

Artículo científico

Influencia del estrés calórico sobre los glóbulos blancos en vacas Holando Argentino

Influence of heat stress on white blood cells in Holando Argentino cows

F. Tolini^{1*}; G. Fernández²; N. Mayer³; L. Maiztegui²; G. Muñoz²; C. Pagni¹; N. Rodríguez³

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Bv. Ovidio Lagos 1000, (2170), Casilda, Santa Fe, Argentina. *E-mail: pooli-tolini@knett.com.ar

² Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina.

³ Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Resumen

La combinación de altas temperaturas y humedad, características de la provincia de Santa Fe, principal zona de producción lechera de Argentina, afectan la producción láctea. El índice de temperatura y humedad (ITH) puede ser utilizado como un indicador de estrés térmico. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos del estrés calórico sobre los glóbulos blancos en respuesta a la liberación de cortisol en bovinos productores de leche. El estudio se realizó en el Módulo Tambo de la Facultad de Ciencias Agrarias, situado en Zavalla (33°1'S, 60°53'O), Santa Fe, Argentina, durante el período 2013-2014. Se utilizaron 30 vacas Holando Argentino, del rodeo de vacas en ordeño de segunda y tercera lactancia. Las muestras fueron tomadas en primavera (ausencia de olas de calor) y verano (presencia de olas de calor), durante el ordeño de la mañana y de la tarde. Se utilizó un método de radioinmunoanálisis para dosar cortisol, (Kit comercial Coat-A-Count Cortisol); un contador hematológico, MINDRAY-BC 2800, para determinar la cantidad total de glóbulos blancos, y la coloración de May Grünwald y Giemsa para determinar la cantidad de neutrófilos y linfocitos. Se observó aumento del ITH en las tardes de verano, coincidiendo con un aumento significativo de cortisol, una disminución relativa del número de linfocitos y un aumento del número de neutrófilos. La relación Neutrófilos/Linfocitos también fue mayor en verano. Se concluye que el estrés calórico, medido a través del ITH, modifica el número y la proporción de glóbulos blancos, y esto podría atribuirse al aumento del cortisol plasmático.

Palabras clave: Estrés térmico; Cortisol; Glóbulos blancos.

Abstract

The combination of high temperature and humidity, characteristic of the province of Santa Fe, the main dairy production area in Argentina, affects dairy production. The Temperature and Humidity Index (ITH) may be used as an indicator of heat stress. The aim of this investigation was to evaluate heat stress effects on white blood cells in response to the release of plasma cortisol in dairy bovines. The study was carried out in the Milking Parlor Module of the Facultad de Ciencias Agrarias, located at Zavalla (33° 1' S, 60° 53' O) during 2013-2014 period. Thirty Holando Argentino dairy cows from second and third lactation milking group were used. Samples were taken during spring (no heat waves) and summer (presence of heat waves) during morning and afternoon milkings. A radioimmunoassay method to dose cortisol was used (Coat-A-Count Cortisol, commercial kit), a blood cell counter (MINDRAY-BC 2800) was used to determine white blood cell total count, and May Grünwald Giemsa stain to determine neutrophil and lymphocyte count. An ITH increase during summer afternoons in coincidence with a significant increase of cortisol levels was observed, a relative decrease in lymphocyte count and an increase in neutrophil count were seen. The neutrophil/lymphocyte ratio also showed a significant increase in summer. It is concluded that heat stress measured by ITH modifies the number and proportion of white blood cells and this could be attributed to plasma cortisol increase.

Keywords: Heat stress; Cortisol; White blood cells.

Introducción

En los sistemas de producción lechera de Ar-

gentina, los animales están expuestos permanentemente a condiciones ambientales extremas que los afectan directamente modificando sus respues-

Recibido 08/06/16; Aceptado 23/06/17.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

tas fisiológicas y productivas. Los factores físico-ambientales que afectan al ganado comprenden la temperatura del aire, la humedad relativa, la velocidad del viento, las precipitaciones y la presión atmosférica los cuales interactúan en forma compleja. La temperatura ambiente es la variable más utilizada como indicador de estrés y el promedio de la temperatura ambiente es generalmente considerado como la principal medida térmica utilizada para estimar el confort del animal (Da Silva, 2006). Por su parte, los principales efectos de la humedad relativa están asociados a una reducción de la efectividad en la disipación del calor por sudoración y respiración (Blackshaw y Blackshaw, 1994; Renaudeau *et al.*, 2001), reportándose que a temperaturas superiores a los 30°C, comienza a asumir un importante rol en los procesos evaporativos. En estas condiciones, el simple gradiente de presión de vapor no es suficiente para asegurar una adecuada evaporación. Es así como durante los meses cálidos, la acción combinada de elevada temperatura y humedad del aire determinan que el bovino se encuentre fuera de la zona de confort.

Para poder expresar en un solo valor la condición ambiental en la que el animal se encuentra se desarrolló un Índice de Temperatura y Humedad (ITH) que da cuenta de la temperatura y humedad a la que está sometido el animal. El ITH es un índice que corrige el valor de la temperatura con el grado de humedad, siendo un indicador objetivo del riesgo de padecer estrés por calor. Los rangos de ITH indican diferentes niveles de estrés calórico: bajo, leve, moderado o grave, y una vez ajustado con relación a otros factores climáticos (viento y radiación) resulta de utilidad para orientar las prácticas ganaderas. El ITH ha llegado a ser un estándar en las prácticas de manejo del ganado durante las últimas cuatro décadas (Khalifa, 2003; Gaughan *et al.*, 2008), existiendo a la fecha tablas y rangos que permiten predecir eventuales riesgos de estrés.

Las olas de calor, definidas como un período anormalmente cálido y usualmente húmedo que en general duran entre días y semanas, provocan en el animal un agotamiento crónico por la falta de confort y las escasas posibilidades de recuperarse. Existe numerosa evidencia científica de que el estrés térmico, esto es, el estrés provocado por temperaturas que superan los umbrales que los animales son capaces de soportar (MAFF, 2000), incrementa la morbilidad y mortalidad del ganado.

Existen diversos antecedentes de la magnitud e

impacto de las olas de calor en la cuenca central de la provincia de Santa Fe, una de las principales zonas lecheras de Argentina. Un estudio sobre el régimen agroclimático de olas de calor (ITH superior a 72) durante 3 a 5 días consecutivos realizado en los alrededores de la ciudad de Rosario, durante el período 1974-2004, mostró que el período normal con olas de calor abarcó 3,6 meses, pudiendo prolongarse hasta 3 meses más, ocurriendo la mayoría de los casos entre principios de noviembre y mediados de marzo (Valtorta, 2008). En los alrededores de Rafaela, se comprobó durante el período 2000-2005 un impacto negativo sobre el volumen de leche entregado a la industria (Leva *et al.*, 2008). En dicho estudio se utilizó como indicador ambiental de estrés térmico el ITH teniendo en cuenta el período de recuperación nocturno como una importante variable de los resultados obtenidos (Leva *et al.*, 2008). Otros autores demostraron que las olas de calor en la región de influencia de la localidad de Zavalla han aumentado su frecuencia en forma significativa, no así su intensidad ni su duración (Montero Bulacio y Coronel, 2012), influyendo directa o indirectamente sobre los sistemas de producción lecheros de la zona.

La influencia negativa del estrés calórico sobre la calidad de la leche fue observado en los departamentos centrales de la cuenca lechera santafesina, donde se registraron importantes variaciones estacionales, con menor calidad en la composición de la leche durante el verano (Weidman *et al.*, 2002). Por ejemplo, Martínez *et al.* (2010) utilizaron el ITH para estudiar el impacto del estrés calórico sobre la producción de leche durante el período 2000-2009 en el Módulo Tambo del Campo Experimental Villarino de Zavalla y demostraron que, durante todos los años analizados, la relación entre la producción de leche y el índice ITH fue siempre negativa, es decir, ante un aumento en la humedad relativa y la temperatura, disminuyó la producción de leche.

La caracterización de la ocurrencia de condiciones meteorológicas estivales de distinta severidad y su impacto sobre respuestas productivas efectuadas en la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía de Salto (Uruguay), en el período diciembre 2005 - febrero 2006, permitió comprobar modificaciones tanto en términos de producción de leche como en la cantidad de grasa butirosa y proteína, debido a que las vacas no lograron mantener la temperatura corporal interna dentro del rango de termo neutralidad. Sin embargo, cuando

las altas temperaturas y humedad diurnas se alteraron con noches de menor ITH, como ocurrió durante olas de calor leve, no observaron diferencias en la producción de vacas lecheras sometidas a elevadas temperaturas diurnas (32 a 38°C) pero mantenidas a temperaturas nocturnas relativamente bajas (menores a 24°C). Estas diferencias explican la posibilidad de recuperación nocturna de la normotermia que permitió a los animales afrontar el estrés calórico durante el día, minimizando de esta forma los efectos perjudiciales sobre la productividad. (Saravia *et al.*, 2011).

Recientes investigaciones desarrolladas en el Módulo Tambo del Campo Experimental Villarino de Zavalla durante las estaciones de verano 2011-2012 y 2012-2013, donde se analizaron algunos componentes de la leche: grasa butirosa, proteínas, lactosa, sólidos no grasos y células somáticas, evidenció los perjuicios del estrés calórico sobre la glándula mamaria arrojando una alteración en el recuento de estas últimas (Maiztegui *et al.*, 2012). Los mismos autores investigaron el impacto negativo de las olas de calor sobre el bienestar y la salud de los animales, a través de la evaluación de parámetros sanguíneos: creatinina, urea, proteínas totales y albúmina, hematocrito, recuento de leucocitos y cociente neutrófilos-linfocitos en bovinos de leche durante las olas de calor (Muñoz *et al.*, 2013).

Es indudable que la relación entre los animales y el medio ambiente que los rodea es un pilar básico para el logro de una producción sostenible y el desafío permanente es evaluar el efecto directo de las variables medioambientales en el desempeño productivo y en el comportamiento del animal. El bovino, en comparación con otras especies, es más vulnerable a sufrir estrés calórico debido al reducido tamaño de los pulmones y, especialmente en las razas europeas, al escaso desarrollo y diferente distribución respecto a razas de clima tropical de las glándulas sudoríparas. Las principales alteraciones fisiológicas que se observan al examinar un bovino estresado son: aumento de las frecuencias respiratoria y cardíaca, y elevada temperatura corporal. Estas modificaciones reflejan la puesta en marcha de algunos de los mecanismos que utiliza el animal para eliminar el excedente de calor, aunque el éxito dependerá en gran parte de la humedad ambiental. Cuánto más alta es la humedad más se dificulta la disipación del calor a través de la piel y de las vías respiratorias, presentando en casos de estrés calórico importantes alteraciones

en su medio interno que aumentan significativamente las posibilidades de enfermedad y muerte.

La respuesta al estrés está controlada por los tres sistemas encargados de mantener la homeostasis: el sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmune. Según Morberg y Mench (2000), la primera respuesta e indudablemente la de menor costo biológico es la conductual. La segunda respuesta o línea de defensa durante el estrés la establece el sistema nervioso autónomo, los resultados son cambios en la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la frecuencia respiratoria, la temperatura corporal y la actividad gastrointestinal. Esta respuesta del sistema nervioso autónomo produce efectos sobre los sistemas biológicos que se caracterizan por su corta duración.

Las respuestas de efecto amplio y duradero están a cargo de las hormonas secretadas por el sistema neuroendocrino del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, (HHA). La activación del componente de la hipófisis del eje HHA puede ser mediado por varias hormonas neuroendócrinas, y culmina con la liberación de glucocorticoides y cortisol por la corteza adrenal (Morberg y Mench, 2000). Por último, el sistema inmune también se ve afectado por el estrés lo cual compromete la salud del individuo.

En bovinos ante situaciones de estrés se observa una alteración de los niveles de cortisol circulante (Myoung-Hoo *et al.*, 2011). A pesar de su variabilidad y corta vida, el cortisol, es uno de los biomarcadores más utilizados para evaluar el estrés experimentado por animales. Este glucocorticoide puede actuar incrementando el número y el porcentaje de neutrófilos (neutrofilia), mientras que decrecen los linfocitos (linfopenia o linfocitopenia). Es así como su uso como indicadores de estrés calórico fue analizado en el sur de Santa Fe durante el período 2011-2013.

En base a lo expuesto, este trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos del estrés calórico sobre los leucocitos en respuesta a la liberación de cortisol plasmático en bovinos productores de leche.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Módulo Tambo de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (FCA-UNR), situado en la localidad de Zavalla (33°1'S, 60°53'O) durante el período 2013-2014.

Características del rodeo

El rodeo del cual se tomaron los individuos para extraer las muestras, está compuesto por animales de raza Holando Argentino: 100 vacas en ordeño, 20 vacas secas, 2 toros y las hembras de reposición. El sistema en su totalidad ocupa 135 has, subdividido en 9 lotes de 15 has promedio cada uno. El Módulo Tambo está integrado a un sistema de producción mixto, con siembra de pasturas, verdes, maíz y soja. A lo largo del año se producen aproximadamente 2.500 litros diarios, en promedio, unos 25 litros diarios por vaca. Las vacas producen más de 7.500 litros por cada lactancia, alcanzando más de 35 litros por día al principio de la lactancia y cerca de 10 litros por día cuando se secan, antes del próximo parto. Las vacas paren una vez por año, están 10-11 meses produciendo leche y se secan 2 meses antes del parto. Durante el ordeño se suplementa alimento según el sistema de gestión del rodeo (ALPRO®). Se ordeña dos veces por día, aproximadamente cada 12 horas, variando el horario según la estación del año. Para este estudio se utilizaron 30 vacas en ordeño de segunda y tercera lactancia las cuales fueron seleccionadas del total de vacas en forma aleatoria, las muestras de sangre se tomaron durante dos estaciones bajo condiciones climáticas distintas: primavera, sin olas de calor en condiciones de termoneutralidad con un ITH menor a 72, y verano, con olas de calor en situaciones de estrés térmico con un ITH mayor a 72.

Índice Temperatura-Humedad (ITH)

El ITH se calculó con la ecuación: $ITH = 1,8T + 32 - (0,55 - 0,55HR) * (1,8T - 26)$ que relaciona temperatura ambiental (T) y humedad relativa del aire (HR) utilizando los registros de la Estación Agrometeorológica de Zavalla.

Para definir la ocurrencia de olas de calor se calcularon los valores de ITH de ambas estaciones; luego, sobre cada período de ola de calor se calcularon los promedios de ITH correspondientes a las 10 horas anteriores a cada muestreo de sangre para obtener un valor promedio representativo de la influencia de las condiciones climáticas sobre la fisiología animal. Posteriormente, para interpretar los resultados se establecieron cuatro niveles de correspondencia entre el valor de ITH y el estrés térmico:

Bajo: ITH menor a 72 sin ocurrencia de desór-

denes fisiológicos.

Leve: ITH entre 72 y 78 con presencia de un desorden fisiológico que altera los parámetros fisiológicos; se afecta el bienestar animal y la producción puede verse disminuida si no se toman medidas para el manejo y la nutrición de los animales.

Moderado: ITH entre 78 y 82, instancia en la que se produce una importante desviación de la energía que ingresa con la dieta para controlar la temperatura corporal; hay ocurrencia de mastitis subclínicas y una importante disminución de la ingesta.

Grave: ITH mayor a 82, en este caso los mecanismos adaptativos colapsan y se altera significativamente el desempeño productivo; los trastornos metabólicos favorecen la ocurrencia de enfermedades y pueden desencadenar la muerte. Se consideró que los animales estaban sometidos a olas de calor cuando el ITH se sostuvo durante 3-5 días consecutivos con valores mayores a 72.

Toma de muestras y determinación de los niveles de cortisol en sangre

A cada animal, luego del ordeño y mientras comía la ración suplementaria en el brete de la sala de ordeño, se le extrajo un volumen aproximado de 3 ml de sangre de la vena coccígea, usando una jeringa de 5 ml con aguja 25/8, rotulada con el RP (registro particular) del animal, que contenía 0,5 ml de heparina sódica de 5000 UI/ml (Riveparin). Las muestras de la primavera se tomaron el 17 de noviembre y las del verano el 17 de diciembre. Las muestras correspondientes a la mañana se tomaron entre las 7:00 y 8:30 h mientras que las de la tarde, entre las 17:00 y 18:30 h, en coincidencia con la rutina de ordeño.

Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 1.500 rpm. Se extrajo el plasma, con pipeta Pasteur, y se colocó una alícuota de 1 ml en un Eppendorf, rotulado con fecha de extracción y RP animal. El procedimiento se hizo por duplicado y se los almacenó en un frízer a -70°C. Las determinaciones se realizaron utilizando el método de cuantificación, radioinmunoanálisis (RIA), a través de un Kit comercial: Coat-A-Count Cortisol, que contiene tubos con menos de 5,5 microcuris (204 kilobequerelios) de cortisol marcado con ¹²⁵I radioactivo, en el laboratorio del departamento de Biología Molecular de la Facultad de Cs. Agrarias y Veterinaria de Río Cuarto.

Determinación de la cantidad de glóbulos blancos, cantidad de neutrófilos, linfocitos y relación neutrófilos/linfocitos

Inmediatamente después de la extracción de la muestra de sangre para dosar cortisol, al mismo animal y en las condiciones ya descritas, se le extrajeron nuevamente 2,5 ml de sangre de la vena coccígea, con una jeringa de 5 ml con aguja 19 G x 11/2 = 40 x 1.1. La sangre se introdujo en un tubo rotulado con el RP del animal, que contenía 25 µl de anticoagulante comercial GTLab (EDTA), se tapó y se homogeneizó suavemente. Se utilizó el contador hematológico MINDRAY-BC 2800, con un programa especial para determinar la cantidad total de glóbulos blancos. Para determinar la cantidad de neutrófilos y linfocitos se realizó una coloración de May Grünwald y Giemsa.

Análisis de los datos

Se realizó el análisis exploratorio correspondiente a las variables en estudio y su distribución para seleccionar así las pruebas adecuadas para los análisis a realizar. Se decidió utilizar la prueba no paramétrica de Wilcoxon para comparar los valores de la mañana y de la tarde entre primavera y verano, y entre la mañana y la tarde dentro de una misma estación. Para la obtención de las correlaciones entre los valores de cortisol y la relación N/L se realizó la prueba de Spearman en cada comparación, todos con un nivel de significancia del 5 %. Se utilizó el programa estadístico R (R Core Team, 2016).

Resultados

Los valores de ITH (Figura 1) fueron bajos durante las mañanas, mientras que, por las tardes alcanzaron a superar el límite que define la ocurrencia de ola de calor (3 a 5 días consecutivos con ITH > 72). Los niveles plasmáticos de cortisol obtenidos durante las mañanas de primavera fueron similares a los veranos (Figura 2, W = 7; p = 0,1484). Sin embargo, al comparar los valores de las tardes de primavera con las tardes de verano, estos últimos resultaron ser significativamente mayores; es decir, cuando los animales estuvieron expuestos a situaciones de estrés térmico debido a la ocurrencia de olas de calor que alcanzaron valores de ITH superiores a 80 (Figura 3, W = 45; p = 0,0039).

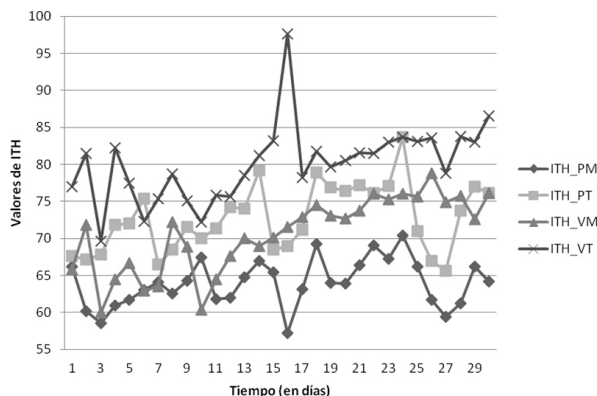


Figura 1. Índice de Temperatura y Humedad (ITH) basado en los valores registrados por la Estación Agrometeorológica de Zavalla, en las mañanas y tardes de primavera y verano durante 2014.

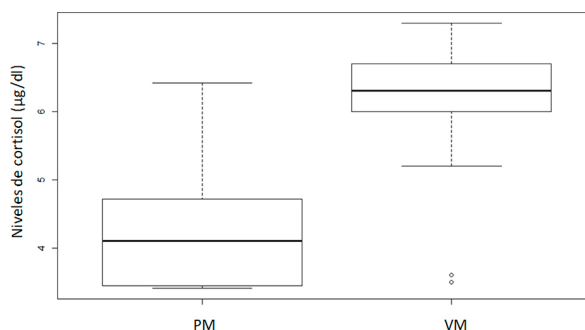


Figura 2. Niveles plasmáticos de cortisol expresados en µg/dl correspondiente a las mañanas de primavera (PM) y de verano (VM) (prueba no paramétrica de Wilcoxon; W = 7; p = 0,1484).

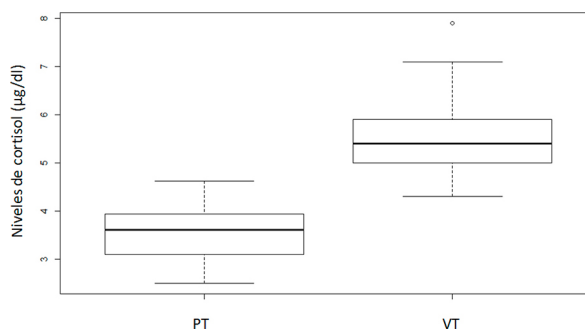


Figura 3. Niveles plasmáticos de cortisol expresados en µg/dl correspondientes a las tardes de primavera (PT) y de verano (VT) (prueba no paramétrica de Wilcoxon; W = 45; p = 0,0039).

El porcentaje de neutrófilos registrado en las mañanas de verano fue significativamente mayor a los valores de primavera (Figura 4, W = 55; p = 0,0057). Por su parte, los valores del muestreo de las tardes indicaron un aumento significativo en los valores de verano (Figura 5, W 65; p = 0,0038).

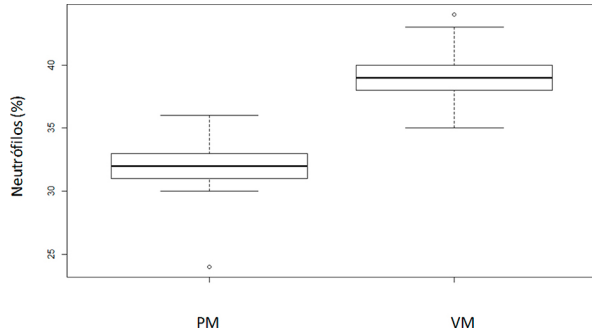


Figura 4. Porcentaje de neutrófilos en bovinos durante las mañanas de primavera y verano (PM y VM) (prueba no paramétrica de Wilcoxon $W = 55$; $p = 0,0057$).

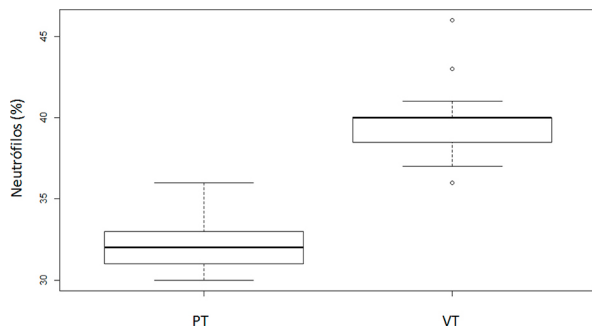


Figura 5. Porcentaje de neutrófilos en bovinos durante las tardes de primavera y verano (PT y VT) (prueba no paramétrica de Wilcoxon; $W = 65$; $p = 0,0038$).

Por su parte, al comparar las cantidades de linfocitos (Figura 6) resulta que los valores obtenidos de animales muestreados en la mañana de verano son menores que los valores obtenidos en los muestreados en la mañana de primavera ($W=55$; $p = 0,0055$).

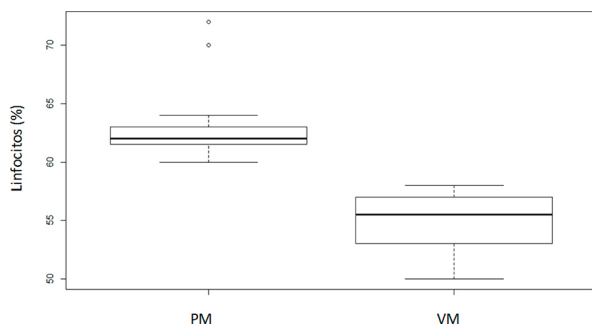


Figura 6. Porcentajes de linfocitos en bovinos durante las mañanas de primavera y de verano (PM y VM) (prueba no paramétrica de Wilcoxon; $W = 55$; $p = 0,0055$).

De igual modo, al comparar las cantidades de linfocitos (Figura 7), se observó una disminución significativa en las tardes de verano con respecto a las tardes de primavera ($W = 66$, X ; $p = 0,0038$).

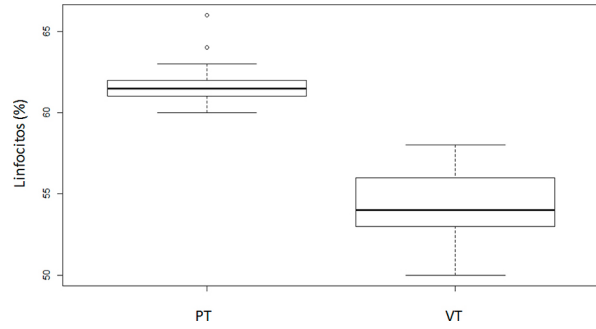


Figura 7. Porcentajes de linfocitos en bovinos durante las tardes de primavera y de verano (PT y VT) (prueba no paramétrica de Wilcoxon; $W = 66$; $p = 0,0038$).

Al comparar la relación Neutrófilos/Linfocitos, se observó un aumento de dicha relación en las tardes de ambas estaciones (Figura 8, $W = 55$; $p = 0,0059$ y Figura 9, $W = 66$; $p = 0,0038$).

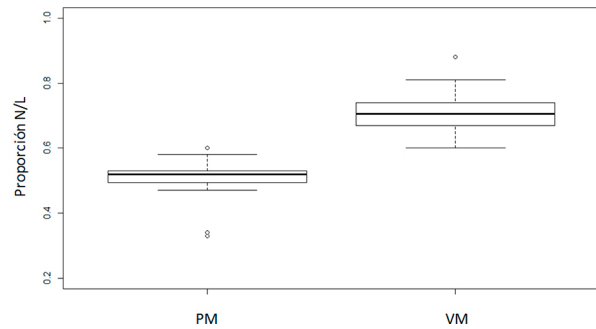


Figura 8. Relación Neutrófilos/Linfocitos obtenida en bovinos durante las mañanas de primavera y de verano (PM y VM) (prueba no paramétrica de Wilcoxon; $W = 55$; $p = 0,0059$).

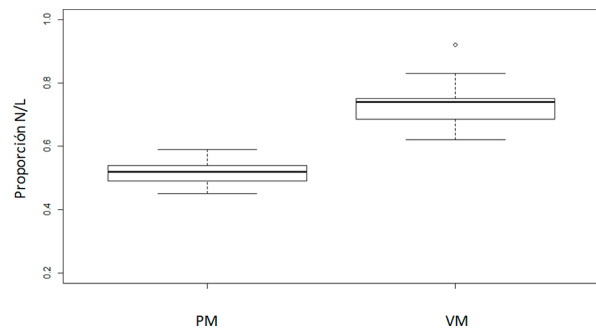


Figura 9. Relación Neutrófilos/Linfocitos obtenida en bovinos durante las tardes de primavera y de verano (PT y VT) (prueba no paramétrica de Wilcoxon; $W = 66$; $p = 0,0038$).

Los resultados obtenidos de los análisis de correlación entre cortisol y la relación Neutrófilos/Linfocitos (N/L) para las dos estaciones y los dos momentos del día (Figuras 10 a 13) indicaron que no existe una correlación entre las variables.

Los coeficientes de correlación oscilaron entre -0.085 a -0.31, con un p-valor mayor a 0,05.

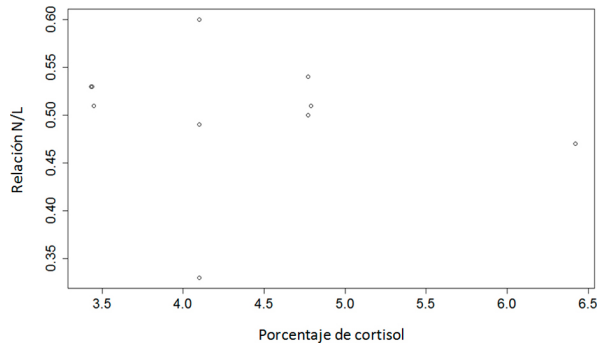


Figura 10. Gráfico de correlación cortisol vs. relación N/L para las mañanas de la primavera de 2014. Valor de correlación $r = -0,328$; $p > 0,05$.

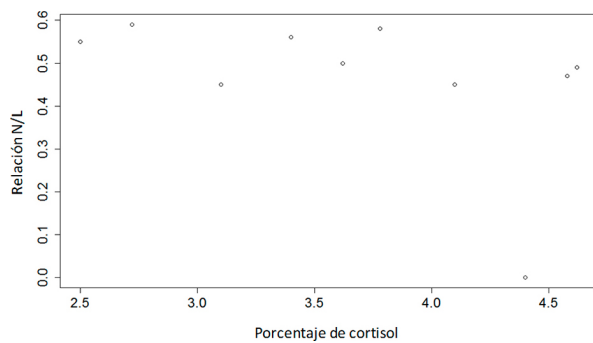


Figura 11. Gráfico de correlación cortisol vs. relación N/L para las tardes de la primavera 2014. Valor de correlación $r = -0,49$; $p > 0,05$.

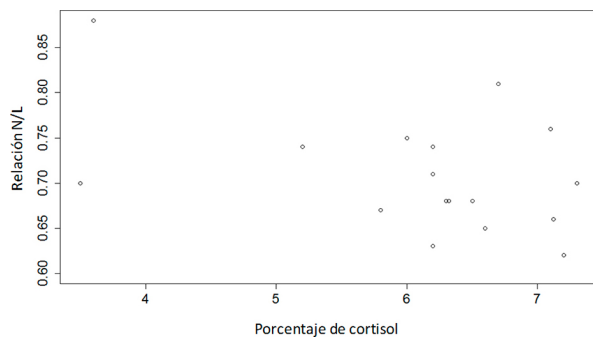


Figura 12. Gráfico de correlación cortisol vs. relación N/L para las mañanas del verano de 2014. Valor de correlación $r = -0,31$; $p > 0,05$.

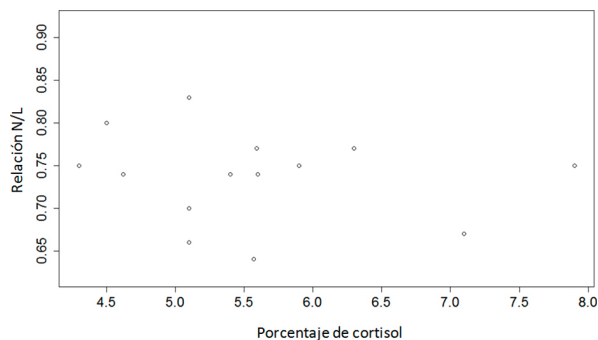


Figura 13. Gráfico de correlación cortisol vs. relación N/L para las tardes de verano de 2014. Valor de correlación $r = -0,085$; $p > 0,05$.

Discusión

En este trabajo se analizó el efecto de las olas de calor en los niveles de cortisol y la relación N/L en vacas Holando Argentino en una zona de producción lechera de Argentina. Mediante la estimación del ITH, se determinó que en verano, en especial por las tardes, había ocurrencia de olas de calor. Como respuesta a estas condiciones los animales experimentaron un incremento de los niveles de cortisol en sangre y de la cantidad de neutrófilos y un descenso en la cantidad de linfocitos; hecho que se evidenció en diferencias entre primavera y verano. Esta respuesta al estrés, está mediada por el sistema endócrino a través de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

Los valores de cortisol plasmático en animales sometidos a estrés calórico fueron mayores que cuando no estuvieron bajo dichas condiciones. Lo observado coincide con los resultados reportados por Christison y Johnson (1972) donde animales expuestos a temperaturas de 35°C mostraron, luego de 20 minutos, que la concentración de cortisol plasmático aumentó para, después de 2 a 4 horas, alcanzar un valor estable. Estos autores comprobaron que la secreción de cortisol estimula ajustes fisiológicos que permiten al animal tolerar el estrés causado por un calor excesivo. Los valores de cortisol plasmático encontrados en condiciones de termo neutralidad resultaron semejantes a las concentraciones plasmáticas promedio, citadas por otros autores (Termeulen *et al.*, 1981); los valores máximos hallados en animales sometidos a estrés térmico fueron más elevados en horas de la mañana que en horas de la tarde, presentando también un ritmo de secreción circadiano. Las variaciones en el ritmo de secreción de cortisol observadas en este trabajo coinciden con lo reportado por diversos autores (Thun *et al.*, 1981; Lefcourt *et al.*, 1993; Cunningham, 1999; Ogino *et al.*, 2014).

El estrés modificó la proporción relativa de los neutrófilos, con valores más elevados en condiciones de estrés térmico. Esta neutrofilia, característica de un leucograma en bovinos sometidos a condiciones de estrés, se debería a un aumento de las concentraciones de cortisol producidas durante el estrés agudo como reportan Best y Taylor (1996), Coles (1989), Kaneko (1989) y Gómez Piquer (1992); donde se muestra que en condiciones de estrés, se producen elevaciones de los neutrófilos, disminución de los linfocitos y de los eosinófilos. Los glucocorticoides estimulan el flujo de neutró-

filos desde la médula ósea hacia la sangre. Esto atenúa el paso de los neutrófilos hacia otros compartimentos, generando neutrofilia, que consiste en un incremento de neutrófilos maduros e inmaduros en la circulación sanguínea. Estos cambios aseguran que los diferentes tipos de células sean dirigidas a los tejidos donde se requieren durante el estrés (Romero Peñuela *et al.*, 2011).

Con respecto a los linfocitos, si bien se observó una disminución de los valores en verano con relación a la primavera, fue significativa al comparar las muestras extraídas de la tarde. Esta disminución del porcentaje de linfocitos característica del leucograma observado en bovinos sometidos a condiciones de estrés, es un fenómeno descrito por diversos autores atribuido a un aumento de las concentraciones de cortisol por la estimulación del eje HHA durante el estrés térmico. La demostración de que los linfocitos contienen receptores de glucocorticoides que son regulados en respuesta al estrés (Odore *et al.*, 2004) sugiere que las variaciones en los valores encontrados tendrían relación con la magnitud del factor causante de estrés y la concentración de glucocorticoides circulantes.

Como consecuencia del aumento de los neutrófilos y la disminución relativa de los linfocitos, ocasionados por la elevación del cortisol plasmático, hubo un aumento significativo de la relación N/L en los animales muestreados entre ambas estaciones.

Por último, al correlacionar el cortisol plasmático con la relación N/L en condiciones de termo neutralidad y estrés térmico con ITH menor a 80 se obtuvo una correlación débil a moderada; por el contrario, no hubo correlación cuando el ITH fue superior a 80, es decir, cuando la magnitud del factor causante de estrés fue suficiente para ocasionar un estrés térmico severo. Esto coincidiría con lo planteado por algunos autores sobre como varían las respuestas biológicas frente a diferentes niveles de estrés, donde para el caso particular del estrés severo se postula la aparición de otros mecanismos inmunomoduladores que afectarían la relación N/L inducida por el cortisol.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se corrobora que en situaciones de estrés calórico se modifican los niveles de cortisol plasmático. Este aumento, ocasionado por la activación del eje HHA, produce cambios sobre la cantidad de leucocitos y la re-

lación N/L. Estas variaciones en los subconjuntos de leucocitos y el aumento de los glucocorticoides, ante situaciones de estrés térmico, modificarían las acciones inmunomoduladoras, influyendo así en el funcionamiento del sistema inmune.

Referencias bibliográficas

- Best C.H., Taylor N. (1996). Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- Blackshaw J.K., Blackshaw A.W. (1994). Heat stress in cattle and the effect of shade on production and behavior. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 34 (2): 285-295.
- Christison G.I., Johnson H.D. (1972). Cortisol turnover in heat-stressed cows. *Journal of Animal Science* 35: 1005-1010.
- Coles E.H. (1989). *Veterinary Clinical Pathology*. Saunders, EE.UU.
- Cunningham J. (1999). *Fisiología Veterinaria*. Editorial Elsevier, España.
- Da Silva R.G. (2006). Weather and climate and animal production. En: http://www.agrometeorology.org/files-folder/repository/gamp_chap_11.pdf, consulta: junio 2017.
- Gaughan J.B., Mader T.L., Holt S.M., Lisle A. (2008). A new heat load index for feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 86: 226-234.
- Gómez Piquer J. (1992). *Manual Práctico de Análisis Clínico en Veterinaria*. Mira S.A., España.
- Khalifa H.H. (2003). Bioclimatology and adaptation of farm animals in a changing climate. En: *Interactions between climate and animal production*. Lacetera N. (Ed.). Wageningen Academic Publisher, Países Bajos. Pp. 15-27.
- Kaneko J.J. (1989). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, EE.UU.
- Kim M.H., Yang J.Y., Upadhya S.D., Lee H.J., Yun C.H., Ha J.K. (2011). The stress of weaning influences serum levels of acute phase protein, iron binding protein, inflammatory cytokines, cortisol and leukocytes subsets of in Holstein calves. *Journal of Veterinary Science*. 12 (2): 151-157.
- Lefcourt A.M., Bitman J., Kahl S. Wood D.L. (1993). Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76: 2607-2612.
- Leva P.E., García M.S., Rodríguez R.O., Valtorta S.E. (2008). Olas de calor y entregas diarias de leche en tambos de la cuenca lechera central argentina. *FAVE Sección Ciencias Agrarias* 7 (1-2): 97-103.
- MAFF. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. (2000). *Climate Change and Agriculture in the United Kingdom*. PB 4876, Summary A4.
- Maiztegui L., Coronel A., Amelong G., Gherardi S., Piza A., Muñoz G. (2012). Variación en la composi-

- ción de la leche en vaca Holando Argentino durante olas de calor. VI Jornadas de Ciencia y Tecnología. Difusión de la Producción Científica y Tecnológica de la UNR. 14 de noviembre, Rosario, Argentina. Pp. 318-322.
- Martínez M.J., Muñoz G., Bocca P., Gómez N., Escudé B., Escudé S., Castagnani L., Gaspard A. (2010). Influencia del estrés calórico en la producción lechera de la Facultad de Ciencias Agrarias (Zavalla). Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias, UNR. XI Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. 6 de agosto, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario, Casilda, Santa Fe, Argentina. Pp. 181-182.
- Montero Bulacio E., Coronel A. (2012). Caracterización y variabilidad climática de las olas de calor en Zavalla, Santa Fe. XIV Reunión Argentina de Agrometeorología. 17-19 de octubre, Malargue, Argentina. Pp. 85-86.
- Morberg G.P., Mench J.A. (2000). The biology of animal stress. Basic Principles and Implications for Animal Welfare. CABI Publishing. EE.UU.
- Muñoz G., Rondelli F., Maiztegui L., Gherardi S., Tolini F., Fernández G., Coronel A., Amelong J., Celoria F. (2013). Efectos de la ola de calor sobre la vaca Holando Argentino en el Módulo Tambo de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNR. Agromensajes 36: 8-12.
- Odore R., Dangelo A., Badino P., Bellino C., Pagliasso S., Re G. (2004). Road transportation affects blood hormone levels and lymphocyte glucocorticoid and beta-adrenergic receptor concentration in calves. The Veterinary Journal 168: 297-303.
- Ogino M., Matsura A., Yamazaki A., Irimajiri M., Suzuki Y., Kushibiki S., Singu H., Kasuya E., Hasegawa Y., Hodate K. (2014). Plasma cortisol and prolactin secretion rhythms in cattle under varying external environments and management techniques. Animal Science Journal 85: 58-68.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Renaudeau D., Quiniou N., Noblet J. (2001). Effects of exposure to high ambient temperature and dietary protein level on performance of multiparous lactating sows. Journal of Animal Science 79: 1240-1249.
- Romero Peñuela M.H., Uribe-Velásquez L.F., Sánchez Valencia J.A. (2011). Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. Biosalud 10 (1): 71-87.
- Saravia C., Astigarraga L., Van Lier E., Bentancur O. (2011). Impacto de las olas de calor en vacas lecheras en Salto (Uruguay). Agrociencia 15 (1): 93-102.
- Termeulen S.B., Butler W.R., Natzke R.P. (1981). Rapidity of cortisol transfer between blood and milk following adenocorticotropin injection. Journal Dairy Science 64: 2197-2200.
- 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: 2208-2212.
- Valtorta S.E., Leva P.E., García M.S., Rodríguez R.O. (2008). Régimen agroclimático de olas de calor en la provincia de Santa Fe, Argentina. FAVE Sección Ciencias Agrarias 7 (1-2): 131-136.
- Weidmann P.E., Thomas J.A., Heer G., Valtorta S.E., González A., Weidmann R.L., Zen G., Garneró O. (2002). Calidad de la leche producida en los departamentos centrales de la cuenca lechera santafesina. Composición química. FAVE Sección Ciencias Agrarias 1 (2): 25-38.