

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

### **Evaluación de los niveles de cortisol, glucosa y constantes fisiológicas luego de la aplicación de un protocolo convencional y alternativo de superovulación en bovinos**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista


#### **Autores:**

Adrian Ricardo Calle Valdez

Silvia Estefania Fares Vizhñay

#### **Director:**

Luis Eduardo Ayala Guanga

ORCID:  0000-0001-6543-7594

**Cuenca, Ecuador**

2023-10-23

### Resumen

Se determinó la respuesta neuroendócrina de la donadora, al reducir el número de aplicaciones de hormona folículo-estimulante (FSH) como factor de superovulación. 8 vacas Holstein mestizas fueron distribuidas aleatoriamente en dos tratamientos (T): T1 (n=4) recibieron una dosis de 200 mg de FSH vía epidural (EP) en el día 4 del protocolo de superovulación (SOV), en T2 se administró 300 mg de FSH repartidas en 8 dosis decrecientes vía intramuscular (IM), los días 4; 5; 6 y 7 del protocolo en la mañana y tarde. La concentración de cortisol se determinó a las 0; 2; 4; 6; 12; 24; 26; 28; 30; 36; 48; 50; 52; 54; 60; 72; 74; 76; 78 y 80 horas del día 4. La frecuencia cardiaca (FC), respiratoria (FR) y los niveles de glucosa fueron evaluados el día 4 a las 05h45; 06h05; 08h00; 10h00; 12h00; 17h45 y 18h05. El cortisol a las 0h fue similar en los dos T: T1 ( $10,9 \pm 0,24 \mu\text{g/dL}$ ) y T2 ( $10,8 \pm 0,33 \mu\text{g/dL}$ ) y alcanzó su mayor nivel a las 4h en T1 ( $15,8 \pm 1,39 \mu\text{g/dL}$ ) y en T2 ( $16,4 \pm 0,28 \mu\text{g/dL}$ ) sin diferencia entre T ( $P>0,05$ ). En las siguientes valoraciones el cortisol disminuyó a niveles basales en los dos T. La FC a las 05h45, mostró valores similares en T1 ( $65,3 \pm 1,65 \text{ pul/min}$ ) y en T2 ( $66,3 \pm 1,43 \text{ pul/min}$ ); sin embargo, a las 06h05 FC se incrementó en T1 ( $74,3 \pm 1,54 \text{ pul/min}$ ) y en T2 ( $84,2 \pm 1,73 \text{ pul/min}$ ) y disminuyó a partir de las 08h00. Igual comportamiento fue observado con la FR y la glucosa. Se concluye que llevar a la donadora a la manga de sujeción para administrar FSH, constituye un factor estresante que incrementa la FC, FR, cortisol y glucosa, factores que influyen sobre el porcentaje de ovulaciones en los dos T.

*Palabras clave:* cortisol, epidural, donadoras, Holstein, superovulación



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

**Repositorio Institucional:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

### Abstract

The neuroendocrine response of the donor was determined by reducing the number of applications of follicle-stimulating hormone (FSH) as a superovulation factor. 8 crossbred Holstein cows were randomly distributed in two treatments (T): T1 (n=4) received a dose of 200 mg of FSH via epidural (EP) on day 4 of the superovulation protocol (SOV), in T2: 300 mg of FSH were administered divided into 8 decreasing doses intramuscularly (IM), on days 4; 5; 6 and 7 of the protocol in the morning and afternoon. The cortisol concentration was determined at 0; 2; 4; 6.24; 26; 28; 30; 48; 50; 52; 64; 72; 74; 76 and 78 hours of day 4. Heart rate (HR), respiratory rate (RR) and glucose levels were evaluated on day 4 at 05:45; 06:05; 08:00; 10:00 a.m.; 12:00; 5:45 p.m. and 6:05 p.m. Cortisol at 0h was similar in both T: T1 ( $10.9 \pm 0.24 \mu\text{g/dL}$ ) and T2 ( $10.8 \pm 0.33 \mu\text{g/dL}$ ) and reached its highest level at 4h in T1 ( $15.8 \pm 1.39 \mu\text{g/dL}$ ) and at T2 ( $16.4 \pm 0.28 \mu\text{g/dL}$ ) with no difference between T ( $P>0.05$ ). In the following evaluations, cortisol decreased to basal levels in the two T. HR at 05:45h showed similar values in T1 ( $65.3 \pm 1.65 \text{ pul/min}$ ) and in T2 ( $66.3 \pm 1.43 \text{ in /min}$ ); however, at 06:05 HR increased in T1 ( $74.3 \pm 1.54 \text{ pul/min}$ ) and in T2 ( $84.2 \pm 1.73 \text{ pul/min}$ ) and decreased from 08:00. The same behavior was observed with RF and glucose. It is concluded that taking the donor to the support sleeve to administer FSH is a stressful factor that increases HR, RF, cortisol and glucose, factors that influence the percentage of ovulations in the two T.

*Keywords:* cortisol, epidural, donors, Holstein, superovulation



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

**Institutional Repository:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Índice de contenido

Introducción.....	10
1.1.    Objetivos.....	11
1.1.1.    Objetivo general.....	11
1.1.2.    Objetivos específicos.....	11
Revisión De Literatura .....	12
2.1.    El estrés.....	12
2.2.    Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.....	13
2.3.    Cortisol .....	13
2.4.    Señalización de catecolaminas.....	14
2.5.    Comportamiento de la glucosa .....	14
2.6.    Valoración de los constantes fisiológicas.....	14
2.7.    Factores que generan estrés en el ganado bovino.....	15
2.7.1.    Estrés térmico .....	15
2.7.2.    Estrés por transporte .....	16
2.7.3.    Estrés por agotamiento.....	16
2.7.4.    Estrés nutricional .....	16
2.7.5.    Estrés por manejo.....	17
2.7.6.    Estrés por aislamiento social y mezcla .....	17
2.8.    Medición de las respuestas al estrés.....	17
2.8.1.    Medición de las respuestas conductuales al estrés.....	18
2.8.2.    Medición de las respuestas fisiológicas al estrés .....	18
2.9.    Técnicas para determinar cortisol.....	19
2.9.1.    Técnica de Elisa.....	19
2.10.    El estrés en el manejo reproductivo.....	20
2.11.    Superovulación .....	21
2.12.    Hormona folículo estimulante (FSH).....	21
2.13.    Frecuencia de la aplicación de FSH .....	21

2.14.	Protocolos alternativos de superovulación .....	22
2.15.	Vías de administración .....	23
2.15.1.	Vía intramuscular .....	23
2.15.2.	Vía epidural .....	23
Materiales y Métodos.....		25
3.1.	Materiales .....	25
3.1.1.	Materiales biológicos .....	25
3.1.2.	Materiales químicos .....	25
3.1.3.	Materiales físicos .....	25
3.2.	Metodología.....	26
3.2.1.	Ubicación geográfica y área de estudio .....	26
3.2.2.	Animales y granja .....	26
3.2.3.	Diseño experimental .....	27
3.2.4.	Protocolo epidural (T1) .....	27
3.2.5.	Protocolo convencional de SOV (T2) .....	28
3.2.6.	Valoración de la concentración de Cortisol plasmático .....	29
3.2.7.	Valoración de constantes fisiológicas .....	30
3.2.8.	Valoración de glucosa en sangre .....	31
3.2.9.	Análisis estadístico .....	31
Resultados y Discusión .....		32
4.1.	Concentración de cortisol en plasma.....	32
4.2.	Concentración de niveles de glucosa en sangre.....	35
4.3.	Valoración de constantes fisiológicas.....	36
4.3.1.	Frecuencia cardiaca.....	36
4.3.2.	Frecuencia respiratoria .....	38
Conclusiones.....		40
Referencias.....		41
Anexos .....		52

### Índice de figuras

Figura 1. Mapa Satelital, ubicación geográfica Granja Experimental "Nero" de la facultad de ciencias agropecuarias de la Universidad de Cuenca .....	26
Figura 2. Protocolo de superovulación epidural (T1). BE=Benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. DIP=Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH=Hormona folículo-estimulante (200 mg). PG=Prostaglandina. Parche=Parche detector de celo. GnRH=Gonadotropina. IA= inseminación artificial. Colecta=colecta de embriones 28	
Figura 3. Protocolo de superovulación convencional (T2). BE=Benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. DIP=Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH=Hormona folículo-estimulante. PG=Prostaglandina. Parche=Parche detector de celo. GnRH=Hormona liberadora de gonadotropina. IA= inseminación artificial. Colecta=colecta de embriones .....	28
Figura 4. Concentración de cortisol valorado a las 0, 2, 4, 6, 12, 24, 26, 28, 30, 36, 48, 50, 52, 54, 60, 72, 74, 76, 78, 84 horas en un protocolo convencional y epidural para superovulación. *=diferencia estadística. Prueba T de Student.....	33
Figura 5. Concentración de glucosa valorado en el día 4 del protocolo de superovulación convencional y epidural 5 min., antes de aplicar la FSH (6A), 5min., después de aplicar la FSH (6D), luego a las 08h00, 10h00 y 12h00 am. *=diferencia estadística. Prueba T de Student.....	36
Figura 6. Frecuencia cardíaca valorada en el día 4 del protocolo de superovulación convencional y epidural 5 min., antes de aplicar la FSH (6A); 5min., después de aplicar la FSH (6D); luego a las 08h00, 10h00, 12h00, 18h00 (5 min., antes de aplicar FSH "18A" y 5 min., después de aplicar la FSH "18D"). *=diferencia estadística. Prueba T de Student. ....	38
Figura 7. Frecuencia respiratoria valorada en el día 4 del protocolo de superovulación convencional y epidural 5 min., antes de aplicar la FSH (6A); 5min., después de aplicar la FSH (6D); luego a las 08h00, 10h00, 12h00, 18h00 (5 min., antes de aplicar FSH "18A" y 5 min., después de aplicar la FSH "18D"). *=diferencia estadística. Prueba T de Student. ....	39

## Índice de tablas

Tabla 1. Respuestas conductuales medidas en ganado vacuno expuesto a estrés .....	18
Tabla 2. Datos generales de las unidades experimentales de los dos tratamientos .....	27
Tabla 3. Protocolo de toma de muestras de sangre .....	29
Tabla 4. Momentos de valoración de la frecuencia cardiaca (FC), frecuencia respiratoria (FR) en el día 4 del protocolo de SOV. ....	31
Tabla 5. Valoración de glucosa en sangre .....	31

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradecemos a Dios y a nuestras familias por siempre apoyarnos y siempre impulsarnos a lograr nuestros objetivos.

Esta tesis no habría sido posible sin la ayuda nuestro tutor de tesis y amigo, Dr. Luis Ayala a quien siempre le brindaremos nuestro agradecimiento por su paciencia y conocimientos que nos guiaron a seguir adelante en todo el proceso de este trabajo de titulación. A nuestra universidad por permitir convertirnos en profesionales en lo que nos apasiona, a todos los maestros y amigos quienes nos apoyaron y estuvieron en este trayecto de manera directa o indirecta.

Finalmente agradecemos a quienes dan lectura a nuestra tesis por permitir que nuestras experiencias, investigaciones y conocimientos incurran dentro de su repertorio de información académica.

¡Muchas gracias a todos!

Ricardo y Silvia



## Dedicatorias

Este trabajo va dedicado a mi madre María Valdez por la vida, el amor recibido y la paciencia en el avance y desarrollo de esta tesis, por ser la principal promotora de mis metas, gracias a ella por confiar y creer en mí y en mis expectativas, por ser una madre que de una u otra forma me puso siempre en el lugar correcto con sus enseñanzas y consejos que a diario los llevo conmigo.

A mis hermanos, Ana, Carmen y Darío por haber sido participes en el proceso de este trabajo de titulación, por sus aportes a mi vida y los grandes lotes de felicidad, emociones y consejos que me han brindado, también, a mi sobrino Gonzalo por su apoyo incondicional.

El desarrollo de esta tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo hacer, es afirmar que durante todo este tiempo pude disfrutar de cada momento, que cada investigación, proceso, y proyectos que se realizaron dentro de esta, lo disfrute mucho y lo hice gracias a mis amigos, de manera especial dedico este trabajo a mi mejor amigo Luis García, por ese apoyo incondicional que me brindó en todo momento, de igual manera a mi compañera de tesis Estefanía quien me apporto responsabilidad, dedicación y amistad en este trabajo; A Sebastián quien aportó parte importante de su tiempo en ayudar en el presente trabajo, a mis colegas y grandes amigos Nicola, Xavier, Walter, Edison V., José V., Cristian, por su apoyo.

Ricardo Calle

Quiero dedicar este trabajo a mi madre Silvia Vizhñay y a mis hermanas, que siempre me han brindado su amor y apoyo en cada etapa de mi vida, impulsándome siempre a cumplir mis metas.

A mi mejor amiga Janeth que siempre estuvo a mi lado con una palabra de aliento, a todos los amigos y futuros colegas que la universidad me dio la oportunidad de conocer; a mi persona especial (BA) que cada día me impulsa a ser una mejor persona y profesional; a mi compañero de tesis Adrian quien me brindó su confianza, responsabilidad y amistad al permitirme realizar este proyecto de titulación junto a él.

Silvia Fares

## Introducción

El estrés es un evento o condición externa que ejerce presión sobre un sistema biológico (Kinlein et al., 2015) y la respuesta del organismo es aguda o crónica, la primera dura horas y es impulsada por reguladores homeostáticos de los sistemas nervioso y endócrino y la segunda persiste por semanas y es regentada por reguladores homeoréticos del sistema endócrino, ambas respuestas implican alteraciones en el balance energético y metabólico (Collier et al., 2017).

El manejo rutinario del ganado bovino, requiere de una interacción humano-animal (Sanmiguel et al., 2018), que muchas veces provocan estrés, por consiguiente, cambios comportamentales y fisiológicos que conllevan a la disminución de su bienestar (Mpakama et al., 2014). Una actividad que se ha vuelto cotidiana en las ganaderías es la superovulación (SOV), técnica de reproducción asistida que implica manipulación continua de la donadora.

En los protocolos de SOV es común utilizar la hormona foliculoestimulante (FSH), hormona que impulsa el crecimiento y desarrollo de varios folículos secundarios hasta el estadio de dominancia (Bautista et al., 2019), proporcionando mayor número de ovocitos listos para ser fecundados (Becaluba, 2007). Sin embargo, la vida media de la FSH (5 horas) crea la necesidad de administrar esta hormona cada 12 horas, por 4 días consecutivos (Bó & Mapletoft, 2014), principio que obliga a trasladar a la donadora mínimo 8 veces al corral de sujeción, manejo excesivo que es responsable de incrementar la tensión y provocar estrés en la donadora (Costa & Dasso, 2007).

Ante situaciones de estrés agudo, se incrementa los niveles de cortisol y se activa la glicólisis hepática, la gluconeogénesis y aumenta el catabolismo de las proteínas libres (Romero & Sánchez, 2012); por lo tanto, la concentración del cortisol y de la glucosa en sangre pueden ser marcadores endócrinos para determinar el grado de estrés generado por la manipulación de la donadora (Tadich et al., 2003).

Además, el sistema simpático-suprarrenal libera catecolaminas como respuesta neuroendocrina (Castaño et al., 2014). Estas catecolaminas son las encargadas de aumentar la frecuencia cardíaca, provocar vasoconstricción periférica, aumento de la glicemia, dilatación pupilar, hiperventilación y aumento del volumen sanguíneo, factores directos que pueden ser utilizados para medir el efecto del estrés (Romero et al., 2020).

Por lo antes expuesto, en varios estudios se ha buscado reducir el número de aplicaciones de FSH dentro de protocolos de SOV mediante la administración intramuscular o subcutánea de esta gonadotropina disuelta en agentes de liberación lenta como la polivinilpirrolidona

(Ratsiri et al., 2021) e hidróxido de aluminio en gel (AH-gel) en bovinos (Kimura, 2016), o la utilización de la vía epidural, la cual permite una eliminación más lenta de la FSH gracias a la capa de grasa que cubre el conducto vertebral (Sakaguchi et al., 2018). Sin embargo, la información disponible sobre la respuesta del organismo ante esta reducción de manipulación dentro de los programas de SOV en bovinos es deficiente.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general**

Determinar los niveles de cortisol, glucosa y constantes fisiológicas luego de la aplicación de un protocolo convencional y alternativo para la superovulación de donadoras de embriones *in vivo*.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Evaluar los niveles de cortisol en vacas con dos protocolos diferentes de superovulación
- Analizar el comportamiento de la glucosa en sangre y su relación con los niveles de cortisol
- Comparar las constantes fisiológicas de las donadoras post-aplicación del protocolo convencional y alternativo de SOV

## Revisión De Literatura

### 2.1. El estrés

Desde el principio el estrés fue definido como una alteración del estado constante del medio interior, luego fue redefinida utilizando la palabra “homeostasis” lo cual se refiere a los procesos fisiológicos armónicos que mantienen un estado estable del organismo (Cannon, 1929). Posteriormente, se definió como la respuesta del organismo ante diversos factores causantes de estrés, denominándolo, así como “síndrome general de adaptación” el cual se compone de tres etapas de adaptación: alarma de reacción que es cuando el cuerpo detecta el estresor, fase de adaptación cuando el cuerpo reacciona ante el estresor y fase de agotamiento cuando por su duración e intensidad empiezan a agotarse las defensas del cuerpo (Selye, 1973).

Por otro lado, Ávila (2014), en su estudio reconoce la existencia de diferentes tipos de estrés, los cuales se clasifican en función de la duración:

- Estrés agudo: es la forma más común de estrés y aparece por las exigencias y presiones de un hecho reciente o incluso pueden ser anticipadas a un hecho futuro cercano.
- Estrés agudo episódico: se entiende por la aparición repetida y frecuente de estrés agudo
- Estrés crónico: es un estado constante estado de alarma, es el resultado de estresores cotidianos los cuales no han sido manejados de una manera adecuada y como resultado podrían provocar desgastes físicos lo cual lleva a la aparición de enfermedades graves.

El estrés, es una respuesta adaptativa, ya que, partiendo de cogniciones sobre el entorno, el organismo animal se prepara para la acción, permitiéndole al animal huir o enfrentarse a un ambiente peligroso o amenazante (Buestán, 2011). Los sistemas hormonales que regulan la reproducción se conectan a la respuesta de estrés y están profundamente influidos por ella (Lubos, 1983).

Álvarez (2009), señala que el estrés en los animales ejerce influencia en 3 áreas principales de acción, y en ellas establece las siguientes respuestas:

- Área psíquica: produciendo sufrimiento y malestar lo que determina una desviación del comportamiento normal del bovino.
- Área fisiológica: la acción sobre esta área se convierte en alteraciones de indicadores como la temperatura corporal, la respiración, el pulso, la presión arterial, la proporción

de enzimas y hormonas en sangre y el dolor, por lo que afecta diferentes sistemas anatomofuncionales del organismo.

- Área física: la acción sobre esta área se manifiesta al ocasionar pérdidas reproductivas y productivas en los animales.

## 2.2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

Arranca del núcleo paraventricular del hipotálamo el cual secreta CRF (Factor Liberador de Corticotropina), el cual, a su vez por vía sanguínea, estimula a la hipófisis anterior para la secreción de ACTH, la cual termina por estimular a la corteza suprarrenal para la producción y secreción de glucocorticoides. Se tienen entonces dos ejes que actuando en forma secuencial y reforzándose mutuamente, definen las vías fisiológicas mediante las cuales el organismo se activa en función de consumir energía y responder activamente a situaciones de estrés. Posteriormente ya sea que la amenaza real desaparezca o así mismo, la percepción de ella, el organismo, a través de mecanismos de retroalimentación negativa entre los diferentes niveles biológicos involucrados en el proceso de activación, restablece nuevamente su homeostasis interna, lo cual también es vital para la supervivencia (Zapata, 2003).

## 2.3. Cortisol

La corteza suprarrenal sintetiza dos clases de esteroides: corticoesteroides y andrógenos. Las acciones biológicas del cortisol son múltiples, comprometen virtualmente a todo el organismo y a varios mecanismos homeostáticos. Las acciones primarias mejor conocidas son metabólicas, pero las acciones fisiológicas también incluyen la función renal y regulación del transporte de iones, sistemas cardiovascular y mantenimiento del tono y permeabilidad vascular, función inmune y acciones en el sistema nervioso central (Beck & McGarry, 1962).

La corteza es capaz de percibir los ciclos circadianos, los cuales son imprescindibles para la regularización y producción de hormonas relacionadas con el estrés, un ejemplo de esto es el cortisol, sus niveles son más altos durante la mañana y más bajos durante la tarde (Avila, 2014). Así también, el hipotálamo es el centro que integra las sensaciones de la corteza, detecta si son estresores y ejecuta la respuesta necesaria (Gaytan et al., 2021).

Acciones simples en los animales puede ocasionar aumento de la concentración de cortisol como la vaginoscopía, la inseminación artificial y otras interacciones como alojar las vacas en lugares desconocidos o no habituales, cambios como pasar al ordeño mecánico e incluso la aparición de celo (Gross et al., 2015).

El manejo y la sujeción de animales, por otro lado, desencadenan respuestas fisiológicas, como la activación del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal (HPA), que se manifiesta en una mayor liberación de glucocorticoides, como el cortisol. Por lo tanto, el cortisol en sangre se usa a menudo como un biomarcador de estrés confiable para determinar cómo los animales responden a diferentes grados de estrés (Sierra, 2019).

En casos de estrés crónico, niveles elevados de glucocorticoides pueden llegar a ser nocivos para la integridad de los tejidos y órganos ya que inhiben el crecimiento, provocando hiperactividad crónica de las glándulas adrenales la cual causa atrofia del tejido linfóide pudiendo ocasionar un colapso de las defensas inmunitarias (Gardner & Shoback, 2019).

#### **2.4. Señalización de catecolaminas**

La norepinefrina y la epinefrina son dos neurotransmisores de catecolaminas liberados por el sistema Simpático Adrenal Medular (SAM) que ejercen efectos a través de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos, pero principalmente  $\beta$ -adrenérgicos (Wong & Tank, 2007). Esta relación repercute en una amplia variedad de sistemas corporales, incrementando la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la frecuencia respiratoria y reduciendo la actividad del tracto gastrointestinal (Aich et al., 2007). Estos cambios fisiológicos integrados son parte de la respuesta de huida, comúnmente observada luego de los estresores agudos (Chen et al., 2015).

#### **2.5. Comportamiento de la glucosa**

Dentro de la respuesta al estrés los niveles de cortisol activan la glicólisis hepática, la gluconeogénesis e incremento del catabolismo de las proteínas libres (Grandin, 1997). Tadich et al. (2003) mencionaron que la concentración de glucosa es un buen indicador indirecto de estrés. La concentración de glucosa sanguínea en bovinos es de 3,0 a 4,4 mmol/L. Indicándose además que cuando los bovinos son transportados bajo condiciones climáticas de baja temperatura, se puede presentar un incremento de la concentración plasmática de glucosa debido al frío y no a las condiciones de manejo.

#### **2.6. Valoración de los constantes fisiológicas**

Ante situaciones de estrés agudo, el sistema simpático-suprarrenal provoca una respuesta inmediata, liberando catecolaminas como respuesta neuroendocrina. Estas catecolaminas son las encargadas de poner al animal en estado de alerta, preparándolo para luchar o huir, provocando un aumento de la frecuencia cardíaca (FC), vasoconstricción periférica, aumento de la glicemia, dilatación pupilar, hiperventilación (FR) y aumento del volumen sanguíneo (Stockman et al., 2013). Los valores de constantes fisiológicas para bovinos adultos son:

frecuencia cardiaca de 40 a 80 pul/min (Robles et al., 2019) y frecuencia respiratoria de 20 a 25 rpm (Saravia et al., 2004).

## **2.7. Factores que generan estrés en el ganado bovino**

Los estresores se presentan de dos maneras, pueden ser de una forma física como: daño, sobre-exigencia a los animales, por un clima intenso en calor o frío, ruidos que se generan en varios momentos dentro del manejo animal o fuera de ellos (sonidos fuertes del exterior) o psicológicos como: el aislamiento de los animales, eventos inesperados que causan intranquilidad, frustraciones, destete o separación maternal, incidentes traumáticos. La mayoría sino todos estos arquetipos de estresores inducen una respuesta diversa, así, se explica las alteraciones conductuales como fisiológicas dentro del individuo animal (Odeón & Romera, 2017).

Los factores de estrés se pueden dividir en factores de estrés físico y psicológico, las cuales son clasificaciones convenientes para el estrés, pero cabe mencionar que el ganado se encuentra expuesto a varios factores de estrés durante las practicas normales de manejo, esto explicaría la relación entre el estrés y la disminución de la producción o salud animal (Chen et al., 2015).

### **2.7.1. Estrés térmico**

Los bovinos son mamíferos endotérmicos, organismos que a pesar de los cambios en la temperatura ambiental son animales aptos para mantener constante la temperatura corporal. Este proceso homeostático es importante para una serie de reacciones bioquímicas y procesos fisiológicos relacionados con el metabolismo normal, sin embargo, esta capacidad se ve amenazada por fuerzas adversas intrínsecas y extrínsecas: “estresores” (Castaño et al., 2014).

Los factores de estrés térmico incluyen tanto el frío como el calor, este último está relacionado con la reducción tanto de la producción como del peso corporal, siendo la mortalidad el resultado más grave del estrés por calor. Durante la gestación se observó que los terneros nacidos de vacas estresadas tenían una gestación más corta, peso corporal bajo, reducción de absorción de calostro y cambios en la función de los leucocitos (O'Brien et al., 2010).

El estrés por frío no se ha investigado ampliamente, pero se ha informado que ocasiona cambios en el apetito, función metabólica, digestiva y la muerte (Young, 1983).

### 2.7.2. Estrés por transporte

El transporte es uno de los factores estresantes más común que experimenta el ganado, varios estudios establecen al transporte como uno de los factores que aporta mayor susceptibilidad a enfermedades respiratorias. Una de las observaciones más frecuentes del transporte es un aumento de la concentración temporal del cortisol en la sangre, asociado a esto se presenta un aumento de la presentación de neutrófilos a linfocitos (Blecha et al., 1984). La compleja combinación de factores estresantes como el transporte, la manipulación e interacción humanos animales se asocia con una extensa gama de respuestas fisiológicas que comprenden una función inmune alterada, respuestas conductuales y alteración en la fisiología muscular (Earley et al., 2012).

### 2.7.3. Estrés por agotamiento

El estrés en primera referencia, se presentan tres segmentos: alarma, resistencia y agotamiento (Selye, 1936). Al momento que se experimenta este paso de alarma, se le atribuye como estrés agudo o transitorio. Este proceso de estrés agudo ocurre a costa de una situación con un mínimo tiempo de duración, siendo física, emocional o psicológica, la cual también permite una rápida respuesta y adaptación para llegar al equilibrio fisiológico. Si el estrés se torna crónico, reincidente o continuo en lapsos prolongados, sin la posibilidad de adaptarse, las propiedades del estado de alarma se pierden y se genera una resistencia, y, por último, la continua exposición da resultados negativos en agotamiento (Fink, 2009). A parte del agotamiento por exposición al manejo intensivo, se prolonga la incidencia de estrés agudo, llegando a estrés crónico, así se mencionan otros factores como enfermedades crónicas, sobrepoblación, elevadas temperaturas y humedad, orígenes permanentes de miedo y dolor, manejo inapropiado por parte de los ganaderos, sonidos intensos del medio, incomodidad, estructuración inadecuada de los establos, difícil acceso a los alimentos. Estas son las causalidades por las que el estrés agudo es investigado continuamente (Grelet et al., 2022).

### 2.7.4. Estrés nutricional

Grandin (1998) indicó, que, en el ganado bovino, la falta de alimentación y bebida, en tiempos prolongados de restricción, induce a que se dé un riego sanguíneo desviado, es decir, que la irrigación hacia los órganos internos se va hacia tejidos periféricos. Este mecanismo mencionado al disminuir el riego sanguíneo en órganos internos como útero, oviductos y ovarios implican una baja disponibilidad de nutrientes y por esta razón, disminuye la actividad funcional de los órganos mencionados (Córdova et al., 2008). El estrés nutricional afecta de



manera considerable y evidente por lo cual, para corregir este fenómeno, se puede aplicar algunos factores directos y menciona uno de ellos que es el factor más importante asociado a la cantidad y calidad adecuada de alimentos, que tiene efectos directos en la reproducción y los cambios inducidos por el estrés nutricional, así también, en los demás efectos de desequilibrio nutricional consecuentes del mismo (Dobson et al., 2001).

### **2.7.5. Estrés por manejo**

La socialización de las vacas entre empleados y otros animales, tienden a influir en la respuesta del ganado sobre el estrés denominado como estrés por manejo (Grandin, 1998b). Las diferentes formas inadecuadas de manejar al ganado, tiende a producir un estrés por manejo innecesario, estos resultados son responsables de distintas alteraciones biológicas tanto fisiológicas y reproductivas, incluyendo también, la reacción inmunitaria que se desencadena debido al mal manejo y estrés continuo (Cuenca et al., 2007). Por otra parte, las picadas eléctricas, la inmovilización, los caminos inadecuados, los arreos con perros, las implicaciones médicas, administración de medicamentos y antiparasitarios, influyen marcadamente en la exposición al estrés en el bovino (Córdova et al., 2014). Estos apartados se instauran sobre el estrés, por el continuo manejo inadecuado que dan los distintos ganaderos, que van generando mayor producción de cortisol y ocasionando cambios, no solo en el temperamento, sino que en la productividad y reproducción animal afectada (Mitchell et al., 1988).

### **2.7.6. Estrés por aislamiento social y mezcla**

Los bovinos son animales de manada los cuales establecen ordenes sociales con animales dominantes y sumisos dentro de cada grupo, es por esta razón que el aislamiento o introducción a un nuevo grupo social pueden llegar a ser factores estresantes significativos para un animal individual, provocando diversas reacciones físicas y de comportamiento. Como resultado de varios estudios se ha establecido que los estresores pueden no involucrar los ejes HHA y SAM, y pueden ocurrir adaptaciones conductuales en respuesta a este tipo de estresante (Craig, 1986).

## **2.8. Medición de las respuestas al estrés**

Un paso importante para determinar los efectos de los factores estresantes agudos o crónicos es la cuantificación de las respuestas a estos factores estresantes experimentales o naturales. El desarrollo de herramientas que puedan medir cambios fisiológicos o respuestas psicológicas es imprescindible ya que se sabe que los animales responden a varios tipos de estrés de manera continua (Chen et al., 2015).

### 2.8.1. Medición de las respuestas conductuales al estrés

Las respuestas conductuales al estrés han sido ampliamente estudiadas en ratones, no obstante, el número de estudios realizados en bovinos es limitado. Se han realizado estudios acerca del orden de entrada a un sistema de rampas para medir la relación entre el comportamiento relacionado con la ansiedad y la activación del sistema HPA (Andrade et al., 2001; Bristow & Holmes, 2007).

Otros parámetros como la frecuencia de vocalizaciones, distancia de caminos, tiempo que pasan recostados y tiempo de transporte han proporcionado medidas cuantitativas de los factores estresantes psicológicos durante un periodo de tiempo prologado (Earley et al., 2013; Haro et al., 2023). Si bien se han evaluado varios parámetros para evaluar respuestas conductuales se requiere mayor trabajo para integrar o relacionar estas respuestas con los cambios fisiológicos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Respuestas conductuales medidas en ganado vacuno expuesto a estrés

Velocidad de salida en rampas
Tracción de la cuerda
Distancia recorrida
Orden de entrada
Corrales pequeños
Vocalización
Caminata
Rumia

### 2.8.2. Medición de las respuestas fisiológicas al estrés

Con frecuencia la activación del eje HHA se controla mediante la medición de cortisol en plasma o suero, pero la liberación rápida y pulsátil ocasiona que su respuesta sea muy dinámica ya que su producción varía con el tiempo y se requiere entre 10 a 20 minutos para que esta hormona pueda alcanzar sus valores máximos, por esta razón se recomienda que la toma de muestras se realice minutos después que el animal ha sido sometido a un factor estresante (Mormede et al., 2007).

El ganado bovino tiene una concentración basal de cortisol de 0-20 ng/mL que puede incrementar rápidamente según el factor de estrés y la respuesta individual producida por el animal (Sierra, 2019). La concentración de cortisol en ganado bovino también ha sido medida en orina, heces, saliva, pelo y leche. Así como el cortisol, se han estudiado otras respuestas

biológicas en el ganado como, por ejemplo: leucocitos totales y proporción de neutrófilos, frecuencia cardíaca y respiratoria, temperatura corporal y peso (Andrade et al., 2001; Lynch et al., 2010).

## **2.9. Técnicas para determinar cortisol**

Varias son las opciones para medir los niveles de cortisol como, por ejemplo: enzimoimmunoanálisis, electroquimioluminiscencia, radioimmunoanálisis, automatizado y cromatografía líquida (Maidana et al., 2013).

### **2.9.1. Técnica de Elisa**

El ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima también llamado ELISA es un método utilizado para determinar de manera cuantitativa un antígeno en una muestra. Esta técnica usa enzimas como marcadores para identificar la formación de los complejos antígeno-anticuerpo (Guzmán, 2004).

#### **Cortisol AccuBind ELISA-IFU Rev 4**

Este kit se utiliza para la determinación cuantitativa de la concentración de cortisol total en suero o plasma humano mediante un inmunoensayo enzimático en microplaca, colorimétrico.

El kit Monobind Cortisol EIA utiliza un anticuerpo monoclonal anticortisol específico y no requiere la extracción previa de muestras de suero o plasma. La reactividad cruzada con otros esteroides naturales es baja, además se menciona en su principio que es un inmunoensayo enzimático competitivo (tipo 7): es decir que los reactivos esenciales necesarios para el mismo incluyen anticuerpo, conjugado enzima-antígeno y antígeno nativo. Al mezclar el anticuerpo biotinilado, el conjugado enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, se produce una reacción de competencia entre el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno por un número limitado de sitios de unión del anticuerpo (AccuBind® ELISA, 2019). Los reactivos utilizados en este Kit son:

1. Calibradores de cortisol (1ml/vial): seis viales de suero de referencia para Cortisol a concentraciones de 0 (A), 1.0 (B), 4.0 (C), 10.0 (D), 20.0 (E) y 50,0 (F) µg/dl.
2. Reactivo de enzima de cortisol (7,0 ml/vial): conjugado de cortisol (análogo) y peróxidos de rábano picante (HRP).
3. Reactivo Cortisol Biotina (7,0 ml): conjugado de mIgG biotinilado anticortisol.
4. Placa recubierta de estreptavidina: microplaca de 96 pocillos recubierta con 1,0 µg/ml de estreptavidina y envasada en una bolsa de aluminio con un agente secante.
5. Solución de lavado concentrada (20ml/vial): contiene un tensioactivo en solución salina tamponada.

6. Sustrato A (7ml/vial): contiene tetrametilbencidina.
7. Sustrato B (7 ml/vial): contiene peróxido de hidrógeno
8. Solución stop (8ml/vial): contiene un ácido fuerte (HCl 1N)

### **2.10. El estrés en el manejo reproductivo**

Los procesos fisiológicos normales se mantienen gracias a un equilibrio dinámico y complejo, “homeostasis”, el cual es desafiado permanentemente por factores estresores. Estos factores actúan interna o externamente sobre el organismo induciendo un esfuerzo adicional para mantener un estado de equilibrio con su medio interno y también con el ambiente externo (Sepúlveda et al., 2007).

Frente a una situación de estrés la homeostasis se ve alterada, desencadenando una respuesta caracterizada por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, la misma que se encarga de activar en el organismo de los mamíferos una serie de mecanismos fisiológicos y conductuales. Dichos mecanismos resultan inadecuados y presentan efectos negativos sobre las funciones del organismo como por ejemplo la reproducción (Odeón & Romera, 2017).

Cabe destacar que la ovulación ha sido descrita antes como un proceso inflamatorio que se presenta de forma localizada, lo cual implica la degradación proteolítica de la pared folicular para permitir la salida del ovocito (Fetiva, 2017).

En respuesta a diversos factores estresores, como por ejemplo el estrés calórico, el transporte, el manejo reproductivo y el tratamiento exógeno con hormonas, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) puede ser inhibido en todos sus niveles por los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (Sierra, 2019).

La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) estimula la liberación de cortisol y progesterona. La progesterona actúa inhibiendo la liberación de la GnRH en el hipotálamo, mientras que el cortisol actúa inhibiendo la liberación de GnRH, alterando la respuesta de los gonadotropos (hipófisis) a la acción de la GnRH. Además, el cortisol ejerce un efecto inhibitorio directo en el ovario sobre la secreción de estradiol y sobre el contenido de receptores de la LH (Vélez & Velásquez, 2010).

Consecuentemente falla el mecanismo de retroalimentación positiva de estrógenos, suprimiendo el pico preovulatorio de la LH, bloqueando la ovulación, con la consiguiente persistencia del folículo dominante y el desarrollo de quistes foliculares (López et al., 2022).

### 2.11. Superovulación

La superovulación de la hembra donante, es indispensable para para todos los procedimientos involucrados en la transferencia de embriones (ET) (Hasler, 2014; Mogollon & Burla, 2013). Esta permite la estimulación ovárica mediante la aplicación exógena de un protocolo hormonal para la sincronización del estro y la ovulación con el fin de desarrollar y madurar varios folículos simultáneamente, posibilitando la producción y recolección de un gran número de embriones (Kolling et al., 2021).

El tratamiento se considera efectivo cuando se logran más de dos ovulaciones, llegando a obtener entre 10 a 20 servicios anuales sin que exista gestación de la hembra donante (Motta et al., 2011), aproximadamente el 85% de las donadoras fértiles responden positivamente al protocolo SOV obteniendo 5 embriones transferibles por hembra en promedio (Garzón et al., 2007).

### 2.12. Hormona folículo estimulante (FSH)

La hormona folículoestimulante juega un papel muy importante en los procesos reproductivos de varios vertebrados debido a que impulsa el crecimiento y desarrollo de varios folículos secundarios hasta el estadio de dominancia (Madrid et al., 2016), esta hormona es sintetizada en la adenohipófisis y actúa en las células de la granulosa del ovario estimulando la foliculogénesis y la esteroidogénesis (Bautista et al., 2019).

Comúnmente se utiliza la pFSH (extracto de pituitaria porcina) en los protocolos SOV (Ponce, 2015), pero, debido a que posee una vida media corta (5 horas o menos) se requiere varias aplicaciones vía intramuscular para conseguir el efecto deseado (Tubert et al., 2013), es decir, para que se desarrollen varios folículos y pueda ocurrir la superovulación que permita colectar una mayor cantidad de embriones, se necesitan entre 6 a 8 aplicaciones de FSH con intervalos de 12 horas durante 3 o 4 días (Fonseca et al., 2001). Para obtener los mejores resultados posibles, las hormonas deben ser aplicadas en tiempos y cantidades previamente establecidas según el protocolo y animales a utilizar (Vilcatoma, 2018).

### 2.13. Frecuencia de la aplicación de FSH

En los protocolos convencionales se utiliza una dosis total de FSH, la cual será administrada de manera decreciente manteniendo la regla am/pm durante tres a cuatro días dependiendo del animal (Yamamoto et al., 1994), la raza, y la variabilidad del animal (Jiménez, 2009). El ganado *Bos Taurus* es mucho menos sensible a la dosis total de FSH en comparación al ganado *Bos Indicus* (Becaluba, 2007). En condiciones de difícil acceso y manejo de los animales, la administración de una sola dosis de FSH al día durante 3 a 4 días puede ser considerada debido a que varios estudios demostraron que se obtienen resultados similares en comparación a la aplicación 2 veces por día (Jiménez, 2009).

En cuanto a la vía subcutánea, la administración de una sola dosis de FSH provoca la obtención de resultados deseables en el protocolo SOV (Hasler et al., 1983). La única administración de FSH vía epidural induce un desarrollo folicular semejante al protocolo convencional de 2 dosis diarias vía IM (Sakaguchi et al., 2018).

#### **2.14. Protocolos alternativos de superovulación**

La elevada variabilidad existente en la respuesta superovulatoria continua siendo un inconveniente en la actualidad, en la producción de embriones en vacas lecheras (Kelly et al., 1997); dentro de los protocolos de superovulación la FSH purificada extraída de pituitaria porcina u ovina son las más comúnmente utilizadas, se usa a razón de que la FSH superó a la eCG a finales de la década de 1970. Al momento de hablar de la FSH purificada se toma en cuenta la vida media que es aproximadamente de 5 horas, razón por la cual se ve obligado a administrarse por lo menos en dos aplicaciones durante el día, en la mañana la primera y en la tarde la segunda, por vía intramuscular con dosis decrecientes logrando así, una elevada tasa en la ovulación (Tasdemir et al., 2012).

El manejo del ganado en exceso por las repetidas frecuencias de aplicación en el tratamiento, reducen la respuesta superovulatoria y generan estrés en el animal, adicionando a esto, los tiempos que se tardan por parte de los médicos veterinarios (Sakaguchi et al., 2018), o se presentan fallas por el manejo o la administración errónea en la granja (Bó et al., 2018).

Es esta la razón por la que las investigaciones nos han llevado a formar otros tipos de programas para la superovulación, a través de distintos protocolos que incluyen una sola aplicación de FSH o distintas rutas de infiltración (Kulus et al., 2019). Se han venido explorando los beneficios de liberación de la hormona en varios enfoques de aplicación y por los cambios en el sitio de inyección, la dosis o el diluyente liofilizado como coadyuvante de la FSH (Mikkola et al., 2019), hace tiempo atrás varios autores dieron información sobre la administración única de extracto pituitario crudo diluido en un vehículo de gelatina-solución salina, el mismo que impulsó una respuesta superovulatoria semejante a la de un tratamiento convencional IM; entre tanto, fue deficiente en número de embriones transferibles con el protocolo mencionado (Bó et al., 2018).

Al momento existen ciertas alternativas para la aplicación hormonal en bovinos, una de las cuales es la aplicación por vía epidural de la FSH, esta intervención se le realiza con la disolución de 20 UA de FSH en solución salina, en una sola dosis, esta aplicación se le realiza en los espacios intervertebrales de la última sección de la columna vertebral (Kulus et al., 2019), con esta alternativa de aplicación, se reducen los números de aplicación hormonal, en tanto también, la cantidad de hormona a usarse, varios estudios corroboran la alta efectividad

en la superovulación, así pudiendo ser comparable con la administración intramuscular de una serie de inyecciones de FSH (dosis total de 20 UA en 8 dosis decrecientes por 4 días), lo cual implica llevar repetidas veces a los animales a las mangas en donde se procede con las aplicaciones (Sakaguchi et al., 2018).

## **2.15. Vías de administración**

### **2.15.1. Vía intramuscular**

En el tratamiento de SOV la principal vía de administración de la FSH es la IM, aunque también se obtuvieron resultados deseables con la vía SC (Mapletoft et al., 2002), adicionalmente se ha utilizado la vía intra-arterial con infusiones continuas del fármaco (Cabodevila & Torquati, 2008). Varios han sido los estudios sobre vías de administración de FSH, sin embargo, la inyección IM en dosis decrecientes durante 3 o 4 días genera mejores resultados, excepto cuando el compuesto es aplicado en la parte posterior de la escapula en una sola dosis vía SC, debido a que se generan resultados similares (Castro & Rodríguez, 2014).

Actualmente se estudia la zona epidural como vía de administración de FSH debido a que provoca resultados similares al protocolo convencional (Sakaguchi et al., 2018), se aconseja utilizar esta vía con una única dosis total para reducir el estrés ocasionado en los animales provocado por las varias punciones que tienen que soportar en el protocolo convencional (Cabodevila & Torquati, 2008).

### **2.15.2. Vía epidural**

Al inyectar un medicamento en el espacio epidural se pretende que este tenga un efecto más prolongado e intenso que cuando se administra por las vías comunes sistémicas (Castiñeiras, 2007).

La adecuada absorción y distribución de un medicamento aplicada por esta vía se encuentra directamente relacionada con el porcentaje de grasa del conducto epidural (Apaza, 2017; Mugabure et al., 2005). Las características anatómicas que se disponen en el plexo venoso permiten que la sangre fluya en diferentes direcciones, de esta manera, se permite una rápida absorción vascular, debido a la gran superficie vascular que proporciona el espacio epidural (Lee et al., 2001; Rioja et al., 2013).

Según Sifaka (2012) las drogas aplicadas por esta vía pueden tener diferentes destinos: salir de los orificios intervertebrales para llegar al espacio muscular paraespinal; pueden

difundirse en grasa epidural, ligamentos y finalmente a través de las meninges espinales (Araujo & Cordero, 2021).

Sakaguchi (2022) mencionan que posterior a la aplicación de la FSH las concentraciones plasmáticas incrementarán en un lapso de tres horas, llegando a un pico de concentración máximo de cinco horas en promedio. Luego la FSH al poseer receptores polipeptídicos de tipo G se enlazan a los receptores de las células de la granulosa ovárica, activa la adenilatociclasa y la proteína-quinasa dependiente de AMPc (Mannaerts et al., 1993; Narváez & Tamay, 2013), además provoca la activación de la fosfolipasa C (Jacobson, 2021).

La farmacocinética de drogas intratecales es poco conocida debido a la dificultad de tomar muestras repetidas de la concentración de drogas en todos los compartimentos (LCR, médula espinal, plasma, espacio epidural, grasa epidural) (Siafaka, 2012).



## Materiales y Métodos

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Materiales biológicos

- Vacas de raza Holstein mestizas
- Muestras de sangre

#### 3.1.2. Materiales químicos

- Kit de Elisa Cortisol (Cortisol Test System. Monobind Inc. Lake Forest. USA)
- Test de Glucosa en Sangre (Accu-Check Guide, Roche, Ecuador)
- Fonendoscopio (Fonendoscopio Littman Profesional, Ecuador)
- Yodo povidona
- Alcohol 70%

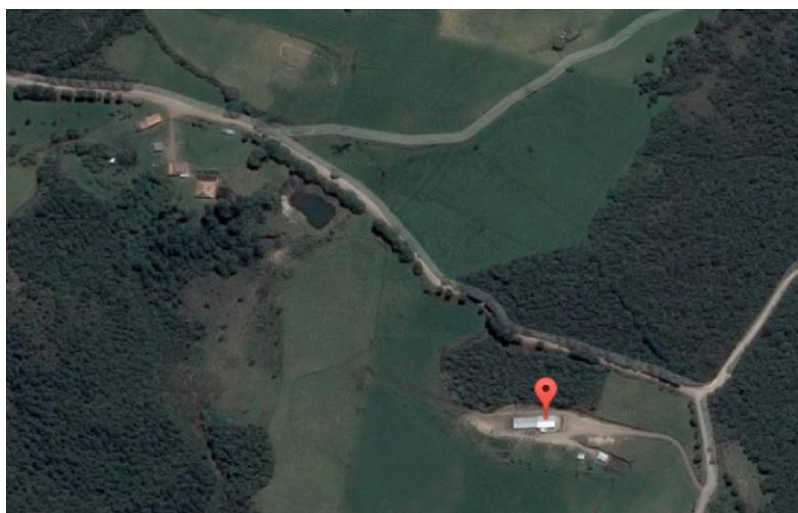
#### 3.1.3. Materiales físicos

- Jeringas
- Plantillas de campo
- Sistema Vacutainer
- Glucómetro (Accu-Chek Guide, Roche, Ecuador)
- Centrifuga (Hettich, Micro 200, Alemania)
- Tubos vacutainer tapa roja sin anticoagulante
- Microtubos Eppendorf™
- Algodón
- Paños
- Cooler
- Papel secante
- Guantes
- Mandil
- Mascarilla
- Cuaderno
- Esfero
- Cámara
- Computador
- Overol desechable
- Botas

### 3.2. Metodología

#### 3.2.1. Ubicación geográfica y área de estudio

El estudio se realizó en la granja de Nero de la Universidad de Cuenca, ubicada en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, Parroquia Baños, sector Nero ( $2^{\circ}57'32.4''S$   $79^{\circ}06'13.2''W$ ), con una altitud de 3.100 m.s.n.m. con una temperatura promedio de 7 - 8 °C y una precipitación pluvial que varía de 500-1.000 milímetros (mm) anuales (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa Satelital, ubicación geográfica Granja Experimental "Nero" de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca

**Fuente:** Directorio Cartográfico de Google Maps, 2022.

#### 3.2.2. Animales y granja

Se seleccionaron 8 vacas multíparas de genotipo Holstein mestizo de la granja experimental de Nero, de la Universidad de Cuenca. Las vacas fueron divididas al azar en dos tratamientos (T): T1=epidural (n=4) y T2=convencional (n=4). Los animales presentaron pesos similares (Tabla 2) de  $541,5 \pm 43,84$  y  $542,5 \pm 55,93$  kilogramos (kg), respectivamente, CC de  $2,7 \pm 0,08$  (T1) y  $2,8 \pm 0,06$  (T2) en escala de 1-5, de acuerdo a lo determinado por Hoedemaker et al. (2009). Edad media de  $6,6 \pm 0,81$  (T1) y  $6,5 \pm 0,64$  años (T2), y una producción láctea promedio  $19,3 \pm 0,66$  (T1) y  $19,2 \pm 0,64$  (T2) kg.

Se realizó un diagnóstico ecográfico del aparato reproductivo de los animales previo al experimento. Las vacas seleccionadas fueron determinadas cíclicas, con una morfología cervical adecuada que permitía el paso del catéter de recolección (determinado al pasar la sonda de lavado en cada donante, a través de su cérvix), y la ausencia de patologías en el tracto reproductivo (Naranjo et al., 2019). Durante la realización del estudio se tuvo presente

la normativa del código sanitario para animales terrestres, capítulo 7,8 “Utilización de animales en la investigación y educación”, de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2010).

**Tabla 2.** Datos generales de las unidades experimentales de los dos tratamientos

	N	Convencional		Epidural		P
		X	DE	X	DE	
Peso	4	542,5	94,21	541,5	111,87	ns
Condición Corporal	4	2,8	0,2	2,7	0,24	ns
Recuento Folículos Antrales	4	17,3	6,84	16	4,24	ns

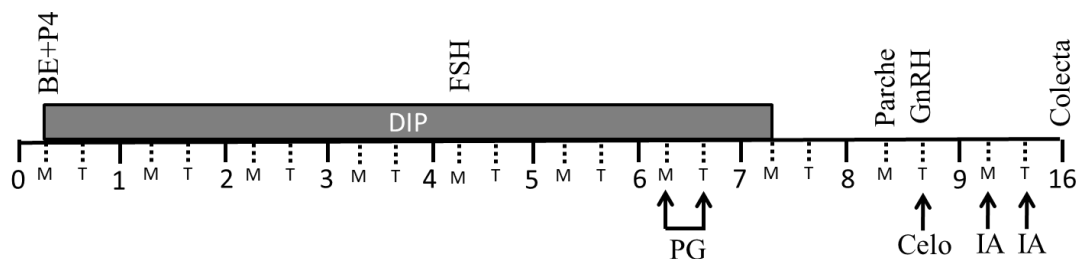
**X**=media. **DE**=desviación estándar. **P**=significancia estadística entre grupos. Prueba T de Student

### 3.2.3. Diseño experimental

La investigación fue de tipo experimental, valoró la concentración plasmática media de cortisol en los días 4; 5; 6 y 7 de dos protocolos de SOV: T1 recibió una sola dosis de FSH vía epidural (EP) y en T2 se administró 8 dosis de FSH vía intramuscular (IM); además, se determinó los niveles de glucosa y constantes fisiológicas el día 4 de los protocolos de SOV.

### 3.2.4. Protocolo epidural (T1)

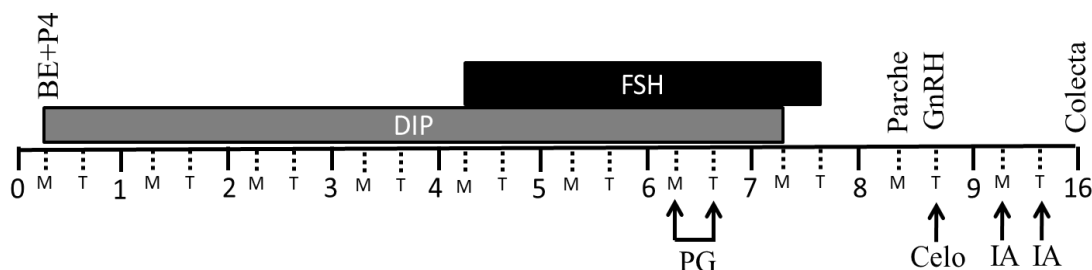
Las donadoras del protocolo epidural recibieron el día 0 a las 06h00 un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR®; 1,38 g de progesterona; Zoetis, Quito, Ecuador) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®; Zoetis, Quito, Ecuador), por vía IM, y 50 mg de progesterona inyectable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



**Figura 2.** Protocolo de superovulación epidural (T1). BE=Benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. DIP=Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona. FSH=Hormona folículo-estimulante (200 mg). PG=Prostaglandina. Parche=Parche detector de celo. GnRH=Gonadotropina. IA= inseminación artificial. Colecta=colecta de embriones

**3.2.5. Protocolo convencional de SOV (T2)**

Los 4 animales de T2 recibieron 300 mg de FSH repartidas en 8 dosis decrecientes en los días 4; 5; 6 y 7 del protocolo de SOV. El día 0 (06h00) se colocó un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR®; 1,38 g de progesterona; Zoetis, Quito, Ecuador) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®; Zoetis, Quito, Ecuador), por vía IM y 50 mg de progesterona inyectable (Progesterona®; ERMA, Quito, Ecuador). A partir del día 4 en la mañana (06h00) y en la tarde (18h00), las donadoras recibieron dosis decrecientes de FSH (Folltropin-V®, Vetoquinol, Québec, Canada) por cuatro días (60; 60; 40; 40; 30; 30; 20; 20; mg), tal como se indica en FIG. 1. El día 6 en la mañana y la tarde se aplicaron 25 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, Lima, Perú), y el día 7 por la mañana se retiró el implante. El día 8 se detectó el celo por observación directa con ayuda de un parche indicador de estro (EstroTECT™, EUA), en la tarde se administró una dosis de 0,25 mg de gonadorelina (GnRH®, MSD, Nueva York, EUA). En la mañana del día 9 se realizó la primera inseminación artificial (IA) y 12 h después se efectuó la segunda IA (Figura 3).



**Figura 3.** Protocolo de superovulación convencional (T2). BE=Benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. DIP=Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona.

FSH=Hormona folículo-estimulante. PG=Prostaglandina. Parche=Parche detector de celo. GnRH=Hormona liberadora de gonadotropina. IA= inseminación artificial. Colecta=colecta de embriones

### 3.2.6. Valoración de la concentración de Cortisol plasmático

Al inicio del protocolo se colocó un catéter intravenoso para animales grandes en la vena yugular de las vacas de T1 y T2, que facilitó la toma de las muestras de sangre (5 mL) en tubos Vacutainer con ácido etilendiaminatetraacético (EDTA, Vacutainer®). El muestreo se inició a las 06h00 del día 4 considerándose ésta como la hora 0, luego se tomaron muestras en las horas descritas en la Tabla 3. Estas fueron colocadas en un cooler (Chiller, 16 QT, Coleman®, EUA) con hielo (5°C) y transportadas al laboratorio para ser centrifugadas (Hettich, Micro 200, Alemania) a 3.000 gravedades (G) x 10 minutos (min). El sobrenadante fue colectado y congelado a -20°C hasta su análisis (Congelador SMC, CG11HB, China).

**Tabla 3.** Protocolo de toma de muestras de sangre

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

Hora=hora del día correspondiente en la cual se tomó la muestra. Muestra=hora considerada dentro del protocolo para la toma de la muestra.

La determinación de la concentración de cortisol se realizó por inmunoensayo enzimático colorimétrico (Accubind Elisa Microwells. Código: 3625-300. Monobind). La dosis mínima detectable de cortisol según el fabricante es 0,4 µg/dL – 95 µg/dL. Con una sensibilidad del 95%. El procedimiento de prueba fue realizado por personas capacitadas, siguiendo las instrucciones del fabricante para un uso adecuado:

1. Se formateó los pocillos de las microplacas para cada suero de referencia, control y muestra del paciente que se va a analizar.

2. Se procedió a pipetear 0,025 ml del suero de referencia, control o muestra apropiado en el pocillo asignado.
3. Añadimos 0,050 ml del reactivo enzimático de cortisol listo para usar a todos los pocillos.
4. Se agitó suavemente la microplaca durante 20-30 segundos para mezclar.
5. Luego se añadió 0,050 ml de reactivo de biotina cortisol a todos los pocillos
6. Después se agitó suavemente la microplaca durante 20-30 segundos para mezclar
7. Cubrimos e incubamos durante 60 minutos a temperatura ambiente
8. Se desechó el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si se decanta, se debe secar la placa con papel absorbente
9. Se agregó 0,350 ml de tampón de lavado, luego se decantó. Repetimos dos veces adicionales para un total de tres lavados.
10. Agregamos 0,100 ml de solución de sustrato de trabajo a todos los pocillos. Se debe añadir siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias de tiempo de reacción entre pocillos.
11. Incubamos a temperatura ambiente durante 15 minutos.
12. Se agregó 0,050 ml de solución stop a cada pocillo y se mezcló suavemente durante 15 a 20 segundos.
13. Para finalizar leímos la absorbancia en cada pozo a 450nm en un lector de microplacas. Los resultados se leyeron dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución stop.

### **3.2.7. Valoración de constantes fisiológicas**

Las constantes fisiológicas: frecuencia cardiaca (FC) fueron monitoreadas mediante auscultación en el tercer espacio intercostal, con la ayuda de un fonendoscopio (Fonendoscopio Littman Profesional, Ecuador) durante un minuto. La frecuencia respiratoria (FR) fue evaluada mediante de la observación de movimientos respiratorios, acompañado de la auscultación traqueal visual.

La valoración de la FC y FR fue realizada 5 minutos antes de la administración de la FSH y 5 minutos después, luego se valoró una sola vez a las: 8, 10, 12, finalmente a las 18 horas (en esta última valoración se procedió como en la primera, es decir, se monitoreo 5 minutos antes y 5 minutos luego de la aplicación de la dosis de la FSH de la tarde (Tabla 4).

**Tabla 4.** Momentos de valoración de la frecuencia cardiaca (FC), frecuencia respiratoria (FR) en el día 4 del protocolo de SOV.

Hora 0				08h00		10h00		12h00		18h00			
Antes		Después								Antes		Después	
FC	FR	FC	FR	FC	FR	FC	FR	FC	FR	FC	FR	FC	FR

FC=frecuencia cardiaca. FR=frecuencia respiratoria. Antes= 5 minutos antes de aplicación de FSH. Después= 5 minutos después de la aplicación de la FSH

### 3.2.8. Valoración de glucosa en sangre

Los niveles de glucosa en sangre fueron evaluados con el uso de glucómetro (Accu-Chek Guide, Roche, Ecuador), con una dosis mínima detectable de 0,1mg/dL, y una sensibilidad de 95%, el test de glucosa. La valoración se realizó en dos ocasiones, antes (5 min) y después (5 min) de aplicar la FSH, y luego de 2 h (08h00), 4h (10h00), y 6 h (12h00), únicamente en el día 4 del protocolo (Tabla 5).

**Tabla 5.** Valoración de glucosa en sangre

Hora 0		08h00	10h00	12h00
Antes	Después			
Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa	Glucosa

### 3.2.9. Análisis estadístico

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

## Resultados y Discusión

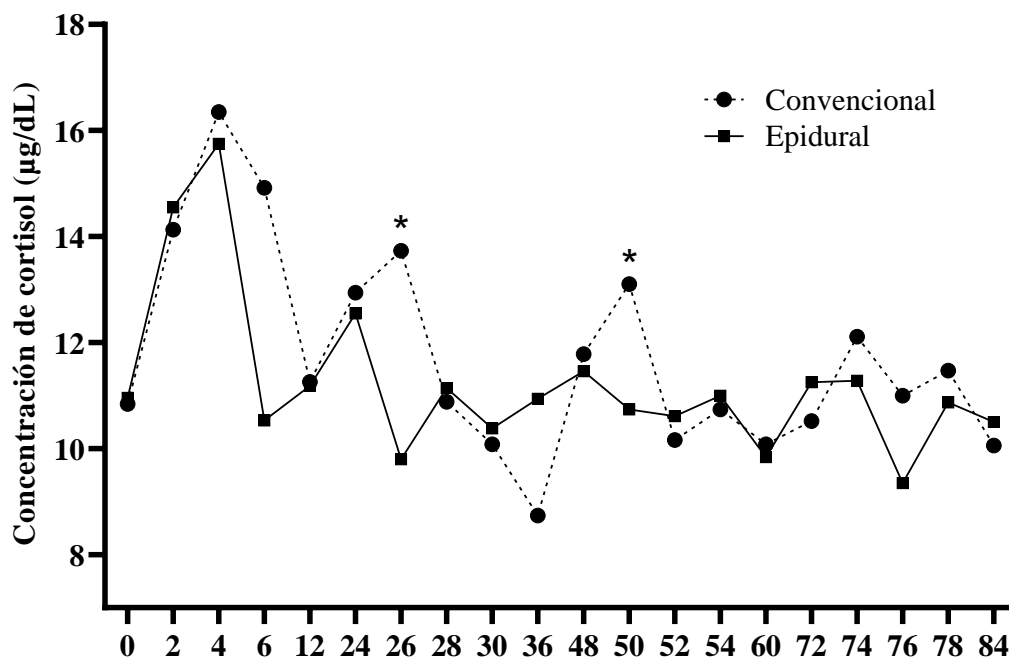
### 4.1. Concentración de cortisol en plasma

Antes de la administración de FSH el día 4 a las 06h00 am (0h; Tabla 3) se tomó la primera muestra de sangre y se determinó que la concentración del cortisol fue similar en los dos tratamientos: T1 ( $10,9 \pm 0,24 \mu\text{g/dL}$ ) y T2 ( $10,8 \pm 0,33 \mu\text{g/dL}$ ), valores que se encuentran dentro del rango determinado como basales en la especie bovina ( $0-20 \text{ ng/mL} = 2\mu\text{g/dL}$ ; Sierra, 2019). Considerando que la toma de la muestra de sangre fue del catéter que se colocó tiempo atrás en los animales.

Sin embargo, 2h después (segunda valoración; 2h), la concentración de cortisol se vio incrementada en T1 ( $14,6 \pm 2,53 \mu\text{g/dL}$ ) y T2 ( $14,1 \pm 1,56 \mu\text{g/dL}$ ) sin diferencia entre estos ( $p > 0,05$ ). El cortisol llegó a su pico más alto 4h luego de la administración de la FSH (4h) en los dos Tratamientos: T1 ( $15,8 \pm 1,39 \mu\text{g/dL}$ ) y T2 ( $16,4 \pm 0,28 \mu\text{g/dL}$ ). Se ha descrito que animales que fueron llevados a la manga para venopunción, con la finalidad de obtener muestras de sangre y determinar concentración de cortisol cada 15 minutos, mostraron incremento sostenido hasta los 30 minutos llegando hasta los  $10 \text{ ng/mL}$ , luego la concentración en la valoración de los 45 y 60 minutos no aumentaron y se mantuvieron estables (Hopster et al., 1999). El patrón de comportamiento de la concentración de cortisol de los animales del presente estudio luego de la primera dosis de FSH el día 4 del protocolo a las 06h00 am, fue similar a la reportada por Hopster et al. (1999), considerando que los dos tratamientos recibieron FSH: T1 (vía epidural) y T2 (vía IM), factores que generaron un proceso de estrés agudo.

En la cuarta valoración (6h), las concentraciones en los dos tratamientos disminuyeron: T1 ( $12,4 \pm 0,54 \mu\text{g/dL}$ ) y T2 ( $12,9 \pm 0,81 \mu\text{g/dL}$ ). En la última valoración del día 4 (12h), tomada antes de la administración de la segunda dosis de FSH (18h00), las concentraciones de cortisol se estabilizaron respecto a la cuarta valoración en los dos Tratamientos: T1 ( $12,6 \pm 1,37 \mu\text{g/dL}$ ) y T2 ( $13,1 \pm 1,49 \mu\text{g/dL}$ ). Sin embargo, los valores de la cuarta y quinta valoración son menores a las de la tercera, posiblemente a consecuencia de que el cortisol es una hormona que tiene un ciclo de producción circadiana (Figura 4), presentando valores más altos en la mañana que en la tarde (Thun et al., 1981).





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

En otros trabajos se ha descrito que factores estresores como el transporte y el ayuno aumentaron la concentración de cortisol a las 3 horas después de generar un proceso de estrés, llegando a valores de 3,8 µg/dL para luego descender a 2,8 µg/dL (Tadich et al., 2003). Este patrón de comportamiento resulta similar al observado en este estudio en el cual el incremento de los valores de Cortisol llegó a su máxima expresión a las 4 horas para luego bajar sostenidamente.

En la primera valoración del día 5 del protocolo (24h) las concentraciones de cortisol fueron similares en los dos tratamientos: T1 ( $11,1 \pm 1,32$  µg/dL) y T2 ( $11,2 \pm 0,58$  µg/dL). Luego de esta valoración solo los animales de T2 (convencional) recibieron la dosis correspondiente de FSH vía intramuscular, lo cual se reflejó en la concentración de cortisol en la segunda valoración del día 5 (26h): T1 ( $9,8 \pm 0,46$  µg/dL) y T2 ( $13,7 \pm 0,65$  µg/dL), observando valores más altos en los animales que recibieron el factor estresante de la aplicación IM de la FHS, con diferencia estadística entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; Figura 3). Esta elevación de la concentración de cortisol es concordante con el criterio emitido por Uribe et al. (1998), quienes indican que los animales sometidos a estímulos nocivos alteran su proceso de homeostasis.

Sin embargo, en la tercera (28h; T1=11,1 ± 0,52 µg/dL; T2=10,9 ± 0,53 µg/dL), cuarta (30h; T1=10,4 ± 0,42 µg/dL; T2=10,1 ± 0,34 µg/dL) y quinta (36h; T1=10,9 ± 0,56 µg/dL; T2=8,7 ± 0,44 µg/dL) valoración del día 5 del protocolo las concentraciones de cortisol fueron similares en los dos tratamientos ( $p>0,05$ ).

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

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

Los resultados del día 7 muestran que la administración de FSH vía IM, ya no constituía un factor estresante para los animales de T2, lo cual provoco que las concentraciones de cortisol fueran similares en los dos tratamientos, esto debido que los animales al ser sometidos constantemente a estímulos nocivos, sufren un proceso de adaptación para llegar a la homeostasis (Uribe et al., 1998).

En otras especies como la caprina se llegó a observar que la concentración de cortisol se incrementaba por factores exógenos estresores como la temperatura, el transporte, presentando concentraciones en rangos de 12µg/dl a 14µg/dl que identifican el estrés agudo en el animal.

Los resultados en cuanto a la respuesta al protocolo de superovulación mostraron que la administración de FSH vía epidural fue tan efectiva como la convencional en la cual los animales recibieron 8 dosis de FSH vía intramuscular durante 4 días consecutivos (datos no mostrados). Sin embargo, los animales de T2 presentaron un porcentaje bajo de ovulación.

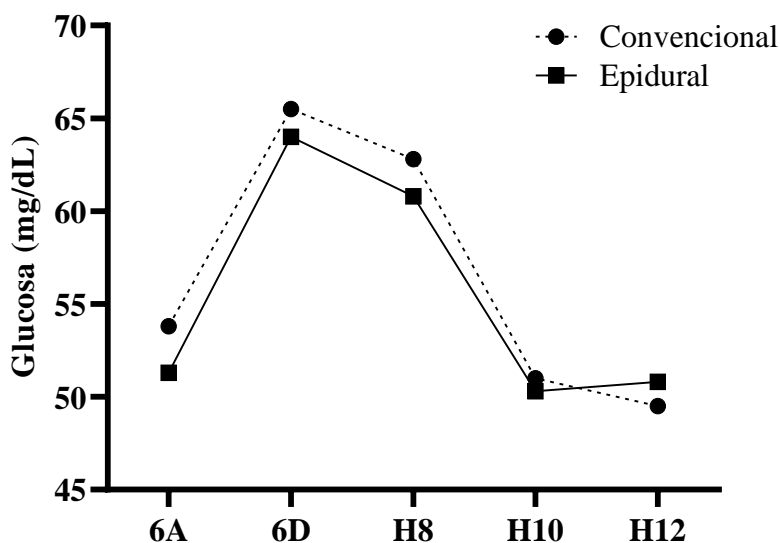
Existe evidencia científica que describe que las altas concentraciones de cortisol provocan efectos negativos en la fase folicular, ya que los glucocorticoides inhiben el desarrollo folicular y la presentación del pico preovulatorio de LH, prolongando la duración del estro y provocando que existan fallos en la ovulación (Macfarlane et al., 2000). Pronunciamento que explicaría el fallo observado en la ovulación de la mayoría de la mayoría de animales de T2.

#### **4.2. Concentración de niveles de glucosa en sangre**

En el presente estudio los niveles de glucosa en sangre determinados 5 minutos antes de la administración de la dosis de FSH el día 4 del protocolo mostró valores basales similares en los dos tratamientos: T1 ( $51,3 \pm 2,14$  mg/dL) y T2 ( $53,8 \pm 0,63$  mg/dL).

En la segunda valoración realizada 5 minutos después de la aplicación de la FSH se observó un aumento de la glucosa llegando a valores en T1 ( $64,0 \pm 0,71$  mg/dL) y T2 ( $65,5 \pm 0,96$  mg/dL). Este incremento responde al proceso estresante generado a los animales al realizar el manejo para la sujeción y aplicación de la hormona, tanto por vía IM como por vía epidural, factor que produce incremento de los niveles de glucosa en sangre; ya que cuando se presenta un factor estresante se activan los receptores  $\beta$  adrenérgicos, los cuales estimulan la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa e inhiben la glucógeno sintetasa para aumentar la conversión de glucógeno en glucosa 6 fosfato y de esta manera aumentar la disponibilidad del combustible metabólico (glucosa y ácidos grasos), necesario para enfrentar el factor estresante (Hellen et al., 2011).

Dos horas posteriores al proceso estresante (administración de la FSH) en la valoración de las 08h00 (tercera), los niveles de glucosa disminuyeron a valores en T1 ( $60,8 \pm 0,85$  mg/dL) y T2 ( $62,8 \pm 0,48$  mg/dL), la caída de los niveles de glucosa se mantuvo en la valoración de las 10h00 ( $50,3 \pm 1,55$  mg/dL) T2 ( $51,0 \pm 3,49$  mg/dL) y las 12h00 en T1 ( $50,8 \pm 2,46$  mg/dL) y T2 ( $49,5 \pm 2,22$  mg/dL) del día 4 del protocolo.



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

### 4.3. Valoración de constantes fisiológicas

#### 4.3.1. Frecuencia cardiaca

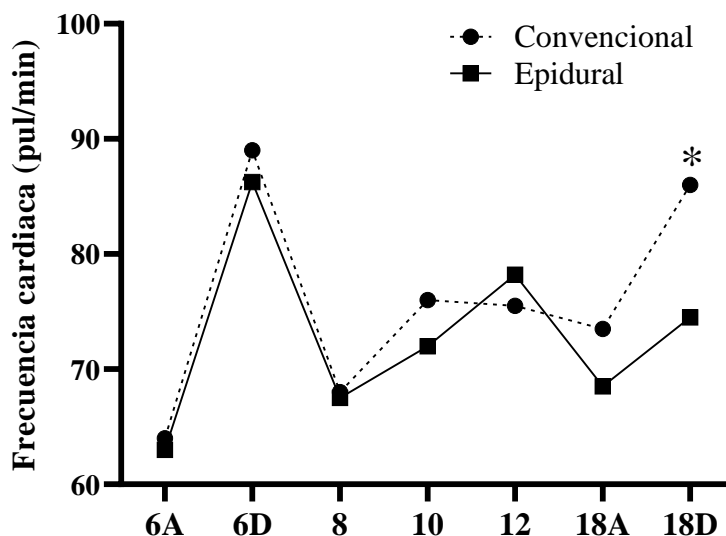
El día 4 del estudio se valoró la frecuencia cardiaca de los animales sometidos a los dos tratamientos de superovulación 5 minutos antes de la aplicación de la FSH, encontrándose un valor en T1 de  $65,3 \pm 1,65$  y en T2 de  $66,3 \pm 1,43$  pul/min (Figura 6), los cuales se encuentran dentro del rango fisiológico del bovino, mismo que según Robles et al. (2019) es de 40 a 80 pul/min para animales adultos que se encuentran en condiciones normales y manejo sin presencia de estresores. Luego de 5 minutos post aplicación de la FSH se observaron valores de frecuencia cardiaca en T1 ( $74,3 \pm 1,54$  pul/min) y T2 ( $84,2 \pm 1,73$  pul/min), mismos que fueron superiores a los establecidos por Londoño et al. (2012) quienes mencionaron en su estudio que el rango normal se encuentra entre 57 a 71 pul/min para animales adultos; además, un animal en reposo luego de haber sufrido algún estímulo de estrés agudo es más susceptible a sufrir una variabilidad de frecuencia cardiaca, debido a que sufre una serie de procesos fisiológicos coordinados que se encargan de mantener la homeostasis estable del organismo (Cannon, 1929), la aparición del estresor produce una reacción de alarma la cual involucra al sistema nervioso especialmente al sistema nervioso simpático (SNS) encargado de inervar el corazón, vasos sanguíneos y medula espinal, por lo

tanto el sistema simpático aumenta la frecuencia cardiaca y genera mayores contracciones del músculo cardiaco (Torres et al., 2020).

La siguiente valoración se realizó a la hora 08:00 en el día 4 del protocolo, es decir luego de dos horas de haber inducido el factor estresante, se pudo observar que la frecuencia cardiaca disminuyó a  $68,2 \pm 1,67$  (T1) y  $67,9 \pm 2,05$  pul/min para T2, posteriormente se valoró a la hora 10:00 (T1= $72,8 \pm 1,36$  y T2= $71,7 \pm 0,89$ ). En la valoración de las 12:00 la FC se mantuvo con valores para T1 de  $73,1 \pm 1,23$  y T2 ( $72,1 \pm 2,05$ ). Los resultados obtenidos en la investigación corroboran lo descrito por Chen et al. (2015) quienes en su estudio menciona que, si se resuelve el factor estresante, se restaura la homeostasis del organismo lo cual lleva a pensar que en este lapso de tiempo se resolvieron todos los procesos psicológicos y fisiológicos que fueron desencadenados en el organismo del animal a causa del estrés agudo.

En la valoración de la tarde 5 minutos antes de la segunda dosis de FSH para los animales de T2 (FSH vía IM), la FC en los dos tratamientos fueron similares ( $p > 0,05$ ), T1 ( $72,3 \pm 0,69$  y T2 ( $72,5 \pm 0,84$ ). La FC previo a la administración de la segunda dosis de FSH se encontraron dentro de los valores fisiológicos para bovinos adultos (40 a 80 pul/min) según Robles et al. (2019),

En la última valoración del día 4 realizado 5 minutos después de la aplicación de la segunda dosis de FSH, se observaron valores de  $72,3 \pm 1,22$  (T1) y  $92,7 \pm 2,15$  pul/min para T2. Estos resultados nos permiten aseverar que el llevar a los animales a la manga de sujeción para administrar la segunda dosis de FSH por vía IM (T2), se constituye en factor de estrés que altera la frecuencia cardiaca sobre los valores referenciales (Robles et al., 2019). Este proceso de estrés no se observó en los animales de T1 (epidural), seguramente porque no fueron trasladados a la manga ni recibieron FSH, lo cual generó que su FC estuviera dentro del rango fisiológico normal (Baier et al., 2019).

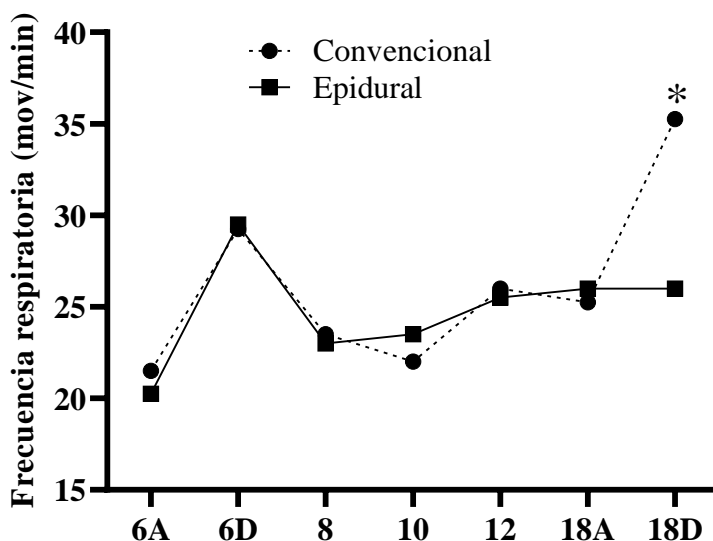


**Figura 6.** Frecuencia cardiaca valorada en el día 4 del protocolo de superovulación convencional y epidural 5 min., antes de aplicar la FSH (6A); 5min., después de aplicar la FSH (6D); luego a las 08h00, 10h00, 12h00, 18h00 (5 min., antes de aplicar FSH “18A” y 5 min., después de aplicar la FSH “18D”). \*=diferencia estadística. Prueba T de Student.

#### 4.3.2. Frecuencia respiratoria

En el presente estudio se observó en el día 4 del estudio, 5 minutos antes de aplicar la dosis de FSH (Figura 7) la frecuencia respiratoria de los animales fue de  $20,3 \pm 1,31$  mov/min (T1) y  $21,5 \pm 0,86$  mov/min (T2), valores que se encuentran dentro del rango fisiológico, ya que Saravia et al. (2004) en su estudio indicaron que en condiciones de tranquilidad la frecuencia respiratoria de los bovinos adultos oscila entre 20 a 25 respiraciones/minuto (rpm).

Sin embargo, 5 minutos post administración de la FSH las rpm se vieron incrementadas a valores de  $29,5 \pm 2,21$  mov/min (T1) y  $29,3 \pm 0,94$  mov/min (T2), como resultado de la exposición del animal al factor estresante, dado que el manejo realizado para llevar los animales a la manga y la administración de la FSH vía epidural (T1) e IM (T2) activaron la respuesta neuroendocrina, misma que provoca un aumento en la ventilación pulmonar con la finalidad de que el animal se encuentra listo para “huir” o pelear (Hellen et al., 2011).



**Figura 7.** Frecuencia respiratoria valorada en el día 4 del protocolo de superovulación convencional y epidural 5 min., antes de aplicar la FSH (6A); 5min., después de aplicar la FSH (6D); luego a las 08h00, 10h00, 12h00, 18h00 (5 min., antes de aplicar FSH “18A” y 5 min., después de aplicar la FSH “18D”). \*=diferencia estadística. Prueba T de Student.

En la valoración realizada a las 08h00 se observó un descenso de la frecuencia respiratoria, en T1 ( $23,0 \pm 2,38$  mov/min) y en T2 ( $23,5 \pm 1,25$  mov/min), estos valores se mantuvieron en las valoraciones de las 10h00 en T1 ( $23,5 \pm 0,5$  mov/min) y en T2 ( $22,0 \pm 0,91$  mov/min), de las 12h00 en T1 ( $25,5 \pm 0,95$  mov/min) y en T2 ( $26,0 \pm 1,15$  mov/min) y a las 18h00 antes de aplicar la segunda dosis de FSH a los animales de T2 (T1= $26,0 \pm 2,58$  mov/min) y T2 ( $25,3 \pm 1,1$  mov/min).

Sin embargo, 5 minutos luego de la segunda aplicación de la FSH (tarde) la frecuencia respiratoria de los animales que recibieron la dosis de FSH (T2) incrementaron los valores a  $35,3 \pm 1,1$  mov/min. Este incremento no se observó en los animales de T1 ( $26,0 \pm 0,81$  mov/min), ya que no sufrieron el proceso estresante del manejo para la administración de la dosis de la FSH. Este incremento de la FR está ligado a la liberación de acetilcolina en las vesículas sinápticas que ingresan a la medula suprarrenal, la cual produce la carga instantánea de adrenalina y noradrenalina, generando vasoconstricción del músculo cardíaco, aceleración del latido cardíaco y en fatiga del animal frente al proceso estresante, factor que provoca aumento de la frecuencia cardíaca (hiperventilación) (Cannon, 1929). Enunciado que mantiene lógica con el manejo recurrente que es necesario para la administración farmacológica (Baier et al., 2019).

## Conclusiones

- La administración de una sola dosis de la hormona folículoestimulante (FSH) vía epidural como promotor del proceso de superovulación en bovinos, produce concentraciones de cortisol basales a partir de las 6h post administración de la hormona hasta el final del protocolo en el día 7
- El manejo de los animales para llevar a la manga y administrar la FSH por cualquiera de las dos vías de administración, produce incremento de la concentración de cortisol y los niveles de glucosa en sangre de forma inmediata, siendo más baja las concentraciones en el T1 que en el T2
- La manipulación de los animales provoca aumento de la frecuencia cardiaca y respiratoria, por esta razón la vía epidural para aplicar una sola dosis de FSH para superovular vacas produce menos estrés que aplicar las 8 dosis consecutivas de FSH intramuscular en el protocolo convencional



## Referencias

- AccuBind® ELISA. (2019). *Cortisol Test System* (p. 1).
- Aich, P., Jalal, S., Czuba, C., Schatte, G., Herzog, K., Olson, D., Ross, A., Potter, A., Babiuk, L., & Griebel, P. (2007). Comparative approaches to the investigation of responses to stress and viral infection in cattle. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 11(4), 413–434. <https://doi.org/10.1089/omi.2007.0023>
- Álvarez, A. (2009). Fisiología animal aplicada. In *Fisiología animal aplicada* (1ª ed.). Universidad de Antioquía.
- Andrade, O., Orihuela, A., Solano, J., & Galina, C. (2001). Some effects of repeated handling and the use of a mask on stress responses in zebu cattle during restraint. *Applied Animal Behaviour Science*, 71(3), 175–181. [https://doi.org/10.1016/s0168-1591\(00\)00177-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1591(00)00177-5)
- Apaza, A. (2017). *Anestesia epidural con asociacion de xilacina y ketamina en ovinos (Ovis aries)*(Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Altiplano. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/5077>
- Avila, J. (2014). El estrés un problema de salud del mundo actual. *Revista Con-Ciencia*, 2(1), 115–124. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2310-02652014000100013](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652014000100013)
- Baier, F., Grandin, T., Engle, T., & Edwards, L. (2019). Evaluation of hair characteristics and animal age on the impact of hair cortisol concentration in feedlot steers. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(323), 3–5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00323>
- Bautista, V., Jiménez, S., Meza, C., Ramos, T., & Toledo, J. (2019). FSH in bovine superovulation. *Revista Bionatura*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.21931/RB/2019.04.01.12>
- Becaluba, F. (2007). Factores que afectan la superovulación en bovino (Tesis de pregrado). In Tandín: UNICEN (Ed.), *Producción animal*. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embionario/17-superovulacion.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embionario/17-superovulacion.pdf)
- Beck, J., & McGarry, E. (1962). Physiological importance of cortisol. *British Medical Bulletin*, 18(2), 134–140. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a069954>
- Blecha, F., Boyles, S., & Riley, J. (1984). Shipping Suppresses Lymphocyte Blastogenic Responses in Angus and Brahman × Angus Feeder Calves. *Journal of Animal Science*,

59(3), 576–583. <https://doi.org/10.2527/jas1984.593576x>

Bó, G., & Mapletoft, R. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>

Bó, G., Rogan, D., & Mapletoft, R. (2018). Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenology*, 112, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.034>

Bristow, D., & Holmes, D. (2007). Cortisol levels and anxiety-related behaviors in cattle. *Physiology & Behavior*, 90(4), 626–628. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.11.015>

Buestán, P. (2011). *Fisiología del estrés y sus efectos sobre la reproducción de la hembra bovina (Tesis de pregrado)*. Universidad de Cuenca. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3051/1/mv168.pdf>

Cabodevila, J., & Torquati, S. (2008). *Gonadotropina empleada: In Biotecnología de la Reproducción*. INTA.

Cannon, W. (1929). Cambios corporales en el dolor, el hambre, el miedo y la ira: un relato de investigaciones recientes sobre la función de la excitación emocional. *Physiological Reviews*, 9(3), 109–120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1152/physrev.1929.9.3.399>

Castaño, F., Rugeles, C., Betancur, C., & Ramirez, C. (2014). Impacto del estrés calórico sobre la actividad reproductiva en bovinos y consideraciones para mitigar sus efectos sobre la reproducción. *Biosalud*, 13(2), 84–94. <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v13n2/v13n2a07.pdf>

Castiñeiras, E. (2007). *Anestesia epidural en los bovinos mediante agonistas alfa dos adrenérgicos y opiáceos*. Universidad Santiago de Compostela. <http://dspace.usc.es/handle/10347/2361>

Castro, D., & Rodríguez, D. (2014). *Evaluación de factores que afectan la producción de embriones luego de un tratamiento superovulatorio en el ganado bovino en Argentina*. Universidad Nacional de Córdoba.

Chen, Y., Arsenault, R., Napper, S., & Griebel, P. (2015). Models and methods to investigate acute stress responses in cattle. *Animals*, 5(4), 1268–1295. <https://doi.org/10.3390/ani5040411>

- Collier, R., Renquist, B., & Xiao, Y. (2017). A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 10367–10380. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13676>
- Córdova, A., Córdova, C., Córdova, M., Saltijeral, J., Ruiz, C., Xolalpa, V., Cortés, S., & Guerra, J. (2008). Efecto de la mastitis y el estrés sobre la reproducción de la vaca. *Revista Veterinaria*, *19*(2), 161. <https://doi.org/10.30972/vet.1921899>
- Córdova, A., Espinosa, R., López, J., Sánchez, P., Villa, A., Guerra, E., & Olivares, J. (2014). Tipos de estrés en el ganado y recomendaciones para su control. *Departamento de Producción Agrícola y Animal*, *3*(1), 86–95. [https://www.researchgate.net/publication/303967229\\_Tipos\\_de\\_estres\\_en\\_el\\_ganado](https://www.researchgate.net/publication/303967229_Tipos_de_estres_en_el_ganado)
- Costa, A., & Dasso, L. (2007). Manejo de Bovinos en Sistemas Productivos : Caracterización de dos estilos de manejo y niveles sanguíneos de cortisol. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, *8*(12), 1–8. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121207B/BA009.pdf>
- Craig, J. (1986). Measuring social behavior: social dominance. *Journal of Animal Science*, *62*(4), 1120–1129. <https://doi.org/10.2527/jas1986.6241120x>
- Cuenca, E., Yero, O., Freeman, F., Mendoza, O., Rosseaux, J., Ramirez, W., & Tamayo, W. (2007). Reacción leucocitaria ante el estrés nutricional provocado por la sequía en bovino. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, *8*(7), 2005–2008. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63612662012>
- Dobson, H., Tebble, J. E., Smith, R. F., & Ward, W. R. (2001). Is stress really all that important? *Theriogenology*, *55*(1), 65–73. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00446-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00446-5)
- Earley, B., Drennan, M., & Riordan, E. (2013). The effect of road transport in comparison to a novel environment on the physiological , metabolic and behavioural responses of bulls. *Research in Veterinary Science*, *95*(2), 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.027>
- Earley, B., Murray, M., Prendiville, D., Pintado, B., Borque, C., & Canali, E. (2012). The effect of transport by road and sea on physiology, immunity and behaviour of beef cattle. *Research in Veterinary Science*, *92*(3), 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.04.002>

- Fetiva, C. (2017). *Identificación de interacciones proteicas de adamts19 en un contexto ovárico (Tesis de grado)*. Universidad Colegio Mayor De Nuestra Señora Del Rosario. <https://repository.urosario.edu.co/server/api/core/bitstreams/29ce328c-4b65-494c-8e12-917b118220b8/content>
- Fink, G. (2009). Stress: Definition and history. *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, 549–555. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00076-0>
- Fonseca, J., Silva, J., Pinto, A., & Palhares, M. (2001). Estadios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53(6), 671–676. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352001000600010>
- Gardner, D., & Shoback, D. (2019). Glucocorticoides y andrógenos suprarrenales. In *Greenspan. Endocrinología básica y clínica* (10th ed.). McGraw Hill.
- Garzón, N., Urrego, R., & Giraldo, C. A. (2007). Algunos Factores Que Afectan Los Tratamientos De Superovulación En La Transferencia De Embriones Bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(2), 1900–9607. <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428098008.pdf>
- Gaytan, P., Vicente, P., Durazo, E., & Navarro, D. (2021). Efectos endocrinológicos del estrés agudo y crónico. *Revista Estudiantil De Medicina De La Universidad De Sonora*, 6, 55–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.59420/remus.6.2021.11>
- Grandin, T. (1997). Evaluación del estrés durante el manejo y transporte. *Journal of Animal Science*, 75, 249–257. <https://doi.org/10.2527/1997.751249x>
- Grandin, T. (1998a). Handling methods and facilities to reduce stress on cattle. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 14(2), 325–341. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30257-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30257-7)
- Grandin, T. (1998b). Reducing Handling Stress Improves Both Productivity and Welfare. *Professional Animal Scientist*, 14(1), 1–10. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31783-6](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31783-6)
- Grelet, C., Vanden, V., Leblois, J., Wavreille, J., Mirabito, L., Soyeurt, H., Franceschini, S., Gengler, N., Brostaux, Y., & Dehareng, F. (2022). Identification of chronic stress biomarkers in dairy cows. *Animal*, 16(5), 100502.

<https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100502>

- Gross, J., Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. (2015). Cortisol secretion in response to metabolic and inflammatory challenges in dairy cows. *Journal of Animal Science*, 93(7), 3395–3401. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-8903>
- Guzmán, E. (2004). Las pruebas de Elisa. *Gaceta Médica de México*, 140(3), 48–49. <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=27363>
- Haro, A., Suarez, A., Burgos, A., Navarrete, J., Ramonez, J., Nieto, P., & Andrade, M. J. (2023). Vocalización como marcador de estrés en ganado bovino. *CEDAMAZ*, 13(1), 126–131. <https://doi.org/10.54753/cedamaz.v13i1.1763>
- Hasler, J. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- Hasler, J., McCauley, A., Schermerhorn, E., & Foote, R. (1983). Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19(1), 83–99. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90125-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90125-5)
- Hellen, M., Peñuela, R., Uribe, L., Alberto, J., & Valencia, S. (2011). Biomarcadores De Estrés Como Indicadores De Bienestar Animal En Ganado De Carne. *Biosalud*, 10(1), 71–87. <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/biosalud/article/view/4753>
- Hoedemaker, M., Prange, D., & Gundelach, Y. (2009). Body condition change ante- and postpartum, health and reproductive performance in German Holstein Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00992.x>
- Hopster, H., Van Der Werf, J., Erkens, J., & Blokhuis, H. (1999). Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *Journal of Animal Science*, 77(3), 708–714. <https://doi.org/10.2527/1999.773708x>
- Jacobson, J. (2021). Examen de la hormona foliculoestimulante (FSH) en la sangre. *MedlinePlus*, 24, 4. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003710.htm>
- Jiménez, C. (2009). Superovulación Estrategias, Factores Asociados Y Predicción De La Respuesta Superovulatoria En Bovinos. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56(3), 195–214. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=407639221005>

- Kelly, P., Duffy, P., Roche, J., & Boland, M. (1997). Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science*, 46(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(96\)01589-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(96)01589-8)
- Kimura, K. (2016). Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 62(5), 1–7. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-066>
- Kinlein, S., Wilson, C., & Karatsoreos, I. (2015). Dysregulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis function contributes to altered endocrine and neurobehavioral responses to acute stress. *Frontiers in Psychiatry*, 6, 19–22. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00031>
- Kolling, A., Brillhante, G., Drechmer, J., Santos, L., Silva, B., & Ramos, A. (2021). Relationship between superovulation and embryo production with ovarian follicular population before superovulatory treatment in Brazilian Bergamasca sheep. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 73(1), 115–122. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12105>
- Kulus, J., Wiczorkiewicz, M., Kulus, M., & Jaskowski, J. (2019). Superovulation in cattle—searching for the optimal dose, alternative routes of administration and a simplified fsh application program. *Medicina Veterinaria*, 75(9), 515–520. <https://doi.org/10.21521/mw.6216>
- Lee, I., Soehartono, R., Yamagishi, N., Taguchi, K., & Yamada, H. (2001). Distribution of new methylene blue injected into the dorsolumbar epidural space in cows. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 28(3), 140–145. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2987.2001.00042.x>
- López, F., Llobera, M., Palacín, R., Garcia, I., & Hunter, R. (2022). Follicular Size Threshold for Ovulation Reassessed. Insights from Multiple Ovulating Dairy Cows. *Animals*, 12(9), 1–9. <https://doi.org/10.3390/ani12091140>
- Lubos, H. (1983). *Bases biológicas de la reproducción bovina* (1ª ed.). México: Diana.
- Lynch, E., Earley, B., McGee, M., & Doyle, S. (2010). Effect of abrupt weaning at housing on leukocyte distribution, functional activity of neutrophils, and acute phase protein response of beef calves. *BMC Veterinary Research*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-39>
- Macfarlane, M., Breen, K., Sakurai, H., Adams, B., & Adams, T. (2000). Effect of duration of



infusion of stress-like concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. *Animal Reproduction Science*, 63(3–4), 167–175. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00179-2)

Madrid, S., López, A., & Echeverri, J. (2016). Association between FSHR polymorphism with productive and reproductive traits in antioquia holstein cattle. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 69(1), 1–10. <https://doi.org/10.15446/rfna.v69n1.54747>

Maidana, P., Bruno, O., & Mesch, V. (2013). A critical analysis of cortisol measurements: an update. *Medicina*, 73(6), 579–584. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356273>

Mannaerts, B., Shoham, Z., Schoot, D., Bouchard, P., Harlin, J., Fauser, B., & Jacobs, H. (1993). Single dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human follicle stimulating hormone in gonadotropin deficient volunteers. *Fertility and Sterility*, 59(1), 108–114. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55624-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55624-6)

Mapletoft, R., Bennett, K., & Adams, G. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 42(6), 601–611. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002046>

Mikkola, M., Hasler, J., & Taponen, J. (2019). Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reproduction Fertility and Development*, 32(2), 104–124. <https://doi.org/10.1071/RD19279>

Mitchell, G., Hattingh, J., & Ganhao, M. (1988). Stress in cattle assessed after handling, after transport and after slaughter. *The Veterinary Record*, 123(8), 201–205. <https://doi.org/10.1136/vr.123.8.201>

Mogollon, E., & Burla, J. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de fsh. *Spei Domus*, 18, 2–10.

Mormede, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., Van, C., Richard, S., & Veissier, I. (2007). Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology and Behavior*, 92(3), 317–339. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>

Motta, P., Ramirez, N., Ramos, N., Valencia, A., & Perdomo, W. (2011). Respuesta superovulatoria en número y calidad embrionaria de vacas y novillas Gyr lechero en clima calido. *Revista Electronica Veterinaria*, 12(10), 1–14.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63621921003>

Mpakama, T., Chulayo, A., & Muchenje, V. (2014). Bruising in slaughter cattle and its relationship with creatine kinase levels and beef quality as affected by animal related factors. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(5), 717–725. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13483>

Mugabure, B., Echaniz, E., & Marín, M. (2005). Fisiología y farmacología clínica de los opioides epidurales e intratecales. *Revista de La Sociedad Española Del Dolor*, 12(1), 33–66. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-038576>

Naranjo, F., Montiel, F., Canseco, R., & Ahuja, C. (2019). Embryo production after superovulation of bovine donors with a reduced number of FSH applications and an increased eCG dose. *Theriogenology*, 141, 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.018>

Narváez, P., & Tamay, M. (2013). *Cuantificación de hormona folículo estimulante, hormona luteinizante y estradiol en mujeres de 45 - 55 años en etapa de climaterio (Tesis de pregrado)*. Universidad de Cuenca. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/4378>

O'Brien, M., Rhoads, R., Sanders, S., Duff, G., & Baumgard, L. (2010). Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 38(2), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.08.005>

Odeón, M., & Romera, S. (2017). Estrés en ganado: causas y consecuencias. *Revista Veterinaria*, 28(1), 69–77. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1669-68402017000100014&lang=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-68402017000100014&lang=es)

OIE. (2010). Utilización de animales en la investigación y educación. In *Código sanitario para los animales terrestres* (p. 311). <http://www.oie.int/doc/ged/D7599.PDF>

Ponce, N. (2015). *Transferencia de embriones en ganado bovino*. Universidad Cardenal Herrera. <http://hdl.handle.net/10637/7574>

Ratsiri, T., Ratchamak, R., Chumchai, R., Boonkum, W., Vongpralub, T., & Chankitisakul, V. (2021). A novel route of follicle-stimulating hormone administration with a split-single ischiorectal fossa in thai-holstein crossbred superovulation programs under heat stress conditions. *Animal Science Journal*, 92(1). <https://doi.org/10.1111/asj.13574>



- Rioja, E., Rubio, L., Monteith, G., & Kerr, C. (2013). Analgesic and motor effects of a high-volume intercoccygeal epidural injection of 0.125% or 0.0625% bupivacaine in adult cows. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 77(4), 273–280. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3788658/>
- Robles, J., Ávila, J., Cano, J., & Olguín, A. (2019). Manual de prácticas de clínica de los bovinos. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 5–25. <https://fmvz.unam.mx/fmvz/>
- Romero, E., Young, J., & Salado, R. (2020). Fisiología del estrés y su integración al sistema nervioso y endocrino. *Revista Médico Científica*, 32, 61–70. <https://doi.org/10.37416/rmc.v32i1.535>
- Romero, M., & Sánchez, J. (2012). Bienestar animal durante el transporte y su relación con la calidad de la carne bovina. *Revista MVZ Cordoba*, 17(1), 2936–2944. <https://doi.org/10.21897/rmvz.264>
- Sakaguchi, K., Ideta, A., Yanagawa, Y., Nagano, M., Katagiri, S., & Konishi, M. (2018). Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for in vivo and in vitro embryo production in Japanese black cows. *Reproduction and Development*, 90(5), 1–16. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-007>
- Sanmiguel, R., Hernández, F., Trujillo, D., Pérez, M., Peñuela, L., & DiGiacinto, A. (2018). Requirements for the measurement of invasive and non-invasive stress indicators in animal production. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(1), 15–30. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14195>
- Saravia, C., Salvarrey, L., Saldanha, S., Cruz, G., & Marcelo, A. (2004). Efecto del acceso a sombra natural en la recría de vaquillonas Holando y Jersey durante el período estival. *X Reunión Argentina Latinoamericana de Agrometeorología*, 10, 1–6.
- Selye, H. (1936). Estrés un síndrome producido por diversos agentes nocivos. *Nature*, 138(I), 32–32. <https://doi.org/10.1176/jnp.10.2.230a>
- Selye, H. (1973). The evolution of the stress concept. *Animal Scientist*, 61(6), 692–699. <https://psycnet.apa.org/record/1974-10586-001>
- Sepúlveda, N., Gallo, C., & Allende, R. (2007). Importancia Del Bienestar Animal En Producción Bovina. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 15(1), 127–132. <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/53077/1/la07043.pdf>
- Siafaka, I. (2012). Epidural and CSF pharmacokinetics of drugs. *Biology, Medicine, Chemistry*,

99.

- Sierra, C. (2019). Indicadores de bienestar en bovinos del trópico: una visión desde el estrés y el eje hipotalámico pituitario adrenal. *Revista Veterinaria*, 30(2), 101. <https://doi.org/10.30972/vet.3024143>
- Stockman, C., Collins, T., Barnes, A., Miller, D., Wickham, S., Beatty, D., Blache, D., Wemelsfelder, F., & Fleming, P. (2013). Flooring and driving conditions during road transport influence the behavioural expression of cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, 143(1), 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.11.003>
- Tadich, N., Gallo, C., Echeverria, R., & Schaik, G. (2003). Efecto del ayuno durante dos tiempos de confinamiento y de transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 35(2), 171–185. 10.4067/S0301-732X2003000200005
- Tasdemir, U., Satilmis, M., Karasahin, T., Kizil, S., Kaymaz, M., & Imai, K. (2012). The effect of single epidural plus intramuscular injection of FSH on superovulatory response in anatolian black cow. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 59(3), 211–216. [https://doi.org/10.1501/vetfak\\_0000002527](https://doi.org/10.1501/vetfak_0000002527)
- Thun, R., Eggenberger, E., Zerobin, K., Lüscher, T., & Vetter, W. (1981). Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: Evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinology*, 109(6), 2208–2212. <https://doi.org/10.1210/endo-109-6-2208>
- Torres, G., Vargas, M., & Quimbayo, A. (2020). *Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca en Bovinos*. Universidad Antonio Nariño.
- Tubert, I., Sherman, W., Repasky, M., & Beuming, T. (2013). Improved docking of polypeptides with Glide. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(7), 1689–1699. <https://doi.org/10.1021/ci400128m>
- Uribe, L., Oba, E., Albuquerque, L., Wechsler, F., & Mendoza, A. (1998). Concentraciones plasmáticas de cortisol, hormônios tiroídeos, metabolitos lipídicos e temperatura corporal de cabras alpinas submetidas ao estresse térmico. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 27(6), 1123–1130. <http://hdl.handle.net/11449/32826>
- Vélez, M., & Velásquez, F. (2010). ¿Cómo afecta el estrés calórico a la reproducción? *Biosalud*, 9(2), 83–95. <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/biosalud/article/view/5505>

- Vilcatoma, E. (2018). *Evaluación de la producción de embriones por multiovulación en vacas Brown Swiss en la estación experimental Santa Ana, Huancayo, en los años 2011-2015*. Universidad Nacional del Centro del Perú. <http://hdl.handle.net/20.500.12894/4850>
- Wong, D., & Tank, A. (2007). Stress-induced catecholaminergic function: Transcriptional and post-transcriptional control. *Stress*, 10(2), 121–130. <https://doi.org/10.1080/10253890701393529>
- Yamamoto, M., Ooe, M., Kawaguchi, M., & Suzuki, T. (1994). Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 41(3), 747–755. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90184-K](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90184-K)
- Young, B. (1983). Ruminant cold stress: effect on production. *Journal of Animal Science*, 57(6), 1601–1607. <https://doi.org/10.2527/jas1983.5761601x>
- Zapata, L. (2003). Psicología desde el Caribe. *Revistas Científicas de América Latina*, 11, 5–7. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=21301101>

## Anexos

### Anexo A. Selección de donadoras



### Anexo B. Aplicación de la hormona FSH: vía intramuscular y epidural



### Anexo C. Valoración de la frecuencia cardiaca

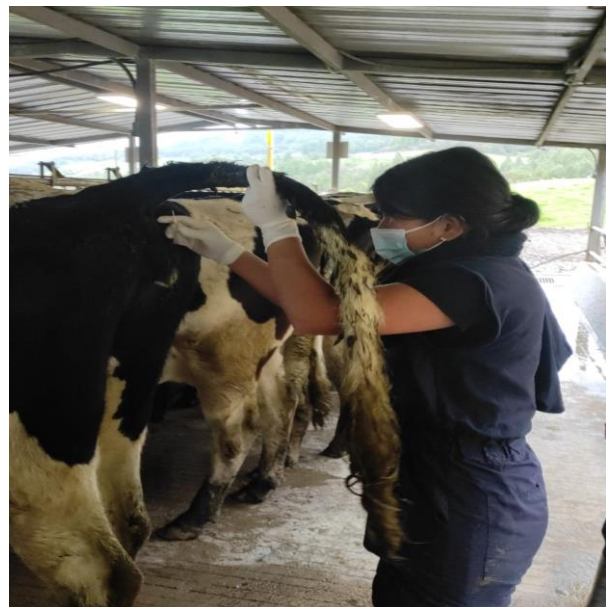
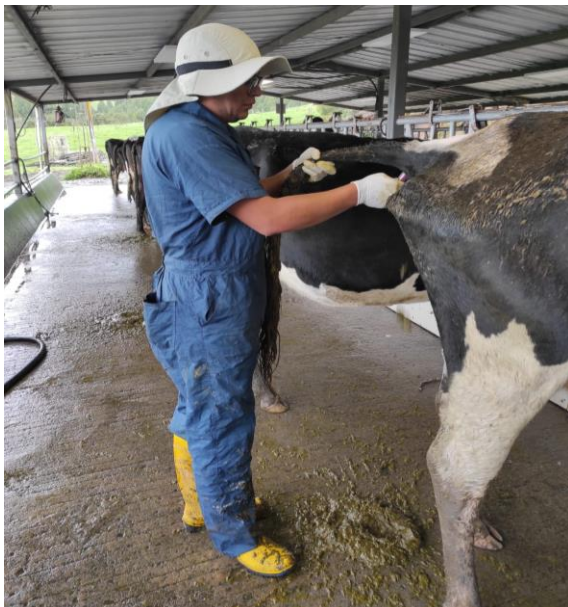




## Anexo D. Valoración de la frecuencia respiratoria



## Anexo E. Toma de muestras sanguíneas



## Anexo F. Valoración de glucosa en sangre





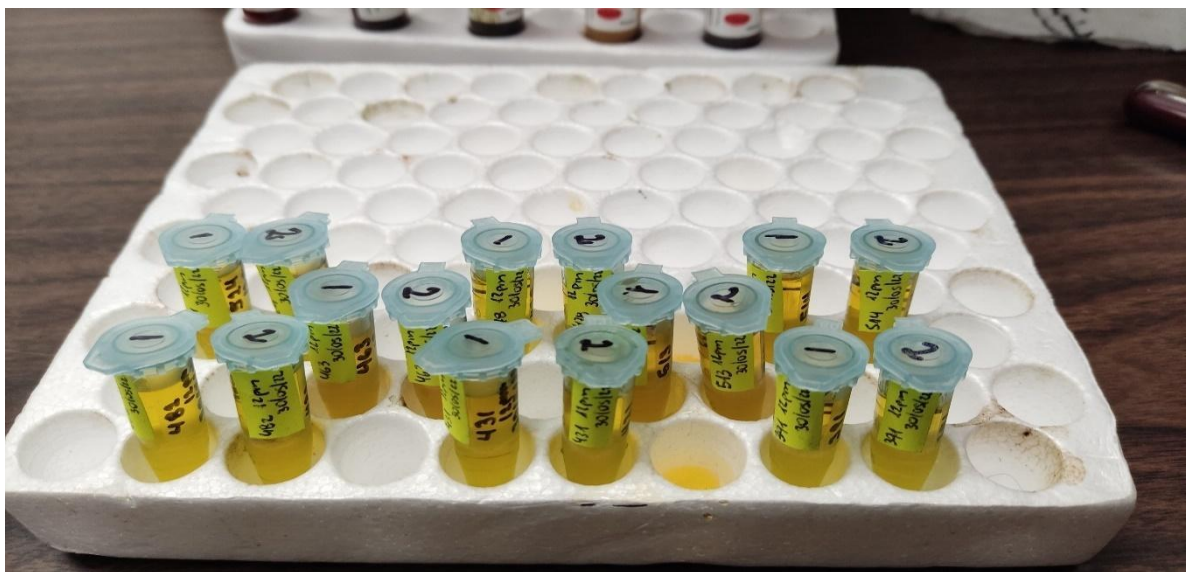
## Anexo G. Centrifugado de las muestras sanguíneas para la obtención de plasma



## Anexo H. Extracción del plasma sanguíneo



## Anexo I. Rotulado del plasma sanguíneo para su posterior almacenamiento y congelación





## Anexo J. Descongelación de las muestras de plasma sanguíneo



## Anexo K. Kit de Elisa Cortisol (Cortisol Test System. Monobind Inc. Lake Forest. USA)

