

E. LEXEN¹, H. NISSEL², G. GAGGL³, K.H. GROHMAN⁴

¿Puede la acupuntura láser reducir la elevación post estrés de los metabolitos de glucocorticoides en las heces de ovino?

Resumen

Introducción: el esquileo bianual constituye uno de los impactos más importantes sobre la explotación económica del ganado ovino. Por este motivo, en el presente estudio los autores han recurrido al esquileo como factor estresante, a fin de determinar si la acupuntura láser es capaz de reducir la excreción de las hormonas del estrés en las heces de oveja.

Método: un rebaño de 77 ovejas fue afeitado y dividido en un grupo experimental y un grupo de referencia. El grupo experimental fue tratado con acupuntura láser en ciertos puntos de equilibración psíquica y esquilado inmediatamente después. Por su parte, el grupo de referencia recibió el mismo tratamiento, con la

particularidad de que el rayo del láser se filtró mediante un capuchón protector colocado en el extremo del instrumento. Se tomaron muestras de las heces inmediatamente, así como transcurridas seis, ocho, 10, 12 y 14 horas, y tras el muestreo se congelaron directamente a -20 °C hasta el momento de analizarlas. La concentración de los metabolitos de glucocorticoides fue determinada en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Veterinaria de Viena mediante un enzimoinmunoanálisis (EIA) desarrollado en el propio departamento.

Resultados: se halló una diferencia significativa entre los grupos transcurridas seis horas, ya que en el grupo de referencia –no irradiado con láser– se pudo constatar un aumento

significativo de metabolitos de glucocorticoides en las heces, mientras que no ocurrió lo mismo en el grupo experimental. En los demás puntos temporales de medida no se pudo apreciar ninguna diferencia significativa entre los grupos.

Conclusiones: si bien en el presente estudio se observó un efecto primario, no se puede establecer una conclusión clara en cuanto a la influencia que ejerce la acupuntura láser sobre la concentración de metabolitos del cortisol en las heces de oveja. Para poder formular afirmaciones más concretas, los futuros estudios podrían contemplar la habituación de los animales al manejo, la variación de la dosis de radiación de la acupuntura láser o la repetición de la misma.

Can Laser Acupuncture Reduce the Increase of Glucocorticoid Metabolites in the Faeces of Sheep after Mental Stress?

Abstract

Background: Shearing is one of the greatest disturbances within economic utilisation of sheep. Therefore shearing was used as a stressor in this study to show whether laser acupuncture could reduce the quantity of cortisol metabolites in the faeces of sheep.

Design: A total of 77 sheep were exposed to disturbances caused by the procedure of shearing and were divided into one test group and one control group. The sheep of the test group were treated with acupuncture by shining a laser beam on specific psychological acupuncture points and then sheared immediately.

The sheep of the control group were treated the same way with an insulation cap placed on the tip of the laser beamer. Faecal samples were taken immediately after shearing and then in time intervals of six, eight, ten, twelve and 14 hours. All samples were frozen immediately and stored at -20 °C until analysis. The concentration of glucocorticoid metabolites was measured by the Institute of Biochemistry, University of Veterinary Medicine Vienna using an Enzyme Immuno-assay (EIA) developed by this institute.

Results: The level of glucocorticoid metabolites was significantly higher for the control group than for the

test group only after six hours. No significant difference between the two groups could be constated for the other sampling times.

Conclusions: Although a primary effect could be detected, the influence of laser acupuncture on the concentration of cortisol metabolites in the faeces of sheep can not be clearly evaluated in this study. Further studies could include habituation of the animals to handling procedures, variation of the laser radiation dose and repeated laser acupuncture to allow more precise conclusions.

Keywords

cortisol, stress, acupuncture, laser

¹ Mag. Vet. Med. Evelyn Lexen, Achleiten 34, A-4531 Kematen an der Krems, Austria

² Dir. Prim. Prof. Dr. Helmut Nissel, Presidente de la Sociedad Austria de Acupuntura, Director del Instituto de Acupuntura Johannes Bischko, director del 2º Departamento de Medicina Interna y director médico del Hospital Kaiserin-Elisabeth de Viena, Huglgasse 1-3, A-1150 Viena, Austria

³ Dr. Gernot Gaggl, veterinario especialista en acupuntura y terapia neural, Consulta veterinaria Gaggl, Bahnhofallee 74, A-8271 Bad Waltersdorf, Austria

⁴ Dr. Karl-Heinz Grohmann, veterinario especialista en acupuntura y terapia neural, Clínica veterinaria Korneuburg, Laerstraße 62, A-2100 Korneuburg, Austria

Introducción

El esquileo supone para el ganado ovino un trastorno mucho más importante, por ejemplo, que la separación del rebaño, la extracción de sangre mediante un catéter permanente o la desparasitación [3, 4]. Hasta la fecha sólo existen unos pocos estudios realizados con un número reducido de individuos que se ocupen de la posible reducción de distintos parámetros de estrés mediante la estimulación de puntos de acupuntura [2, 6].

En el presente estudio se pudieron incluir en el experimento 77 animales que participaban en una sesión de esquileo en la finca de prácticas e investigación de la Universidad de Veterinaria de Viena.

La magnitud del estrés y la posible influencia de la acupuntura láser fueron determinadas midiendo los metabolitos de los glucocorticoides en las heces, ya que, en contraposición con la medición del nivel sérico de cortisol, ofrece la ventaja de la facilidad de extracción indolora de la muestra y de la ausencia de repercusiones.

Los metabolitos de los glucocorticoides podemos determinarlos en las heces porque el cortisol se metaboliza principalmente en el hígado, y sus productos metabólicos se excretan después en parte en orina y en parte pasan al intestino a través de la bilis [9]. Como el tiempo de tránsito intestinal medio es de 10 horas, el pico de concentración de los metaboli-

tos de cortisol en las heces tras el estrés aparece con un retardo temporal de unas 10 horas con respecto al nivel de cortisol plasmático [8].

El objetivo del presente estudio fue demostrar si mediante la acupuntura láser aumentaba la concentración de los metabolitos de los glucocorticoides en las heces de los animales de experimentación de forma menos acusada.

Material y método

El rebaño constaba de 77 ovejas que se componía como sigue:

- sólo animales adultos (edad: de uno a siete años)

Localización de los puntos de acupuntura en ovejas [1, 6]

Yintang (Ex-KH3): se corresponde en la oveja con el punto *Long-Hui* y se encuentra localizado sobre el vaso gobernador, en el punto medio de la línea imaginaria que une los salientes anteriores de los dos bordes supraorbitarios. Entre las indicaciones de este punto se encuentran, además de la reducción del estrés, la relajación general del animal, los trastornos oculares y la sinusitis.

Du Mai 20: al igual que en humanos, este punto también se encuentra en la línea media, en el punto más elevado de la cabeza. No obstante, no coincide con el nombre chino «*Baihui*», ya que en animales nos referimos al punto *Du Mai 3* cuando decimos «*Baihui*». Además de para el estrés, este punto se utiliza también para los espasmos, las lesiones cefálicas cerradas y las hiperemias cerebrales.

E 36: se corresponde en la oveja con el punto *Hou San Li*. Se localiza en la cara lateral de la pata del animal, en la fosa del borde inferior de la cabeza del peroné, entre el músculo extensor digital largo y el extensor digital lateral, seis centímetros por debajo de la rótula y un poco lateral con respecto a la misma. También en animales se trata de un punto de equilibración psíquica y de un punto eficaz para la función genital. El punto se puede utilizar también en caso de trastornos de presión arterial, espasmos, paresias y dolores, cojera de las extremidades posteriores, debilidad general, convalecencia, anemia, y como punto para el tracto gastrointestinal y el sistema inmunológico.

V 23: este punto se sitúa en todos los tipos de animales exactamente como en humanos, entre la apófisis transversa de la 2^a y 3^a vértebra lumbar. El *V 23* es el punto *Shu* (punto de la espalda del Riñón), con efecto también sobre la glándula suprarrenal, los ovarios o los testículos.

Entre las indicaciones posibles en animales se encuentra el aumento de la libido en toros, la regulación de la función suprarrenal y corticotrópica, los trastornos del ciclo menstrual y la infertilidad de etiología ovárica, cojeras de las extremidades posteriores, debilidad y enfermedades crónicas.

B 6: según el sistema de transposición, este punto se encuentra situado en ovejas en una pequeña escotadura mediocaudal de la tibia, a unos dos dedos de distancia sobre el maléolo tibial.

Tiene aplicación en casos de desequilibrio hormonal por alteraciones funcionales del hígado o el páncreas; en casos de trastornos uterinos, sobre todo en vacas; de diarrea; de estados de debilidad general; para una recuperación más rápida tras enfermedades crónicas, en casos de anemia así como de alteraciones del conducto urinario.

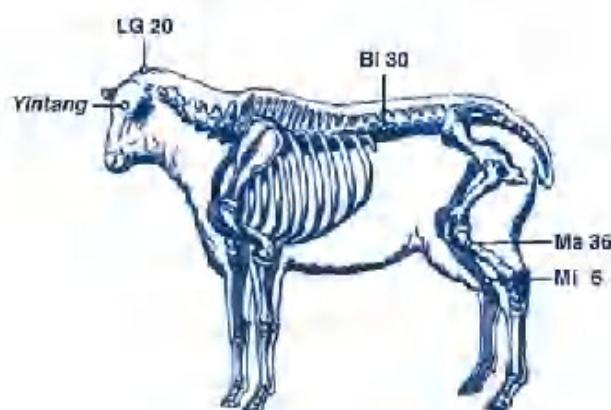


Fig. 1: Localización de los puntos de acupuntura empleados

- animales de los dos性
- en total tres razas (43 ovejas lecheras, 21 ovejas de raza *Steinschafe* y 13 ovejas de raza *Bergschafe*)

Una semana antes del experimento se afeitaron los puntos de acupuntura de todos los animales, con el fin de evitar la atenuación de la potencia del láser a través de la lana.

Los criterios de selección más importantes de los puntos de acupuntura fueron los siguientes:

- Indicación y experiencia de aplicación en medicina
- Indicación y experiencia de aplicación en veterinaria
- Practicabilidad en ovejas

Los autores acordaron utilizar los siguientes puntos: *Yintang*, *Du Mai 20*, bilateral: *E 36*, *B 6*, *V 23*. El rebaño se dividió en un grupo experimental formado por 39 animales (22 ovejas lecheras, 10 ovejas de raza *Steinschafe* y siete ovejas de raza *Bergschafe*) y un grupo de re-

ferencia con 39 animales (21 ovejas lecheras, 11 ovejas de raza *Steinschafe* y seis ovejas de raza *Bergschafe*).

En el grupo experimental se realizó antes del esquileo una estimulación indolora con un láser de diodo de los puntos de acupuntura definidos previamente.

La acupuntura láser se aplicó con un láser de diodo de 50 mW con «Hidden Monitor System». Este tipo de láser posee un diodo externo de monitorización dispuesto de tal forma que la posible luz reflejada no pueda incidir sobre el mismo. De esta forma el láser emite exactamente la potencia total establecida. En este modelo el tiempo de irradiación puede fijarse mediante un temporizador incorporado. Durante la radiación, el láser emite una señal luminosa y acústica que concluye con el apagado automático del láser, una vez transcurrido el tiempo fijado.

Los puntos escogidos se ubican según el sistema de transposición, es decir, se 'traducen' del organismo humano al del animal teniendo en cuenta las distintas condiciones anatómicas, y se irradian con una energía de 1 J/cm² (Fig. 1). Algunos puntos individuales coinciden en el sistema tradicional y en el de transposición, como el *V 23* y el *Du Mai 20*.



Fig. 2: Láser de diodo de 50 mW de la empresa Silberbauer utilizado para la acupuntura

Fig. 3: Acupuntura láser en el punto *Yintang*

Los animales del grupo experimental fueron capturados por separado justo antes del esquileo y se les aplicó la acupuntura láser en los puntos de acupuntura indicados ejerciendo una ligera presión sobre la piel con el puntero del láser. El láser se mantuvo durante 20 segundos en cada punto, lo que se corresponde con una dosis de energía de 1 J/cm² (Fig. 2 y 3).

En los animales del grupo de referencia el láser fue también activado y aplicado sobre la piel durante 20 segundos exactamente, sin embargo el rayo del láser se filtró totalmente colocando un capuchón protector en el orificio de salida del mismo (Fig. 4). El láser también se activó para los animales del grupo de referencia, y el temporizador integrado en el láser aseguró que se respetara exactamente la duración del tratamiento (de 20 segundos por punto de acupuntura). Cada animal, nada más capturado y tratado con el láser, fue conducido por separado a la zona de esquileo, donde se llevó a cabo el mismo.

Todas las muestras de heces fueron extraídas del recto del animal con

ACUPUNTURA LÁSER EN OVEJAS

un guante de un solo uso, a fin de poder identificar cada muestra inequívocamente. A continuación las muestras contenidas en un recipiente para muestras fueron congeladas inmediatamente a -20 °C para evitar la interferencia de las enzimas bacterianas sobre la concentración de los metabolitos de los glucocorticoides [11]. La primera muestra fue extraída nada más completar el esquileo, tomándose como valor basal. Las extracciones subsiguientes de las muestras fueron realizadas seis, ocho, 10, 12 y 14 horas después, con el fin de registrar la elevación máxima de la concentración de los metabolitos de los glucocorticoides.

La extracción de los metabolitos de los glucocorticoides de las muestras fue realizada en el laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Veterinaria de Viena, al igual que la determinación de su concentración mediante un enzimoinmunoanálisis (EIA) desarrollado en este mismo departamento [7].

Análisis estadístico

Los distintos puntos temporales de medida (seis, ocho, 10, 12 y 14 horas tras el esquileo) fueron comparados respectivamente con el valor basal (es decir, la concentración de metabolitos de cortisol en las heces inmediatamente después del esquileo).

Debido a la asimetría de los datos se ha recurrido a procedimientos no paramétricos:



Fig. 4: Láser de diodo de 50 mW empleado para la acupuntura con el capuchón protector colocado

Dentro de los grupos se realizaron contrastes entre los puntos temporales de medida individuales y los valores basales a través del test de Wilcoxon para pares de datos igualados. Se comprobaron las diferencias existentes entre los grupos mediante el test de Wilcoxon para muestras independientes. Las comparaciones de los grupos se representaron en forma de diagramas de caja. El nivel de significación obtenido fue del 5%. Todos los análisis fueron realizados con el paquete de software estadístico SAS® Versión 8.2 (SAS Inst. Inc. Cary NC).

Resultados

Seis horas después del estrés por el esquileo aparece un aumento significativo de la concentración de los metabolitos de los glucocorticoides (mediana: 64,9 ng/g heces) en el grupo de referencia no irradiado con el láser. Por el contrario, en el grupo experimental no se produjo a las seis horas una elevación significativa de la concentración de los metabolitos de los glucocorticoides (mediana: 6,6 ng/g heces).

El análisis de la concentración de los metabolitos de los glucocorti-

coides tras ocho, 10, 12 y 14 horas reveló un aumento significativo en ambos grupos, y por tanto no se apreciaron diferencias entre los animales irradiados con láser y los no irradiados (Fig. 5, Tab. 1).

Discusión

El análisis estadístico muestra en ambos grupos una elevación significativa de los metabolitos del cortisol producida por el estrés del esquileo.

Tan sólo seis horas después del esquileo aparece una diferencia significativa entre el grupo experimental tratado con láser (en el que se apreció una elevación de la concentración de metabolitos del cortisol notablemente inferior) y el grupo de referencia no tratado.

Además, el efecto de la acupuntura láser sobre la motilidad intestinal (por ejemplo, en el punto B 6) ha podido ser importante, y por consiguiente haber producido una excreción retardada a las heces de los metabolitos del cortisol.

Puesto que a las 10 horas los valores de ambos grupos fueron prácticamente coincidentes, el tiempo de

TABLA 1 Aumento de la mediana de los metabolitos de los glucocorticoides en heces por el esquileo en relación con el valor basal.

Tratamiento	n	Mediana tras 6 h (ng/g heces)	Mediana tras 8 h (ng/g heces)	Mediana tras 10 h (ng/g heces)	Mediana tras 12 h (ng/g heces)	Mediana tras 14 h (ng/g heces)
Con láser	39	6,6	49,8	252,6	285,6	363,9
Sin láser	38	64,9	141,8	263,3	263,6	338,6

tránsito intestinal debió haberse acelerado de nuevo posteriormente. No obstante, este aspecto debe investigarse más minuciosamente dedicándole un trabajo propio.

La toma de muestras de las heces se realizó directamente de la ampolla rectal del animal debido a la necesidad de asignación inequívoca. Puesto que el estrés no se manifiesta hasta unas 10 horas más tarde en forma de concentración máxima de metabolitos de cortisol en las heces, es de suponer que los resultados de este experimento apenas se han visto afectados por la toma de las muestras. La recogida de las muestras de heces del suelo hubiera influido aún menos sobre los resultados, pero entonces la asignación inequívoca clara hubiera sido muy difícil de realizar.

El análisis estadístico de los subgrupos en cuanto a otros posibles factores condicionantes como la raza, la edad, el sexo y el estado

de gestación no obtuvo diferencias significativas.

Como el experimento fue realizado en una sesión de esquileo, los animales fueron esquilados en parte por esquiladores habituales y en parte por nuevos. Sin embargo, no se pudo demostrar una diferencia estadísticamente significativa entre los esquiladores. La influencia de las diferencias en el orden de precedencia de los animales para el esquileo no fue analizada. Entre otros posibles factores condicionantes, hay que considerar por un lado la selección de los puntos de acupuntura y por otro, la duración de la acción del láser y la intensidad de estimulación, puesto que las dosis de irradiación láser recogidas en la literatura son muy variables [10]. Además, el capuchón del extremo del láser también podría producir un efecto de acupresión, por su mayor superficie de contacto en comparación con la del extremo del láser. Los animales menos acostumbrados a los huma-

nos tuvieron que ser capturados y sujetados para aplicarles la acupuntura láser, por lo que se vieron expuestos al estrés antes de la acupuntura láser en sí misma. Para eliminar el estrés no deseado de las ovejas antes de la acupuntura láser sería interesante llevar a cabo un experimento con habituación previa de los animales al manejo necesario para aplicar la acupuntura láser. Es posible que la duración del efecto del láser no se mantuviera el tiempo suficiente, por lo que resultaría interesante realizar un experimento posterior aplicando de nuevo la acupuntura láser a las ovejas, a continuación del esquileo, cuando aún se encuentran inmovilizadas.

Conclusiones

A pesar de la diferencia significativa hallada después de seis horas entre el grupo experimental y el grupo de referencia no tratado con láser, no se puede establecer nin-

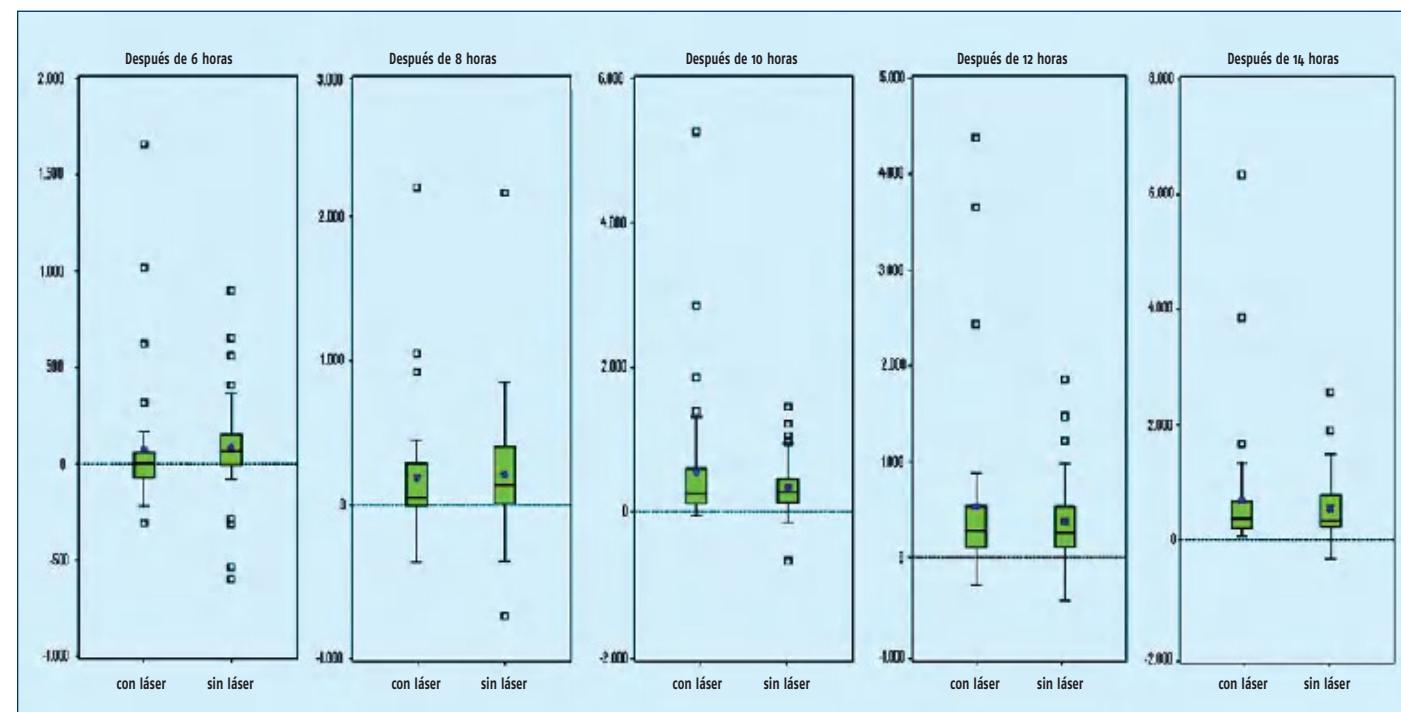


Fig. 5: Representación gráfica de la elevación relativa de la concentración de los metabolitos del cortisol en heces (ng/g heces) transcurridas 6, 8, 10, 12 y 14 horas del esquileo.

guna conclusión clara en cuanto al efecto que ejerce la acupuntura láser sobre la elevación de la concentración de metabolitos del cortisol en las heces de oveja.

Con el fin de aclarar la cuestión del tiempo de tránsito intestinal retardado o acelerado, podría realizarse una determinación del nivel sérico de cortisol antes e inmediatamente después del esquileo, así como a intervalos de tiempo específicos tras el mismo. Sin embargo, este método invasivo lleva asociado el riesgo de influencia sobre los valores séricos de cortisol debido a la ansiedad y el dolor asociados a la extracción de sangre.

Los experimentos futuros podrían incorporar un grupo de referencia sin tratamiento (para evaluar un posible efecto de acupresión por parte del láser desactivado) y un grupo de referencia con un patrón de puntos de acupuntura considerados no específicos. La acupuntura láser reiterada (antes y después del esquileo) podría arrojar luz sobre si el efecto del láser es tan sólo de corta duración. Otro factor importante a tener en cuenta en investigaciones posteriores sería la habituación de las ovejas, con anestesia al experimento, a las maniobras necesarias, con el objetivo de reducir al mínimo el estrés soportado antes de la acupuntura.

Agradecimientos

Agradezco mucho el apoyo económico prestado por el Instituto Ludwig Boltzmann de Acupuntura y el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Veterinaria de Viena. Hago extensible mi agradecimiento también al Prof. Dr. Erich Möstl, del Departamento de Bioquímica (Sección de Ciencias) de la

Resumen

En el presente estudio controlado con placebo debía determinarse si la acupuntura láser es capaz de minimizar el estrés que soportan las ovejas durante el esquileo. Como marcador del grado de estrés se analizó el nivel de cortisol en las heces de las ovejas. Se tomó como valor basal la determinación realizada inmediatamente tras el esquileo, y se comparó a continuación con los valores obtenidos a las seis, ocho, 10, 12 y 14 horas. Tan sólo el valor obtenido a las seis horas mostró una elevación del nivel de cortisol significativamente inferior en los animales irradiados con láser, en comparación con el grupo del placebo. Puesto que, sin embargo, la elevación máxima no es detectable hasta transcurridas 10 horas del estrés, no se puede sacar ninguna conclusión clara del presente estudio sobre el efecto de la acupuntura láser.

Universidad de Veterinaria de Viena y a la Prof. Dr. Barbara Schneider, Departamento de Estadística Médica de la Universidad de Viena. Asimismo, mi más cordial agradecimiento a la empresa Silberbauer de Viena, y especialmente al Sr. Ing. Georg Haider por haber puesto amablemente a nuestra disposición el instrumento láser.

Finalmente, mi gratitud también para el Dr. Maximilian Dobretsberger, director de la finca de prácticas e investigación de la Universidad de Veterinaria de Viena y el Sr. Elmar Draxler, así como para los jefes de la sesión de esquileo Markus Jereb y Klaus Feichtinger, y los numerosos voluntarios que nos ayudaron, gracias por su excelente colaboración.

Referencias bibliográficas

1. Chuan Y. Traditional Chinese Veterinary Acupuncture and Moxibustion. Beijing, China: Agriculture Press, 1995
2. Fassoulaki A, Paraskeva A, Patris K, et al. Pressure applied on the extra 1 acupuncture point reduces bispectral index values and stress in volunteers. *Anesth. Analg.* 2003; 96:885-90
3. Hargreaves AL, Hutson GD. The stress response in sheep during routine handling procedures. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1990a; 26:83-90
4. Hargreaves AL, Hutson GD. Changes in heart rate, plasma cortisol and haematocrit of sheep during a shearing procedure. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1990b; 26:91-101
5. Kothbauer O. Veterinary Acupuncture. München: Zweimühlen Verlag, 1999
6. Middlekauff HR, Yu JL, Hui K. Acupuncture effects on reflex responses to mental stress in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001; 280,5:R1462-R1468
7. Möstl E, Maggs JL, Schötter G et al. Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Vet. Res. Commun.* 2002; 26:127-139
8. Palme R, Robia C, Messmann S et al. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 1999; 86:237-241
9. Taylor W. The excretion of steroid-hormone metabolites in bile and feces. *Vitam. Horm.* 1971; 29:201-285
10. Whittaker P. Laser acupuncture: past, present, and future. *Lasers in Medical Science* 2004; 19:69-80
11. Winter J, Brokkenheuser VD, Ponticorvo L. Bacterial metabolism of corticoids with particular reference to 21-dehydroxylation. *J. Biol. Chem.* 1979; 254:2626-2629



Dirección de correspondencia

Mag. Vet. Med. Evelyn Lexen
Achleiten 34
A-4531 Kematen an der Krems
Tel.: +43 (0) 72 28 / 64 60
Fax: +43 (0) 72 28 / 64 60 25
evelyn.lexen@pollex-lc.com