LA SALIVA EN LA EVALUACIÓN DEL EJE CORTICOTROPO EN GANADO VACUNO.

G. Chacón Pérez[1], S. García-Belenguer Laita[1], J. C. Illera del Portal[2], J. Palacio Liesa[3]

[1] Dpto. Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

[2] Dpto. Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

[3] Dpto. Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad Cardenal Herrera-CEU. Moncada (Valencia).

INTRODUCCIÓN

Cuando se produce una situación de estrés, el organismo sufre una serie de cambios internos para adaptarse a esa nueva situación. El eje corticotropo (hipotálamo-hipófisis-adrenal) y el sistema nervioso simpático y meduloadrenal desempeñan un papel fundamental en la repuesta de adaptación. (García-Belenguer y Mormède, 1993).

El cortisol es una hormona esteroide sintetizada en la corteza adrenal bajo el control del eje corticotropo, esta hormona se encuentra elevada en situaciones de estrés. Su cuantificación es, por tanto, de gran utilidad en el campo de producción animal para valorar el estado de bienestar animal.

La determinación de cortisol suele realizarse en plasma o en suero; sin embargo, se tiende a la utilización de otro tipo de muestras biológicas. Según algunos autores las muestras de saliva tiene ventajas sobre el plasma, como es la recogida no cruenta, disminuyendo el estrés que se causa a los animales. Por otro lado, a la saliva sólo se filtra la fracción de cortisol libre (no unida a proteínas trasportadoras), que es la fracción con actividad biológica (Vinning et al., 1983; Fell et al., 1985; Cooper et al., 1989; Cook et al., 1997).

El objetivo de este trabajo es valorar la utilidad de la determinación de cortisol salival en la especie bovina mediante una técnica EIA (enzimoinmunoensayo) como una alternativa a las técnicas de RIA (radioinmunoensayo) y a la utilización de plasma como muestra.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la determinación de las concentraciones basales de cortisol en plasma y saliva de ganado vacuno se utilizaron muestras de un total de 63 animales de ambos sexos y 4 razas diferentes: Parda Alpina, Pirenaica, Holstein y Blonde Aquitaine. Estos animales se dividieron en 2 grupos según la edad: 40 animales jóvenes de menores de 1 año y 23 animales de más de 1 año de edad.

Todas las muestras fueron recogidas a la misma hora del día, por la tarde, cuando las concentraciones de cortisol son menores. Para la toma de muestra de plasma se hicieron pasar a los animales por la manga de contención, estando previamente habituados. Las muestras se obtuvieron mediante la extracción de sangre por punción en la vena caudal y su posterior centrifugación a 1500 g. durante 15 min. conservándose el plasma en viales eppendorf a -30º C hasta su análisis.

La toma de muestras de saliva se hizo en presencia de comida para estimular la salivación, sin necesidad de introducir a los animales en la manga. Las muestras se obtuvieron mediante la introducción de torundas de algodón a nivel de las desembocaduras del conducto de Stenon de la glándula parótida y de las glándulas sublinguales. Posteriormente se centrifugaron los algodones a 1500 g. durante 30 min., tras lo que se distribuyó la saliva en viales eppendorf y se conservaron a -30º C.

La determinación de cortisol en plasma y saliva se realizó mediante una técnica de EIA puesta a punto y validada en el laboratorio de Medicina Interna de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. La técnica tiene un límite de detección de 0,024 ng/ml y la recuperación es de 92,60-103,96% y de 91,36-126,5% en plasma y saliva respectivamente. La precisión intraensayo de 3,47-6,63% en plasma y de 1,47-7,30% en saliva, mientras que la precisión interensayo es de 3,92-9,93% en plasma y de 2,40-9,78% en saliva.

Se valoró igualmente las posibles interferencias del tipo de muestra en la determinación directa en el EIA. Esto se realizó mediante pruebas de paralelismo de la curva estándar con curvas estándar a las que se les añadieron plasma o saliva libres de esteroides. Así mismo se evaluó la correlación de la técnica de EIA con una técnica comercial de RIA (ICN Biomedical, ICN, Costa Mesa, CA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar las concentraciones basales para ganado bovino, obtenidas con esta técnica EIA (tabla 1) con los datos aportados por otros autores (Gardy-Godillot et al., 1989; Cooper et al., 1989; Van der Kolk et al., 1991; Schrama et al., 1996; Morrow et al., 2000) se observan niveles similares aunque ligeramente superiores a nivel plasmático. Hay que reseñar, sin embargo, que la concentración basal varía considerablemente de un autor a otro, debido a las diferencias de razas, edades, estado reproductor y técnicas analíticas utilizadas (García-Belenguer y Mòrmede, 1993). Así mismo hay que destacar que en este estudio se ha encontrado una gran variabilidad entre los individuos dentro de una misma raza y grupo de edad, por ello a la hora de diseñar un estudio experimental es imprescindible obtener el nivel basal de los animales que van a ser utilizados para tomarlo posteriormente como muestras control.

Tabla 1: Valores basales de cortisol en ganado vacuno.

		N	Media (ng/ml)	D.E.	Intervalo de confianza
Animales < 1 año	**Plasma:**	40	8,911	11,158	0 - 31,23
	Saliva:	40	1,220	1,227	0 - 3,674
	sv-pl:	40	13,69%		
Animales > 1 año	**Plasma:**	23	14,174	7,916	0 - 30,52
	Saliva:	23	1,324	0,852	0 - 3,028
	sv-pl:	23	10,31%		

A pesar de la variabilidad interindividual, las concentraciones de cortisol basal en la especie bovina son menores a las encontradas en otras especies domésticas (Fell et al., 1985; Beerda et al., 1996; Cook et al., 1997; Van der Kolk et al., 2001). De hecho, las técnicas de RIA disponibles en el mercado no tienen un rango de detección suficientemente sensible (de 10 a 100 ng/ml) para la determinación de las muestras de saliva y de las muestras más bajas de plasma. Ambas técnicas están altamente correlacionadas (r de Pearson=0,793; p<0,001; n=34).Por todo ello, a la hora de elegir la técnica de determinación de cortisol en la especie bovina, las técnicas de EIA deberían ser las de elección al tener unas características de sensibilidad óptimas.

Respecto a la relación entre el cortisol plasmático y salival, cabe destacar la alta correlación entre ambos parámetros (r de pearson=0,746, p<0,001, n=63), (figura 1), por lo que a la hora de diseñar un experimento se pueden utilizar ambos parámetros indistintamente. La concentración de cortisol en saliva respecto al plasma se encuentra en torno al 10% (10,31 y 13,69% en animales mayores y menores de 1 año

respectivamente). Estos resultados concuerdan con los aportados para la especie humana (Vinnig et al., 1983; Rijnberk y Mol, 1989; Lac, 1998).

Figura 1: Correlación saliva-plasma mediante la técnica de EIA.

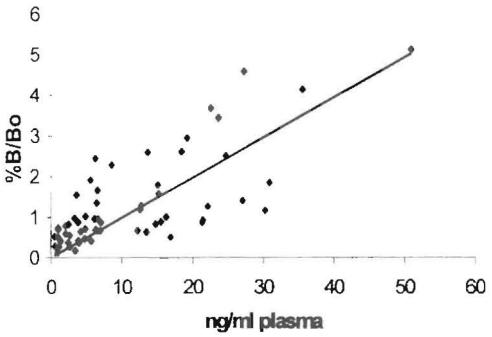
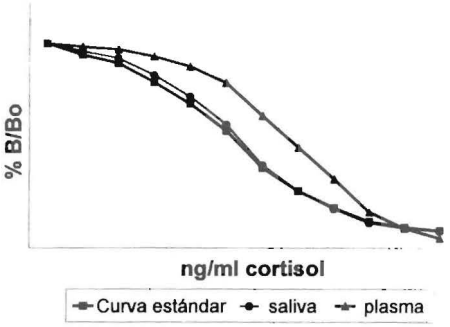


Figura 2: Paralelismos de la curva estándar con las curvas realizadas en plasma y saliva.



La determinación de cortisol salival presenta ventajas respecto a su determinación en plasma. Los componentes de la saliva no produce interferencia sobre el ensayo, como se observa en la figura 2, mientras que el plasma sí provoca una pequeña interferencia. A esto hay que añadir la menor necesidad de sujeción de los animales y por tanto, el menor estrés al que se les somete para obtener la muestra de saliva, y el hecho de determinar la fracción de cortisol biológicamente activa. Todo ello la convierte en un tipo de muestra con grandes posibilidades de aplicación en los estudios de bienestar animal en la especie bovina.

BIBLIOGRAFÍA

Beerda B., Schilder M.B.H., Janssen N.S.C.R., Mol J.A., 1996. Horm. Behav. 30, 272-279.

Cook N.J, Schaefer A.L., Lepage A., Morgan Jones S., 1997. J. Agri. Food Chem. 45, 395-399.

Cooper T.R., Trunkfield H.R., Zanella A.J., Booth W.D., 1989. J. Endocr. 123, R-13, R-16.

Fell L.R., Shutt D.A., Bentley C.J., 1985. Australian Vet. J. 62 (12), 403-406.

Garcia-Belenguer S., Mòrmede P., 1993. Investi. Agr.: Prod. Y Sanid. Anim. 8(2), 87-110.

Gardy-Godillot M., Durand D., Dalle M., Bauchart D., 1989. J. Dairy Sci. 72, 1842-1846.

Lac G., 1998. Science And Sports 13, 55-63.

Morrow C.J., Kolver E.S., Verkerk G.A., Matthews L.R., 2000. Proceeding. Of The New Zealand Of Anim. Production. 60, 218-221.

Rijnberk A., Mol J.A., 1989. En: J. Kaneko. Clinical Biochemistry Of Domestic Animal, 4ª Ed. Academic Press Inc. San Diego, California, Pp: 610-629.

Schrama J.W., Heetkamp M.J.W, Verstegen M.W.A, Schouten W.G.P., Van Der Veen F., Helmond F.A., 1996. J. Anim. Sci. 63, 79-89.

Van Der Kolk J.H., Breukink H.J., Wensing T., Mol J.A., 1991. The Vet. Quarterly 13(3), 144-147.

Van Der Kolk J. H., Nachreiner R.F., Schott H.C., Refsal K.R., Zanella A.J., 2001. Equine Vet. J. 33(2), 211-213.

Vining R.F., Mcginley R.A., Maksvytis J.J., Hok Y., 1983. Ann. Clin. Bioch. 20, 329-335.