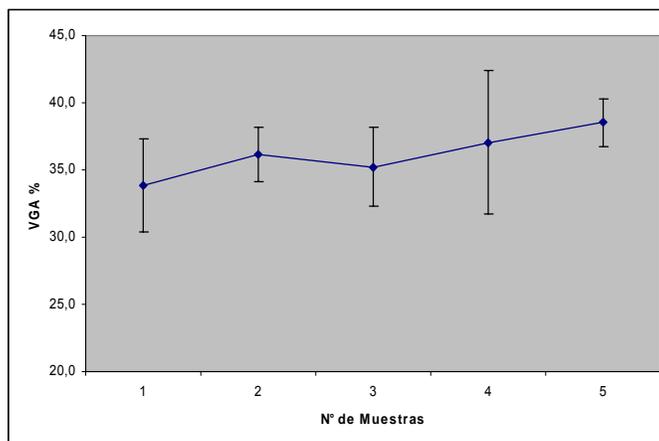


Gráfico 9. Promedio (\pm DE) del hematocrito (%) en las muestras tomadas durante los distintos períodos de muestreo durante el transporte, comenzando del último valor previo al transporte.

Se observó un incremento evidente y sostenido en el VGA durante las 12 horas de transporte de los animales.

5.2.3 Evolución de las concentraciones plasmáticas de glucosa

Existió un aumento evidente y prácticamente sostenido de la concentración plasmática de glucosa el cual se hizo más evidente a partir de las 9 horas.

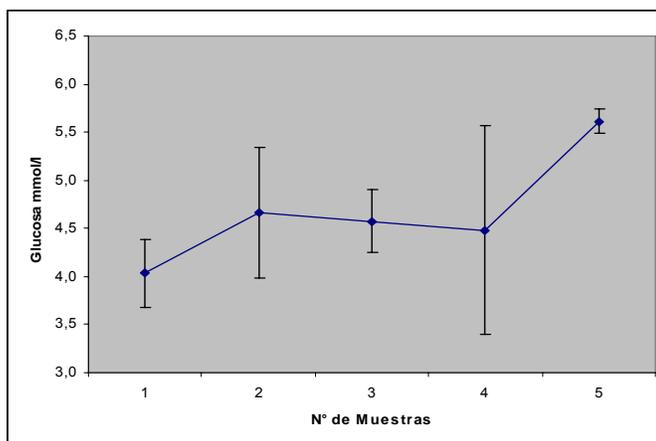


Gráfico 10. Concentración promedio (\pm DE) de glucosa (mmol/l) plasmática durante los distintos períodos de muestreo durante el transporte, comenzando del último valor obtenido en reposo.

5.2.4 Evolución de las concentraciones plasmáticas de Lactato

Las concentraciones plasmáticas de lactato tendieron a aumentar a medida que aumentaron las horas de transporte (Gráfico 15)

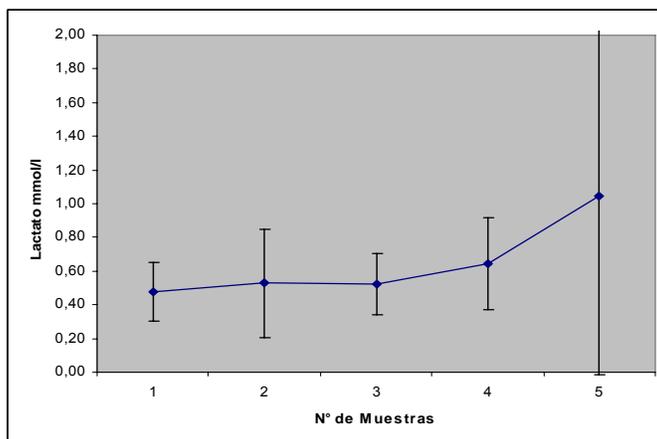


Gráfico 11. Concentración promedio (\pm DE.) de lactato (mmol/l) de las muestras tomadas cada tres horas durante los distintos períodos de muestreo durante el transporte, comenzando del último valor previo al transporte.

5.2.5 Evolución de las concentraciones plasmáticas de β -Hidroxiacetato

La concentración de β -HBA mostró una tendencia a disminuir a medida que aumentaron las horas de transporte.

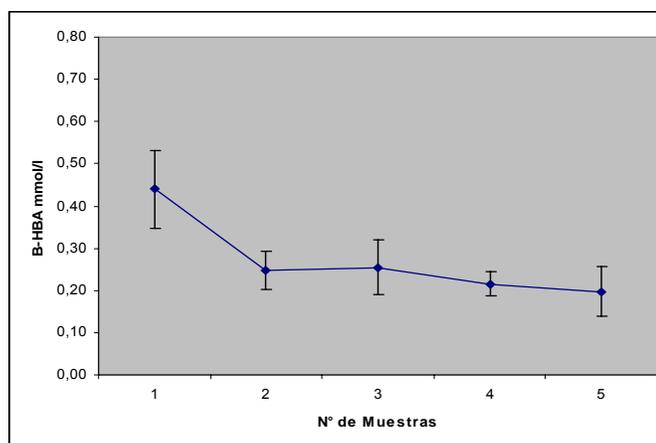


Gráfico 12. Concentración promedio (\pm DE) de β -HBA (mmol/l) plasmático durante los distintos períodos de muestreo durante el transporte, comenzando del último valor previo al transporte.

5.2.6 Evolución de la actividad enzimática de creatinfosfoquinasa

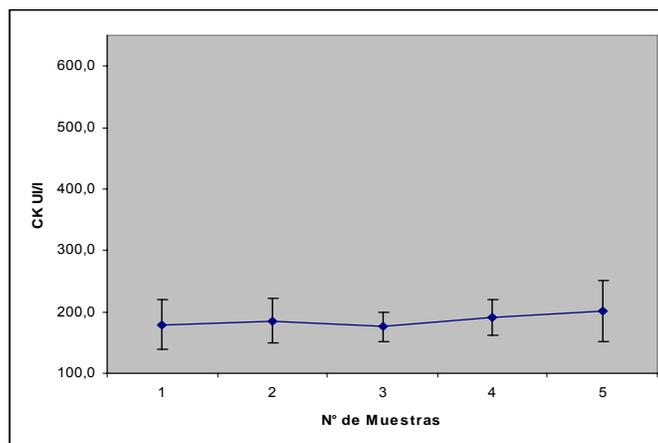


Gráfico 12. Actividad enzimática promedio (\pm DE) de creatinfosfoquinasa (UI/L) de las muestras tomadas durante los distintos períodos de muestreo durante el transporte, comenzando del último valor previo al transporte.

Se observó un aumento en la actividad enzimática de CK desde el último muestreo pre transporte. En este caso no se utilizó el valor promedio obtenido durante el reposo, ya que estos eran muy altos, a pesar de haberse observado una curva decreciente al final del tercer día de muestreo (gráfico 6).

5.2.7 Evolución de la concentración de leucocitos

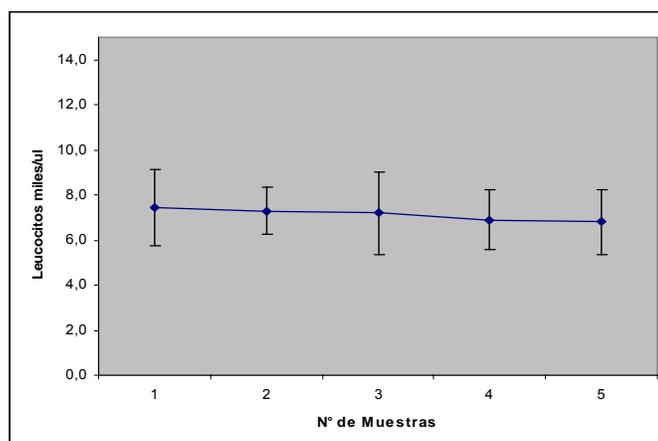


Gráfico 14. Promedio de la concentración (\pm DE) de leucocitos (miles/ml) en las muestras tomadas durante los distintos períodos de muestreo durante el transporte, comenzando del último valor previo al transporte.

Durante las 12 horas de transporte se observó una disminución en la concentración de leucocitos, pero se mantuvo dentro de los rangos de la especie, para dicho constituyente.

6. DISCUSIÓN

La determinación de constituyentes sanguíneos ha sido siempre un aspecto importante de considerar para analizar el efecto de los eventos que producen estrés en los animales (Mitchell y Col. 1988). Es importante señalar que la toma de la muestra de sangre es en si misma un factor de estrés por lo que debe ser considerado al momento de analizar los resultados obtenidos. Con el fin de minimizar estos efectos se utilizan métodos automáticos y portables de obtención de muestra (Cockram y col 1996). El método utilizado en este estudio tiende a minimizar errores de este tipo, pero no por eso dejan de estar presentes aunque en un porcentaje pequeño no determinado (Mitchell y Col. 1988; Thun y col 1981). En este estudio los animales fueron muestreados periódicamente desde la postura de la cánula, observándose que la primera muestra presenta una diferencia importante para todos los constituyentes estudiados siendo superiores a una DE, para el cortisol, la glucosa, la CK y β -HBA. Se puede observar también, como producto del manejo, que en la novena muestra del animal 1 y en la cuarta del novillo 2 un incremento por sobre de la curva promedio debido a la reposición de las cánulas yugulares lo que afectó la secreción normal del cortisol plasmático y los constituyentes antes mencionados (excepto glucosa), por lo cual como se mencionó anteriormente no se incluyeron en el análisis estadístico.

De los siete constituyentes estudiados el cortisol fue el más sensible, ya que éste es un indicador de estrés inmediato el cual se altera, por ejemplo, debido a procedimientos de manejo o quirúrgicos habituales, como la castración (Grandin 1997; Mitchell y col 1988). Los rangos obtenidos coinciden con los valores referenciales indicados por otros autores (Kaneko 1989; Radostits y col 2000). Sin embargo, los promedios obtenidos fueron levemente superiores a los entregados por los autores mencionados anteriormente, esto puede haber estado influido por la reposición de las cánulas, a pesar de no haber considerado el valor inmediatamente cercano al evento. Cabe destacar que al eliminar los datos alterados por la reposición de las cánulas la tendencia de la curva se acerca mucho a cero, hecho que confirma una buena manipulación de los animales y uso de la técnica de extracción de muestras en reposo.

El aumento de los valores de cortisol durante las primeras 6 horas de transporte concuerda con los resultados de Aranís (2003) y Tadich y col (2003), quienes encontraron aumentos de los valores de cortisol en animales transportados por 3 horas. Warriss y col (1995) señalan que se produce una elevación de los niveles sanguíneos de cortisol durante el embarque y el principio de la jornada de transporte. Cockram y Corley (1991), creen que este aumento en las primeras horas de transporte, se debería principalmente a efectos psicológicos relacionados con éste, como son el embarque, el ruido y las vibraciones. La disminución de los valores de cortisol posterior a las 6 horas de transporte, coincidiría con los resultados de Alvarado (1999) quien encontró una disminución de los valores de cortisol posterior a las 12 horas de transporte y con Tadich y col (2003, 2005) quienes encontraron una disminución de los valores de cortisol en transportes de 16 horas. La disminución de los valores de cortisol a

medida que transcurre el transporte y el animal se adapta a ser transportado ha sido descrita por Kent y Ewbank (1983) Mitchell y col (1988) y Warriss y col (1995).

La tendencia de la curva de los valores promedio de VGA en los novillos en reposo indica que la concentración del VGA se mantuvo constante y no fue influenciada por la colocación y reposición de las cánulas. Estos resultados eran esperables ya que el VGA aumenta por factores tales como, deshidratación o contracción esplénica inducida por la actividad nerviosa simpática o aumento de catecolaminas circulantes (Lister y col 1981, Mitchell y col 1988). En un experimento similar Mitchell y col (1988), encontraron que los valores de VGA eran significativamente mayores en aquellos animales en que se obtuvo sangre vía punción yugular y permanecieron 20 minutos dentro de una manga, que en aquellos en los cuales se obtuvo sangre vía catéter endovenoso. Es interesante señalar que se observó un aumento en los valores de VGA en las muestras tomadas en la mañana y en la noche, comparadas con las muestras tomadas durante el día, esta variación estuvo dentro de los rangos para la especie y no puede ser asociada a factores de estrés.

El incremento de los valores de VGA en la medida que aumentaron las horas de transporte coincide con resultados encontrados por Tarrant y col (1992), Tadich y col (1999, 2005) Knowles (1999). El aumento de los valores de VGA en transportes prolongados de 12 o más horas podrían deberse principalmente a deshidratación. Sin embargo Warriss y col (1995) encontraron una disminución de los valores de VGA de un 5% comparado con los valores iniciales, en terneros transportados por 5 horas, estos autores atribuyeron esta disminución del VGA al acostumbramiento de los animales a ser transportados. Esto indicaría que en el experimento de Warriss y col (1995), los animales tuvieron un manejo estresante al ser cargados y comenzar el viaje que produjo una contracción esplénica que hizo que aumentaran los valores de VGA y que posteriormente al acostumbrarse al transporte disminuyeran estos valores. Sin embargo, la mayor parte de la literatura consultada indica que esta variable aumenta a medida que aumenta el período de transporte Tadich y col (2003).

Los valores iniciales de glucosa de los animales en reposo pueden haber estado influidos por los valores de cortisol plasmático en el mismo período y al igual que en el caso anterior al eliminar los datos alterados por la reinscripción de las cánulas, la tendencia de la curva tiende a cero. El promedio de los valores en reposo obtenido en este estudio es similar a los valores indicados por Mitchell y col (1988), Witwer y Böhmwald (1983) y Radostitis y col 2000. De acuerdo con Alvarez (2002), al menos hasta los 20 minutos, no existe una respuesta de la glucosa en respuesta al alza de las concentraciones de cortisol. Esto se confirmó en la segunda experiencia de este trabajo donde producto del transporte a las tres horas de viaje se produjo un aumento de los niveles plasmáticos de este constituyente, manteniéndose elevado hasta el final del transporte. Diferentes autores han descrito resultados similares (Mitchell y col 1988, Tarrant y col 1992, Warriss y col 1995, Tadich y col 2005). De acuerdo a Shaw y Tume (1992), el incremento en las concentraciones de glucosa es debido principalmente a la glicogénesis asociada con el incremento de cortisol y catecolaminas las que son liberadas producto del transporte. Knowles y col (1999), encontraron una disminución de la glucosa sanguínea durante la primeras 24 h de transporte en novillos transportados hasta por 31 horas.

El lactato disminuyó durante el período de muestreo de los animales en reposo. Los valores iniciales más altos pueden haber estado influenciados por el efecto del arreo al brete y la postura de cánula como acciones de intensa actividad física. Mitchell y col. (1988), observaron que las concentraciones plasmáticas de lactato eran significativamente mayores después de realizar un procedimiento de manejo estresante, como carga y descarga y entrada a corrales, comparadas con las encontradas en los animales en los que no se realizó este tipo de manejo. De acuerdo con Shaw y Tume (1992) y Gregory (1998), tiempos cortos de ejercicio brusco y estados de estrés aumentan la adrenalina circulante, produciendo una degradación del glucógeno muscular y aumento de las concentraciones de lactato. Lo anterior se vio reflejado cuando los animales fueron transportados, en que se observa un aumento de los valores de lactato a medida que aumenta el tiempo de transporte. Otros autores coinciden en que el tiempo de transporte contribuye a aumentar las concentraciones de lactato (Cole y col 1988, Warriss y col 1995). Cabe señalar que tanto los valores en reposo como durante el transporte fluctuaron dentro de los rangos entregados para la especie (0,6-2,2 mmol/L) por Radostits y col (2000)

Habitualmente se encuentran concentraciones sanguíneas de β -HBA producto de su síntesis a nivel ruminal (Herdt 1988) y los aumentos de estas se deben principalmente a su relación con el ayuno y la disponibilidad de azúcares en la sangre (Kaneko 1989; Alvarado 1999). El aumento de β -HBA sanguíneo estaría relacionado a períodos de ayuno prolongado, de varios días de duración, ya que, en lo rumiantes la falta de alimento por períodos cortos es compensada por el contenido ruminal (Vernon 1980). En el primer estudio los animales no fueron sometidos a ayuno por lo que no se esperaba cambios en las concentraciones de este constituyente. Esta se mantuvo dentro de los rangos para la especie de 0,20 – 0,46 mmol/L¹. El menor valor encontrado en las concentraciones de este cuerpo cetónico, si bien dentro de los rangos de referencia, al inicio del experimento, se podría explicar, por una vasoconstricción de la pared ruminal, producto de la colocación de la cánula endovenosa, con lo cual el B-HBA no pasaría a la sangre.

La disminución, dentro de los rangos de referencia, de las concentraciones sanguíneas de β -HBA durante el período de transporte están de acuerdo con lo encontrado con Knowles y col (1999) y Tadich y col (2003, 2005), quienes informaron una disminución significativa de este constituyente sanguíneo en novillos transportados por 31, 24 y 3 horas, respectivamente. Esta disminución se debería a la utilización del β -HBA circulante en la sangre, ya que los rumiantes producen una cantidad constante de cuerpos cetónicos, incluyendo β -HBA (Herdt 1988). Este autor señala que la formación de cuerpos cetónicos está directamente relacionada con la gluconeogenesis, así, al aumentar una lo hace la otra. Esto se explica porque cuando la gluconeogenesis es alta, como ocurrió en este experimento, el oxalacetato es removido de las mitocondrias para la formación de glucosa, cuando sus niveles se agotan y no hay suficiente oxalacetato para unirse a unidades de dos carbonos (C2) para entrar al ciclo de Krebs, las unidades C2 se acumulan en la mitocondria y son removidas de ella vía formación de cuerpos cetónicos. Así, la gluconeogenesis en virtud de sus requerimientos de oxalacetato promueve la ketogénesis.

Los valores séricos de CK en el primer experimento disminuyeron rápidamente durante los tres días de muestreo. Los valores iniciales altos, sobre 300 UI/L se deberían al efecto del estrés del manejo en la colocación de las cánulas. Diversos autores señalan distintas causas para el aumento de esta enzima. El más aceptado es el ejercicio, sin embargo Cockram y Corley (1991) indican que los aumentos de catecolaminas circulantes podrían aumentar los valores de CK. Esto aparentemente sucedió en el primer experimento y se vio reflejado cuando hubo que reponer las cánulas en dos animales, donde se observan aumentos transitorios de la enzima. Los valores promedio iniciales están levemente por sobre los rangos de referencia 35 a 280 UI/L (Radostits y col 2000).

Durante el transporte se observó una leve tendencia a aumentar la actividad plasmática de CK dentro de los valores de los rangos de referencia entregados por Radostits y col (2000). Este aumento moderado no está de acuerdo con resultados encontrados en estudios anteriores en que los animales fueron transportados por 15 h (Warriss y col 1995) y por 3 y 16 h (Tadich y col 2003). Los aumentos de CK durante el transporte se deberían principalmente a daño muscular producto del ejercicio para mantener la postura y roces entre los animales en el camión (Tarrant y Grandin 1993), alcanzándose las concentraciones más altas entre 2 y 12 h posterior al daño muscular (Holmes y col 1973). En este estudio la densidad de carga fue menor a la utilizada comercialmente (500 kg/m²) y los animales tuvieron la posibilidad de echarse durante el transporte. Al respecto Grandin y Tarrant (1993) señalan que para períodos de transporte de 4 a 24 h, la actividad plasmática de la CK aumenta cuando se incrementa la densidad de carga de los animales.

Los valores sanguíneos de leucocitos no tuvieron una gran variación durante el muestreo en reposo. Cabe mencionar que a pesar de las diferencias entre individuos la media obtenida es prácticamente el promedio exacto del rango citado en la literatura (Wittwer y Böhmwald, 1983). Debido a que los valores encontrados están dentro de los rangos descritos por Wittwer y Böhmwald (1983) es posible asumir que los manejos realizados en el presente estudio no fueron suficientes para inducir cambios en los valores sanguíneos de leucocitos. Además, los valores obtenidos son similares a los encontrados por Álvarez (2002), en los cuales se obtuvo la sangre mediante punción venosa después de distintos tipos de arreo. Sin embargo, el transporte produjo una leve disminución de los valores de leucocitos dentro de los rangos de la especie. Este resultado es interesante y contradictorio con experimentos anteriores, en que al transportar animales por 3 horas se produjo un aumento brusco de los leucocitos el cual disminuyó a medida que aumentaron las horas de transporte, para llegar a los valores obtenidos previo al transporte (Tadich y col 2003). Según Meyer y Harvey (2000), la adrenalina es responsable de la leucocitosis que se produce en situaciones estresantes, con aumento de neutrófilos y monocitos, provocando una disminución de la movilización de neutrófilos hacia los tejidos y aumento de la migración de aquellos ubicados en la pared de los vasos sanguíneos y tejidos cercanos a la circulación. El transporte provocaría aumento de la adrenalina promoviendo esta leucocitosis, por lo tanto resulta difícil explicar este resultado.

6.2.- Conclusiones Experimento 1

6.2.1.- Bajo las condiciones experimentales propuestas las concentraciones plasmáticas promedio de glucosa, lactato, β -hidroxibutirato y los valores de hematocrito y leucocitos concuerdan con aquellos descritos en la literatura consultada.

6.2.2 Las concentraciones plasmáticas promedio de cortisol y la actividad enzimática de CK estuvieron levemente por sobre los valores de referencia.

6.3.- Conclusiones Experimento 2

6.3.1.- Bajo las condiciones experimentales propuestas, el transporte terrestre por 12 horas produjo un aumento de los valores medios de hematocrito y de las concentraciones sanguíneas de cortisol, glucosa lactato y una mantención de la actividad enzimática de CK.

6.3.2.- Bajo las condiciones experimentales propuestas, el transporte terrestre por 12 horas produjo una disminución de las concentraciones sanguíneas promedio de β -Hidroxibutirato.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado M. 1999 Análisis de las concentraciones sanguíneas de algunas Variables indicadoras de estrés por transporte, en bovinos. Tesis de Grado, Medicina Veterinaria, Fac. Cs. Vet. Univ. Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Alvarez E. 2002 Efecto de Estímulos de diferente intensidad durante el arreo sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en Bovinos. Memoria de Título, Medicina Veterinaria, Fac. Cs. Vet. Univ. Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Aranis A. 2003 Efecto de dos densidades de carga sobre indicadores sanguíneos de estrés en novillos transportados por tres horas vía terrestre. Memoria de Título, Medicina Veterinaria, Fac. Cs. Vet. Univ. Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Axelrod J, TD Reisine. 1984 Stress hormones: Their Interaction and Regulation. *Science*, 224, 452-459.
- Caballero SC, HS Sumano. 1993 Caracterización del Estrés en Bovinos. *Arch Med Vet*, 1, 15-30.
- Chile. 2001 Compendio Estadístico Silvoagropecuario 1999-2000.
- Cole NA, TH Camp, LD Rowe Jr., DG Stevens, DP Hutcheson. 1988 Effects of transport in feeder calves. *Amer J Vet Res* 49, 178-183.
- Cockram MS, KTT Corley. 1991 Effect of Pre-slaughter Handling on the Behaviour and Blood Composition of Beef Cattle. *British Vet J*, 147, 444-454.
- Cockram MS, JE Kent, PJ Goddard, NK Waran, IM McGilp, RE Jackson, GM Muwanga, S. Prytherch. 1996. Effect of space allowance during transport on the behavioural and physiological reponses of lambs during and after transport. *Animal Science* 62, 461-477.
- Currie WB. 1988. Structure and Function of Domestic Animals. Ed. Butterworth Boston, USA.
- Dantzer R, P Mormède. 1984 El Estrés en la Cría Intensiva del Ganado. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Eicher SD. 2001 Transportation of Cattle in the Dairy Industry: Current Research and Future Directions. *Journal Dairy Science*, 84, E19-E23.

Galyean ML, RW Lee, ME Hubbert. 1981 Influence of Fasting and Transit on Ruminal and Blood Metabolites in Beef Steers. *J of Anim Sci*, 53, 7-19

Ganong, WF. 1993 Fisiología Médica. Ed. Manual Moderno. 13ª Edición. Argentina

Gallo C, C Gatica, J Correa, S Ernst. 1995 Análisis del Tiempo de Transporte y Espera, Destare y Rendimiento de la Canal de Bovinos Transportados desde Osorno a Santiago. XX Reunión Anual SOCHIPA, Coquimbo, Chile. En: Resúmenes de la XX Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal, 81-82.

Grandin T. 1997 Assessment of Stress During Handling and Transport. *J of Anim Sci*, 75, 249-257.

Grandin T. 1998 Handling methods and facilities to reduce stress on cattle. A Review. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 14, 325-41.

Grandin T. 2000 Principios de Comportamiento Animal para el Manejo de Bovinos y otros Herbívoros en Condiciones Extensivas. *Livestock Handling and Transport*, 5, 63-85.

Gregory NG. 1998. Animal Welfare and Meat Science. CABI Publishing, Oxon. England.

Herdt TH. 1988. Fuel homeostasis in the ruminant. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 4, 213-231.

Holmes JHG, CR Ashmorer, DW Robinson. 1973. Effect of stress on cattle with hereditary muscular hypertrophy. *J Anim Sci* 36, 684-694.

Johnson HD, WJ Vanjonak. 1976. Effects of Environmental and other Stressors on Blood Hormone Patterns in lactating Animals. *J of Dairy Science*, 59, 1603-1617.

Kaneko J. 1989. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Ed. Academic Press. 4th Edición.

Kent JE, R. Ewbank. 1983. The effect of Road Transportation on Blood Constituents and Behavior of Calves. *British Vet J*, 142, 326-335.

Knowles TG. 1997. Effects on Calves less than one month old of feeding or not feeding them during road transport of up of 24 hours. *Vet Rec*, 140, 116-124.

Knowles TG. 1999. A Review of the Road Transport of the Cattle. *Vet Rec*, 144, 197-201.

Lister D, NG Gregory, PD Warriss. 1981. Developments in meat science. Applied Science Publishers, London, England.

Matic MA. 1997. Contusiones en canales bovinas y su relación con el transporte. Tesis de Licenciatura, Fac. Cs. Vet., Univ. Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Meyer D, J Harvey. 2000. El laboratorio en Medicina Veterinaria. Editorial Intermédica. Buenos Aires , Argentina.

Mitchell G, J Hattingh, M Ganhao. 1988. Stress in cattle assessed after handling, after transport and after slaughter. *Vet Rec* 123, 201-205.

Moberg GP. 1987 A Model For Assessing the Impact of Behavioral Stress on Domestic Animals. *J of Anim Sc.*, 65, 1228-1235.

Navarro-Beltran IE. 1984. Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas. Ed. Salvat. 12ª Edición. Barcelona, España.

Radostits OM, CC Gay, DC Blood, KW Hinchcliff. 2000. Veterinary Medicine; A textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 9 ed. W.B. Saunders Company, London. England.

Selye H. 1973 The Evaluation of the Stress Concept. *Animal Science*, 26, 901-946

Shaw FD, RK. Tume. 1992. The Assesment of Pre-slaughter and Slaughter Treatments of Livestock by Measurements of Plasma Constituents – A Review of a Recent Work. *Meat Science*, 32, 311-329.

Stott GH. 1981. What is Animal Stress and How is it Measured?. *J of Anim Sci*, 52, 150-153.

Tadich N, C Gallo, M Alvarado. 1999. Efecto de 3, 6, 12, 24 horas de transporte terrestre continuo sobre algunas variables indicadoras de estrés en bovinos. XXIV reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal, Temuco, Chile. pag 173-174.

Tadich N, C Gallo, R Echeverría, G van Schaik. 2003 Efecto del ayuno durante dos tiempos de confinamiento y de transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. *Arch Med Vet*, 35, 171-185.

Tadich N, C Gallo, H Bustamante, M Schwerter, G. Van Schaik. 2005. Effects of transport and lairage time on some blood constituents of Friesian-cross steers in Chile. *Livest Prod Sci*, 93, 223-233.

Tarrant PV, FJ Kenny, D Harrington. 1988. The Effect of Stocking Density During 4 Hour Transport to Slaughter on Behavior, Blood Constituents and Carcass Bruising in Friesian Steers. *Meat Science*, 24, 209-222.

Tarrant PV, FJ Kenny, D Harrington, M Murphy. 1992. Long distance transportation of steers to slaughter: effect of stocking density on physiology, behaviour and carcass quality. *Livest Prod Sci* 30, 223-228.

Tarrant PV, T Grandin. 1993. Cattle Transport. C.A.B. International CHK. 9, 109-126

Thun R, E Eggenberger, K Zerobin, T Lüscher, W Vetter. 1981. Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: Evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinology*, 109, 2208-2212.

Tume RK, Shaw, FD. 1992. Beta-endorphin and Cortisol Concentrations in Plasma of Blood Samples Collected During Exsanguination of Cattle. *Meat Science*, 31, 211-217.

Vernon RG. 1980. Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. *Prog Lipid Res*, 19, 23-106.

Warriss PD. 1990. The Handling of Cattle Pre-slaughter and its Effects on Carcass and Meat Quality. *Applied Animal Behavior Science*, 28, 171-186.

Warriss PD, SN Brown, TG Knowles, SC Kestin, JE Edwards, SK Dolan, AJ Phillips. 1995. Effects on Cattle of Transport by Road for up to 15 Hours. *Vet Rec*, 136, 319-323.

Wittwer F, H Böhmald. 1983. Manual de Patología Clínica Veterinaria. Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias. Facultad de Ciencias Clínicas Veterinarias. Universidad Austral de Chile.

8. ANEXOS

Cuadro 1.- Datos obtenidos para el Cortisol

Novillo	Día 1			Día 2			Días 3			Viaje						
1	3,32	1,1	0,91	0,49	0,48	0,77	3,51	0,62	0,99	2,02	2,83	2,1	1,97	1,1		
2	3,17	1,17	1,35	7,24	0,39	0,99	1,89	0,88	2,03	1,31	2,71	1,01	5,17	4,45	2,48	2,44
3	1,91	0,59	2,4	0,47	1,39	0,35	1,77	0,35	0,9	0,63	0,85	2,88	0,89	3,07	1,4	2,29
4	1,32	0,7	1,5	0,64	0,84	0,65	0,5	0,44	1,16	1,33	1,92	0,56	3,65	4,52	0,86	1,55
5	3,84	2,8	0,97	0,71	0,66	1,15	0,96	0,87	0,9	0,93	0,69	0,64				
Prom.	2,71	1,27	1,43	1,91	0,75	0,79	1,18	0,64	1,70	0,96	1,43	1,42	3,14	3,54	1,68	1,85

Cuadro 2.- Análisis de datos de las concentraciones plasmáticas de Cortisol obtenidas en novillos canulados en reposo.

Dato	Valor	Valor Ajustado*
Media Aritmética	1,3	1,0
Media Geométrica	1,032	0,91
D Estándar	0,855	0,596
C Variación	65.77	59.6
Varianza	0,731	0,355

* valor ajustado no incluye datos del primer muestreo, y posteriores a las reposiciones de cánulas.-

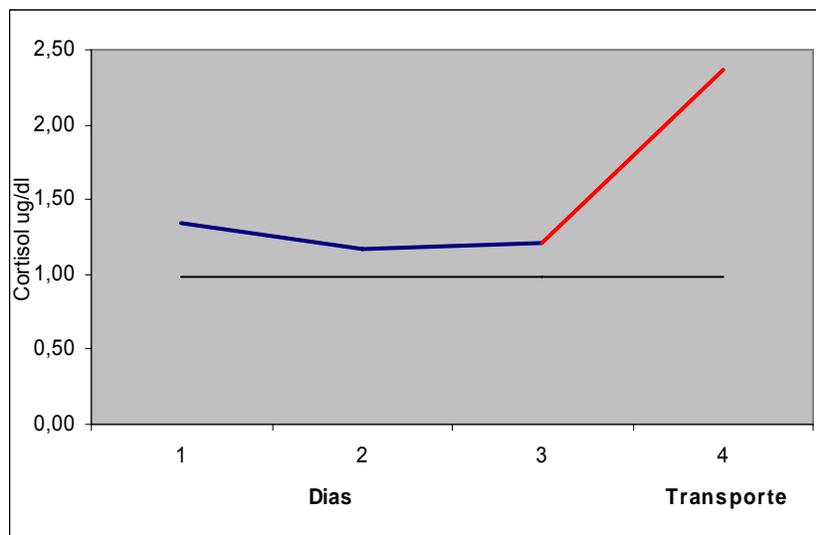


Gráfico 1.- Evolución Concentración plasmática de Cortisol durante el reposo (Azul) y durante el transporte (rojo), indicándose en negro el promedio obtenido durante el reposo.

Cuadro 11 Datos obtenidos de Hematocrito

Novillo	Día 1			Día 2			Días 3			Viaje						
1	30,0	30,6	32,5	34,1	32,5	31,9	31,1	33,3	31,9	31,5	35,7	32,9	31,8	36,8		
2	34,0	36,5	36,8	36,9	36,9	35,3	36,5	36,5	37,9	38,1	41,5	39,9	38,2	38,9	38,0	37,9
3	32,0	33,4	31,8	31,7	33,0	31,1	31,0	32,7	30,9	31,3	35,5	33,0	33,5	36,2	44,1	41,0
4	30,0	28,2	30,7	29,5	29,9	30,0	29,4	30,3	31,4	31,4	31,1	31,7	37,2	32,8	34,3	38,5
5	31,3	32,1	34,7	33,1	30,8	31,6	31,8	31,5	31,4	31,8	29,9	33,1				
Prom.	31,5	32,2	33,3	33,1	32,6	32,0	32,1	32,5	32,5	33,2	34,0	33,8	36,2	35,2	37,1	38,6

Cuadro 12: Análisis de Valores del Hematocrito obtenidos en novillos canulados en reposo.

Dato	Valor	Valor Ajustado*
Media Aritmética	32,6	32,8
Media Geométrica	32,5	32,6
D Estándar	2,66	2,72
C Variación	8.15	8.3
Varianza	7,07	7,41

* valor ajustado no incluye datos del primer muestreo, y posteriores a las reposiciones de cánulas.-

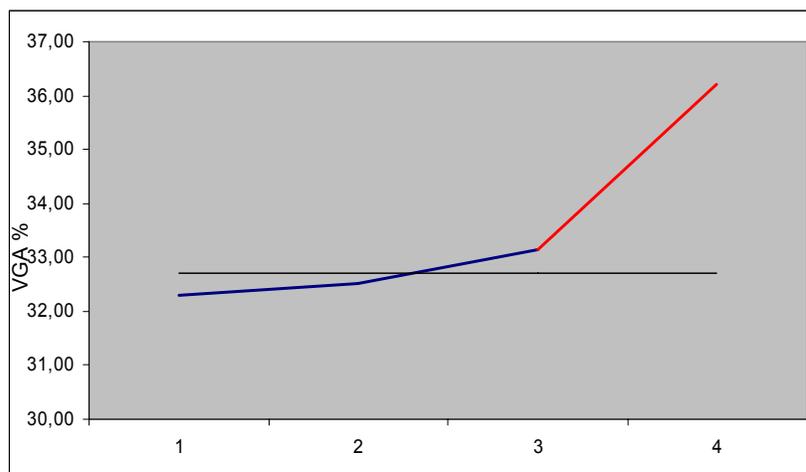


Gráfico 6.- Evolución del VGA durante el reposo (Azul) y durante el transporte (rojo), indicándose en negro el promedio obtenido durante el reposo.

Cuadro 3.- Datos obtenidos para la Glucosa

Novillo	Día 1			Día 2			Días 3			Viaje						
1	0,7	3,9	3,8	3,6	3,9	3,7	3,7	3,8	3,8	3,8	4,3	4,9	4,1	5,7		
2	4,2	4,1	4,5	3,6	3,8	3,9	3,8	3,5	3,9	3,7	3,7	3,6	4,1	4,7	3,8	5,7
3	4,5	4,0	4,3	4,0	4,4	3,8	4,2	3,8	4,0	3,8	4,6	4,4	4,6	4,2	3,9	5,5
4	4,7	4,1	4,3	4,0	4,0	4,1	4,2	4,0	3,9	4,0	4,0	4,1	5,6	4,5	6,1	5,5
5	3,7	3,9	4,2	4,0	3,8	4,2	4,3	4,3	4,2	4,1	4,3	4,3				
Prom.	3,6	4,0	4,2	3,8	4,0	4,0	4,0	3,9	3,9	3,9	4,1	4,0	4,7	4,6	4,5	5,6

Cuadro 4.- Análisis de las concentraciones plasmáticas de Glucosa obtenidas en novillos canulados en reposo.

Dato	Valor	Valor Ajustado*
Media Aritmética	3,9	4,0
Media Geométrica	3,86	3,97
D Estándar	0,53	0,25
C. Variación	13,5	6,25
Varianza	0,28	0,06

* valor ajustado no incluye datos del primer muestreo, y posteriores a las reposiciones de cánulas.-

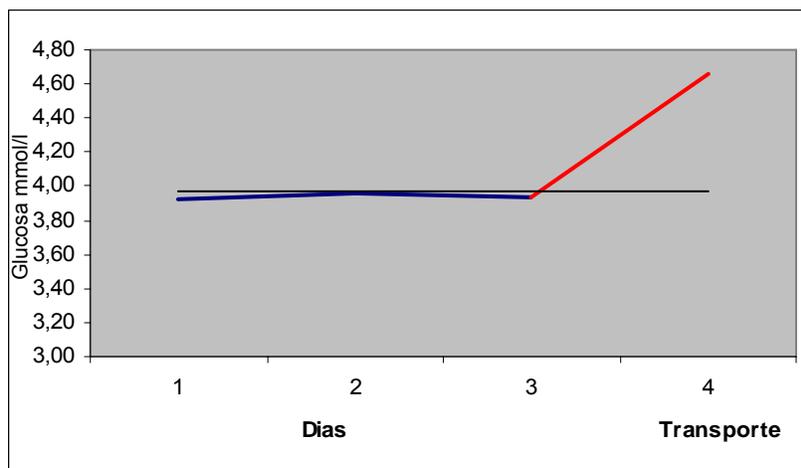


Gráfico 2.- Evolución Concentración plasmática de Glucosa durante el reposo (Azul) y durante el transporte (rojo), indicándose en negro el promedio obtenido durante el reposo.

Cuadro 5.- Datos obtenidos para el lactato

Novillo	Día 1			Día 2			Días 3				Viaje					
1	0,81	0,71		0,72	0,70	0,28	0,33	0,41	0,37	0,51	0,45	0,35	0,26	0,46		
2	1,05	0,80	0,61	2,63	0,90	0,33	0,41	0,46	0,87	0,47	0,29	0,33	0,47	0,51	0,88	0,52
3	0,62	0,74	1,58	0,73	0,67	0,33	0,26	0,24	0,52	0,60	0,21	0,21	1,94	0,66	0,57	
4	0,76	0,65	0,41	0,65	0,74	0,29	0,39	0,31	0,40	0,39	0,27	0,36	0,98	0,71	0,78	2,63
5	0,72	1,44	1,26	1,17	1,00	1,06	1,01	0,81	0,56	0,75	0,69	0,71				
Prom.	0,79	0,89	0,91	1,18	0,80	0,50	0,47	0,46	0,54	0,52	0,37	0,48	0,53	0,88	0,65	1,05

Cuadro 6.- Análisis de las concentraciones plasmáticas de Lactato obtenidas en novillos canulados en reposo.

Dato	Valor	Valor Ajustado*
Media Aritmética	0,6	0,6
Media Geométrica	0,6	0,6
D Estándar	0,3	0,3
C Variación	50	50
Varianza	0,1	0,1

* valor ajustado no incluye datos del primer muestreo, y posteriores a las reposiciones de cánulas.-

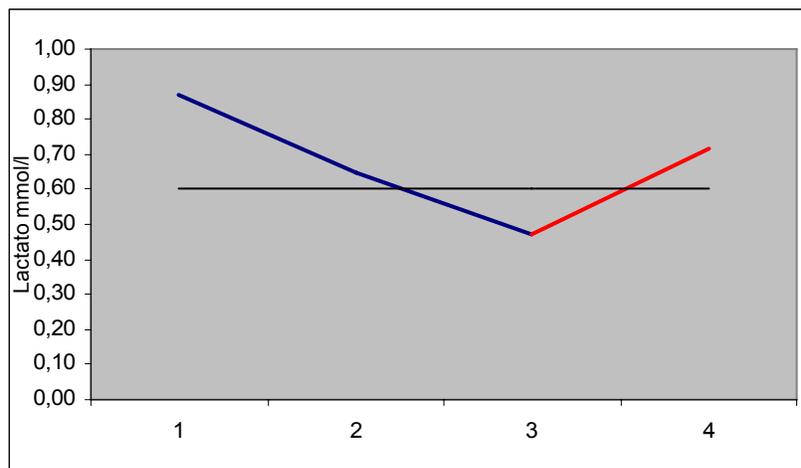


Gráfico 3.- Evolución Concentración plasmática de Lactato durante el reposo (Azul) y durante el transporte (rojo), indicándose en negro el promedio obtenido durante el reposo.

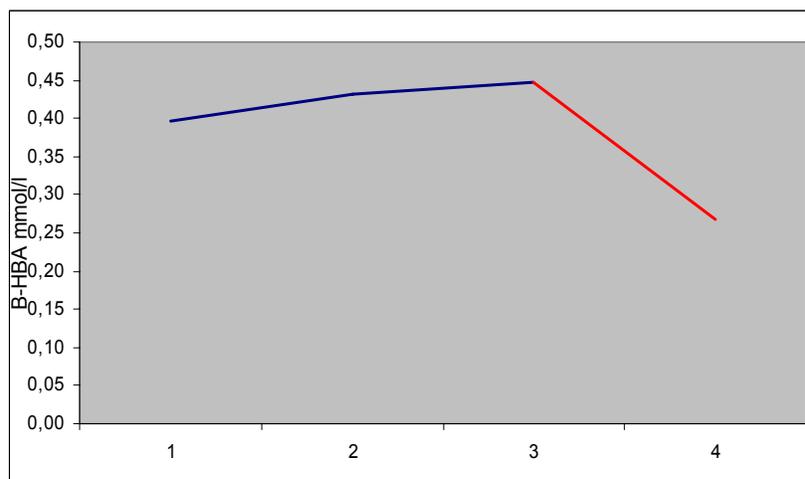
Cuadro 9.- Datos obtenidos para el β -Hidroxi-Butirato

Novillo	Día 1			Día 2			Días 3			Viaje						
1	0,30	0,45	0,39	0,38	0,48	0,40	0,34	0,44	0,49	0,44	0,20	0,23	0,25	0,17		
2	0,38	0,36	0,60	0,36	0,50	0,48	0,45	0,46	0,56	0,43	0,41	0,54	0,31	0,33	0,22	0,13
3	0,32	0,48	0,42	0,39	0,45	0,36	0,51	0,29	0,60	0,78	0,42	0,31	0,24	0,18	0,21	0,23
4	0,31	0,48	0,59	0,39	0,69	0,35		0,47	0,37	0,44	0,53	0,40	0,24	0,28	0,18	0,26
5	0,23	0,35	0,29	0,47	0,23	0,38	0,50	0,45	0,36	0,37	0,38	0,51				
Prom.	0,31	0,42	0,46	0,40	0,47	0,39	0,47	0,42	0,45	0,49	0,45	0,44	0,25	0,26	0,22	0,20

Cuadro 10: Análisis de las concentraciones plasmáticas de β -HBA obtenidas en novillos canulados en reposo.

Dato	Valor	Valor Ajustado*
Media Aritmética	0,4	0,4
Media Geométrica	0,42	0,43
D Estándar	0,11	0,1
C Variacion	8.46	25
Varianza	0,01	0,01

* valor ajustado no incluye datos del primer muestreo, y posteriores a las reposiciones de cánulas.-

Gráfico 5.- Evolución Concentración plasmática de β -HBA durante el reposo (Azul) y durante el transporte (rojo).

Cuadro 7.- Datos obtenidos para Creatinfosfoquinasa

Novillo	Día 1			Día 2				Días 3				Viaje				
1	207,0	166,0	192,0	182,0	188,0	226,0	178,0	208,0	143,0	173,0	173,0	166	182	187		
2	576,0	647,0	421,0	275,0	578,0	209,0	198,0	209,0	261,0	216,0	160,0	222,0	226,0	203	223	256
3																
4	241,0	196,0	213,0	182,0	192,0	180,0	167,0	166,0	168,0	150,0	162,0	142,0	157,0	159	167	161
5	256,0	523,0	561,0	409,0	433,0	343,0	387,0	271,0	353,0	278,0	302,0	469,0				
Prom.	320,0	383,0	346,8	262,0	347,8	244,0	244,5	215,3	240,0	213,0	191,8	251,5	185,3	176,0	190,7	201,3

Cuadro 8: Análisis de Actividad enzimática de Creatinfosfoquinasa obtenidas en novillos canulados en reposo

Dato	Valor	Valor Ajustado*
Media Aritmética	275,5	254
Media Geométrica	250,2	234
D Estándar	135,9	113
C Variación	49.32	44.48
Varianza	18.457	12.981

* valor ajustado no incluye datos del primer muestreo, y posteriores a las reposiciones de cánulas.-

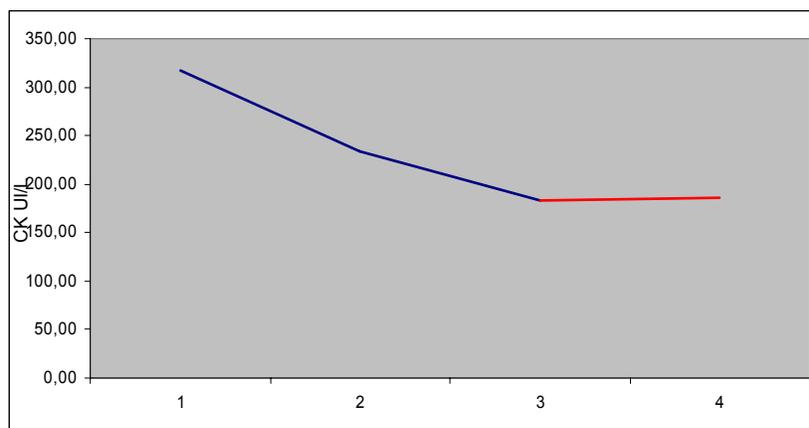


Gráfico 4.- Evolución de la actividad enzimática de CK durante el reposo (Azul) y durante el transporte (rojo).

Cuadro 13.- Datos obtenidos de Concentración de Leucocitos

Novillo	Día 1			Día 2				Días 3				Viaje				
1	4,0	4,4	5,6	5,6	5,6	5,2	7,2	8,0	14,0	6,0	6,8	6,0	6,0			
2	8,4	8,4	12,8	10,8	10,0	13,3	12,0	10,4	8,8	9,2	14,4	8,8	7,2	9,6	7,6	6,4
3	8,4	8,4	8,4	8,4	7,2	6,4	6,8	6,8	6,0	6,8	9,2	9,0	8,8	7,6	8,4	8,4
4	4,4	4,4	4,8	4,4	4,4	4,8	4,8	5,2	5,2	4,8	6,0	6,0	6,4	5,6	5,6	5,6
5	15,2	10,0	14,8	12,0	10,0	10,0	11,6	10,8	10,8	11,2	12,4	10,8				
Prom.	8,1	7,1	9,3	8,2	7,4	8,0	8,1	8,0	7,6	8,0	11,2	8,1	7,3	7,2	6,9	6,8

Cuadro 14.- Análisis de las concentraciones de leucocitos obtenidas en novillos canulados en reposo.

Dato	Valor	Valor Ajustado*
Media Aritmética	8,0	7,9
Media Geométrica	7,5	7,48
D Estándar	2,81	2,52
C Variacion	35.12	31.9
Varianza	7,88	6,57

* valor ajustado no incluye datos del primer muestreo, y posteriores a las reposiciones de cánulas.-

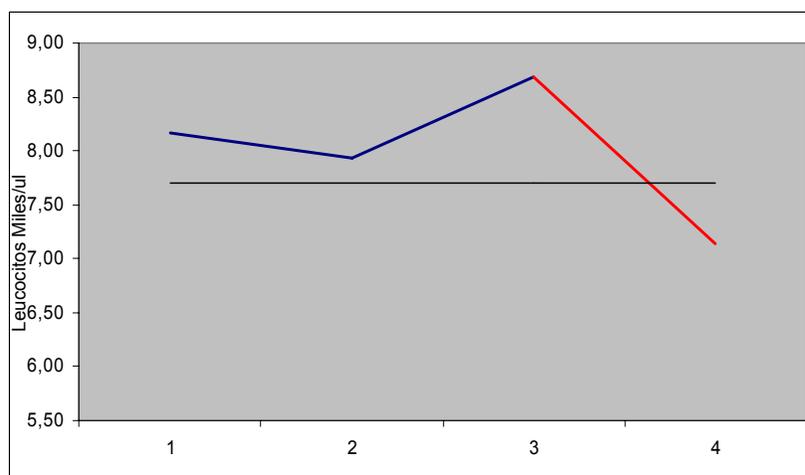


Gráfico 7.- Evolución de la concentración de leucocitos durante el reposo (Azul) y durante el transporte (rojo), indicándose en negro el promedio obtenido durante el reposo.

9. AGRADECIMIENTOS

En 9 años de vida universitaria como alumno y empleado se siembran y cultivan infinitas flores.

- ✎ Mi esposa y mi hijo son fruto de esta vida. Los Amo
- ✎ Los amig@s y compañer@s que esta casa reunió de distintas partes del país y que hoy emigraron en busca de prosperidad a muchos recónditos lugares. Los extraño.
- ✎ Los profesores que en su labor diaria forjaron el destino de muchos de nosotros, a quienes a veces consideramos padres y debido a la vorágine de la vida sólo fueron profesores, cuando lo que esperábamos eran mentores. De algunos, sin embargo, sí obtuvimos afecto, preocupación y formación para la vida, a veces más importante que las dosis y las recetas, a ellos, el agradecimiento mas profundo y el manifiesto del deseo de haber sido mas que un número sentado en un pupitre, el deseo de haber sido un discípulo que aprende y comparte la vida para darle continuidad a la labor del maestro. De verdad lo deseaba.
- ✎ Gracias por su paciencia, confianza y cariño N. Tadich y C. Gallo. Los más cercanos y recordados maestros. Los estimo y admiro mucho.
- ✎ A la comunidad universitaria en general, a los auxiliares, paradocentes y secretarias. Mi particular agradecimiento al Coro Universitario, ahí aprendí y crecí mucho más que en algunas de las clases regulares. La extensión y cultivar las artes es más importante de lo que se cree.
- ✎ A pesar de la distancia siempre están con uno, mi amada familia que incondicional me acompañó en todos estos años, a mis padres que ven crecer su fruto muchas gracias y los amo, a toda mi familia y mi recuerdo a quienes ya no están, con quienes no pude compartir lo que hubiese querido por estar creciendo lejos de casa. Compartan conmigo esta alegría.
- ✎ A Dios o como quiera que se llame por todo lo que aquí está escrito.
- ✎ Gracias. Y espero volver a ser parte de lo que nunca he dejado de ser.