



75671

TOLINI, MARIA FERNANDA

Estres calórico en vacas holando argentinas.

2016

75671



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Tesis para acceder al título de Magister en
Anatomía y Fisiología Veterinaria

ESTRÉS CALÓRICO EN VACAS HOLANDO ARGENTINO

Med. Vet. María Fernanda Tolini

DIRECTOR: Prof. MSc. Griselda María del Carmen Muñoz

CO- DIRECTOR: Prof. MSc. Nora Mayer

Río Cuarto, Noviembre 2016

17058

170.4

MFI
Clasif:
T. 1085

73671

El presente trabajo fue realizado en el Módulo Tambo de la Facultad de Ciencias Agrarias (Zavalla) y en el Laboratorio Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Casilda) ambos pertenecientes a la Universidad Nacional de Rosario, y en el Departamento de Biología Molecular en el Área de Fisiología Animal, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Para optar por el título de Magister en Anatomía y Fisiología Veterinaria.

Jurado conformado por:

Prof. Dra. Lucía B. FUENTES

Dr. José M. RAVIOLO

Prof. Dra. Nancy RODRIGUEZ

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a un grupo de personas formidables que desde diferentes lugares y en situaciones diversas, siempre estuvieron brindándome su apoyo necesario e incondicional.

A mi esposo y mis hijos, por su paciencia y colaboración a lo largo del tiempo transcurrido.

A mi familia de Río Cuarto, quienes me brindaron su contención.

A Griselda, por su invaluable apoyo en la ejecución y dirección de este trabajo, y por su dedicación incondicional que me permitió llevar a cabo este desafío.

A Nora, por su confianza, por guiar mi investigación, sus valiosos aportes y sugerencias que contribuyeron al trabajo final.

A todos los integrantes del equipo de investigación, que me brindaron su apoyo desinteresado en el trabajo de campo.

Agradezco especialmente a Flavia y Silvina por permitirme trabajar en su laboratorio y con su experiencia enriquecieron mis conocimientos.

A los integrantes de la cátedra de Fisiología, por su colaboración, que me permitió disponer del tiempo necesario para la ejecución del trabajo.

A Gustavo, quien me puso en conocimiento de la carrera y me incentivó al cursado.

La **ciencia** será siempre **una búsqueda**, jamás un descubrimiento real. Es **un viaje**, nunca una llegada”

Karl Raiumd Popper

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona Adrenocorticotropina
AM	Ante Meridiano
ARN _m	Ácido Ribonucleico Mensajero
C ₄	Carbono 4
C ₅	Carbono 5
C ₁₁	Carbono 11
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
EDTA	Ácido Etilendiaminoacético
FCA	Facultad de Ciencias Agrarias
HHa	Hipotálamo Hipofisario Adrenal
HR	Humedad Relativa
ITH	Índice de Temperatura y Humedad
µg/L	Microgramo por Litro.
ng/ml	Nanogramos por Mililitro
N/L	Relación Neutrófilos Linfocitos
NSB	Unión no Específica
PM	Pasado meridiano
POMC	Pro-opiomelanocortina
RIA	Radioinmunoanálisis
RP	Registro Particular
rpm	Revoluciones por minuto
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
T	Temperatura
UNRC	Universidad Nacional de Río Cuarto
UNR	Universidad Nacional de Rosario
VP	Vasopresina

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Tipo general de respuesta biológica para el enfrentamiento del animal al estrés	9
2	Sala de ordeño del módulo tambo de la fac. cs. agrarias-unr- (Zavalla)	22
3	Extracción de la muestra de sangre	23
4	Niveles plasmáticos de cortisol	32
5	Cantidad de glóbulos blancos	33
6	Cantidad de neutrófilos	34
7	Cantidad de linfocitos	35
8	Relación neutrófilos/linfocitos	36
9	Cantidad de glóbulos rojos	37
10	Correlación entre cortisol vs N/L mañana de primavera	38
11	Correlación entre cortisol vs N/L tarde de primavera	39
12	Correlación entre cortisol vs N/L mañana de verano	40
13	Correlación entre cortisol vs N/L tarde de verano	41
14	Gráfico de dispersión de la relación N/L en verano mañana vs primavera mañana	42
15	Gráfico de dispersión de la relación N/L en verano tarde vs primavera tarde	43
16	Gráfico de dispersión de la relación N/L primavera tarde vs primavera mañana	44
17	Gráfico de dispersión de la relación N/L verano tarde vs verano mañana	45

INDICE

Indice de figuras	v
Resumen en español e inglés	x
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1. Ocurrencia de las olas de calor y efectos sobre la producción lechera	2
2. Vulnerabilidad del bovino al estrés térmico	5
3. Neurofisiología del estrés	7
3.1- Respuestas biológicas frente al estrés	7
3.2- Activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal	11
3.3- Efectos inmunomoduladores sobre el sistema inmune	13
3.4- El cortisol plasmático como indicador neuroendócrino de estrés	14
3.5- Alteraciones en la cantidad y distribución de células sanguíneas	16
4. Interrogantes	19
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
Hipótesis	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	21
Población	21
Muestra	21
Unidad de análisis	21
Variable independiente	22
Variables dependientes	22
Procedimiento para medir la variable independiente	23
• Índice de Temperatura –Humedad	23

Procedimiento para medir las variables dependientes	24
A. Toma de muestras	24
• Cortisol	24
• Cantidad de glóbulos blancos, cantidad de neutrófilos y linfocitos, relación neutrófilos/linfocitos y cantidad de glóbulos rojos	24
B. Técnicas de laboratorio	25
• Cortisol	25
-Principio del análisis	26
-Procedimiento del radioinmunoanálisis	26
-Cálculos de resultados	27
-Blancos solventes	27
-Características analíticas	27
• Cantidad de glóbulos blancos	28
-Fórmula leucocitaria relativa	28
• Cantidad de glóbulos rojos	29
Procesamiento de datos	30
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	31
Descripción del comportamiento de las variables	31
- Estrés térmico: ITH	
- Niveles plasmáticos de cortisol	32
- Cantidad de glóbulos blancos	32
- Cantidad de neutrófilos	33
- Cantidad de linfocitos	34
- Relación neutrófilos-linfocitos	35
- Cantidad de glóbulos rojos	36
1- CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES	37
-Correlación entre cortisol primavera mañana y la relación neutrófilos-linfocitos primavera mañana	38
-Correlación entre cortisol primavera tarde y la relación neutrófilos-linfocitos primavera tarde	38

-Correlación entre cortisol verano mañana y la relación neutrófilos- linfocitos verano mañana	39
-Correlación entre cortisol verano tarde y la relación neutrófilos-linfocitos verano tarde	40
2- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA RELACIÓN NEUTRÓFILOS- LINFOCITOS ENTRE LAS MAÑANAS Y LAS TARDES DE CADA ESTACIÓN	42
3- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA RELACIÓN NEUTRÓFILOS- LINFOCITOS ENTRE LA MAÑANA Y LA TARDE EN CADA ESTACIÓN	44
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	46
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO	71

RESUMEN

La combinación de altas temperaturas y humedad, características de nuestra región, afectan la producción lechera ya que los rumiantes son homeotermos con escaso margen para mantener la temperatura corporal dentro del rango fisiológico normal. Las olas de calor provocan un agotamiento crónico por la falta de confort y escasas posibilidades de recuperarse. El índice de temperatura y humedad (ITH) puede ser utilizado como un indicador de estrés térmico. Los glucocorticoides, liberados en situaciones de estrés inducen cambios en los mecanismos inmunomoduladores que afectan el bienestar animal. El objetivo de la presente investigación fue evaluar los efectos que tiene el estrés calórico sobre los glóbulos blancos en respuesta a la liberación de cortisol plasmático en bovinos productores de leche. El estudio se realizó en el Módulo Tambo de la Facultad de Ciencias Agrarias, situado en la localidad de Zavalla (33°1'S, 60°53'O) durante el período 2013-2014. Se utilizaron 30 vacas de la raza Holando Argentino, pertenecientes al grupo 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; un contador hematológico, para determinar la cantidad total de glóbulos blancos, y la coloración de May Grünwald and Giemsa para determinar la cantidad de neutrófilos y linfocitos. El análisis de los parámetros evaluados, arrojó un moderado aumento del ITH en las tardes de verano, en coincidencia con un aumento significativo de los niveles de cortisol, una disminución en el número de linfocitos y un aumento en el número de neutrófilos, visualizándose un aumento significativo en la relación Neutrófilos/Linfocitos en las mañanas y las tardes en ambas estaciones. Se concluye que el estrés calórico, medido a través del ITH, modifica los glóbulos blancos, efecto que podría atribuirse al aumento del cortisol plasmático, el cual aumenta por la activación del Eje Hipotálamo Hipofisiario Adrenal.

Abstract

The combination of high temperature and humidity characteristic of our zone affects dairy production because of ruminants are homeotherm animals with little margin to keep body temperature within normal physiological range. Heat waves provoke a chronic exhaustion due to the lack of comfort and little possibilities to recover. Temperature and humidity index (ITH) may be used as an indicator of heat stress. Glucocorticoids released under stress conditions induce changes on immunomodulating mechanisms affecting animal welfare. 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. Thirty Holando Argentino dairy cows from second and third lactation milking group were used. Samples were made during spring (no heat waves) and summer (presence of heat waves) during morning and afternoon milkings. A radioimmunoassay method to dose cortisol was used, a blood cell counter was used to determine white blood cell total count, and May Grünwald Giemsa stain to determine neutrophil and lymphocyte count. The analysis of parameters evaluated showed an ITH moderate increase during summer afternoons in coincidence with a significant increase of cortisol levels, a decrease in lymphocyte count, and an increase in neutrophil count, a significant increase in neutrophil/lymphocyte rate during mornings and afternoons of both seasons was seen. It is concluded that heat stress measured by ITH modifies white blood cells and this could be attributed to plasma cortisol increase which increases by activation of Adrenal Pituitary Hypothalamic Axis.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el estudio de la interacción entre la conducta, la función neural y endocrina, y los procesos inmunes, ha desarrollado un campo de investigación interdisciplinario. Cuando en los organismos vivientes se ve perturbado el equilibrio homeostático por deficiencia o por exceso de los estímulos a los que el organismo es capaz de ajustarse, se produce el estrés. Los organismos vivientes tienen la capacidad de ajustarse a una cantidad, variedad e intensidad de estímulos siempre y cuando estos oscilen dentro de un rango que no altere la homeostasis del organismo. Si la cantidad y calidad de estos estímulos está por debajo o por encima de ese rango, el equilibrio se ve perturbado y esta deficiencia o exceso puede ser considerado como estrés.

En los sistemas de producción lechera de nuestro país los animales están expuestos permanentemente a cambios climáticos que los afectan directamente modificando sus respuestas fisiológicas y productivas.

Durante los meses cálidos, la acción combinada de la elevada temperatura y humedad del aire determinan que el ambiente para el bovino se encuentre fuera de la zona de confort.

El estrés calórico en el bovino lechero ocasionado por la ocurrencia de olas de calor en el sur de Santa Fe ha sido investigado por equipos científicos que demostraron la ocurrencia de cambios en parámetros fisiológicos, bioindicadores sanguíneos y rendimiento productivo. A continuación se exponen los conceptos y antecedentes que constituyen el marco teórico referencial para la presente tesis.

1. OCURRENCIA DE OLAS DE CALOR Y EFECTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN LECHERA

Los factores físico-ambientales que afectan al ganado comprenden una compleja interacción entre la temperatura del aire, la humedad relativa, la velocidad del viento, las precipitaciones y la presión atmosférica.

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 animal (Da Silva, 2006). Se ha reconocido que ésta es alterada por la acción del viento, la humedad y las precipitaciones, entre otros factores.

Los principales efectos de la humedad relativa están asociados con una reducción de la efectividad en la disipación del calor por sudoración y respiración (Blackshaw y Blackshaw, 1994; Renaudeau, 2005), 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.

Por esta razón, fue desarrollado originalmente un índice de temperatura y humedad (ITH) que da cuenta de ambos factores. El ITH es un índice que corrige el valor de temperatura con el grado de humedad, siendo un indicador objetivo del riesgo de padecer estrés por calor. Dado que el viento ayuda a reducir los efectos del estrés por calor durante el verano mejorando los procesos de disipación de calor por vías evaporativas, la velocidad del mismo resulta ser uno de los factores de ajuste del ITH más importantes.

Los rangos de ITH indican diferentes niveles de estrés calórico: leve, medio o grave, y una vez ajustado con relación a otros factores climáticos (viento, 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 y col, 2007), 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 dura 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. El desafío permanente es evaluar el efecto directo de las variables medioambientales en el desempeño productivo y de comportamiento animal.

Un estudio sobre el régimen agroclimático de olas de calor -ITH superior a 72 durante 3-5 días consecutivos- realizado en la provincia de Santa Fe mostró que en Rosario, durante el período 1974-2004, el período normal con olas de calor abarcó 3,6 meses pudiendo prolongarse hasta 3 meses más, ocurriendo la mayoría entre principios de noviembre y mediados de marzo (Valtorta, 2008).

En la Cuenca Central de Santa Fe, una de las más importantes del país con centro en Rafaela, se comprobó durante el período 2000-2005 un impacto negativo sobre el volumen de leche entregado a la industria. El estudio 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 y col, 2008).

Otros autores demostraron que las olas de calor en la región de influencia de la localidad de Zavalla (Santa Fe) 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.

El ITH fue utilizado 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 (Martínez y col, 2010). Dicho módulo, integrado a un sistema de producción mixto donde se siembran pasturas, verdeos y maíz para la alimentación de los animales, y soja para la producción de granos, se caracteriza por ser un tambo mediano de base pastoril intensificado con 145-165 vacas en ordeño. Los resultados de la investigación 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. Concretamente, siempre que hubo valores por encima del rango que determina la ocurrencia de estrés (ITH > 75) se verificó una disminución en la producción lechera.

Otras investigaciones han demostrado que el estrés calórico tiene una influencia negativa sobre la calidad de la leche. En particular, esto ha sido observado en los departamentos centrales de la cuenca lechera santafesina, que permiten reconocer la composición de la leche como reflejo del sistema de producción, encontrándose importantes variaciones estacionales con menor calidad composicional detectada en verano (Weidman y col, 2002).

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 alternaron 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 normo termia que permitió a los animales afrontar el estrés calórico durante el día, minimizando de esta forma los efectos perjudiciales sobre la productividad (Saravia y col, 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 el efecto negativo sobre la glándula mamaria arrojando una alteración en el recuento de células somáticas. El mismo equipo investigó el impacto climático 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. Las alteraciones registradas demuestran que las olas de calor tienen un efecto negativo sobre la salud, lo cual se expresa claramente en la alteración de algunos parámetros sanguíneos (Muñoz y col, 2013).

2. VULNERABILIDAD DEL BOVINO AL ESTRÉS TÉRMICO

Indudablemente, la relación entre los animales y el medio ambiente que los rodea es un pilar básico para el logro de una producción sustentable. Para el caso particular del ganado bovino en esta región, resulta de interés revisar algunos de los efectos negativos que tienen las olas de calor, es decir, la combinación de altas temperaturas con elevada humedad.

En primer lugar, debemos considerar que el bovino es un animal homeotermo, es decir, que posee la capacidad de mantener constante la temperatura corporal independientemente de cuál sea la temperatura ambiental. La temperatura normal del ganado bovino adulto sano fluctúa entre 37,8 y 40,0⁰ C; a esta temperatura las actividades celulares y bioquímicas operan con mayor eficiencia y eficacia. Si los tejidos se enfrían demasiado el metabolismo se reduce, en el caso contrario el metabolismo se acelera existiendo el riesgo de que ocurra una desnaturalización de las proteínas, disrupción de la integridad de la membrana celular y posiblemente un daño permanente de los tejidos, resultando en morbilidad de largo plazo y bajo desempeño productivo (Guyton y Hall, 1996).

Para mantenerse dentro de esta condición los animales necesitan ganar o perder calor del medioambiente circundante. Este fenómeno, denominado balance térmico, se logra a través de un constante proceso termorregulatorio que involucra el flujo de calor mediante cuatro vías básicas. Tres de estas vías (conducción, convección y radiación) son conocidas como transferencias sensibles, ya que basan su operación en el gradiente térmico, mientras que la cuarta (evaporación) opera a través de un gradiente de presión de vapor y se le denomina pérdida insensible de calor o pérdida latente. La pérdida latente de calor resulta ser un mecanismo muy importante en los momentos en que la temperatura ambiental se acerca a los valores de temperatura corporal del animal, ya que en estas condiciones se reduce o elimina el gradiente térmico que permite la operación de las vías sensibles. Si a la situación anterior se suman condiciones de alta humedad relativa también

decrece el gradiente de vapor y con ello la posibilidad del animal de disipar el exceso de calor. Cuando esto ocurre el exceso de calor es acumulado en el cuerpo resultando en un incremento en la temperatura corporal.

La modificación de los mecanismos por los cuales el animal gana o produce calor, así como los mecanismos por los que lo disipa, son las principales estrategias con las que el animal cuenta para mantener el balance térmico. La producción de calor metabólico es directamente controlada por el sistema nervioso central, por el sistema endócrino a través de la modificación del apetito y procesos digestivos, e indirectamente por alteraciones de la actividad de enzimas respiratorias y síntesis de proteína (Arias y col 2008).

En segundo lugar, se advierte que 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 glándulas sudoríparas apócrinas tienen mayor importancia en la regulación de la temperatura, mientras que las glándulas sudoríparas écrinas, presentes en regiones lampiñas de la piel, como el plano naso labial, cumplen una función de menor importancia (Dyce, 1991).

Los mecanismos de termorregulación que se ponen en juego en los animales homeotermos frente a un balance térmico desfavorable implican un menor consumo de energía que afecta la producción y las condiciones de salud del ganado.

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.

Estudios realizados en la Cuenca Media del Río Luján determinaron los valores de temperatura del aire umbrales a partir de los cuales las vacas lecheras manifestaban síntomas de estrés calórico para las condiciones climáticas y de producción características de la región. Los resultados demostraron que el valor umbral para la temperatura máxima

del aire está en el rango de 28°C a 29 °C ya que a partir de estos valores comenzó a registrarse un estado de discomfort térmico (Goldberg y col 2008).

3. NEUROFISIOLOGÍA DEL ESTRÉS

El término estrés denota el efecto de estímulos aversivos sobre las constantes fisiológicas que perturban la homeostasis y la conducta de los seres vivos.

El término estrés deriva del vocablo inglés *stresse*, usado durante la Edad Media para denotar el sufrimiento y pobreza de las personas, *stresse* a su vez, tiene su origen en los vocablos *destresse* y *estrece* del francés antiguo, ambos con significados de opresión, dolor y sufrimiento.

La raíz más antigua de la cual deriva *estrece* es del latín *stricia*, término vulgar para el vocablo latino *strictus*, este último es el pasado participio de *stringere* que significa oprimir, apretar o atar (Dictionary of English, 1992).

Seyle (1936) introdujo el término estrés al campo de las ciencias biológicas para denotar un síndrome producido por diversos agentes nocivos, cuya finalidad era promover la adaptación del organismo a su medio ambiente.

Dada la complejidad de la neurofisiología del estrés, para esta tesis en particular, se abordarán únicamente los siguientes tópicos: las respuestas biológicas ante el estrés, la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal,(HHA) los efectos inmunomoduladores sobre el sistema inmune, el cortisol plasmático como indicador neuroendocrino de estrés y por último, las alteraciones en la cantidad y distribución de las células sanguíneas.

3.1. Respuestas biológicas frente al estrés

Moberg (1985) define el estrés como la respuesta biológica provocada cuando un individuo percibe una amenaza a su homeostasis. La amenaza es el "estrés". Es el conocimiento de estos efectos nocivos del estrés lo que sensibiliza frente a la importancia del mismo en el bienestar de un animal o su estado saludable.

El término *diestrés* ayuda a diferenciar entre una respuesta de estrés que no pone en peligro el bienestar (a menudo referido como el "estrés bueno") y un estado biológico en el cual la respuesta al estrés tiene un efecto perjudicial sobre el bienestar del individuo (o "estrés malo").

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.

El estrés actúa como una señal de alarma generada en el cerebro, que detecta el peligro en el medio e indica que se requiere de una acción inmediata. Cuando la respuesta a esta acción no se da de manera adecuada y con la rapidez necesaria se producen condiciones físicas y patológicas, como depresión, alteraciones del ritmo cardíaco y respiratorio, alteraciones en el peso, entre otros, que interfieren con el bienestar y la salud (Chrousos, 2000; Muñoz-Abellan, y col, 2009).

La primera respuesta e indudablemente la de menor costo biológico es la conductual (Morberg, y col, 2000). El animal puede evitar el estrés sencillamente suprimiendo la amenaza, es decir, puede tener éxito evitando el factor estresante por simple eliminación. Así, un enemigo puede ser evitado por escapar, o un animal puede buscar la sombra si su temperatura corporal se eleva. Obviamente, las respuestas de comportamiento no siempre son adecuadas ni suficientes para todos los factores de estrés, y los animales también pueden encontrarse en situaciones en las que sus opciones de comportamiento son limitadas o frustradas.

La segunda respuesta o línea de defensa durante el estrés la establece el sistema nervioso autónomo que a su vez afecta un número diverso de sistemas biológicos, incluyendo el sistema cardiovascular, el sistema gastrointestinal, las glándulas exocrinas y la médula adrenal. 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.

Por último, el sistema inmune también se ve involucrado en la respuesta al estrés lo cual compromete la salud del individuo.

Prácticamente todas las funciones biológicas están afectadas por el estrés, incluyendo la reproducción, el metabolismo y la conducta, que a su vez, son regulados por las hormonas de la glándula hipófisis (Morberg y col., 2000).

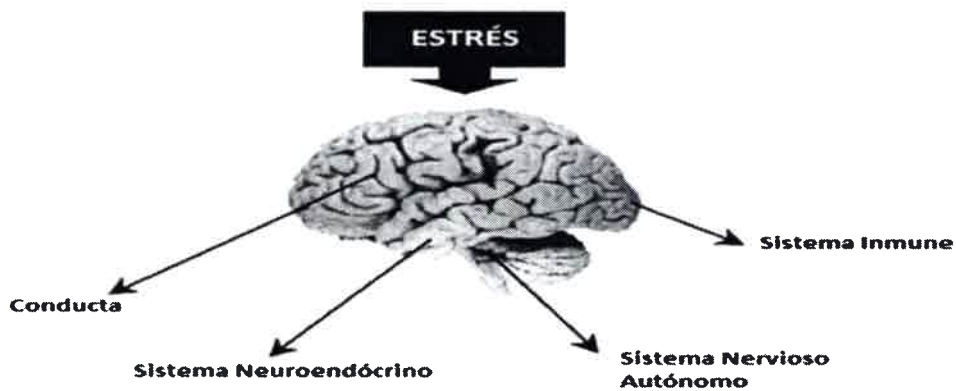


Figura 1 Tipo general de respuesta biológica para el enfrentamiento del animal al estrés (adaptada de Morberg. La biología de estrés de los animales)

Selye (1936), ya por los años 30, logró resumir todo un conjunto de síntomas psicofisiológicos a los que definió como “estrés o síndrome general de adaptación”. Ante una situación de estrés, el organismo tiene una serie de reacciones fisiológicas que suponen la activación del sistema nervioso autónomo y del eje HHA. Ambos producen la liberación de hormonas que, transportadas a través de la sangre, excitan, inhiben o regulan la actividad de los órganos. De este modo, se observa que frente a una situación de amenaza el individuo efectúa dos tipos de reacción.

En la primera respuesta, casi inmediata y de corto plazo, se halla involucrado el sistema nervioso autónomo (SNA), también conocido como vegetativo, visceral o sistema nervioso involuntario, que está al servicio de las funciones que mantienen la continua actividad de los órganos y de las que median la adaptación a los cambios ambientales. Esta adaptación, conocida como homeostasis, se logra a través de programas adaptativos que no sólo mantienen la funcionalidad de los órganos, sino que también responden frente a factores estresantes que de algún modo amenazan a la supervivencia del individuo. El SNA es uno de los componentes que forman parte del extenso sistema motor-integrador-sensitivo, en el cual se incluyen los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario que aseguran tanto el funcionamiento del organismo en condiciones normales como en aquellas en que se requieren respuestas adecuadas a factores externos que garanticen la supervivencia.

La activación simpática, componente del SNA, responsable de la respuesta del organismo frente al estrés, supone la secreción de:

- a) La adrenalina secretada por la médula adrenal.
- b) La noradrenalina secretada por las terminaciones nerviosas simpáticas.

Ambas intervienen en los siguientes procesos: dilatación de las pupilas, dilatación bronquial, movilización de los ácidos grasos pudiendo dar lugar a un incremento de los lípidos en sangre, aumento de la coagulación, incremento del rendimiento cardíaco, vasodilatación en tejido muscular y vasoconstricción en tejido cutáneo, reducción de los niveles de estrógenos y testosterona, inhibición de la secreción de prolactina, incremento de la producción de tiroxina, entre otras.

Vemos, pues, que ante una situación de estrés, existe un compromiso de todo el organismo (Seyle, 1936). Sin embargo, debido a que las respuestas autónomas afectan sistemas biológicos muy específicos y los efectos biológicos son relativamente de corta duración, se podría argumentar que esa activación por estrés del sistema nervioso autónomo no tiene un impacto significativo en el bienestar animal en el largo plazo.

La segunda respuesta, se produce cuando un factor estresante activa el eje HHA que inicia la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) provenientes de las células neurosecretoras del hipotálamo. La activación del eje HHA, es la respuesta neuroendocrina más conocida y consistente al estrés. Esta relación entre el estrés y la activación de la corteza suprarrenal fue uno de los primeros fenómenos reconocidos en el estudio de la endocrinología del estrés (Seyle, 1939). Los primeros investigadores concluyeron que la regulación de la secreción de glucocorticoides por la glándula suprarrenal dependía de una vinculación entre el hipotálamo y la glándula pituitaria. Harris (1948) sugirió que las neuronas del hipotálamo regulan la secreción de hormonas de la pituitaria anterior. El trabajo de Harris condujo a una mayor investigación en la relación hipotálamo-hipófisis, la que demostró que los factores producidos en las neuronas del hipotálamo, efectivamente, regulan la secreción de ACTH de la pituitaria anterior (Guillemin y Rosenberg, 1955; Saffran y col, 1955; Porter y Jones, 1956).

3.2. Activación del Eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal (HHA)

La función principal de la CRH es estimular la secreción hipofisaria de la hormona corticotropina (ACTH). La ACTH se produce a partir de una molécula más grande conocida como pro-opiomelanocortina (POMC), que también es un precursor de la beta-endorfina, lipotropina y melanotropina (Matteri,1994). Los péptidos relacionados con POMC se sintetizan en células especializadas de la pituitaria anterior conocidas como corticotrofas.

La ACTH estimula la síntesis y liberación de esteroides de la corteza adrenal mediante la promoción de la absorción de colesterol y su conversión enzimática en hormonas glucocorticoides: cortisol en los bovinos (Morberg, y Mench, 2000) y en la mayoría de los mamíferos, y corticosterona en ratas. Los oligocorticoides también apoyan esta respuesta por medio de la potenciación de la síntesis y la acción de la epinefrina (adrenalina), una catecolamina liberada por la médula adrenal durante la respuesta al estrés.

El mantenimiento de una concentración suficiente, aunque no excesiva de glucocorticoides, es necesario para mantener la homeostasis. En cambio, la elevación crónica de los glucocorticoides produce catabolismo de proteínas, hiperglucemia, inmunosupresión, susceptibilidad a la infección y depresión.

Teniendo en cuenta las potentes acciones nocivas de la elevación crónica de glucocorticoides, una función importante de estos esteroides es limitar la respuesta del HHA al estrés. Esto ocurre a través de la inhibición por retroalimentación negativa, donde los glucocorticoides inhiben la respuesta HHA a nivel del cerebro y de la pituitaria (McEwen, 1979; Fink y col, 1991).

La activación del componente de la hipófisis del eje HHA puede ser mediado por varias hormonas neuroendocrinas. En varias especies (rata, humano, porcino, bovino), se ha demostrado que la vasopresina (VP) posee la capacidad de potenciar la secreción de ACTH inducida por CRH (Liu y col, 1983; Rivier y Vale, 1983; Watabe y col, 1988; Carroll y col, 1993; Minton y Parsons, 1993). Existen al menos otros dos factores reguladores, además de CRH y VP que se han publicado que inducen la secreción de ACTH de la pituitaria anterior: la adrenalina (Giguere y Labrie, 1983) y la oxitocina (Link

y col, 1993), habiéndose identificado receptores de alta afinidad tanto para la adrenalina (Petrovic y col, 1983) como para la oxitocina (Antoni, 1986) en la glándula pituitaria de rata.

En los mamíferos, la glándula adrenal comprende: la corteza y la médula. La médula adrenal está encapsulada por la corteza adrenal y sus principales secreciones son las catecolaminas: adrenalina, noradrenalina y dopamina. La corteza adrenal se compone de tres capas: la zona glomerular, la zona fasciculada y la zona reticular las cuales son responsables de la síntesis y liberación de tres clases de hormonas esteroides: mineralocorticoides, glucocorticoides y andrógenos respectivamente.

El papel de los andrógenos adrenales se limita a los efectos sobre el comportamiento reproductivo y el crecimiento, los mineralocorticoides son esenciales para el mantenimiento del equilibrio de sodio y el volumen de líquido extracelular, y los glucocorticoides provocan una variedad de efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y proteínas, y regulan la respuesta al estrés. Mientras que la secreción de glucocorticoides por la corteza adrenal está mediada principalmente por la acción endocrina de ACTH de la pituitaria anterior, CRH y VP también pueden regular la producción y secreción de glucocorticoides a través de las acciones parácrinas (locales) dentro de la glándula adrenal. La capacidad de CRH para aumentar el flujo sanguíneo adrenal y la localización de CRH y ARNm para CRH en la glándula adrenal sugieren para esta neurohormona un papel dentro de la adrenal (Minamino y col, 1988; Usui y col, 1988; Muglia y col, 1994).

Se ha reportado que la CRH estimula directamente la secreción de los glucocorticoides de la glándula adrenal en los seres humanos (Fehm y col, 1988; Parker y col, 1995), ratas (Mazzocchi y col, 1989) y ganado (Jones y Edwards, 1990; Carroll y col, 1996). Se ha identificado a la CRH en la médula adrenal de los seres humanos y de otras especies de mamíferos (Suda y col, 1984), y se ha informado que es capaz de estimular la producción local de ACTH a partir de las células cromafines en presencia o ausencia de VP (Markowska y col, 1993; Mazzocchi y col, 1994, 1997). Asimismo, se ha sugerido que VP es capaz de sostener la secreción de catecolaminas y esteroides actuando directamente a través de los receptores de VP en la corteza adrenal, o indirectamente actuando sobre los receptores medulares de VP que estimulan la secreción local de ACTH (Markowskay col, 1993; Mazzocchi y col, 1994, 1997).

La eficacia de la retroalimentación negativa mediada por glucocorticoides sobre el eje HHA varía con respecto a estresores específicos (Plotsky y col, 1993). Al parecer, el cerebro tiene la capacidad de distinguir entre los factores de estrés y liberar secretagogos de ACTH dependiendo de la respuesta fisiológica necesaria para hacer frente al estresante actual.

La regulación interpretativa central en el cerebro, acoplada a la intercomunicación que existe entre el sistema nervioso simpático y el HHA, trabajan en forma conjunta para mantener la homeostasis.

La exposición del organismo a condiciones adversas genera activación de las neuronas simpáticas y liberación concomitante de noradrenalina al torrente sanguíneo.

Ambos tipos de hormonas -glucocorticoides y catecolaminas- liberadas durante la exposición del organismo al estrés, ejercen funciones inmunomoduladoras con lo que contribuyen a regular el funcionamiento del tercer efector de la respuesta al estrés, el sistema inmunológico.

3.3. Efectos inmunomoduladores sobre el sistema inmune

Los principales mediadores de los efectos inmunomoduladores del estrés: glucocorticoides, adrenalina y noradrenalina, ejercen influencia directa sobre el funcionamiento de las células inmunes al acoplarse a sus receptores específicos, localizados en el citoplasma y membrana celular respectivamente y también tienen efectos indirectos al alterar la producción de citocinas como el interferón gama y el factor de necrosis tumoral y las interleucinas 1, 2 y 6 (IL-1, IL-2 e IL-6) todas necesarias para la maduración y movilización de los linfocitos y otras células inmunitarias.

Los órganos linfoides primarios, así como linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos y macrófagos poseen receptores de glucocorticoides tipo II para las hormonas corticoesteroides. Los glucocorticoides, al acoplarse a sus receptores citoplasmáticos en las células del sistema inmune, se traslocan al núcleo y funcionan como factores de la transcripción para numerosas proteínas sintetizadas por linfocitos, macrófagos y otros tipos

celulares del sistema inmune. Entre las proteínas cuyos genes poseen elementos de respuesta a los glucocorticoides, se encuentran las citocinas y los receptores y antígenos de superficie de las células inmunológicas.

Las catecolaminas adrenalina y noradrenalina, modulan el funcionamiento del sistema inmune a través de sus receptores beta localizados en todos los órganos inmunes y en linfocitos T y B, las células asesinas, los monocitos y los macrófagos.

Se ha observado alteración de los niveles de cortisol circulante y modificaciones en subconjuntos de leucocitos ante situaciones de estrés en bovino (Myoung-Hoo K y col, 2011). Se conoce que los neutrófilos responden a niveles elevados de glucocorticoides con alteración en la expresión génica (Burton y col, 2005; Chang y col, 2004; Madsen-Bouterse y col, 2006; Madsen y col, 2004; Weber y col, 2004, 2006). Asimismo, se ha podido determinar relaciones significativas entre los totales de leucocitos y neutrófilos, y cambios en toda la expresión de genes (Buckham Sporer y col, 2008).

3.4. El cortisol plasmático como indicador neuroendocrino de estrés

Los glucocorticoides son los productos finales de la activación del eje HHA, estas hormonas ejercen un mecanismo de retroalimentación negativa para controlar la actividad basal del eje HHA y limitar la duración de la exposición del organismo a los glucocorticoides y sus efectos (Sapolsky y col, 1992).

Las hormonas corticoadrenales son derivados de los núcleos de pregnano (21 carbonos con doble enlace entre C4 y C5), que al incorporar hidroxilos o cetonas en C11 adquieren propiedades glucocorticoides.

Su transporte en la sangre depende de su unión a proteínas plasmáticas, tales como la globulina ligante de corticoides o transcortina (75%) y albúmina (10%), el 10% restante se encuentra libre. La vida media de eliminación del cortisol es de 60 minutos aproximadamente y se elimina por la orina (75%) y las heces (25%), por lo cual el hígado juega un rol importante en la modificación de esta hormona, y en menor proporción los riñones (Alvarado, 1999; Cunningham, 1999; Morrow y col 2002; Lager y col 2004).



En los bovinos, el glucocorticoide más importante es el cortisol (hidrocortisona), seguido por corticosterona y algo de cortisona. Según otros autores, los rumiantes segregarían cantidades equivalentes de cortisol y corticosterona (Coppo y col 2001).

Es importante tener presente que el cortisol presenta un ritmo ultradiano y circadiano en vacas lecheras, el ritmo ultradiano corresponde a oscilaciones en los niveles de esta variable cada 120 minutos, en cuanto al ritmo circadiano este indica que los valores tanto de ACTH y de cortisol son más bajos a media noche y más altos a las 6:00 a.m. (Thun y col 1981; Lefcourt y col 1993; Cunningham, 1999).

Se ha reportado que la secreción de cortisol es una de las principales respuestas del animal a condiciones de estrés en animales expuestos a temperaturas de 35 °C; luego de 20 min la concentración de cortisol en el plasma sanguíneo aumentó de 30 a 37 µg/L para alcanzar finalmente, después de 2 a 4 horas, un valor estable de 43 µg/L. Sin embargo, luego de prolongados periodos de exposición al calor los animales ajustaron la secreción de cortisol. Así, la secreción de cortisol estimula ajustes fisiológicos que permiten al animal tolerar el estrés causado por un calor excesivo (Christison y Johnson 1972).

El cortisol es liberado desde la corteza adrenal, su secreción es pulsátil, con una periodicidad de 90 minutos (Mormèd y col 2007). Este glucocorticoide aumenta la disponibilidad de energía y las concentraciones de glucosa en la sangre porque estimula la proteólisis, la lipólisis y la gluconeogénesis en el hígado aumentando la síntesis de aminoácidos, glicerol y lactato en glucosa, y la movilización de los aminoácidos desde el músculo (Muchenje y col 2009). También disminuye el transporte de glucosa y su utilización por las células, produciendo una elevación de la concentración de glucosa sanguínea hasta un 50% sobre el nivel normal (Trevisi y Bertoni 2009) (Lay y Wilson 2001).

El cortisol, a pesar de su variabilidad y corta vida, es uno de los biomarcadores más utilizados para evaluar el estrés experimentado por animales, aunque el aumento de su concentración plasmática solo sería un indicador neuroendocrino primario (Tadich y col 2005).

Los niveles de cortisol basal en plasma se encuentran por debajo de 10 ng/ml, pero se ha descrito que fluctúa en un rango entre 0 y 20 ng/ml (Mormède, 2007).

La interpretación de los niveles basales de cortisol se dificulta porque se afecta por múltiples factores, incluyendo los siguientes: el ritmo circadiano (concentraciones

aumentadas en la mañana y baja en la tarde), aunque estudios recientes han indicado que el ritmo circadiano en bovinos es débil; otros factores como el muestreo, la restricción de movimiento, la lactancia, el coito, el ordeño, el grado de habituación, algunas hormonas (por ejemplo, la vasopresina puede potenciar la secreción de ACTH) y las infecciones, así como las endotoxinas (Trevisi y Bertoni 2009) (Sapolsk y col 2000) (Blanco y col 2009).

La medición del cortisol es dependiente del tiempo porque requiere entre 10 y 20 minutos para alcanzar valores máximos y tiene una vida media de 60 minutos, eliminándose principalmente por el hígado (Buckham Sporer y col 2008) (Knowles y Warriss 2006) (Souza, 2006).

También ha sido sugerido que las manifestaciones conductuales de los animales ante un agente estresor están íntimamente asociadas con el incremento de cortisol, debido a que sus receptores se encuentran localizados en regiones específicamente involucradas con la regulación hormonal (hipotálamo e hipófisis) y particularmente con el sistema límbico, que juega un papel relevante en las conductas emocionales, por lo tanto, las concentraciones plasmáticas de cortisol, han sido usadas como un confiable indicador de estrés físico agudo (Kannan y col 2003) .

3.5. Alteraciones en la cantidad y distribución de las células sanguíneas

El leucograma es el conjunto de pruebas de laboratorio que informan sobre la cantidad y calidad de los glóbulos blancos circulantes en sangre. Los leucocitos se agrupan en series mononucleares y granulocíticas. La primera, incluye linfocitos y monocitos, mientras la segunda se refiere a neutrófilos, eosinófilos y basófilos (Ruckebush y col 1994).

En el bovino, el número de leucocitos aumenta continuamente durante la segunda mitad de la vida intrauterina, alcanzando al nacer 6 a 12 x 10⁹/l de sangre (Rosenberger, 1981). Durante su crecimiento, la concentración de glóbulos blancos decrece hasta alcanzar los niveles normales de la adultez, desde 12 hasta 9,1 x 10⁹/l (Benjamín, 1967), desde 8 hasta 7 x 10⁹/l (Durr y Kraft, 1980), desde 10,7 hasta 8 x 10⁹/l (Jain, 1993) o desde 4 hasta 12 x 10⁹/l (Meyer y Harvey, 2000). Los leucocitos totales varían escasamente por el sexo pero varían mucho por la edad.

Al comparar con la fórmula leucocitaria diferencial de otras especies, la sangre del bovino se caracteriza por un elevado componente linfocitario (Kolb, 1987).

Entre las hormonas capaces de modificar el leucograma se encuentran las catecolaminas (alarma simpática) y los glucocorticoides (estrés).

En la alarma simpática, los glóbulos blancos aumentan su concentración a expensas de todos los tipos leucocitarios, mientras que en condiciones de estrés se elevan solamente los neutrófilos, disminuyendo linfocitos y eosinófilos (Best y Taylor, 1986; Coles, 1989; Kaneko, 1989; Gómez Piquer, 1992).

En las alarmas simpáticas las modificaciones son pasajeras (“leucocitosis fisiológicas”) perdurando 30 minutos (Jain, 1993) a una hora. En cambio, durante el estrés son más prolongadas debido a que, en el intento de resistir a una noxa, las secreciones de ACTH y corticosteroides se sostienen en el tiempo perdiéndose el ritmo nictameral (Best y Taylor, 1986; García Sacristán, 1995; Swenson y Reece, 1999). Estos cambios serían muy marcados en carnívoros pero poco pronunciados en rumiantes (Jain, 1993).

En bovinos existiría una leucocitosis fisiológica (pasajera) con elevaciones de hasta 15 a $27 \times 10^9/l$ (con neutrofilia) y una leucocitosis del estrés (duradera) con elevaciones de 8 a $18 \times 10^9/l$ acompañadas de neutrofilia, linfopenia, eosinopenia y a veces monocitopenia (Smith y Thier, 1983; Duncan y Prasse, 1994).

Los glucocorticoides pueden actuar incrementando el número y el porcentaje de neutrófilos (neutrofilia), mientras que decrecen los linfocitos (linfopenia o linfocitopenia). Esta modificación se debe a que, como respuesta al incremento de estas hormonas durante el estrés, los linfocitos circulantes se adhieren a las células endoteliales que cubren las paredes de los vasos sanguíneos y, posteriormente, pasan de la circulación a otros tejidos como los ganglios linfáticos, médula ósea, bazo y piel, donde son secuestrados, produciendo una reducción del número de linfocitos circulantes (linfopenia) (Dhabar y col, 1995).

Al mismo tiempo, los glucocorticoides estimulan el flujo de neutrófilos desde la médula ósea hacia la sangre y atenúan el paso de éstos hacia otros compartimentos, generando neutrofilia, que consiste en un incremento de los 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 y col, 2011).

Los mecanismos de la neutrofilia inducida por corticoesteroides se explican por la desmarginación de los neutrófilos, movimiento acelerado de los neutrófilos de la médula ósea a la sangre, y la disminución de la diapédesis de los neutrófilos de la sangre a los tejidos (Weiss y Wardrop, 2010).

Se ha sugerido que la exposición a las condiciones hostiles, u otros factores de estrés psicológicos, inicia la secreción de varias hormonas incluyendo cortisol (Toft y col, 1994; Van de Kar y Blair, 1999), pudiendo alterar los receptores de adhesión en los leucocitos circulantes y por lo tanto, contribuir a una distribución alterada de los mismos (McLaren y col, 2003).

El hematocrito puede variar aumentando o disminuyendo según la duración del estrés y el grado de hidratación del animal. Se ha reportado que en episodios de estrés agudo la contracción del bazo esplénico por efecto del sistema nervioso autónomo aumenta el hematocrito pero en casos de estrés crónico disminuye (Broom, 2006).

Algunas investigaciones realizadas en los últimos decenios indican que la cuantificación de los parámetros hematológicos tales como neutrofilia/linfopenia, se puede utilizar como un complemento de la medición de las hormonas adrenales en el estudio de las respuestas de estrés de vertebrados. Existen evidencias que demuestran que las respuestas suprarrenales y los perfiles de leucocitos están estrechamente vinculados, y son similares en todos los vertebrados (Davis y col, 2008; Dhabhar y col, 1996).

Estudios sobre el impacto de las olas de calor sobre las vacas en ordeño realizados en el Módulo Tambo de la Facultad de Ciencias Agrarias de Zavalla durante las estaciones de verano 2011-2012 y 2012-2013, corroboran que el leucograma y el hematocrito pueden ser utilizados como indicadores de estrés calórico ya que se modifican como consecuencia de la liberación de los corticoesteroides (Muñoz y col, 2013).

4- INTERROGANTES

Considerando los antecedentes expuestos sobre los efectos del estrés térmico, ocasionado por las olas de calor, sobre el ganado lechero surgen algunos interrogantes que a lo largo de la presente tesis se procurarán responder:

- ¿Cómo responde el eje H-H-A frente al estrés térmico?
- ¿Cómo se modifican los niveles de cortisol plasmático en condiciones de estrés térmico?
- ¿La modificación en los niveles de cortisol plasmático afecta la cantidad de glóbulos blancos en la sangre?
- ¿La modificación en los niveles de cortisol plasmático: modifica la distribución de los glóbulos blancos y la fórmula leucocitaria relativa?
- ¿Cómo cambia la relación neutrófilos/linfocitos ante una modificación en los niveles de cortisol plasmático?

CAPITULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El estrés calórico, medido a través del ITH, modifica la cantidad y distribución de los glóbulos blancos en la sangre, efecto que podría ser adjudicado al aumento del cortisol plasmático.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en vacas Holando Argentino los efectos que tiene el estrés calórico sobre los glóbulos blancos en respuesta a la liberación de cortisol plasmático.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto del estrés térmico ocasionado por las olas de calor sobre las concentraciones de cortisol plasmático en vacas Holando Argentino en lactancia.
- Identificar los cambios que el cortisol plasmático produce sobre la cantidad de glóbulos blancos, porcentajes de neutrófilos y linfocitos y la relación neutrófilos/linfocitos en vacas Holando Argentino ante diferentes niveles de estrés térmico durante su lactancia.

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Módulo Tambo de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (FCA-UNR)¹, situado en la localidad de Zavalla (33°1'S, 60°53'O) durante el período 2013-2014. El rodeo completo está compuesto por animales de raza Holando Argentino: 100 vacas en ordeño, 20 vacas secas, 2 toros (aunque la mayoría de las veces se utiliza inseminación artificial) y las hembras de reposición (terneras y vaquillonas).

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, verdeos, maíz y soja.

A lo largo del año se producen aproximadamente 2500 litros diarios, en promedio, unos 25 litros diarios por vaca. Las vacas producen más de 7500 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 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.

POBLACIÓN: todas las vacas del tambo.

MUESTRA: 30 vacas en ordeño de segunda y tercera lactancia, por muestreo aleatorio. Las muestras de sangre se extrajeron en diferentes estaciones bajo condiciones climáticas distintas:

- Primavera: sin olas de calor en condiciones de termoneutralidad con un ITH (Índice Temperatura Humedad) menor a 72
- Verano: con olas de calor en situaciones de estrés térmico con un ITH mayor a 72.

¹ Para mayor información sobre el Módulo Tambo se puede consultar:

<http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/34/8AM34.html>).

En cada período se tomaron dos muestras: a las 7 am y 7 pm; siempre durante el ordeño mientras comían la ración en el brete. (Figura 2).

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.

UNIDAD DE ANÁLISIS: sangre de la mañana y de la tarde de cada una de las vacas muestreadas.

VARIABLE INDEPENDIENTE: estrés térmico medido a través del ITH

VARIABLES DEPENDIENTES: cortisol, cantidad de glóbulos blancos, cantidad de neutrófilos y linfocitos, relación neutrófilos/ linfocitos.

Además de las variables dependientes mencionadas se midió la cantidad de glóbulos rojos. En este caso particular, esta medida fue considerada como una VARIABLE DEPENDIENTE SECUNDARIA, útil para cotejar la homogeneidad de las muestras de este diseño de investigación.

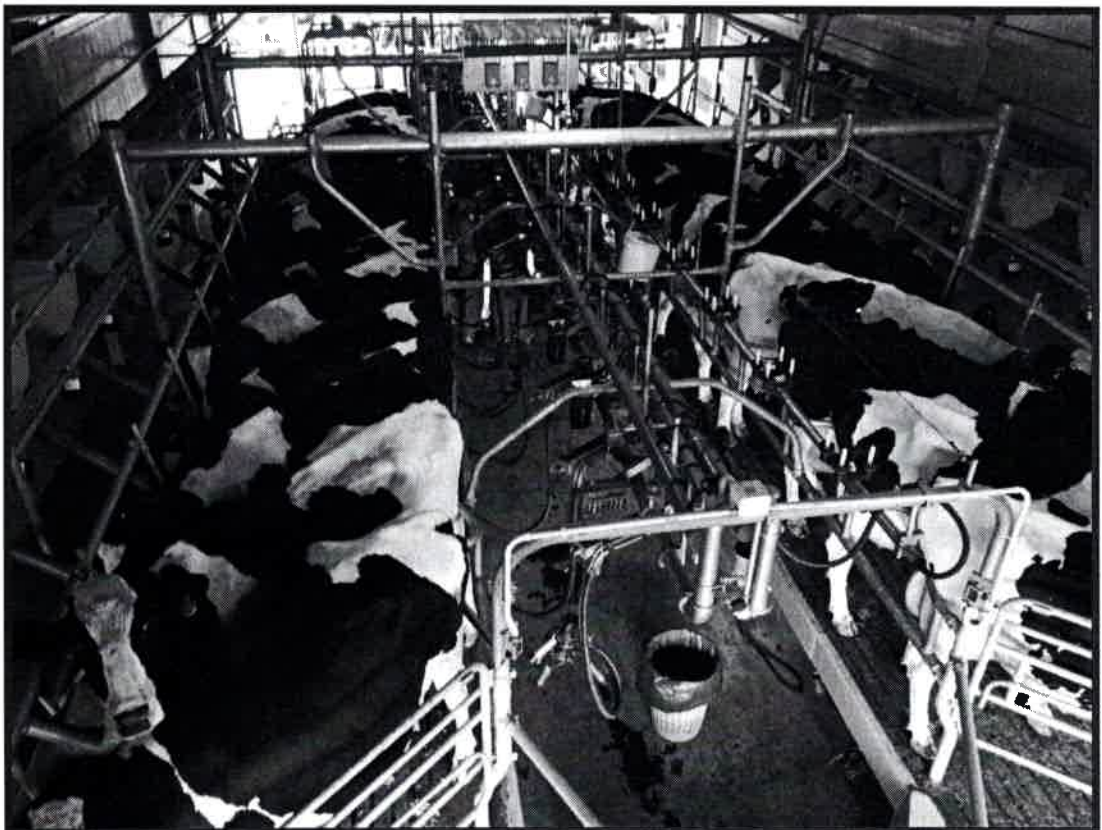


Figura 2: Sala de ordeño del Módulo Tambo de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNR (Zavalla).

PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA VARIABLE INDEPENDIENTE

Índice Temperatura-Humedad

Para definir la ocurrencia de olas de calor se utilizaron los valores de ITH recabados en los mismos días considerando los promedios de las 10 horas anteriores a cada toma de sangre. Posteriormente se establecieron cuatro niveles de correspondencia entre el valor de ITH y estrés térmico:

Menor a 72 Bajo: No ocasiona desordenes fisiológicos.

Mayor a 72 Leve: Ocasiona 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.

Mayor a 78 Moderado: 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.

Mayor a 82 Grave: Los mecanismos adaptativos colapsan y se altera significativamente el desempeño productivo; los trastornos metabólicos favorecen la ocurrencia de enfermedades y pueden desencadenar la muerte.

De este modo, cuando el ITH promedio se sostuvo durante 3-5 días consecutivos con valores mayores a 72 se consideró que los animales estaban sometidos a olas de calor.

PROCEDIMIENTOS PARA MEDIR LAS VARIABLES DEPENDIENTES

A- TOMA DE MUESTRA

Cortisol

A cada animal, luego del ordeño 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) (Figura 3). Antes de realizar la venopunción, se agitó la jeringa para que el anticoagulante tomase contacto con las paredes de la misma. Luego de la extracción se invirtió suavemente la jeringa 2 o 3 veces, se la colocó inmediatamente en una caja de telgopor con refrigerante y fue trasladada al Laboratorio de Anatomía y Fisiología Animal de la misma Facultad.

Cantidad de glóbulos blancos, cantidad de neutrófilos y linfocitos, relación neutrófilos/linfocitos y cantidad de glóbulos rojos

Inmediatamente después de la extracción de la muestra de sangre para dosar cortisol, al mismo animal y en las condiciones ya descritas, se le extrajo nuevamente 2,5 ml de sangre de la Vena Coccígea, con una jeringa de 5 ml con aguja 40/12. La sangre se introdujo en un tubo rotulado con el RP del animal, que contenía 25 μ l de anticoagulante comercial GTLab (EDTA), el que fue depositado previamente con micropipeta automática. Antes de verter la sangre al tubo, se descartó la aguja; se tapó y se homogeneizó suavemente. Las muestras fueron refrigeradas y trasladadas al laboratorio central de la Facultad de Ciencias Veterinarias Casilda.

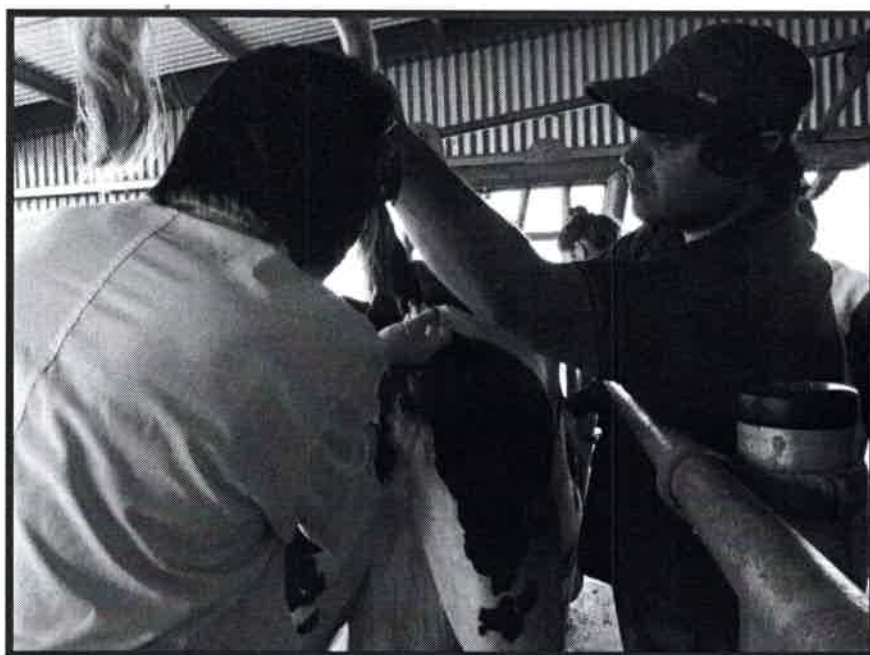


Figura 3: Extracción de la muestra de sangre.

B- TÉCNICAS DE LABORATORIO

Cortisol

Se descartó la aguja y se colocó la sangre suavemente, para evitar hemólisis, en un tubo rotulado con el RP del animal.

Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 1500 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.

Se colocaron los eppendorf en bolsa ziploc y se los almacenó en un frízer a -70 grados centígrados, en el laboratorio de la FCA-UNR, hasta su traslado al Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Río Cuarto.

El transporte hasta el laboratorio de UNRC se realizó en caja de telgopor con hielo seco. Allí se realizaron las determinaciones como a continuación se describe.

Se utilizó un 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 ^{125}I radioactivo.

Principio del Análisis

El procedimiento Coat-A-Count es un radioinmunoanálisis en fase sólida en el cual el cortisol marcado radiactivamente con ^{125}I compite, durante un período de tiempo determinado, con el cortisol de la muestra, por los sitios de unión de los anticuerpos. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción unida al anticuerpo del cortisol marcado.

El tubo se cuenta en un contador gama y da un número, que, mediante una curva de calibración, se convierte en una medida de cortisol presente en la muestra.

Procedimiento del Radioinmunoanálisis

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente (15-28 C) antes de su uso.

1-Tubos de ensayo: marcar cuatro tubos de polipropileno (sin recubrir) 12 x 75 mm. Tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica) por duplicado.

Tubos recubiertos: marcar doce tubos recubiertos de anticuerpo frente a cortisol: A (máxima unión) y B hasta F por duplicado. Marcar tubos recubiertos de anticuerpo adicionales, también en duplicado, para controles y muestras.

2-Pipetear 25 microlitros del calibrador cero A en los tubos NSB y A. Pipetear 25 microlitros del resto de los calibradores, controles y muestras.

3-Añadir 1 ml de ^{125}I cortisol a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.

4- Incubar durante 45 minutos a 37 C.

5- Decantar

6- Contar durante 1 minuto en un contador gamma

Cálculo de Resultados

Para obtener resultados en términos de concentración a partir de una representación logit-log de la curva de calibración, primero hay que calcular para cada pareja de tubos las cuentas medidas por minuto corregidas con NSB de los tubos A como 100%. Usando papel gráfico logit- log representar el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibración no cero, y dibujar la línea que pasa por esos puntos aproximadamente.

Los resultados de las muestras pueden ser leídos en la curva por interpolación. También se recomienda mantener un registro de los siguientes parámetros de la reducción de datos:

T: cuentas totales (como cuentas por minuto)

% NSB: $100 \times (\text{media cuentas NSB} / \text{cuentas totales})$

% MB: $100 \times (\text{cuentas netas} / \text{cuentas totales})$

Y los cortes 20,50 y 80 por ciento, donde 20% = concentración al 20% de unión, etc.

Blancos de Solventes

Esto implica extraer y analizar agua destilada o estéril, para verificar que dé una concentración aparente de cortisol esencialmente cero, es decir, por debajo del límite de detección del análisis.

Características Analíticas

Los resultados se expresan en microgramos de cortisol por decilitro (μ/dl)

Factor de Conversión: $\mu/\text{dl} \times 27,59 \rightarrow \text{nmol/l}$

Intervalo de Calibración: 1-50 μ /dl (27,6-1 380 nmol/l)

Sensibilidad Analítica: 0,2: μ /dl (5,5 nmol/l)

Precisión intraensayo (dentro de una tanda) las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos en una tanda.

Precisión entre ensayos (de una tanda a otra) los análisis estadísticos se calcularon para las muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos.

Efecto Deriva: ninguno, hasta aproximadamente 700 tubos.

Linealidad: las muestras fueron analizadas con varias diluciones.

Recuperación: se han analizado las muestras cargadas 1 a 19 con tres soluciones (130, 250 y 475 μ /dl) de cortisol.

Hemólisis: la presencia de eritrocitos hasta concentraciones de 30 μ /dl no tiene efecto en los resultados en lo concerniente a la precisión del ensayo.

Lipemia: el calibrador de 50 μ /dl se diluyó sucesivamente con un pool de suero lipémico. Esto hace que el grado de lipemia aumente a medida que la concentración del cortisol disminuye. Todas las diluciones se analizaron junto con el pool lipémico sin calibrador. Los resultados muestran una buena recuperación.

Especificidad: el antisuero Coat-A-Count Cortisol es altamente específico para el cortisol, y tiene una reactividad cruzada extremadamente baja para otros esteroides.

Cantidad de Glóbulos Blancos

Para determinar la cantidad total de glóbulos blancos se utilizó el contador hematológico MINDRAY-BC 2800, del laboratorio central de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Casilda. Las muestras extraídas en la mañana, entre las 7 y las 8.30 am,

fueron procesadas en forma inmediata luego de la extracción, mientras que las muestras extraídas a la tarde, entre las 6 y 7.30 pm se mantuvieron refrigeradas y se contaron a la mañana del día siguiente.

Antes de analizar la muestra, se seleccionó en el contador la especie bovina. La muestra se homogenizó varias veces, se colocó debajo de la aguja y el conteo se realizó en forma automática según las indicaciones que sugiere el contador hematológico.

Fórmula Leucocitaria Relativa

Para determinar la cantidad de neutrófilos y linfocitos y la relación neutrófilos/linfocitos, se realizó una coloración de May Grunwald and Giemsa:

- 1- Se realizó un extendido con la sangre extraída con EDTA
- 2- Se cubrió con 30 gotas de MAY GRUNWALD y se esperó 3 minutos.
- 3- Se agregó igual número de gotas de agua estabilizada (para preparar 50 ml de estabilizador se utilizó 1 parte de estabilizador en 49 partes de agua destilada).
- 4- Se mezcló por vaivén y se esperó 1 minuto.
- 5- Sin lavar, se agregó 10 ml de solución de Giemsa de uso (15 gotas de Giemsa Stock cada 10 ml de agua estabilizada). Se esperó entre 15-18 minutos.
- 6- Se lavó con agua corriente, se dejó secar.
- 7- Se observó al microscopio óptico a 40 x con aceite de inmersión contando un total de 200 células.

Cantidad de Glóbulos rojos

Para determinar la cantidad total de glóbulos rojos se utilizó el contador hematológico MINDRAY-BC 2800, del laboratorio central de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Casilda.

Las muestras extraídas en la mañana, entre las 7 y las 8.30 am, fueron procesadas en forma inmediata luego de la extracción, mientras que las muestras extraídas a la tarde, entre las 6 y 7.30 pm se mantuvieron refrigeradas y se contaron a la mañana del día siguiente.

Antes de analizar la muestra, se seleccionó en el contador la especie bovina. La muestra se homogenizó varias veces, se colocó debajo de la aguja y el conteo se realizó en forma automática según las indicaciones que sugiere el contador.

PROCESAMIENTO DE DATOS

Luego de haber realizado los procedimientos de laboratorio con el propósito de evaluar las muestras obtenidas se procedió a procesar los datos por medio del programa estadístico STATISTICA.

Las comparaciones se realizaron por un Análisis de la Varianza (ANOVA).

Como Test a Posteriori se usó un Test de Duncan cuando fueron apropiadas las comparaciones post-hoc. Se consideraron diferencias significativas las que presentaron un $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos se presentaron en Gráficos de Barras.

Se realizaron correlaciones entre los valores de cortisol y la relación Neutrófilos/Linfocitos.

El coeficiente de correlación es un valor que oscila entre -1 y 1 y es una evaluación cuantitativa de la “fuerza de la relación lineal” entre las variables.

Valor de *r* tal que $-1 < r < -0.5$ o $0.5 < r < 1$ le corresponde un nivel de esta fuerza “Fuerte”

Valor de *r* tal que $-0.5 < r < -0.3$ o $0.3 < r < 0.5$ le corresponde un nivel de esta fuerza “Moderado”

Valor de *r* tal que $-0.3 < r < -0.1$ o $0.1 < r < 0.3$ le corresponde un nivel de esta fuerza “Débil”

Valor de $r=1$ o $r=-1$ corresponde a una muy débil o ninguna fuerza en esta relación.

CAPITULO 4: RESULTADOS

Descripción del comportamiento de las variables

ESTRÉS TÉRMICO: ITH

Los valores promedios resultaron ser los siguientes:

ITH = 65,6 corresponde a Bajo para la toma de Primavera de la mañana.

ITH = 74,3 corresponde a Leve para la toma de Primavera de la tarde.

ITH = 71 corresponde a Bajo para la toma de Verano de la mañana.

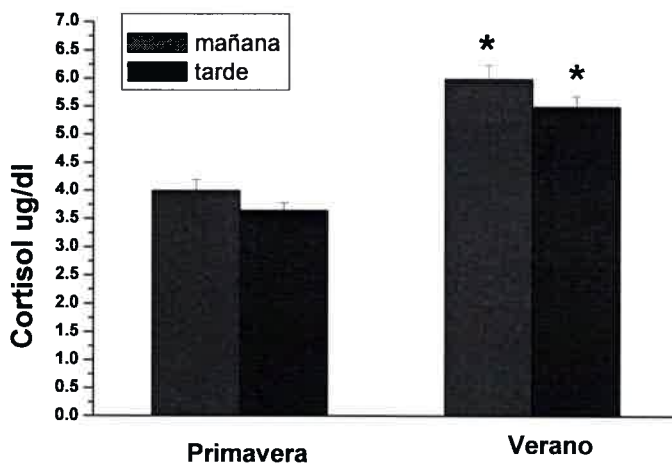
ITH = 80,08 corresponde a Moderado para la toma de Verano de la tarde.

Se puede observar que durante las mañanas los valores de ITH fueron bajos y por períodos de corta duración; en cambio, por las tardes alcanzaron a superar el límite que define la ocurrencia de ola de calor (ITH >72) aunque únicamente en Verano se sostuvieron durante varios días consecutivos (3-5 días).

De este modo, al comparar las variables dependientes de las mañanas entre sí y de las tardes entre sí, se advierte que las diferencias significativas se dan mayormente al comparar estas últimas, en coincidencia con la ocurrencia de las olas de calor. Cabe recordar que todas las variables dependientes, evaluadas en Primavera (no olas de calor) y Verano (olas de calor), se midieron en horas de la mañana (7 am) y de la tarde (7 pm). y en Verano (presencia de olas de calor), en horas de la mañana (7 am) y de la tarde (7 pm).

NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTISOL

En la Figura 4 se advierte que los niveles de cortisol fueron significativamente mayores en verano cuando los animales estuvieron expuestos a situaciones de estrés térmico debido a la ocurrencia de olas de calor que alcanzaron valores de ITH=80. El aumento fue observado en la mañana y en la tarde.



* $p < 0.05$ (Primavera-mañana vs. Verano-mañana)

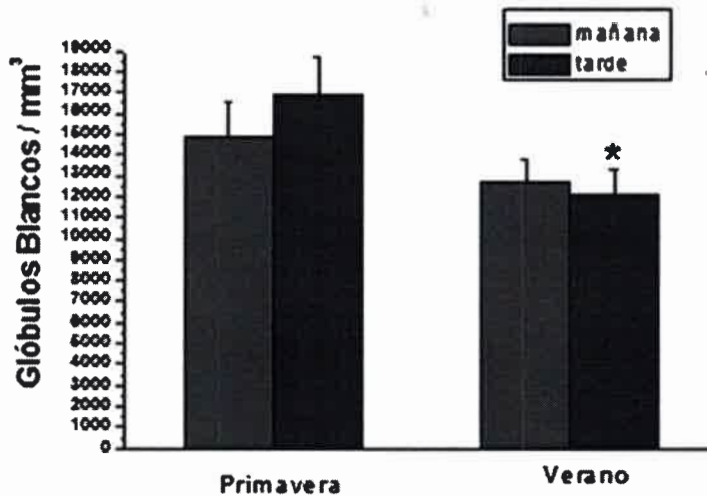
* $p < 0.05$ (Primavera-tarde vs. Verano-tarde)

Figura 4: Valores de Cortisol plasmático expresado en $\mu\text{g/dl}$

CANTIDAD DE GLÓBULOS BLANCOS

Como se puede observar en la Figura 5, el número total de Glóbulos Blancos fue menor en las muestras de sangre cuando los animales estuvieron expuestos a condiciones

de estrés térmico. Esta diferencia fue significativa al comparar las muestras correspondientes a la tarde.



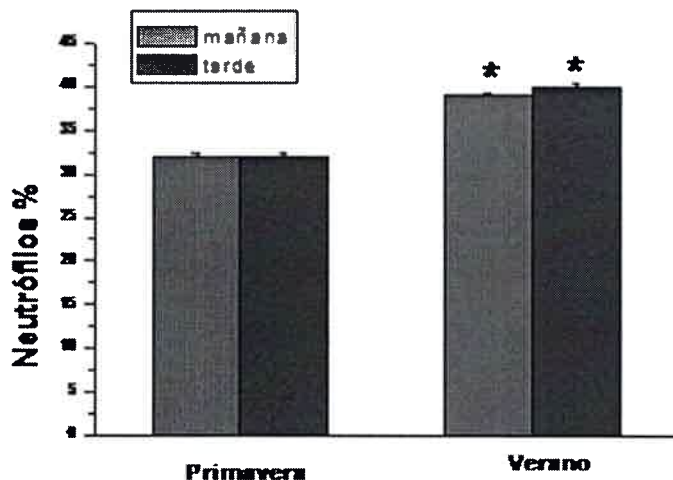
* $p < 0.05$ (Primavera-tarde vs. Verano-tarde)

Figura 5: Número total de Glóbulos Blancos expresados en miles en mm^3

CANTIDAD DE NEUTRÓFILOS

La Figura 6 muestra que los valores obtenidos en el muestreo de la mañana de verano son superiores a los obtenidos en la mañana de primavera. De igual forma, al comparar los valores del muestreo de la tarde de primavera con los obtenidos en la tarde de verano se observa un aumento significativo de los últimos.

En particular, se advierte que el porcentaje de Neutrófilos en animales muestreados en condiciones de termoneutralidad no se vio afectado por la hora de extracción.



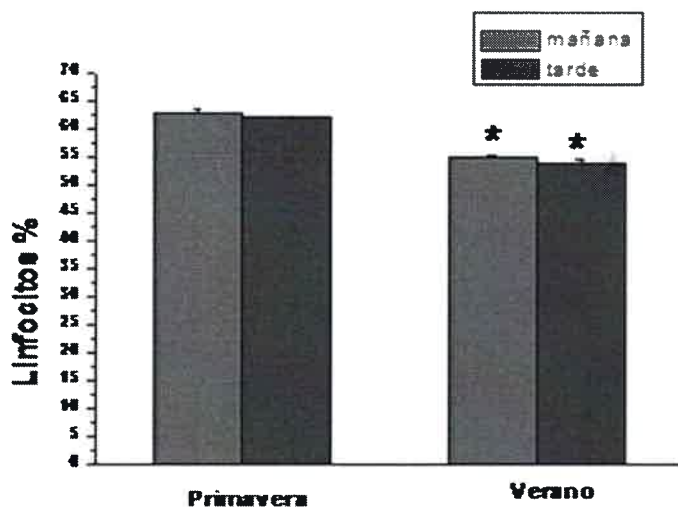
* $p < 0.05$ (Primavera-mañana vs. Verano-mañana)

* $p < 0.05$ (Primavera-tarde vs. Verano-tarde)

Figura 6: Cantidad de Neutrófilos expresados en porcentaje

CANTIDAD DE LINFOCITOS

En la Figura 7 se observa 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. De igual modo, los animales muestreados en la tarde de verano muestran una disminución significativa con respecto a la tarde de primavera.



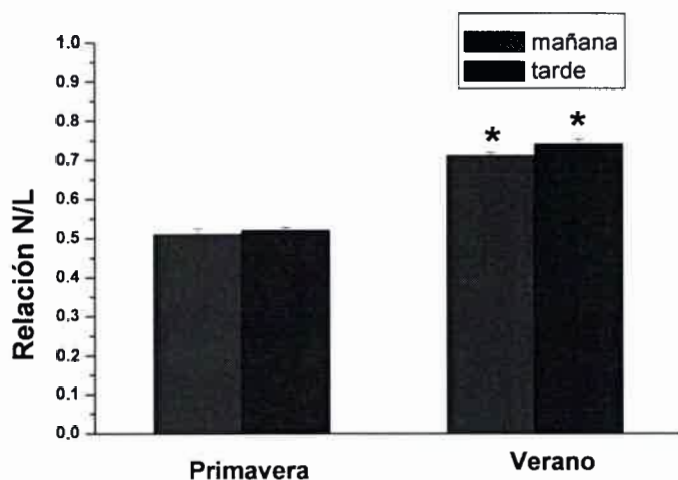
* $p < 0.05$ (Primavera-mañana vs. Verano-mañana)

* $p < 0.05$ (Primavera-tarde vs. Verano-tarde)

Figura 7: Cantidad de Linfocitos expresados en porcentaje

RELACIÓN NEUTRÓFILOS-LINFOCITOS

En la Figura 8 se advierte un aumento significativo de la relación Neutrófilos/Linfocitos al comparar las muestras de sangre de las mañanas y de las tardes para ambas estaciones.



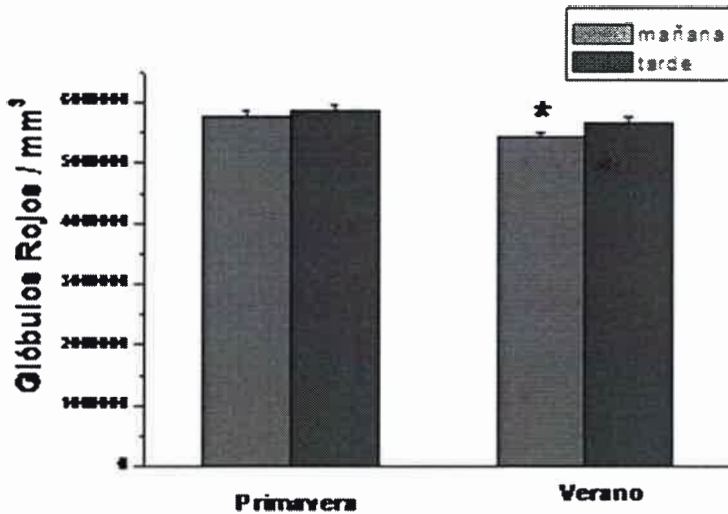
* $p < 0.05$ (Primavera-mañana vs. Verano-mañana)

* $p < 0.05$ (Primavera-tarde vs. Verano-tarde)

Figura 8: Relación Neutrófilos/Linfocitos

CANTIDAD DE GLÓBULOS ROJOS

En la Figura 9 se puede observar una disminución en la cantidad de Glóbulos Rojos cuando los animales estuvieron sometidos a condiciones de estrés térmico; esta diferencia resulta significativa al comparar los valores de la mañana.



* $p < 0.05$ (Primavera-mañana vs. Verano-mañana)

Figura 9: Cantidad de Glóbulos Rojos expresados en millones en mm^3

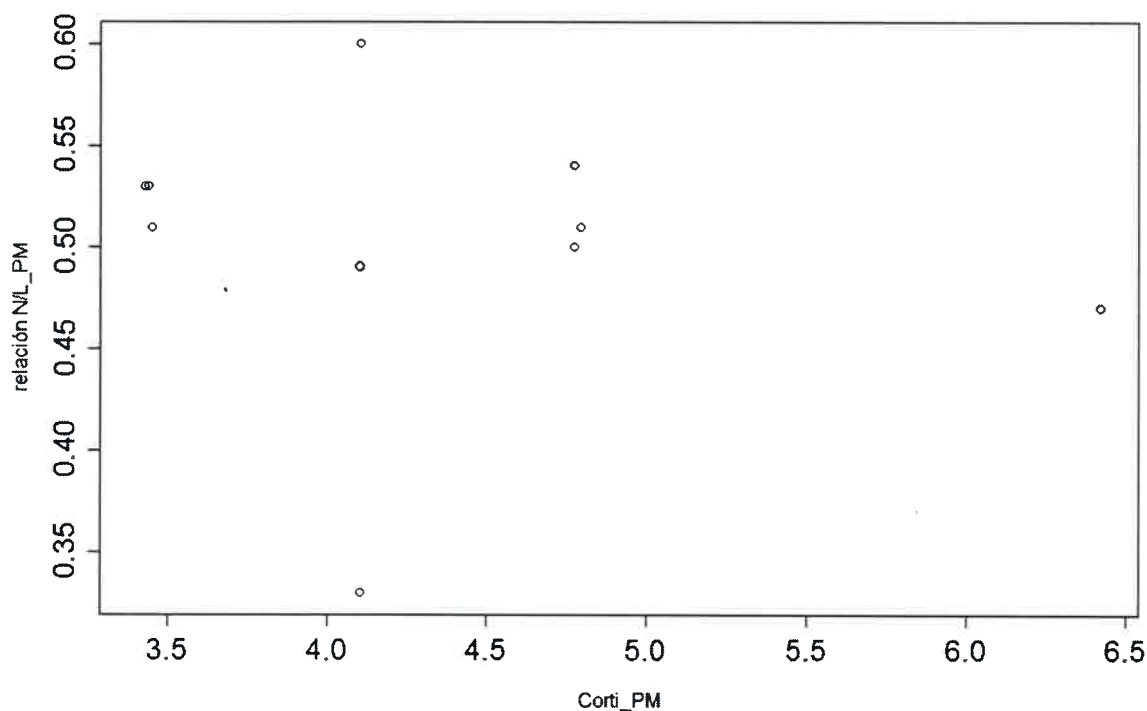
1-Correlación entre variables

Luego de analizar el comportamiento de las variables se procedió a realizar la correlación entre cortisol y la relación Neutrófilos/Linfocitos (N/L). El coeficiente de correlación es un valor que oscila entre -1 y 1 y es una evaluación cuantitativa de la “fuerza de la relación lineal” entre las variables. Este valor mide el grado de asociación entre las variables, no es “causalidad”.

CORRELACIÓN ENTRE CORTISOL PRIMAVERA MAÑANA Y LA RELACIÓN
NEUTRÓFILOS-LINFOCITOS PRIMAVERA MAÑANA

En la Figura 10 no se observa la existencia de alguna relación lineal entre estas variables

Figura 10: Correlación entre Cortisol vs N/L Mañana de Primavera.

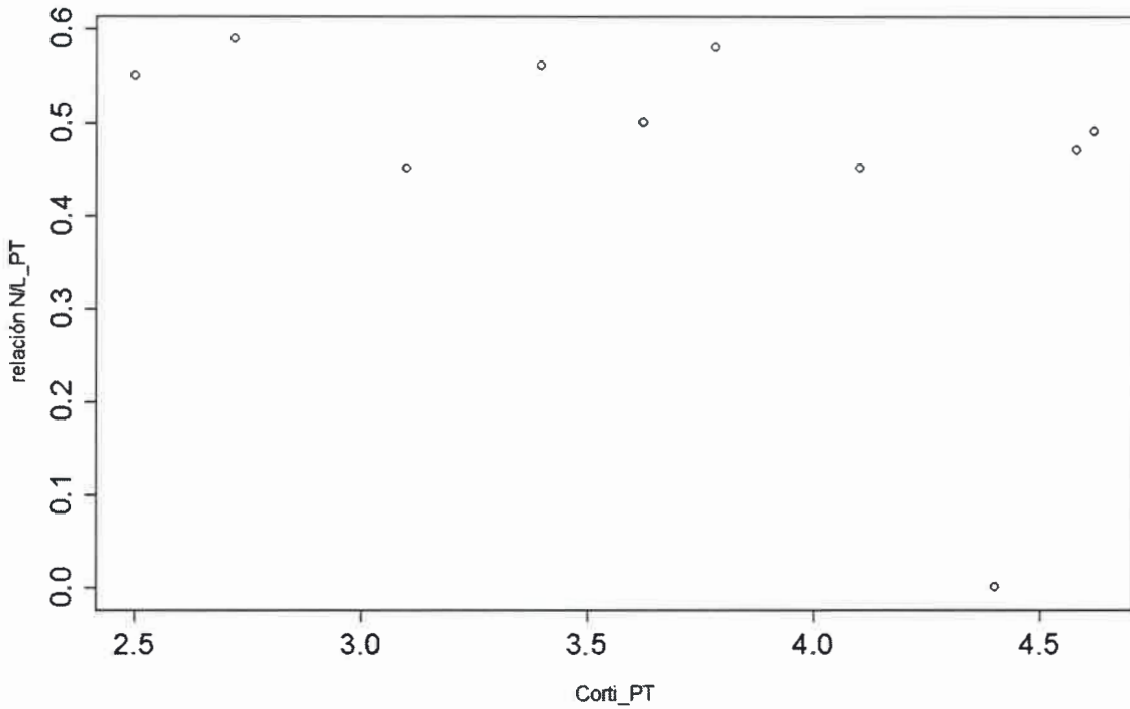


El coeficiente de correlación Spearman indica una débil fuerza de la correlación $r = -0.328$, $p < 0,05$

CORRELACIÓN ENTRE CORTISOL PRIMAVERA TARDE Y LA RELACIÓN NEUTRÓFILOS-LINFOCITOS PRIMAVERA TARDE

En la Figura 11 no se observa la existencia de alguna relación lineal entre estas variables.

Figura 11: correlación entre Cortisol vs N/L Tarde de Primavera.

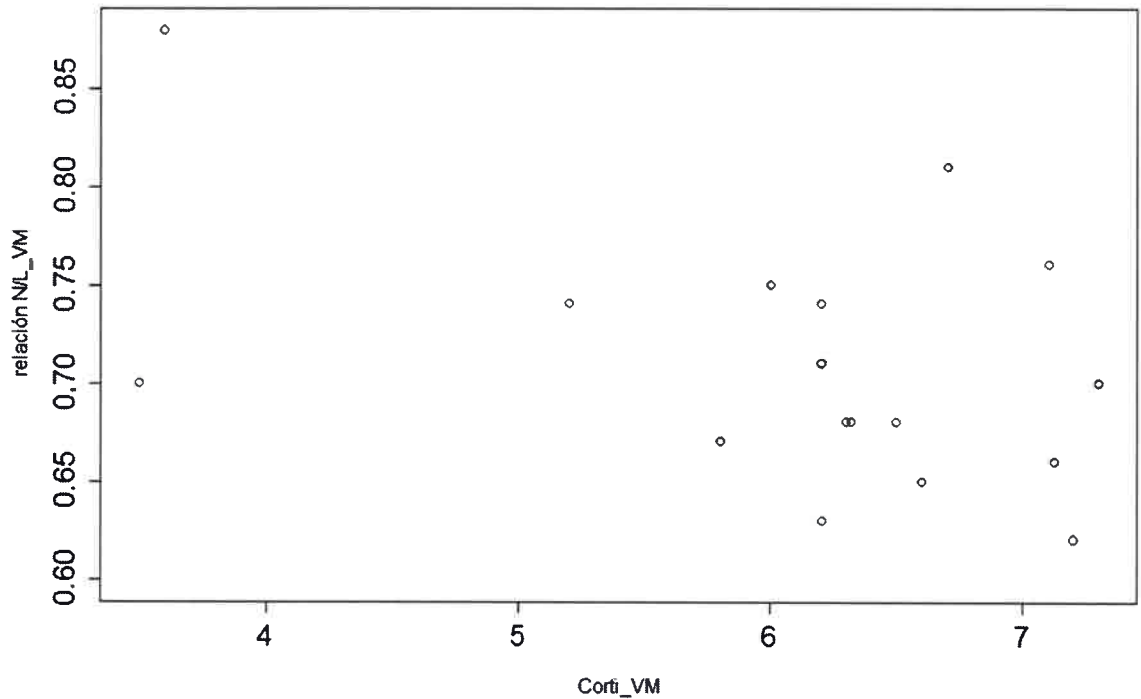


El coeficiente de correlación Spearman indica una moderada fuerza de correlación, $r=0.49$, $p < 0,05$

CORRELACIÓN ENTRE CORTISOL VERANO MAÑANA Y LA RELACIÓN NEUTRÓFILOS-LINFOCITOS VERANO MAÑANA

En la Figura 12 no se observa la existencia de alguna relación lineal entre estas variables.

Figura 12: Correlación entre Cortisol vs N/L Mañana de Verano

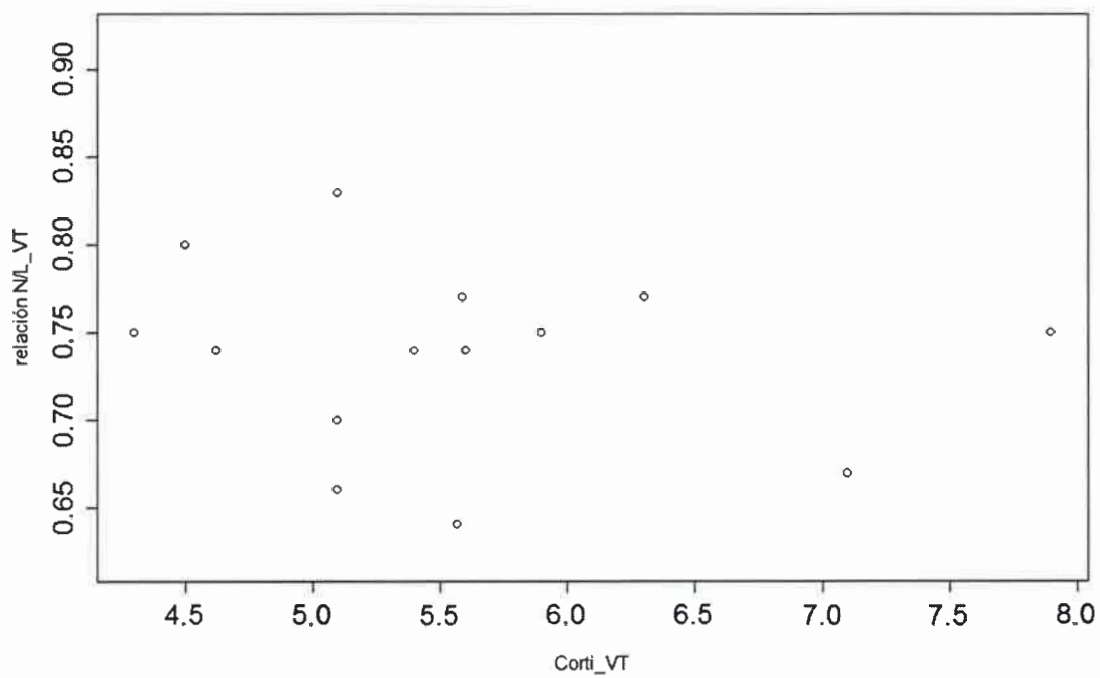


El coeficiente de correlación Spearman indica una débil fuerza de correlación, $r=-0.31$, $p<0,05$

CORRELACIÓN ENTRE CORTISOL VERANO TARDE Y LA RELACIÓN NEUTRÓFILOS-LINFOCITOS VERANO TARDE

En la Figura 13 no se observa la existencia de alguna relación lineal entre estas variables.

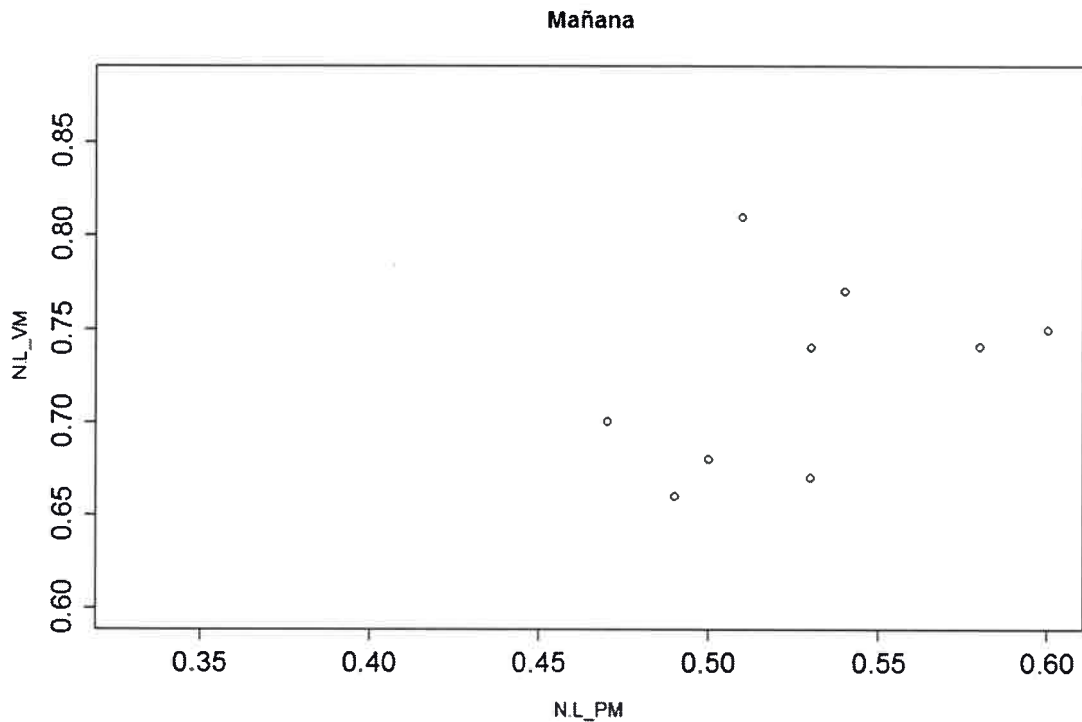
Figura 13: Correlación entre Cortisol vs N/L Tarde de Verano



El coeficiente de correlación Spearman indica que no hay correlación, $r=-0.085$, $p<0,05$

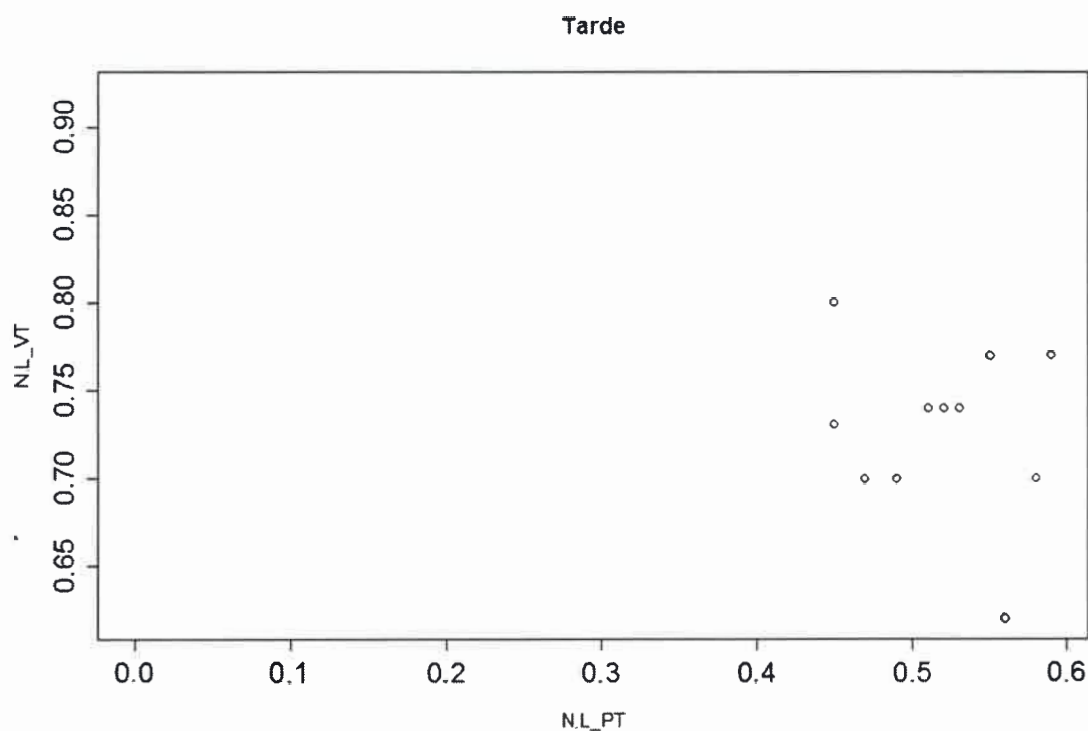
2-Análisis comparativo de la relación Neutrófilos/Linfocitos entre las mañanas y las tardes de cada estación

Figura 14: Gráfico de dispersión de la relación N/L en Verano Mañana Vs. Primavera Mañana



En la Figura 14 se observa que mientras en primavera los valores son menores a 0.6, en verano todos superan 0.65. Estas diferencias estacionales observadas en la relación N/L, que podrían atribuirse a las olas de calor, son significativas.

Figura 15: Gráfico de dispersión de la relación N/L en Verano Tarde Vs. Primavera Tarde

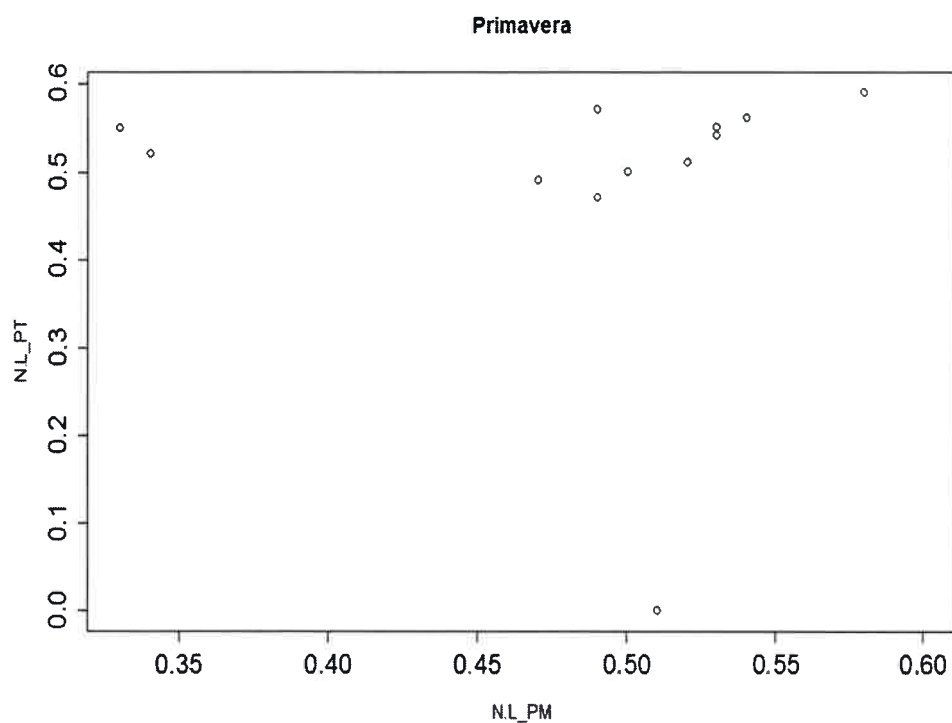


La Figura 15 muestra que, al comparar las tardes que es cuando se produce la diferencia de nivel en ITH para aproximadamente el mismo rango de variación en primavera, en verano en su mayoría superan 0.7 (la proporción es mayor).

Según los resultados se produjeron aumentos significativos de la cantidad de Neutrófilos con relación a la de Linfocitos, y descenso de Linfocitos entre las mañanas y tardes en ambas estaciones. Esto puede relacionarse con los aumentos significativos producidos en el Cortisol.

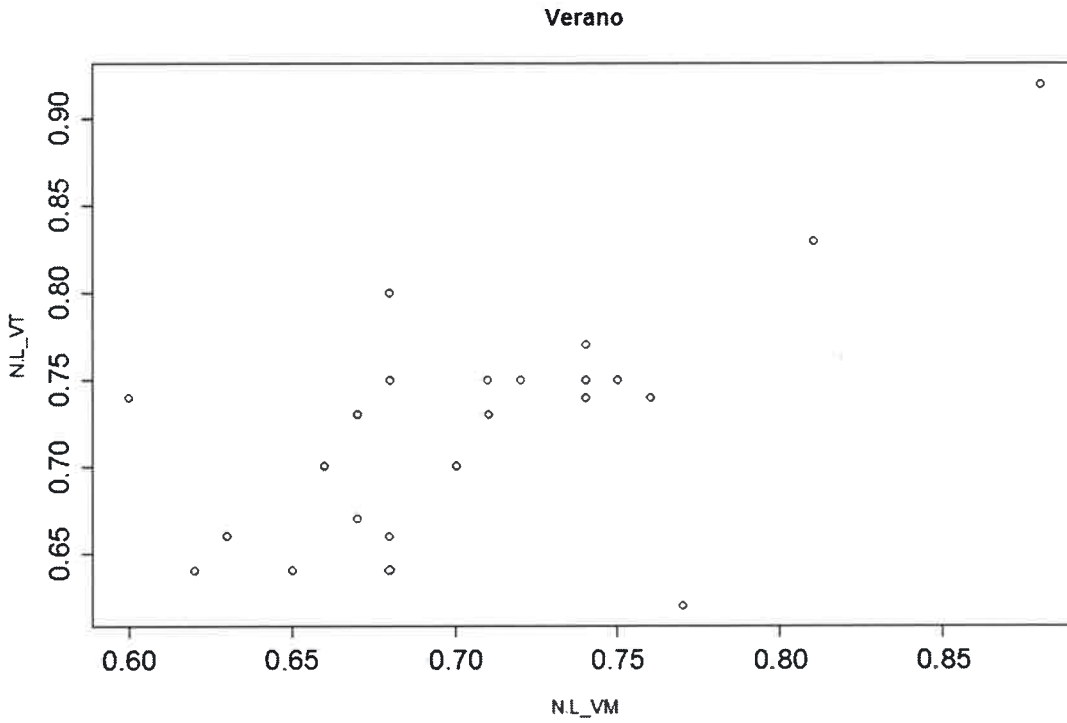
3- Análisis comparativo de la relación Neutrófilos/Linfocitos entre la mañana y la tarde en cada estación

Figura 16: Gráfico de dispersión de la relación N/L Primavera Tarde Vs. Primavera Mañana



Esta Figura 16 muestra que en Primavera al comparar la mañana con la tarde las proporciones no presentan diferencias significativas.

Figura 17: Gráfico de dispersión de la relación N/L Verano Tarde Vs. Verano Mañana



En cambio, aquí se advierte que las diferencias resultan ser significativas por la tarde, no así por la mañana.

CAPITULO 5: DISCUSIÓN

Como hemos visto, la secreción de cortisol es una de las principales respuestas del animal a condiciones de estrés. Los glucocorticoides son el producto final de la activación del eje HHA. Esta respuesta, se produce cuando un factor estresante activa el eje HHA que inicia la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). La activación del eje HHA es una de las respuestas neuroendocrinas más conocida y consistente frente al estrés.

La respuesta de los glucocorticoides al estrés es inmediata, las concentraciones de cortisol aumentan hasta alcanzar valores varias veces superiores a los normales (Ley y col, 1996; Cunningham 1999). Por ello, los valores de cortisol sanguíneo han sido reconocidos como indicadores de estrés.

A partir de los resultados obtenidos se observa que, en términos generales, los valores de cortisol plasmático en animales que fueron sometidos a diferentes condiciones climáticas -muestreados en la mañana y en la tarde- presentaron un aumento significativo en condiciones de estrés calórico.

Lo observado coincide con los resultados reportados por Christison y Johnson sobre un estudio realizado con animales expuestos a temperaturas de 35 °C que luego de 20 minutos mostraron 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.

El aumento del cortisol plasmático es fundamental para desencadenar el mecanismo de adaptabilidad del animal frente a un factor estresante, disminuyendo la disponibilidad de hormonas calorigénicas, que le permite al animal reducir el calor endógeno y el equilibrio térmico con su entorno ambiental (Christison y Johnson, 1972).

Los valores de cortisol plasmático encontrados en condiciones de termo neutralidad resultaron semejantes a las concentraciones plasmáticas promedio, citadas por otros autores (Termeulen y col, 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 el trabajo realizado en el módulo tambo de la Facultad de Ciencias Agrarias (Zavalla) coinciden con lo reportado por diversos autores (Thun y col 1981; Lefcourt y col 1993; Cunningham, 1999, Ogino y col 2014).

Los números totales y las proporciones relativas de los glóbulos blancos en la sangre representan el estado de distribución de los leucocitos en el organismo. Los cambios en dicha distribución y la relación entre los mismos se produce en respuesta a la liberación de cortisol, inducidos por el estrés térmico.

Debido a que la sangre es un compartimento accesible y de uso común para los estudios experimentales, el análisis de las muestras extraídas a animales en diferentes condiciones climáticas, permitió evaluar detalladamente el leucograma y sus modificaciones producidas en los animales sometidos a diferentes condiciones climáticas.

En la presente investigación, el número total de glóbulos blancos de las muestras extraídas a animales en condiciones de estrés térmico mostró una disminución significativa en el muestreo en horas de la tarde. Estos resultados coinciden con los de otros autores, los cuales han demostrado que el estrés puede disminuir el número total de los leucocitos sanguíneos (Naliboff y col, 1991; Schedlowski y col, 1993; Brosschot y col, 1994; Mills y col, 1995; Bosch y col, 2003).

Esto podría ser producido por los glucocorticoides endógenos, quienes en respuesta al estrés, inducen una disminución rápida y significativa de los leucocitos en sangre. Esta disminución en el número de leucocitos en sangre podría reflejar una redistribución de los leucocitos de la sangre a otros órganos en el cuerpo como el pasaje de linfocitos de la circulación a los ganglios linfáticos, la médula ósea, el bazo y la piel, produciendo una linfopenia, y el flujo de neutrófilos desde la médula ósea hacia la sangre y la disminución del paso de éstos hacia otros compartimentos, generando neutrofilia.

Sobre este aspecto se realizaron experimentos con el propósito de probar la hipótesis de que el estrés agudo induce una redistribución de los leucocitos de la sangre hacia otros

compartimentos en el cuerpo los cuales permitieron comprobar la redistribución de leucocitos inducida por los glucocorticoides (Dhabhar y col, 1995).

Una respuesta a un estrés agudo puede inducir cambios bifásicos en el número de leucocitos en la sangre. Poco después del comienzo de la tensión, en minutos, o durante el estrés agudo leve o ejercicio, las hormonas catecolaminas inducen a los leucocitos a salir del bazo, pulmón y otros órganos para ingresar en los vasos sanguíneos y linfáticos. Esto se traduce en un aumento del número de leucocitos en sangre. Como la respuesta al estrés continúa, la activación del eje HHA produce como resultado la liberación de hormonas glucocorticoides que inducen a los leucocitos salir de la sangre y tomar posición en distintos órganos, como la piel, las mucosas del tracto gastrointestinal y el urinario-genital, el pulmón, el hígado y los ganglios, aprestándose para los desafíos inmunológicos que pueden ser impuestos por acciones del factor de estrés (Dhabhar y col, 1996). Esta redistribución da por resultado una disminución en la sangre del número de leucocitos lo cual coincide con lo obtenido en nuestra experiencia.

En nuestro estudio, hemos observado que el estrés modificó la proporción relativa de los neutrófilos, que presentaron mayores valores en condiciones de estrés térmico, con un aumento significativo en el muestreo de la tarde en esas condiciones climáticas. 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.

Esto coincide con lo observado por algunos autores que en condiciones de estrés (Best y Taylor, 1986; Coles, 1989; Kaneko, 1989; Gómez Piquer, 1992) comprobaron elevaciones de los neutrófilos, disminución de los linfocitos y de los eosinófilos. En esta situación, los leucocitos pueden aumentar de 8 a $18 \times 10^9/l$ acompañados de neutrofilia, linfopenia, eosinopenia y a veces monocitopenia (Smith y Thier, 1983; Duncan y Prasse, 1994).

Los glucocorticoides estimulan el flujo de neutrófilos 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, 2011).

Los mecanismos de la neutrofilia inducida por los glucocorticoides se explican, además, por la desmarginación de los neutrófilos, que consiste en el pasaje de los neutrófilos desde la periferia del vaso al centro del flujo sanguíneo, movimiento acelerado de los neutrófilos de la médula ósea a la sangre, llevándolos al torrente sanguíneo central y la disminución de la diapédesis de los neutrófilos de la sangre hacia los tejidos (Weiss y Wardrop, 2010).

También se observó que el porcentaje de linfocitos obtenidos en las muestras evaluadas, presentaron valores menores en los muestreos realizados en horas de la tarde en las diferentes condiciones climáticas, con una disminución significativa del porcentaje de los mismos en las muestras extraídas en horas de la tarde, en presencia de estrés térmico.

Esta linfopenia, característica del leucograma presentado 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 y col 2004) sugiere que las variaciones en los valores encontrados tendrían relación con la magnitud del estresor y la concentración de glucocorticoides circulantes.

Es probable que los cambios observados en la distribución de los leucocitos estén mediados ya sea por los cambios en la expresión, o la afinidad de las moléculas de adhesión en los leucocitos y/o las células endoteliales. Se ha sugerido que después de un estrés agudo las subpoblaciones de leucocitos específicos, transportados por la sangre y la linfa a los diferentes compartimentos corporales, pueden ser retenidas selectivamente en aquellos compartimentos en los que se encuentran (Dhabhar y McEwen, 1999). Como resultado de esta retención selectiva, la proporción de subpoblaciones de leucocitos

específicos disminuirían en la sangre, mientras que aumentarían en el órgano en el que se conservan (por ejemplo, la piel) (Viswanathan y Dhabhar, 2005).

El apoyo a esta hipótesis proviene de estudios que muestran que las situaciones de estrés agudo puede inducir cambios significativos en moléculas de adhesión de leucocitos (Mills y Dimsdale, 1996; Goebel y Mills, 2000; Bauer y col, 2001; Redwine y col, 2003, 2004; Shephard, 2003).²

Por otra parte, los glucocorticoides también influyen en la producción de citoquinas (Danes y Araneo, 1989)³, que a su vez puede afectar a las propiedades de adhesión de la superficie de leucocitos y células endoteliales.

Sería necesario, por lo tanto, realizar otras investigaciones sobre los efectos de los glucocorticoides respecto a cambios en la expresión y actividad de moléculas de adhesión de superficie celular y sobre la adhesión de leucocitos a las células endoteliales.

Como consecuencia del aumento de los neutrófilos y la disminución de los linfocitos, ocasionados por la elevación del cortisol plasmático, hubo un aumento significativo de la relación Neutrófilos/Linfocitos en los animales muestreados en horas de la mañana y de la tarde en situación de estrés térmico. Estos hallazgos coinciden con lo expresado por algunos autores que han sugerido que la exposición a las condiciones estresantes, inicia la secreción de varias hormonas, adrenalina, noradrenalina y glucocorticoides. (Toft y col, 1994; Van de Kar y Blair, 1999), pudiendo alterar los receptores de adhesión en los leucocitos circulantes y por lo tanto, contribuir a una distribución modificada de leucocitos (McLaren, 2003).

Asimismo, estos resultados concuerdan con los de otros autores (Myung-Hoo y col. 2011) quienes abocados al estudio del estrés en bovinos comprobaron que la secreción de cortisol luego de la activación del eje HHA influyó en las subpoblaciones de los leucocitos, presentando un aumento significativo en el porcentaje de neutrófilos y una reducción en el porcentaje de los linfocitos. Esto se había derivado de cambios en la expresión de los

² Firdaus S. Dhabar

³ Firdaus S. Dhabar

genes de transcripción de neutrófilos, en coincidencia con los aumentos de cortisol, generado por situaciones estresantes como es el transporte, que modificó la relación Neutrófilos/Linfocitos en circulación (Buckam Sporer y col, 2008).

Estudios previos han permitido postular que los cambios en subpoblaciones de leucocitos pueden ser considerados como los potenciales biomarcadores del estrés fisiológico. En este sentido, la relación neutrófilos/linfocitos podría ser admitida ser un biomarcador efectivo de la respuesta al estrés, ya que esa relación presentó una correlación positiva con la magnitud del estresor y los niveles de glucocorticoides circulantes, aún en diferentes taxones de vertebrados (Davis y col 2008).

En nuestro estudio, al correlacionar el cortisol plasmático con la relación Neutrófilos/ Linfocitos en condiciones de termo neutralidad y estrés térmico menor a ITH 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 estresor 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 Neutrófilos/Linfocitos inducida por el cortisol.

Como ya vimos, complementariamente se analizó la variación del número total de glóbulos rojos en muestreos efectuados en horas de la mañana y de la tarde en diferentes condiciones ambientales observándose que los valores hallados en las muestras obtenidas en condiciones de estrés térmico fueron menores que los hallados en condiciones de termo neutralidad. Estos hallazgos coinciden con lo observado por algunos autores, (Beaty y col, 2006) que encontraron valores eritrocitarios menores en bovinos *Bous Taurus* sometidos a estrés calórico, pero difieren de lo citado por otros autores (Ferreira y col, 2009); (Delfino y col 2012) quienes obtuvieron resultados más elevados en el número de eritrocitos en animales en condiciones de estrés térmico.

CAPITULO 6: 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 glóbulos blancos y la relación Neutrófilos/Linfocitos.

Estos resultados, corroboran la hipótesis planteada: el estrés calórico, medido a través del ITH, modifica la cantidad y distribución de los glóbulos blancos en la sangre, efecto que podría ser adjudicado al aumento del cortisol plasmático.

Estas variaciones en los subconjuntos de leucocitos y el aumento de los glucocorticoides, ante situaciones de estrés térmico, modificarían las acciones inmunomoduladoras, pudiendo influir así en el funcionamiento del sistema inmune.

La disminución en el número de eritrocitos en concordancia con el aumento de ITH, sugiere la modificación de otro parámetro sanguíneo en condiciones de estrés calórico.

REFLEXIONES FINALES

Finalmente, considerando la complejidad de la neurofisiología del estrés térmico, se prevé ampliar el estudio y profundizar sobre la relación entre las variables cuando hay ocurrencia de olas de calor con ITH superior a 80. De este modo, se podría corroborar la existencia de una asociación entre ambas y concluir sobre los efectos inmunomoduladores de los glucocorticoides.

Asimismo, se sugiere realizar nuevos estudios sobre los efectos de los glucocorticoides en los cambios en la expresión y actividad de las moléculas de adhesión de superficie celular y la adhesión de leucocitos a las células endoteliales.

Por último, se propone desarrollar una propuesta de transferencia de las evidencias científicas obtenidas para modular el impacto de las olas de calor en sistemas de producción lechera que posean características comparables al Módulo Tambo de la

Facultad de Ciencias Agrarias-UNR y estén influenciados por condiciones climáticas similares a las descriptas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

-Alvarado, M. 1999. Análisis de las concentraciones sanguíneas de algunas de las variables indicadoras de estrés por transporte, en bovinos. *Tesis de Grado*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

-Arias, R.A.; Mader, T.L.; Escobar, P.C. 2008. Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. *Arch Med Vet* 40, 7-22.

-Bauer, C.; Herzog, V.; Bauer, M.F. 2001. Improved technique for electron microscope visualization of yeast membrane structure. *Microsc Microanal.* (6):530-534.

-Beatty, D.T.; Barnes, A; Taylor, E; Pethick, D.; Mc Carthy, M.; Maloney, S.K. 2006. Physiological responses of *Bos Taurus* and *Bos Indicus* cattle to prolonged and continuous heat and humidity. *J. Anim. Sci.* 84: 972-985.

-Benjamin, M.M. 1967. Blood cytology of shipping fever in beef cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 123: 209-212.

-Best y Taylor. 1996. *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*. 13⁰ edi. Editorial Médica Panamericana.

-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.

-Blanco, M.; Casasús, I.; Palacio, J. 2009. Effect of age at weaning on the physiological stress response and temperament of two beef cattle breeds. *Animal*; 3(1):108-117.

- Bosch, J.A.; Berntson, G.G.; Cacioppo, J.T.; Dhabar, F.S.; Marucha, P.T. 2003. Acute stress evokes selective mobilization of T cells that differ in chemokine receptor expression: a potential pathway linking immunologic reactivity to cardiovascular disease. *Brain Behav. Immun* 17:251-259.

-Broom, D.M. 2006. Behaviour and welfare in relation to pathology. *Applied Animal Behavior Science.* 97:73-83.

-Brosschot, J.F.; Benschop, R.J; Godaert, G.L.; Olf, M.; Desmet, M.; Heijnen, C.J.; Ballieux, R.E. 1994. Influence of life stress on immunological reactivity to mild psychological stress. *Psychosom. Med.* 56:216-224.

- Buckam Sporer, K.R.; Xiao, L.; Tempelman, R.J.; Burton J.L.; Earley, B.; Crowe, M.A. 2008. Transportation stress alters the circulating steroid environment and neutrophil gene expression in beef bulls. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121. 300-320.
- Buckham Sporer, K. R .; Weber, S. D; Burton, J. L; Earley, B. ; Crowe, M. A. 2008. Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. *Journal of Animal Science*. 86: 6: 1325-1334.
- Burton, M.; Rose, T.M; Faergeman, N.J.; Knudsen, J. 2005. Evolution of the acyl-Coa binding protein (ACBP). *Biochem J* 392 (Pt 2): 299-307.
- Carroll, J.; Jones, K.T.; Whittingham, D.G. 1996. One of the first who recognized the importance of intracellular Ca release in oocyte activation *J.Reprod.Fert*.
- Coles, E.H. 1989. *Veterinary Clinical Pathology*, 4th ed., Saunders, Philadelphia, 486 p.
- Colle, N.A.; Camp, T.H.; Rower Jr, L.D.; Stevens, D.G.; Hutcheson, D.P. 1988. Effects transport on feeder calves. *Amer. J. Vet. Res.* 49: 178-183.
- Coppo, J.A.; Coppo, N.B.; Revidatti, M.A.; Capellari, A. 2001. Valores de cortisol en vacas precozmente destetadas. Relaciones con recuentos totales y diferenciales de leucocitos. Web.unne.edu.ar/cyt/veterinarias/v.035.pdf.
- Cunningham, J. 1999. *Fisiología Veterinaria*. Pp: 409-429. Editorial Elsevier 3rd ed. Madrid, España.
- Chang, M; Bellaovi, M; Zhang, C; Desai, R; Morozov, P; Delgado-Cruzata, L; Rothstein, R; Freyer, G.A; Brown, G.W. 2004. RMI/NCE 4 a suppressor of genome instability, encodes a member of the Rec Q helicase/topo III complex. *EMBO J* 24 (11): 2024-3. *Journal Article- Pub Med*.
- Christison, G.I.; Johnson, H.D. 1972. Cortisol turnover in heat-stressed cows. *J Anim Sci* 35, 1005-1010.

-Chrousos, G.1998. Stressors, estress and neuroendocrine integration of adaptative response. The 1997 Hans Seyle Memorial Lecture. Animals of the New York Academy of Sciences, 851,311-355.

-Chrousos, G. 2000. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int Jobs Relat Metab Disord*.

-Danes, R.A. ; Araneo, B.A. 1989. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the grwth factors interleukin 2 and interleukin 4. *European Journal fo Immunology*. 19 :2319-2325.

-Davis, A.K.; Mane, D.L; Maerz, J.C. 2008. The use of leucociyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologist. *Funtional Ecology*. 22, 760-772.

-Delfino, L.J.B.; de Souza, B.B.; Rosangela, M.N.; da Silva, W.W. 2012. Efeito do estresse calórico sobre eritograma de ruminantes. *Revista ACSA*. V.8, n p 01-07.

-Dhabhar, Fridaus S. 1998. Stress-induced Changes in Immune cell Distribution and Trafficking: Implications for Immunoprotection Versus Immunopathology.

-Dhabhar, F.S.; McEwen, B.S. 1999. Changes in blood leukocyte distribution: interactions between catecholamine and glucocorticoids homones. *Neuroinmunomodulation*. 6:213.

-Dhabhar, F.S.; Miller, A.H.; McEwen, B.S.; Spencer, R.L. 1995b. Differential activation of adrenal steroid receptors in neural and immune tissues of Sprague Dawley, Fischer 344, and Lewis rats. *J. Neuroimmunol*. 56:77-90.

-Dhabhar, F.S.; Miller, A.H.; McEwen, B.S.; Spencer, R.L. 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *Journal of Immunology*. 157 4: 1638-1644.

-Da Silva RG. 2006. Weather and climate and animal production. In: Update of the guide to agricultural meteorological practices. WMO-No.134 published in 1982.

-Dukes' Phhysiology of Domestic Animals, 12^a. ed. William O. Reece. Editorial Cornell University Press.

-Duncan, J.R.; Prasse, K.W. 1986. *Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Pathology* 2^{da} edn., Iowa Univ. Press, Ames.

-Duncan, V.R.; Prasse, K.W.; Mahaffey, E.A. 1994. Eds *Veterinary Laboratory Medicine*-3rd ed.

-Durr, U.M.; Kraft, W. 1980. *Lab. Testing in Veterinary Medicine*. Public B.Mannheim, Munich.

- Dyce, K.M; Sack, W.O; Wensing, C.J.G. 1991. *Anatomía Veterinaria*. Editorial Médica Panamericana. S.A.

Fehm,H.L.;Benkowitsch,R.;Kern,W.;FehmWolfsdorf,G.;Pauschinger,P.;Born,J 1986. Influences of corticosteroids, dexametasone and hydrocortisone on sleep in humans. *Neuropsychobiology* 16:198-204.

-Feng Liu; Garofalini, S. H; King-Smith, R. D.; Vandrivilt, D. 1993. *Physical Review Letters*. 70, 2750.

-Ferreira, F.; Campos, W.E.; Carvalho, A.V.; Pires, M.F.A.; Martinez, M.L.; Silva ,M.V.G.B.; Verneque, R.S.; Silva, P.F. 2009. Parámetros clínicos, hematológicos e hormonais de bovinos submetidos ao estresse calórico. *Arq. Bras. Vet. Zootec.*, V.61, n.4 p.769-776.

-Fink,G. y Smith, G.S. 1991. Ultrastructural features of the prenatal development of the hypothalamo-pituitary axis in the rat. *J. Anat* 106:207.

- García, M. S.; Léva, P.E.; Zbrun, M.E; Veles, M. A.; Gandolfo, J. A.; Valtorta, S. E. Tendencias de índices meteorológicos y biometeorológicos. *Revista FAVE - Ciencias Agrarias* 1 (1): 27 - 36. 2002 ISSN 1666-7719.

-García Sacristán, A. 1995. *Fisiología Veterinaria*. Editorial Mc Graw-Hill-Interamericana.

-Gaughan, J.B; Mader, T.L.; Holt, S.M.; Lisle,A. 2007. A new heat load index for feedlot cattle. *Journal Anim Sci*. jas.2007-0305 vl.

-Golbel, M.U. y Mills, P.J. 2000. Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. *Psychosomatic Medicine* 62, 664-670.

-Goldberg,S; Cirera,I. ;Denegri, M.J. 2008.Temperatura umbral para la ocurrencia de estrés calórico en vacas lecheras en la Cuenca Media del Rio Luján. XII Reunión Argentina de Agrometeorología. San Salvador de Jujuy, Argentina.

-Guillemin, R.; Rosenberg, B. 1955. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: study with combined tissue cultures. *Endocrinology*. 57:599-607.

-Gómez González, B.; Escobar, A. 2006. Estrés y Sistema Inmune- *Rev. Mex Neuroci*, 7 (1): 30-38.

-Gómez Piquer, J. 1992. *Manual Práctico de Análisis Clínico en Veterinaria*. 1ªedi., Mira S.A., Zaragoza.

-Guyton, A.C y Hall, J.E. 1996. *Textbook of Medical Physiology*.

-Harris, G.W. 1948. Neural Control of the pituitary gland. *Physiol. Rev.*, 28, 139-179.

-Jain,N.C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. 1ªEd. Lea & Febiger, Philadelphia.

-Jones, C.T. y Edwards, A .V. 1990. Release of adenocorticotrophin from the adrenal gland in the conscious calf. *J Physiol (Lond)* 426: 397.

-Kaneko,J.J. 1989. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4th, edn., Academic Press, San Diego.

-Kannan,G.; Kouakou,B.; Terril,T.H.; Gelaye,S. 2003. Endocrine, blood metabolite, and meat quality changes in goats as influenced by short-term, preslaughter stress. *J Anim Sci*; 81:1499-1507.

-Khalifa H.H. 2003. *Bioclimatology and adaptation of farm animals in a changing climate*. In: interactions between climate and animal production. Netherland Ed. Wageningen Academic Publisher. 15-29.

- Kim Young-Hoo; Kim, J.S.; Park, J.W.; Joo, J.H. 2011. Comparison of the low contact stress and press fit condylar rotating-platform mobile-bearing prostheses in total knee arthroplasty a prospective randomized study. *J Bone J Am* 93 (11):1001-7.
- Knowles, T.; Warriss, P. 2006. Stress physiology of animals during transport. In: *Livestock handling and transport*, eds. Temple Grandin. 3 ed.
- Kolb, E. 1987. *Fisiología Veterinaria*, 3er edn., Acribia, Zaragoza.
- Labrie, F.; Giguere, V.; Proulx, L.; Lefevre, G. 1984. Interactions between CRF, epinephrine, vasopressin and glucocorticoids in the control of ACTH secretion. *J Steroid Biochem.* (1):153-60.
- Lagger, J. E.; Schmidt, D.; Waran, R.; Otrsky. 2004. Medición de cortisol en leche como indicador de bienestar animal. Resultados preliminares. *Vet Arg* 208, 577-586.
- Lay, D. y Wilson, M. 2001. Physiological indicators of stress in domestic livestock. Symposium on Concentrated Animal Feeding Operations Regarding Animal Behavior, Care, and Well-Being, Indiana; p.1-25.
- Lefcourt, A. J.; Bitman, S.; Kahl, L.; Wood. 1993. Circadian y ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 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. *Revista FAVE - Ciencias Agrarias* 7 (1-2) ISSN 1666-7719.
- Ley, S.J.; Waterman, A.E.; Livingston, A. 1996. Measurement of mechanical thresholds, plasma cortisol and catecholamines in control and lame cattle: a preliminary study. *Res Vet Sci.* 61 (2):172-3.
- Liu, P.S.; Lin, M.K.; Hsieh, H.L. 1983. Dehydroepiandrosterone sulfate inhibition of catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett*; 204:181-4.
- Madsen-Bouterse, S. A; Rosa, G. J. M.; Burton, J.L. 2006. Glucocorticoid modulation of Bcl-2 family members A1 and bak during delayed spontaneous apoptosis of bovine blood neutrophils. *Endocrinology* 147(8):3826.

- Madsen, S.A.; Chang, L.C.; Hickey, M.C; Rosa, G.J.; Coussens, P.M.;Burton, J.L. 2004. Microarray analysis of gene expression in blood neutrophils of parturient cows. *Physiol Genomics* 16:212–221.
- Maff, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 2000. *Climate Change and Agriculture in the United Kingdom*. PB 4876, Summary A4.
- Markowska, A.; Rebuffat, P.; Rocco, S.; Gottardo, G.; Mazzochi, G.; Nussdofer, G.G. 1993. Evidence that and extrahypothalamic pituitary corticotrophin (CRH) / adenocorticotropin (ACTH) system controls adrenal growth and secretion in rats. *Cell Tissue Res*, 272 (3):439-45
- 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 Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de Rosario.
- Matteri, 1994. Gonadotropin-releasing hormone: molecules and receptors.
- Mazzocchi, G.; Rebuffat, P.; Meneghelli, V.; Nussdofer, G.G. 1989. Effects of infusion with ACTH or CRH on the secretory activity of rat adrenal cortex. *J. Steroid Biochem* 32 (6): 841-3.
- Mazzocchi, G.; Malendowicz, L.K.; Andreis, P.G.; Meneghelli, V.; Markowska, A.; Belloni, A.G.; Nussdorfer, G.G. 1994. Neuropeptide K enhances glucocorticoid release by acting directly on the rat adrenal gland: the possible involvement of zona medullaris. *Brain Res*. 661 (1-2): 91-6.
- Mazzocchi, G.; Malendowicz, L.K.; Rebuffat, P.; Tortorella, C.; Nussdorfer, G.G. 1997. Arginine-Vasopresine stimulates CRH and ACTH release by rat adrenal medulla, acting via the V1 receptor subtype and protein kinase c- dependent pathway. *Peptides* 18 (2): 191-5.
- Mc Ewen, 1979. Glucocorticoids and ACTH secretion- Hormones and the Brain.

- McLaren, G.W.; Macdonald, D.W.; Georgiou, C.; Mathews, F.; Newman, C. and Mian, R. 2003. Leukocyte coping capacity: a novel technique for measuring the stress response in vertebrates. Publication of the Physiological Society.
- Meyer, D. J.; Harvey John. W. 2000. El Laboratorio en medicina veterinaria. 2⁰ Edición. Inter-Médica Editorial.
- Mills, P.J.; Berry, C.C.; Dimsdale, J.E.; Ziegler, M.G.; Nelsen, R.A.; Kennedy, B.P. 1995. Lymphocyte subset redistribution in response to acute experimental stress: Effects of sender, ethnicity, hypertension and the sympathetic nervous system. *Brain Behav. Immun.* 9:61-69.
- Mills, P.J.; Dimsdale, J.E. 1996. The effects of acute psychologic stress on cellular adhesion. *J Psychosom Res.* 23 (1-2): 83-90.
- Minamino, T.; Kitakaze, M.; Sanada, S.; Asanuma, H.; Kurotobi, T.; Koretsune, Y.; Fukunami, M.; Kuzuya, T.; Hokin, N.; Hori, M. 1998. Increased expression of P-selectin on platelets is a risk factor for silent cerebral infarction in patients with atrial fibrillation: role of nitric oxide. *Circulation.* 98 (17): 1721-7.
- Minton, E.J. 1994. Function of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. *J. Anim. Sci.* 72:1891-1898.
- Minton, E.J.; Parsons, K.M. 1993. *J. Anim. Sci.* 71,724
- Montero Bulacio, E.; Coronel, A. 2012. Caracterización y variabilidad climática de las olas de calor en Zavalla, Santa Fe. XIV Reunión Argentina de Agrometeorología. Argentina. Mendoza.
- Moberg, G.P. 1985. Biological response to stress: key to assessment of animal stress. Bethesda M D. American Physiological Society.
- Morberg G.P.; Mench J.A. 2000. The biology of animal stress. Basic Principles and Implications for Animal Welfare. Edit. CABI Publishing. New York. USA.

- Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; Beerda, B.; Guémené, D.; Malmkvist, J. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav*; 92:317-339.
- Morrow, C.; Kolver, E.; Verkerk, G.; Matthews, L. 2002. Fecal glucocorticoid measure of adrenal activity in dairy cattle. *Gen Com Endocrinol* 126, 229-241.
- Muchenje, V.; Dzama, K.; Chimonyo, M.; Strydom, P.E.; Raats, J.G. 2009. Relationship between pre-slaughter stress responsiveness and beef quality in three cattle breeds. *Meat Sci*; 81:653-657.
- Muglia, L.J.; Jenkins, N.A.; Gilbert, D.J.; Copeland, N.G.; Majzoub, J.A. 1994. Expression of the mouse corticotrophin-releasing hormone gene in vivo and targeted inactivation in embryonic stem cells. *J Clin Invest*. 93 (5): 2066-72.
- Muñoz-Abellán, C.; Andero, R.; Nadal, R.; Armario, A. 2008. Marked dissociation between hypothalamic-pituitary-adrenal activation and long-term behavioral effects in rats exposed to immobilization or cat odor. *Psyconeuroendocrinology*; 33 (8): 1139-50.
- Muñoz-Abellán, C.; Daviu, N.; Rabasca, C.; Nadal, R.; Armario, A. 2009. Cat odor causes long-lasting contextual conditioning and increased pituitary-adrenal activation without modifying anxiety. *Horm Behav*.
- 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.
- Muñoz, G.; Rondelli, F.; Maiztegui, L.; Gherardi, S.; Tolini, F.; Fernández, G.; Coronel, A.; Amelong, J. 2013. Leucograma y hematocrito como indicadores de estrés térmico en vacas Holando Argentino. VII Jornada de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Rosario.
- Myung-Hoo, K.; Ji-Young, Y.; Santi Devi, V.; Hyun-Jun, L.; Cheol-Hevi, Y.; Jong Ha, K. 2011. El estrés del destete influencia niveles séricos de proteínas de fase aguda, proteína de unión a hierro, citoquinas inflamatorias, cortisol y sub conjuntos de leucocitos en terneros Holstein. *Journal of Veterinary Science*. 12 (2) 151-157.

-Naliboff, B.D.; Benton, D.; Solomon, G.F.; Morley, J.E.; Fahey, J.L.; Bloom, E.T.; Makinodan, T.; Gilmore, S.L. 1991. Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress. *Psychosom. Med.* 53: 121-132.

-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.

-Parker, S.; Nichter, M.; Vuckovic, S.C.; Ritenbaugh, C. 1995. Body image and weight concerns among African American and white adolescent females: difference. *Human Organization* 54: 103-114.

-Plotsky, P.M.; Trivikraman, K.V.; Meaney, M.J. 1993. Central and feedback regulation of hypothalamic corticotrophin-releasing factor secretion. *Ciba Found. Symp.* 172, 59-75.

-Porter, J.C.; Jones, C.I. 1956. *Endocrinology* 58, 62.

-Redwine, L.; Dang, J.; Hall, M.; Irwin, M. 2003. Disordered sleep, nocturnal cytokines, and immunity in alcoholics. *Psychosom. Med.* 65, 75-85.

-Redwine, L.; Hauger, R.L.; Gillin, J.C.; Irwin, M. 2000. Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol, and melatonin levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3597-3603.

-Renaudeau, D. 2005. There were on the other hand intensive discussions in the field of energy feed evaluation systems. *Animal Production and Animal Science World Wide*.

-Rivier, J.; Spiess, J.; Vale, W. 1983. *Peptides : structure and function*. Pierce Chemical Co, Rockford II pp 853- 856.

- Romero Peñuela, Marlyn Hellen; Uribe-Velásquez, Luis Fernando; Sánchez Valencia, Jorge Alberto. 2011. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. Biosalud, Volumen 10. 71 – 87.

-Rosemberger, A.L. 1981. Systematics: the higher taxa in ecology and behavior of neotropical primates. A.F. Coimbra-Filo & R.A. Mihermeir, (Eds). Academia Brasilia de ciencias, Río de Janeiro p.p.9-27.

-Ruckebusch, Y.; Phaneuf, L.P.; Dunlop, R. 1994. Fisiología de pequeñas y grandes especies. Editorial El Manual Moderno, S.A de C.V. México, D.F.- Santafé de Bogotá.

-Saffran, M.; Schally, A.V.; Benfey, B.G.1955. Stimulation of the release of corticotrophin from the adenohypophysis by a neurohypophysial factor. *Endocrinology*, 57:439-44.

-Sapolsky, R. 1992. Neuroendocrinology of the stress-response. In: Becker JB BS, Crew D, editor. Behavioral Endocrinology. London, England: Massachusetts Institute of Technology, MIT Press, Cambridge. p 287-324.

-Sapolsky, R. M.; Romero, L. M.; Munck, A. U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.*, 21:55-89.

-Saravia, C.; Astigarraga, L.; Van Lier, E.; Bentancur, O. 2011. Impacto de las olas de calor en vacas lecheras en Salto (Uruguay). *Agrociencia Uruguay - Volumen 151*: 93-102

-Schedlowski, M.; Jacobs, R.; Stratman, G.; Richter, S.; Hadike, A.; Tewes, V.; Wagner, T.O.F.; Schmidt, R.E. 1993. Changes of natural killer cells during acute psychological stress. *J. Clin. Immunol.* 13: 119-126.

-Selye, H. 1936. A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*, vol. 138, p. 32. Edit. Macmillan Magazines Ltd. Montreal, Canadá.

-Selye, H. 1939. On the toxicity of oestrogens with special reference to diethylstibioestrol. *Can Med Assoc J.*

-Shephard, R.J. 2003. Adhesión molecules catecholamines and leucocytes redistribution during and following exercise. *Sports Med*; 33 (4): 261-84. Review.

- Shipman, G.F.; Bloomfield, C.D; Gajil-Peczalska, K.J; Munck, A.V.; Smith, K.A. 1983. Glucorticoids and linfocytes III. Effects of glucocorticoid receptors blood. 61, 1086-1090.
- Souza, M.I.L.; Uribe-Velásquez, L.F.; Ramos, A.A.; Oba, E. 2006. Níveis plasmáticos de colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL) e cortisol, e sua biorritmicidades, em carneiros Ideal-Polwarth. Cien Anim Bras; 7(4):433-438.
- Suda, M.; Nakao, K.; Sakamoto, M.; Yoshimasa, T.; Moni, N.; Numa, S.; Imura, H.I. 1982. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproephalian. Nature. 295: 202-16.
- Swanson, L.W.; Sawchenko, P.E.; Rivier, J.; Vale, W.W. 1983. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. Neuroendocrinology. 36 (3):165-86.
- Swenson, M. ; Reece, W. 1999. Fisiología de los Animales domésticos de Dukes. Segunda edición, Tomo 2. Editorial LIMUSA, Grupo Noriega Editores. S. A. México, D. F. Pp. 629-664.
- Tadich, N.; Gallo, C.; Bustamante, H.; Schwerter, M.; Van Schaik, G. 2005. Effects of transport and lairage time on some blood constituents of Friesian-cross steers in Chile Livest Prod Sci; 93:223-233.
- 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.
- The American Heritage Dictionary of English Language. 1992. 3rd Ed. Boston: Houghton Mifflin Company.
- Thun, R.; Eggenberger, K.; Zerobin, T.; Lüscher, W. Vetter,E. 1981. Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm. Endocrinol 109, 2208-2212.
- Toft y col.1994. Exercise as an Emergency and a Stressor.

- Trevisi, E.; Bertoni, G. 2009. Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Ital J Anim Sci*; 8(Suppl.1):265-286.

-Valtorta, S.E.; Leva, P. E.; Garcia, M. S.; Rodriguez, R. O. 2008. Régimen agroclimático de olas de calor en la provincia de Santa Fe, Argentina. *Revista FAVE - Ciencias Agrarias* 7 (1-2) ISSN 1666-7719.

-Van de Kar, L.D; Blair, M.L. 1999. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front. Neuroendocrinol.* 20, 1-48.

-Viswanathan, K.; Dhabhar, F.S. 2005. Stress-induced enhancement of leucocyte trafficking into sites of surgery or immune activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102 (16): 5008-13.

-Watabe, T.; Tanaka, K.; Kumagae, M.; Itoh, S.; Kogure, M.; Hasegawa, M.; Horiuchi, T.; Morio, K.; Takeda, F.; Ubukata, E. 1988. Role of endogenous arginine vasopressin in potentiating corticotropin-releasing hormone-stimulated corticotropin secretion in man. *J clin. Endocrinol Met* 66 (6): 1132-7.

-Weber, P.A.; Chang, H.C.; Spaeth, K.E.; Nitsche, J.M.; Nicholson, B.J. 2004. The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities. *Biophys J* 87(2):958-73.

-Weber, H.; Hunks, S.; Jonas, L.; Sparman, G.; Bastian, M.; Scuff-Werner, P. 2006. Hydrogen peroxide-induced activation of defense mechanisms against oxidative stress in rat pancreatic acinar. *AR42 J Cells. Free Radic Biol Med*, 42 (6) 830-41.

-Weidmann, P. E.; Thomas, J. A.; Heer, G.; Valtorta, S. E.; González, A.; Weidmann, R. L.; Zen, G.; Garnero, O. 2002. Calidad de la leche producida en los departamentos centrales de la cuenca lechera santafesina. Composición química. *Revista FAVE - Ciencias Agrarias* 1 (2).

-Weiss, D.; Wardrop, J. 2010. Schalm's Veterinary Hematology. Wiley-Blackwell 6th Edition. Hardcover.

ANEXO APÉNDICE A: CÁLCULO ITH

Noviembre

Día	HS.	T horaria	HR horaria	ITH horario	Tmedia diaria	HR media diaria	ITH diario
1	1	19,3	97	66,6			
1	2	19,2	97	66,4			
1	3	19,1	97	66,2			
1	4	19,1	97	66,2			
1	5	19,1	97	66,2			
1	6	19,0	97	66,1			
1	7	18,7	97	65,5			
1	8	18,8	97	65,7			
1	9	19,7	97	67,3			
1	10	19,8	96	67,5			
1	11	19,9	96	67,6			
1	12	19,9	96	67,6			
1	13	20,3	96	68,3			
1	14	20,6	95	68,8			
1	15	20,7	95	69,0			
1	16	19,6	99	67,3			
1	17	20,1	95	67,9			
1	18	19,7	99	67,5			
1	19	18,7	95	65,5			
1	20	18,4	95	65,0			
1	21	18,0	92	64,2			
1	22	17,9	92	64,0			
1	23	17,6	95	63,4			
1	24	17,2	95	62,7	19,2	96	66,4
2	1	16,7	95	61,9			
2	2	16,1	95	60,8			
2	3	16,6	97	61,8			
2	4	16,4	88	61,2			
2	5	15,9	80	60,3			
2	6	14,6	80	58,2			
2	7	14,8	77	58,6			
2	8	16,0	75	60,4			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

2	9	17,1	76	62,1			
2	10	19,7	71	66,0			
2	11	21,7	66	68,6			
2	12	22,7	59	69,5			
2	13	22,4	65	69,5			
2	14	22,0	65	69,0			
2	15	21,6	62	68,2			
2	16	21,8	56	68,1			
2	17	21,9	51	67,8			
2	18	21,0	50	66,5			
2	19	18,4	53	63,3			
2	20	17,1	54	61,6			
2	21	16,2	52	60,3			
2	22	15,8	53	59,8			
2	23	15,5	62	59,5			
2	24	14,8	73	58,5	18,2	69	63,6
3	1	14,7	100	58,5			
3	2	13,7	100	56,7			
3	3	13,4	80	56,3			
3	4	12,6	82	55,0			
3	5	11,6	85	53,3			
3	6	11,9	86	53,8			
3	7	15,1	89	59,1			
3	8	18,0	86	63,9			
3	9	20,1	67	66,3			
3	10	21,7	50	67,4			
3	11	21,9	40	66,9			
3	12	23,0	35	67,9			
3	13	23,3	36	68,3			
3	14	24,1	33	69,0			
3	15	24,9	31	69,7			
3	16	24,5	30	69,1			
3	17	23,3	31	67,9			
3	18	22,2	32	66,7			
3	19	19,9	35	64,3			
3	20	16,8	43	60,9			
3	21	17,1	56	61,7			
3	22	15,0	64	58,9			
3	23	14,6	71	58,2			
3	24	13,8	76	56,9	18,2	60	63,3

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

4	1	13,5	79	56,4			
4	2	14,0	82	57,2			
4	3	14,8	85	58,5			
4	4	12,8	83	55,3			
4	5	12,5	81	54,8			
4	6	12,9	74	55,6			
4	7	17,4	69	62,4			
4	8	21,2	60	67,5			
4	9	23,8	51	70,3			
4	10	25,0	49	71,7			
4	11	25,5	50	72,3			
4	12	26,0	49	73,0			
4	13	26,3	48	73,2			
4	14	26,5	49	73,6			
4	15	26,5	48	73,5			
4	16	26,3	48	73,2			
4	17	25,5	50	72,4			
4	18	23,8	58	71,0			
4	19	20,4	75	67,3			
4	20	18,4	84	64,5			
4	21	18,7	86	65,1			
4	22	17,8	84	63,6			
4	23	16,9	86	62,0			
4	24	15,5	96	59,8	20,1	68	66,3
5	1	14,6	98	58,2			
5	2	14,1	98	57,3			
5	3	13,5	98	56,3			
5	4	13,8	99	56,8			
5	5	14,0	97	57,2			
5	6	14,8	92	58,6			
5	7	17,2	78	62,4			
5	8	20,0	69	66,3			
5	9	22,1	63	69,0			
5	10	23,3	61	70,5			
5	11	24,3	58	71,6			
5	12	25,0	54	72,2			
5	13	25,6	53	72,9			
5	14	26,2	51	73,5			
5	15	26,3	48	73,2			
5	16	26,4	48	73,4			
5	17	25,9	48	72,7			
5	18	24,9	52	71,8			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

5	19	20,9	65	67,3			
5	20	20,8	71	67,6			
5	21	20,4	70	66,9			
5	22	19,7	70	65,8			
5	23	18,8	71	64,5			
5	24	17,6	73	62,9	20,4	70	67,0
6	1	16,5	79	61,3			
6	2	15,6	85	60,0			
6	3	15,5	87	59,8			
6	4	14,9	89	58,8			
6	5	14,8	89	58,6			
6	6	16,1	89	60,8			
6	7	18,2	77	63,9			
6	8	20,2	71	66,7			
6	9	22,1	65	69,1			
6	10	23,8	58	71,0			
6	11	25,2	52	72,2			
6	12	26,4	51	73,7			
6	13	27,4	47	74,6			
6	14	28,5	45	75,6			
6	15	29,3	43	76,4			
6	16	29,4	43	76,5			
6	17	29,1	43	76,2			
6	18	27,6	47	74,8			
6	19	25,4	51	72,5			
6	20	24,6	51	71,4			
6	21	23,7	46	69,8			
6	22	22,4	43	67,9			
6	23	22,7	45	68,3			
6	24	21,9	46	67,3	22,6	60	69,4
7	1	20,3	50	65,6			
7	2	20,0	52	65,3			
7	3	19,7	53	65,0			
7	4	19,7	55	65,1			
7	5	19,0	60	64,4			
7	6	20,5	66	66,8			
7	7	19,7	73	66,0			
7	8	17,2	68	62,1			
7	9	15,9	86	60,4			
7	10	16,6	84	61,5			
7	11	19,5	69	65,4			
7	12	19,8	68	66,0			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

7	13	21,2	64	67,8			
7	14	20,1	64	66,2			
7	15	21,0	64	67,5			
7	16	21,4	65	68,1			
7	17	21,0	68	67,7			
7	18	19,4	77	65,8			
7	19	17,8	86	63,6			
7	20	17,6	90	63,4			
7	21	17,1	95	62,7			
7	22	16,6	95	61,8			
7	23	16,7	98	61,9			
7	24	16,0	98	60,7	18,9	73	64,8
8	1	15,9	98	60,5			
8	2	15,9	98	60,5			
8	3	15,8	98	60,4			
8	4	16,1	98	60,9			
8	5	16,5	98	61,6			
8	6	16,8	98	62,2			
8	7	17,2	98	62,9			
8	8	17,6	98	63,6			
8	9	18,0	98	64,3			
8	10	18,9	97	65,9			
8	11	18,7	96	65,5			
8	12	18,7	97	65,5			
8	13	19,1	97	66,2			
8	14	20,4	97	68,5			
8	15	20,9	87	68,8			
8	16	21,1	85	69,0			
8	17	21,0	83	68,7			
8	18	20,8	84	68,4			
8	19	19,9	91	67,3			
8	20	19,0	94	65,9			
8	21	18,8	94	65,6			
8	22	18,6	95	65,3			
8	23	17,9	96	64,1			
8	24	17,5	97	63,4	18,4	95	64,9
9	1	17,7	93	63,6			
9	2	17,7	92	63,6			
9	3	17,7	90	63,5			
9	4	17,7	89	63,5			
9	5	17,6	91	63,4			
9	6	17,6	92	63,4			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

9	7	17,9	93	64,0			
9	8	18,2	93	64,5			
9	9	19,9	86	67,0			
9	10	20,6	82	68,1			
9	11	21,5	80	69,3			
9	12	22,4	77	70,4			
9	13	22,5	73	70,4			
9	14	23,7	68	71,7			
9	15	24,3	65	72,3			
9	16	24,4	64	72,4			
9	17	23,9	67	72,0			
9	18	22,7	78	71,1			
9	19	21,7	85	70,0			
9	20	20,1	94	67,9			
9	21	19,3	95	66,6			
9	22	19,5	95	66,9			
9	23	19,9	98	67,6			
9	24	19,9	98	67,6	20,4	85	67,8
10	1	19,7	98	67,3			
10	2	19,8	90	67,1			
10	3	19,3	97	66,5			
10	4	19,3	97	66,6			
10	5	19,0	98	66,1			
10	6	19,5	98	67,0			
10	7	19,8	98	67,5			
10	8	20,5	97	68,7			
10	9	20,9	88	68,8			
10	10	22,9	73	70,9			
10	11	24,8	72	73,6			
10	12	24,2	67	72,5			
10	13	24,6	64	72,7			
10	14	24,3	67	72,5			
10	15	22,9	71	70,8			
10	16	23,2	68	71,0			
10	17	22,4	73	70,2			
10	18	20,9	82	68,5			
10	19	19,7	92	67,1			
10	20	18,8	87	65,3			
10	21	17,2	87	62,7			
10	22	16,8	89	62,1			
10	23	16,3	86	61,0			
10	24	16,2	84	60,8	20,5	84	68,0

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

11	1	16,1	87	60,7			
11	2	15,9	87	60,4			
11	3	15,9	89	60,4			
11	4	15,9	92	60,5			
11	5	15,6	90	59,9			
11	6	15,6	85	59,9			
11	7	16,8	80	61,8			
11	8	18,0	80	63,7			
11	9	18,8	79	64,9			
11	10	20,8	69	67,5			
11	11	20,6	69	67,2			
11	12	22,0	63	68,8			
11	13	24,1	58	71,3			
11	14	25,7	50	72,7			
11	15	26,5	46	73,3			
11	16	26,4	44	72,9			
11	17	25,5	44	71,8			
11	18	24,0	50	70,5			
11	19	21,3	52	67,1			
11	20	19,4	54	64,7			
11	21	18,0	57	62,9			
11	22	16,8	61	61,3			
11	23	15,9	70	60,2			
11	24	15,6	74	59,8	19,6	68	65,7
12	1	15,1	72	59,0			
12	2	14,5	74	58,1			
12	3	13,9	80	57,1			
12	4	13,4	78	56,3			
12	5	12,8	80	55,4			
12	6	14,3	72	57,8			
12	7	17,9	75	63,4			
12	8	21,6	64	68,3			
12	9	24,3	49	70,7			
12	10	25,8	44	72,1			
12	11	26,9	40	73,0			
12	12	27,3	38	73,3			
12	13	28,0	37	74,0			
12	14	29,0	36	75,0			
12	15	29,3	36	75,3			
12	16	29,3	35	75,2			
12	17	29,4	37	75,6			
12	18	26,8	41	73,0			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

12	19	24,7	47	71,2			
12	20	24,1	54	71,1			
12	21	22,8	61	69,9			
12	22	19,7	62	65,6			
12	23	18,9	71	64,7			
12	24	16,9	73	61,7	21,9	56	68,3
13	1	16,9	73	61,7			
13	2	16,2	90	60,9			
13	3	16,1	82	60,6			
13	4	15,5	75	59,6			
13	5	15,6	79	59,8			
13	6	17,3	78	62,5			
13	7	19,8	70	66,0			
13	8	22,3	65	69,4			
13	9	23,6	62	71,0			
13	10	24,9	62	72,8			
13	11	25,0	62	73,0			
13	12	27,0	59	75,6			
13	13	29,0	46	76,4			
13	14	29,2	40	75,8			
13	15	29,2	39	75,6			
13	16	28,5	38	74,6			
13	17	27,8	41	74,2			
13	18	26,6	45	73,2			
13	19	24,2	49	70,7			
13	20	22,3	65	69,4			
13	21	21,3	70	68,3			
13	22	19,8	73	66,2			
13	23	18,6	85	64,9			
13	24	17,5	90	63,2	22,2	64	69,3
14	1	16,9	90	62,2			
14	2	16,8	89	62,0			
14	3	16,8	86	61,9			
14	4	16,8	87	61,9			
14	5	16,9	79	61,9			
14	6	18,0	85	63,9			
14	7	20,3	73	67,0			
14	8	24,8	62	72,7			
14	9	26,3	56	74,1			
14	10	28,8	51	76,8			
14	11	29,6	46	77,0			
14	12	30,2	46	78,0			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

14	13	31,1	48	79,5		
14	14	31,5	48	79,9		
14	15	31,8	49	80,5		
14	16	31,3	51	80,2		
14	17	30,8	51	79,6		
14	18	29,3	56	78,3		
14	19	27,4	64	76,6		
14	20	26,6	67	75,9		
14	21	26,3	70	75,8		
14	22	25,7	72	75,1		
14	23	25,4	75	75,0		
14	24	25,8	72	75,3	25,2	66
15	1	21,6	84	69,8		
15	2	21,0	98	69,7		
15	3	20,7	98	69,2		
15	4	20,1	90	67,6		
15	5	19,6	88	66,7		
15	6	19,4	86	66,2		
15	7	19,1	80	65,5		
15	8	17,5	62	62,4		
15	9	19,1	57	64,3		
15	10	19,5	54	64,8		
15	11	20,6	53	66,1		
15	12	21,7	49	67,4		
15	13	22,7	47	68,5		
15	14	23,2	43	68,8		
15	15	23,9	44	69,8		
15	16	23,7	44	69,5		
15	17	23,5	45	69,3		
15	18	22,3	48	68,1		
15	19	19,9	57	65,5		
15	20	16,5	74	61,1		
15	21	15,1	80	59,0		
15	22	14,7	81	58,3		
15	23	13,9	84	57,0		
15	24	13,1	85	55,8	19,7	68
16	1	11,6	90	53,2		
16	2	10,7	98	51,4		
16	3	9,6	98	49,4		
16	4	8,8	98	48,0		
16	5	8,7	98	47,8		
16	6	12,5	97	54,6		

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

16	7	16,6	62	61,1			
16	8	19,9	44	64,8			
16	9	21,5	43	66,7			
16	10	21,6	43	66,8			
16	11	22,2	41	67,4			
16	12	23,6	39	69,0			
16	13	24,2	43	70,0			
16	14	24,8	42	70,7			
16	15	25,6	42	71,7			
16	16	24,7	42	70,5			
16	17	24,1	46	70,2			
16	18	20,9	54	66,7			
16	19	18,7	64	64,2			
16	20	17,4	78	62,7			
16	21	15,5	86	59,8			
16	22	15,3	84	59,4			
16	23	15,8	84	60,2			
16	24	15,5	85	59,7	17,9	67	63,1
17	1	14,5	87	58,1			
17	2	12,7	96	54,9			
17	3	11,7	98	53,1			
17	4	11,1	97	52,1			
17	5	14,2	97	57,6			
17	6	17,7	73	63,0			
17	7	20,7	64	67,0			
17	8	22,8	53	69,2			
17	9	23,6	49	69,8			
17	10	24,2	48	70,6			
17	11	24,8	48	71,2			
17	12	25,3	48	71,9			
17	13	25,7	48	72,4			
17	14	26,5	48	73,5			
17	15	26,6	49	73,7			
17	16	25,2	50	72,0			
17	17	23,9	55	70,8			
17	18	22,1	65	69,1			
17	19	20,9	72	67,9			
17	20	18,9	80	65,2			
17	21	19,0	82	65,4			
17	22	18,1	83	64,0			
17	23	17,3	86	62,7			
17	24	16,1	89	60,8	20,1	69	66,5

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

18	1	15,9	92	60,5
18	2	15,8	92	60,3
18	3	16,1	94	60,9
18	4	17,8	95	63,9
18	5	19,6	98	67,2
18	6	21,1	84	68,9
18	7	22,1	75	69,9
18	8	23,4	72	71,6
18	9	25,6	64	74,1
18	10	27,3	60	76,0
18	11	29,3	55	78,1
18	12	30,5	48	78,7
18	13	31,4	48	79,8
18	14	32,5	49	81,4
18	15	32,1	53	81,5
18	16	31,4	54	80,7
18	17	29,9	53	78,7
18	18	29,0	52	77,3
18	19	25,7	60	73,8
18	20	23,6	80	72,6
18	21	22,4	89	71,4
18	22	21,7	93	70,5
18	23	21,7	92	70,4
18	24	20,3	94	68,3
19	1	19,5	98	67,0
19	2	18,7	96	65,6
19	3	17,7	97	63,8
19	4	18,0	96	64,3
19	5	16,6	96	61,8
19	6	16,3	96	61,3
19	7	17,5	96	63,4
19	8	19,1	90	65,9
19	9	19,9	87	67,1
19	10	21,5	81	69,4
19	11	24,0	73	72,6
19	12	26,8	66	76,0
19	13	28,6	63	78,3
19	14	29,4	59	78,8
19	15	29,4	57	78,6
19	16	28,8	58	77,9
19	17	28,0	57	76,5
19	18	26,8	67	76,1

24,4

73 **73,3**

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

19	19	23,7	85	73,3			
19	20	21,5	96	70,4			
19	21	20,9	97	69,5			
19	22	20,1	98	68,1			
19	23	19,4	98	66,7			
19	24	18,5	95	65,0	22,1	83	70,5
20	1	17,9	97	64,1			
20	2	18,0	98	64,3			
20	3	16,9	99	62,4			
20	4	15,5	98	59,9			
20	5	15,5	98	59,8			
20	6	16,0	98	60,7			
20	7	17,6	93	63,4			
20	8	19,8	84	66,8			
20	9	23,8	79	72,9			
20	10	25,1	74	74,4			
20	11	26,4	69	75,8			
20	12	26,8	65	76,0			
20	13	27,1	65	76,4			
20	14	27,7	65	77,3			
20	15	28,0	62	77,3			
20	16	27,8	61	76,9			
20	17	27,0	61	75,8			
20	18	27,0	61	75,8			
20	19	25,9	70	75,3			
20	20	23,8	80	73,0			
20	21	20,9	90	69,0			
20	22	19,9	95	67,6			
20	23	19,7	100	67,4			
20	24	18,7	100	65,6	22,2	82	70,6
21	1	18,1	100	64,5			
21	2	17,1	100	62,7			
21	3	16,6	100	61,8			
21	4	15,1	100	59,1			
21	5	15,2	100	59,3			
21	6	18,0	100	64,4			
21	7	21,1	95	69,6			
21	8	22,8	85	71,8			
21	9	24,7	75	73,9			
21	10	25,9	67	74,9			
21	11	27,0	58	75,4			
21	12	28,8	49	76,5			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

21	13	30,2	48	78,3			
21	14	30,6	47	78,6			
21	15	30,5	51	79,1			
21	16	29,9	52	78,4			
21	17	29,6	55	78,5			
21	18	26,9	61	75,6			
21	19	24,8	65	73,0			
21	20	22,5	74	70,3			
21	21	21,4	79	69,0			
21	22	19,6	88	66,6			
21	23	18,1	89	64,1			
21	24	18,4	90	64,8	23,0	76	71,4
22	1	17,8	93	63,9			
22	2	18,2	94	64,6			
22	3	17,6	99	63,7			
22	4	17,4	99	63,3			
22	5	16,7	99	62,1			
22	6	18,7	95	65,5			
22	7	21,1	86	69,1			
22	8	28,6	74	79,8			
22	9	25,4	69	74,4			
22	10	27,3	61	76,2			
22	11	29,0	55	77,7			
22	12	29,7	49	77,8			
22	13	30,0	48	78,0			
22	14	30,4	47	78,3			
22	15	30,4	47	78,4			
22	16	30,3	44	77,8			
22	17	29,3	41	76,1			
22	18	28,5	39	74,8			
22	19	25,8	39	71,6			
22	20	24,2	44	70,2			
22	21	23,5	56	70,4			
22	22	22,7	69	70,4			
22	23	22,1	74	69,7			
22	24	22,3	75	70,1	24,5	67	72,7
23	1	21,7	79	69,5			
23	2	20,0	84	67,1			
23	3	19,4	87	66,2			
23	4	19,4	88	66,3			
23	5	18,9	88	65,5			
23	6	18,8	87	65,3			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

23	7	18,9	89	65,5		
23	8	20,8	84	68,4		
23	9	23,7	75	72,4		
23	10	25,0	69	73,7		
23	11	26,8	64	75,8		
23	12	27,7	60	76,7		
23	13	28,1	55	76,5		
23	14	28,8	53	77,2		
23	15	30,1	50	78,4		
23	16	30,1	47	78,0		
23	17	30,1	47	78,0		
23	18	29,2	48	77,0		
23	19	26,4	51	73,8		
23	20	25,1	53	72,3		
23	21	23,8	55	70,7		
23	22	23,1	63	70,4		
23	23	22,5	76	70,5		
23	24	22,6	76	70,7	24,2	68
24	1	21,8	79	69,7		
24	2	21,4	84	69,4		
24	3	21,4	85	69,5		
24	4	20,9	87	68,8		
24	5	19,8	93	67,3		
24	6	19,3	98	66,6		
24	7	21,0	94	69,4		
24	8	24,8	81	74,7		
24	9	25,9	75	75,7		
24	10	28,8	69	79,4		
24	11	30,7	64	81,4		
24	12	31,3	63	82,2		
24	13	32,0	61	82,9		
24	14	32,7	61	83,8		
24	15	32,7	61	83,8		
24	16	33,1	61	84,4		
24	17	33,6	61	85,1		
24	18	32,5	61	83,6		
24	19	30,7	61	81,1		
24	20	29,9	62	80,1		
24	21	28,7	63	78,5		
24	22	27,5	66	77,2		
24	23	27,2	67	76,7		
24	24	22,5	78	70,6	27,1	72

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

25	1	22,7	98	72,6			
25	2	21,8	98	71,0			
25	3	17,8	98	63,9			
25	4	18,3	98	64,8			
25	5	18,8	98	65,7			
25	6	19,5	97	66,9			
25	7	19,3	98	66,6			
25	8	19,4	98	66,8			
25	9	19,0	95	66,0			
25	10	18,5	96	65,1			
25	11	18,6	92	65,2			
25	12	19,5	91	66,7			
25	13	20,0	90	67,4			
25	14	22,0	79	70,0			
25	15	22,5	75	70,5			
25	16	23,2	75	71,6			
25	17	23,0	76	71,3			
25	18	22,9	78	71,3			
25	19	22,5	84	71,2			
25	20	21,9	86	70,3			
25	21	21,7	87	70,0			
25	22	21,3	87	69,4			
25	23	21,0	87	68,8			
25	24	20,0	90	67,6	20,6	89	68,5
26	1	19,6	85	66,6			
26	2	19,4	85	66,3			
26	3	19,0	85	65,6			
26	4	17,8	83	63,5			
26	5	16,9	85	62,1			
26	6	16,6	89	61,7			
26	7	16,2	91	61,0			
26	8	15,9	93	60,5			
26	9	16,5	93	61,5			
26	10	16,9	93	62,2			
26	11	17,9	92	63,8			
26	12	19,6	87	66,7			
26	13	19,6	81	66,3			
26	14	19,6	82	66,4			
26	15	19,8	82	66,7			
26	16	20,3	80	67,4			
26	17	20,4	79	67,5			
26	18	20,1	81	67,2			

“Estrés calórico en vacas Holando Argentino”

26	19	19,6	83	66,5			
26	20	19,0	84	65,5			
26	21	19,0	84	65,6			
26	22	18,9	84	65,4			
26	23	19,0	85	65,4			
26	24	18,4	88	64,6	18,6	86	64,9
27	1	18,4	88	64,6			
27	2	17,5	87	63,0			
27	3	17,6	88	63,2			
27	4	16,0	88	60,6			
27	5	15,2	88	59,2			
27	6	14,7	86	58,4			
27	7	14,9	84	58,7			
27	8	15,0	84	58,9			
27	9	16,0	88	60,5			
27	10	17,1	85	62,4			
27	11	17,7	85	63,3			
27	12	19,9	76	66,5			
27	13	20,1	74	66,6			
27	14	19,7	74	66,1			
27	15	20,0	72	66,5			
27	16	19,8	69	66,0			
27	17	20,1	68	66,4			
27	18	19,8	65	65,8			
27	19	17,8	66	63,0			
27	20	15,7	85	60,1			
27	21	14,5	90	58,2			
27	22	13,1	98	55,7			
27	23	12,6	99	54,6			
27	24	13,9	90	57,0	17,0	82	62,1
28	1	14,5	85	58,0			
28	2	14,4	85	57,9			
28	3	14,3	87	57,7			
28	4	13,6	90	56,5			
28	5	11,6	100	52,9			
28	6	14,5	88	58,1			
28	7	17,6	81	63,1			
28	8	20,5	72	67,2			
28	9	22,5	61	69,3			
28	10	24,4	54	71,3			
28	11	25,9	53	73,2			
28	12	26,9	47	73,9			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

28	13	27,3	43	73,8			
28	14	28,1	42	74,7			
28	15	28,5	41	75,1			
28	16	28,8	36	74,8			
28	17	28,3	34	73,9			
28	18	26,9	43	73,4			
28	19	23,2	62	70,5			
28	20	21,5	73	68,9			
28	21	20,0	75	66,7			
28	22	19,3	74	65,6			
28	23	19,2	77	65,4			
28	24	19,9	73	66,3	21,3	66	68,0
29	1	19,4	73	65,5			
29	2	16,3	87	61,0			
29	3	17,5	76	62,7			
29	4	17,1	82	62,3			
29	5	16,1	88	60,8			
29	6	17,4	78	62,7			
29	7	20,9	66	67,4			
29	8	23,9	57	71,0			
29	9	25,7	53	73,0			
29	10	27,3	52	75,1			
29	11	28,7	44	75,6			
29	12	28,7	40	75,1			
29	13	29,4	44	76,5			
29	14	30,1	42	77,2			
29	15	30,2	41	77,2			
29	16	30,3	44	77,7			
29	17	30,2	46	77,9			
29	18	29,5	44	76,7			
29	19	28,0	46	75,1			
29	20	26,0	54	73,5			
29	21	23,0	64	70,3			
29	22	21,5	72	68,7			
29	23	20,0	73	66,4			
29	24	18,9	76	65,0	24,0	60	71,4
30	1	17,9	88	63,9			
30	2	16,5	94	61,6			
30	3	15,8	95	60,4			
30	4	15,7	96	60,2			
30	5	16,0	99	60,8			
30	6	15,7	99	60,3			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

30	7	17,2	99	62,9		
30	8	20,7	89	68,6		
30	9	23,9	69	72,1		
30	10	26,1	59	74,2		
30	11	27,4	53	75,2		
30	12	28,1	50	75,8		
30	13	29,3	43	76,4		
30	14	29,6	43	76,7		
30	15	30,0	42	77,0		
30	16	29,9	37	76,1		
30	17	29,8	38	76,1		
30	18	29,4	39	75,9		
30	19	27,8	44	74,7		
30	20	24,3	56	71,4		
30	21	22,2	69	69,6		
30	22	20,3	78	67,2		
30	23	18,9	82	65,2		
30	24	18,4	82	64,4	23,0	68 70,7

Diciembre

Día	HS.	T horaria	HR horaria	ITH horario	Tmedia diaria	HR media diaria	ITH diario
	1	1	17,8	83	63,5		
	1	2	17,4	84	62,9		
	1	3	16,7	93	61,9		
	1	4	16,6	93	61,7		
	1	5	16,1	94	60,9		
	1	6	17,3	83	62,7		
	1	7	19,1	85	65,7		
	1	8	22,7	69	70,3		
	1	9	24,8	70	73,5		
	1	10	26,4	67	75,6		
	1	11	28,0	59	76,8		
	1	12	29,2	50	77,3		
	1	13	30,3	47	78,1		
	1	14	30,8	41	77,9		
	1	15	30,7	42	77,9		
	1	16	30,6	38	77,2		
	1	17	30,4	37	76,8		
	1	18	29,7	41	76,6		

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

1	19	26,9	59	75,3		
1	20	23,8	69	71,9		
1	21	23,2	78	71,8		
1	22	23,0	89	72,4		
1	23	22,5	91	71,8		
1	24	22,5	87	71,5	24,0	69 72,3
2	1	22,0	83	70,4		
2	2	21,4	86	69,6		
2	3	20,9	92	69,2		
2	4	20,3	96	68,2		
2	5	20,0	99	67,9		
2	6	20,6	99	69,0		
2	7	22,0	98	71,4		
2	8	25,5	81	75,8		
2	9	28,1	71	78,6		
2	10	30,5	63	81,0		
2	11	32,1	55	81,8		
2	12	33,2	49	82,3		
2	13	34,2	44	82,5		
2	14	34,6	37	81,7		
2	15	34,6	42	82,7		
2	16	34,4	42	82,5		
2	17	32,4	47	81,0		
2	18	32,5	49	81,5		
2	19	29,8	59	79,4		
2	20	26,0	78	76,3		
2	21	21,0	95	69,5		
2	22	21,1	87	69,2		
2	23	20,2	83	67,3		
2	24	19,5	94	66,7	26,5	72 76,4
3	1	18,8	100	65,8		
3	2	17,9	100	64,2		
3	3	17,3	77	62,5		
3	4	16,1	84	60,7		
3	5	14,2	76	57,6		
3	6	14,1	71	57,5		
3	7	15,0	68	58,8		
3	8	16,8	61	61,3		
3	9	18,8	53	63,8		
3	10	20,8	47	66,1		
3	11	22,4	43	67,8		
3	12	23,6	39	69,0		

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

3	13	24,0	36	69,2			
3	14	24,5	33	69,4			
3	15	25,4	33	70,5			
3	16	25,5	33	70,6			
3	17	25,2	33	70,3			
3	18	24,5	36	69,8			
3	19	21,4	51	67,1			
3	20	18,7	63	64,1			
3	21	17,4	73	62,5			
3	22	17,7	71	62,9			
3	23	15,8	80	60,2			
3	24	15,9	79	60,3	19,6	60	65,3
4	1	14,0	87	57,3			
4	2	14,0	89	57,2			
4	3	15,1	87	59,1			
4	4	13,9	96	57,0			
4	5	14,6	88	58,3			
4	6	16,9	77	61,9			
4	7	19,9	71	66,2			
4	8	22,8	65	70,1			
4	9	25,2	60	73,1			
4	10	27,7	52	75,6			
4	11	30,4	45	78,0			
4	12	31,7	44	79,4			
4	13	30,8	45	78,6			
4	14	33,5	46	82,1			
4	15	34,4	43	82,7			
4	16	34,6	43	83,0			
4	17	34,7	43	82,9			
4	18	31,4	63	82,3			
4	19	29,0	73	80,3			
4	20	27,1	81	78,4			
4	21	26,0	83	76,9			
4	22	24,5	65	72,6			
4	23	23,8	56	70,7			
4	24	22,5	54	68,8	24,9	65	73,2
5	1	20,7	53	66,3			
5	2	21,0	60	67,2			
5	3	18,9	72	64,8			
5	4	19,1	84	65,7			
5	5	18,1	85	64,0			
5	6	18,1	81	63,9			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

5	7	20,1	70	66,5			
5	8	21,8	65	68,7			
5	9	24,0	60	71,3			
5	10	25,2	55	72,6			
5	11	27,3	53	75,1			
5	12	30,4	41	77,4			
5	13	31,8	37	78,4			
5	14	32,7	32	78,6			
5	15	32,4	31	78,0			
5	16	32,3	34	78,4			
5	17	32,3	32	78,1			
5	18	28,7	52	76,9			
5	19	26,4	58	74,6			
5	20	23,3	69	71,3			
5	21	22,3	72	70,0			
5	22	20,7	78	68,0			
5	23	19,4	80	65,9			
5	24	18,7	77	64,6	24,4	60	71,9
6	1	17,7	74	63,0			
6	2	17,4	72	62,4			
6	3	16,6	73	61,3			
6	4	15,0	87	58,9			
6	5	14,7	87	58,4			
6	6	16,2	78	60,8			
6	7	18,2	68	63,6			
6	8	21,0	56	66,9			
6	9	22,6	55	69,0			
6	10	22,8	55	69,3			
6	11	23,4	54	70,0			
6	12	24,1	52	70,8			
6	13	24,3	53	71,2			
6	14	25,7	46	72,2			
6	15	26,1	47	72,9			
6	16	27,3	48	74,5			
6	17	25,8	49	72,7			
6	18	24,5	51	71,3			
6	19	23,3	56	70,1			
6	20	21,8	72	69,3			
6	21	19,4	74	65,7			
6	22	18,7	82	65,0			
6	23	17,9	87	63,7			
6	24	16,5	94	61,5	20,9	65	67,4

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

7	1	16,2	94	61,0			
7	2	15,6	95	60,0			
7	3	15,5	95	59,8			
7	4	15,6	96	60,0			
7	5	14,7	96	58,4			
7	6	14,1	98	57,4			
7	7	18,9	83	65,3			
7	8	21,9	68	69,1			
7	9	23,8	58	70,9			
7	10	24,4	53	71,4			
7	11	25,6	52	72,7			
7	12	26,5	49	73,5			
7	13	27,8	51	75,6			
7	14	28,6	51	76,6			
7	15	28,1	52	76,1			
7	16	27,5	50	75,0			
7	17	27,2	53	75,0			
7	18	26,7	58	74,9			
7	19	26,1	62	74,6			
7	20	25,0	68	73,7			
7	21	24,3	71	72,9			
7	22	24,5	68	72,9			
7	23	23,5	75	72,1			
7	24	22,5	77	70,7	22,7	70	70,4
8	1	21,9	80	69,9			
8	2	20,8	87	68,6			
8	3	21,6	83	69,6			
8	4	22,0	81	70,2			
8	5	20,9	81	68,4			
8	6	21,6	79	69,4			
8	7	23,7	68	71,7			
8	8	27,7	56	76,1			
8	9	28,7	57	77,6			
8	10	29,9	60	79,7			
8	11	31,7	61	82,4			
8	12	32,7	59	83,5			
8	13	33,9	58	84,9			
8	14	34,0	56	84,7			
8	15	32,7	55	82,7			
8	16	30,7	55	80,1			
8	17	29,7	59	79,3			
8	18	28,4	64	78,2			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

8	19	19,7	97	67,4		
8	20	19,6	97	67,2		
8	21	19,7	93	67,2		
8	22	19,6	95	67,1		
8	23	20,6	80	67,8		
8	24	20,9	74	67,9	25,5	72
9	1	20,6	85	68,1		74,9
9	2	20,5	84	67,9		
9	3	19,6	89	66,7		
9	4	19,5	92	66,7		
9	5	19,4	94	66,6		
9	6	19,5	95	66,8		
9	7	20,8	85	68,5		
9	8	22,7	78	71,1		
9	9	24,6	75	73,8		
9	10	25,7	73	75,3		
9	11	24,8	74	73,9		
9	12	25,5	73	74,9		
9	13	26,4	71	76,1		
9	14	26,8	71	76,7		
9	15	26,5	70	76,1		
9	16	27,0	62	75,8		
9	17	26,7	60	75,2		
9	18	25,2	63	73,4		
9	19	24,7	69	73,2		
9	20	22,3	83	70,7		
9	21	20,8	90	68,7		
9	22	20,0	93	67,5		
9	23	19,7	88	66,7		
9	24	18,5	85	64,8	22,8	79
10	1	16,9	85	62,1		71,3
10	2	16,0	89	60,7		
10	3	14,9	93	58,8		
10	4	14,2	97	57,6		
10	5	13,5	98	56,3		
10	6	14,6	94	58,3		
10	7	16,4	86	61,3		
10	8	17,2	82	62,5		
10	9	19,6	79	66,2		
10	10	21,8	72	69,3		
10	11	22,9	62	70,0		
10	12	24,0	57	71,1		

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

10	13	25,0	54	72,2			
10	14	25,7	51	72,8			
10	15	26,4	49	73,5			
10	16	26,1	48	73,0			
10	17	25,8	45	72,3			
10	18	24,7	57	72,1			
10	19	22,1	69	69,5			
10	20	19,3	77	65,7			
10	21	17,9	87	63,8			
10	22	17,1	92	62,6			
10	23	17,1	90	62,4			
10	24	16,2	94	61,0	19,8	75	66,4
11	1	15,8	96	60,3			
11	2	15,5	97	59,8			
11	3	16,0	96	60,7			
11	4	15,0	97	58,9			
11	5	14,2	97	57,5			
11	6	17,2	94	62,8			
11	7	19,9	82	66,8			
11	8	21,3	76	68,7			
11	9	23,6	73	72,0			
11	10	25,2	64	73,5			
11	11	26,4	58	74,5			
11	12	27,2	59	75,8			
11	13	27,4	56	75,6			
11	14	27,8	55	76,1			
11	15	28,6	54	77,0			
11	16	28,1	55	76,5			
11	17	28,1	54	76,3			
11	18	27,5	56	75,7			
11	19	24,8	70	73,5			
11	20	22,1	83	70,5			
11	21	21,1	86	69,1			
11	22	20,0	90	67,5			
11	23	19,3	94	66,3			
11	24	19,0	92	65,8	22,1	76	70,0
12	1	18,4	93	64,8			
12	2	17,9	98	64,2			
12	3	17,8	97	64,0			
12	4	17,0	98	62,6			
12	5	16,6	98	61,8			
12	6	19,4	91	66,4			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

12	7	21,6	74	69,0			
12	8	24,0	66	72,0			
12	9	26,0	59	74,1			
12	10	26,4	58	74,6			
12	11	27,3	57	75,6			
12	12	27,7	54	75,7			
12	13	27,6	49	75,1			
12	14	28,2	49	75,8			
12	15	27,8	50	75,4			
12	16	28,5	50	76,4			
12	17	28,5	48	76,1			
12	18	28,3	48	75,8			
12	19	26,8	52	74,3			
12	20	24,0	60	71,3			
12	21	20,4	84	67,7			
12	22	20,5	78	67,5			
12	23	19,2	89	66,0			
12	24	18,8	91	65,5	23,3	70	71,3
13	1	18,2	93	64,6			
13	2	17,6	97	63,7			
13	3	19,8	83	66,8			
13	4	19,1	90	65,9			
13	5	19,2	89	66,0			
13	6	19,0	98	66,1			
13	7	23,2	74	71,5			
13	8	25,7	63	74,1			
13	9	27,7	58	76,4			
13	10	28,5	56	77,1			
13	11	29,7	50	77,8			
13	12	30,0	48	78,1			
13	13	31,2	49	79,7			
13	14	30,4	47	78,3			
13	15	31,0	46	79,0			
13	16	31,1	44	78,8			
13	17	30,8	46	78,7			
13	18	30,5	47	78,5			
13	19	29,2	52	77,6			
13	20	26,8	62	75,6			
13	21	24,3	72	73,1			
13	22	22,2	77	70,3			
13	23	21,5	83	69,4			
13	24	21,3	85	69,2	25,3	67	74,1

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

14	1	20,9	86	68,7		
14	2	20,0	92	67,5		
14	3	19,0	97	66,0		
14	4	18,3	97	64,8		
14	5	18,5	93	65,0		
14	6	17,9	97	64,1		
14	7	20,9	87	68,8		
14	8	25,4	72	74,7		
14	9	27,9	58	76,5		
14	10	29,9	53	78,6		
14	11	30,9	46	78,7		
14	12	32,0	41	79,4		
14	13	32,8	44	80,8		
14	14	33,8	45	82,3		
14	15	33,8	46	82,5		
14	16	32,9	48	81,7		
14	17	32,3	49	81,1		
14	18	31,2	51	80,0		
14	19	29,8	58	79,3		
14	20	25,8	66	74,6		
14	21	22,8	78	71,2		
14	22	22,4	73	70,2		
14	23	22,0	80	70,0		
14	24	21,6	84	69,7	25,9	68
15	1	20,3	89	67,9		75,1
15	2	20,2	89	67,7		
15	3	18,9	95	65,8		
15	4	18,2	98	64,7		
15	5	17,9	98	64,1		
15	6	19,9	95	67,5		
15	7	23,9	79	73,1		
15	8	25,7	68	74,7		
15	9	28,1	56	76,6		
15	10	30,6	51	79,2		
15	11	31,9	49	80,6		
15	12	32,7	45	80,9		
15	13	33,4	43	81,4		
15	14	34,1	43	82,3		
15	15	33,9	44	82,2		
15	16	33,5	46	82,1		
15	17	33,4	55	83,7		
15	18	32,9	72	86,1		

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

15	19	29,9	79	82,6		
15	20	26,2	79	76,7		
15	21	25,6	65	74,2		
15	22	22,9	74	71,1		
15	23	21,2	79	68,6		
15	24	20,6	82	67,9	26,5	70
16	1	20,6	86	68,2		76,1
16	2	20,7	83	68,2		
16	3	20,3	87	67,8		
16	4	19,1	93	66,0		
16	5	18,1	98	64,5		
16	6	22,0	88	70,7		
16	7	24,5	73	73,4		
16	8	26,6	68	76,0		
16	9	29,0	62	78,7		
16	10	31,0	56	80,6		
16	11	32,8	54	82,6		
16	12	34,6	48	83,8		
16	13	35,4	45	84,3		
16	14	35,8	40	83,8		
16	15	35,7	43	84,3		
16	16	33,6	49	82,8		
16	17	33,7	49	82,8		
16	18	32,6	554	172,0		
16	19	29,9	63	80,2		
16	20	26,7	74	76,9		
16	21	26,3	74	76,3		
16	22	25,7	75	75,5		
16	23	24,1	78	73,2		
16	24	23,1	82	72,0	27,6	88
17	1	22,2	82	70,5		80,1
17	2	20,9	88	68,8		
17	3	21,0	93	69,3		
17	4	19,8	93	67,4		
17	5	20,3	96	68,2		
17	6	22,1	89	70,9		
17	7	25,5	68	74,4		
17	8	28,4	54	76,8		
17	9	30,3	55	79,4		
17	10	32,3	53	81,9		
17	11	33,8	53	83,7		
17	12	34,9	52	85,1		

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

17	13	35,0	51	84,9			
17	14	36,5	46	85,9			
17	15	35,3	48	84,8			
17	16	33,5	50	82,9			
17	17	22,9	82	71,7			
17	18	23,0	87	72,3			
17	19	22,4	92	71,7			
17	20	23,1	86	72,4			
17	21	23,2	89	72,8			
17	22	23,0	94	72,9			
17	23	23,9	80	73,0			
17	24	23,5	82	72,7	26,5	73	76,6
18	1	21,5	97	70,4			
18	2	23,8	71	72,1			
18	3	22,8	86	71,9			
18	4	22,1	89	70,9			
18	5	21,9	98	71,3			
18	6	23,9	87	73,8			
18	7	25,0	80	74,9			
18	8	26,8	73	76,9			
18	9	28,7	70	79,4			
18	10	30,8	61	81,2			
18	11	31,5	57	81,4			
18	12	32,5	55	82,4			
18	13	32,8	47	81,5			
18	14	33,0	48	81,8			
18	15	33,4	48	82,4			
18	16	33,5	49	82,6			
18	17	33,2	49	82,3			
18	18	32,1	56	82,1			
18	19	28,8	69	79,4			
18	20	25,1	76	74,6			
18	21	24,5	84	74,6			
18	22	24,1	86	74,0			
18	23	24,2	87	74,3			
18	24	24,1	89	74,4	27,5	71	77,8
19	1	23,9	90	74,0			
19	2	23,6	92	73,8			
19	3	22,9	94	72,8			
19	4	22,3	95	71,7			
19	5	22,2	95	71,6			
19	6	22,5	94	72,1			

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

19	7	23,3	91	73,1		
19	8	24,8	81	74,7		
19	9	26,2	70	75,6		
19	10	28,0	67	78,0		
19	11	31,2	57	81,0		
19	12	29,9	60	79,6		
19	13	32,9	46	81,4		
19	14	33,5	41	81,2		
19	15	34,0	43	82,2		
19	16	33,3	40	80,8		
19	17	32,2	36	78,8		
19	18	30,6	50	79,2		
19	19	27,5	58	76,0		
19	20	24,1	77	73,1		
19	21	22,9	84	71,8		
19	22	23,2	82	72,2		
19	23	22,8	85	71,8		
19	24	22,2	89	71,1	26,7	72
20	1	21,0	95	69,5		76,5
20	2	21,0	96	69,6		
20	3	19,8	97	67,6		
20	4	19,7	99	67,3		
20	5	20,0	99	67,9		
20	6	21,9	91	70,7		
20	7	24,5	80	74,1		
20	8	26,3	74	76,3		
20	9	28,7	71	79,6		
20	10	30,8	64	81,7		
20	11	32,1	56	81,9		
20	12	32,5	51	81,6		
20	13	32,9	54	82,8		
20	14	33,0	54	82,9		
20	15	32,7	53	82,4		
20	16	32,3	54	82,0		
20	17	31,8	50	80,7		
20	18	30,7	44	78,3		
20	19	27,8	60	76,7		
20	20	23,5	82	72,6		
20	21	22,9	87	72,1		
20	22	22,4	89	71,4		
20	23	22,8	91	72,3		
20	24	21,8	95	70,9	26,4	74

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

21	1	20,8	98	69,4		
21	2	20,7	99	69,3		
21	3	20,9	99	69,7		
21	4	20,7	98	69,1		
21	5	20,4	98	68,6		
21	6	22,7	98	72,7		
21	7	24,9	86	75,4		
21	8	26,9	74	77,2		
21	9	28,9	69	79,5		
21	10	30,5	63	81,1		
21	11	31,8	61	82,5		
21	12	32,4	54	82,1		
21	13	33,7	50	83,2		
21	14	33,7	47	82,6		
21	15	33,9	48	83,0		
21	16	33,7	49	83,0		
21	17	33,2	49	82,3		
21	18	31,7	54	81,3		
21	19	27,7	64	77,2		
21	20	25,6	79	75,9		
21	21	24,3	84	74,3		
21	22	24,2	85	74,2		
21	23	24,2	88	74,3		
21	24	25,1	87	75,7	27,2	74
22	1	23,8	95	74,3		77,7
22	2	22,8	96	72,6		
22	3	22,0	97	71,3		
22	4	21,3	97	70,1		
22	5	21,9	97	71,2		
22	6	24,6	95	75,7		
22	7	27,8	66	77,5		
22	8	29,7	63	79,9		
22	9	31,7	59	82,1		
22	10	32,6	55	82,6		
22	11	33,8	50	83,3		
22	12	34,5	46	83,4		
22	13	34,6	45	83,3		
22	14	35,0	43	83,4		
22	15	35,0	42	83,2		
22	16	34,5	45	83,2		
22	17	33,8	47	82,7		
22	18	30,8	55	80,1		

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

22	19	26,9	66	76,2		
22	20	25,0	75	74,4		
22	21	24,6	78	74,1		
22	22	23,5	85	73,0		
22	23	23,3	88	72,8		
22	24	23,3	84	72,5	28,2	69
23	1	22,5	88	71,5		
23	2	21,7	91	70,4		
23	3	20,9	95	69,3		
23	4	20,1	96	67,9		
23	5	21,9	98	71,3		
23	6	25,4	85	76,1		
23	7	28,0	61	77,2		
23	8	29,0	58	78,1		
23	9	31,1	58	81,0		
23	10	33,2	53	83,0		
23	11	34,5	49	83,9		
23	12	35,4	44	84,1		
23	13	35,8	41	83,9		
23	14	36,3	40	84,4		
23	15	36,3	39	84,1		
23	16	36,2	38	83,8		
23	17	35,5	39	83,2		
23	18	34,4	44	82,9		
23	19	30,2	57	79,7		
23	20	27,6	66	77,2		
23	21	26,4	72	76,2		
23	22	25,9	80	76,3		
23	23	25,7	81	76,0		
23	24	24,7	81	74,6	29,1	65
24	1	25,1	73	74,4		
24	2	24,5	72	73,3		
24	3	23,1	78	71,7		
24	4	22,8	76	71,1		
24	5	23,5	75	72,1		
24	6	25,9	68	75,0		
24	7	28,8	61	78,3		
24	8	30,5	57	80,1		
24	9	31,0	52	79,9		
24	10	31,9	48	80,4		
24	11	32,9	42	80,5		
24	12	35,2	40	83,1		

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

24	13	35,7	40	83,6		
24	14	36,3	40	84,4		
24	15	36,4	39	84,3		
24	16	36,1	38	83,7		
24	17	35,8	34	82,5		
24	18	34,9	41	82,9		
24	19	33,9	56	84,6		
24	20	29,9	65	80,5		
24	21	27,0	72	77,1		
24	22	25,4	76	75,1		
24	23	25,0	77	74,5		
24	24	24,3	84	74,2	29,8	58
25	1	23,6	87	73,3		
25	2	22,5	91	71,8		
25	3	21,7	93	70,6		
25	4	21,8	92	70,7		
25	5	22,3	93	71,6		
25	6	22,8	94	72,6		
25	7	26,8	82	78,0		
25	8	30,1	57	79,5		
25	9	32,8	47	81,4		
25	10	34,5	42	82,6		
25	11	35,7	39	83,4		
25	12	35,9	40	83,8		
25	13	36,6	38	84,3		
25	14	37,1	39	85,1		
25	15	37,0	39	85,0		
25	16	36,6	35	83,7		
25	17	36,1	36	83,2		
25	18	35,6	33	82,0		
25	19	31,9	43	79,5		
25	20	28,9	56	77,7		
25	21	26,2	68	75,5		
25	22	25,0	78	74,7		
25	23	25,1	83	75,3		
25	24	23,9	86	73,7	29,6	62
26	1	24,1	88	74,2		
26	2	23,8	92	74,1		
26	3	23,8	87	73,7		
26	4	23,7	93	74,0		
26	5	23,7	94	74,1		
26	6	25,8	89	77,2		

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

26	7	28,9	70	79,7		
26	8	32,0	63	83,2		
26	9	33,5	59	84,5		
26	10	34,4	56	85,3		
26	11	26,7	53	74,2		
26	12	37,1	51	87,7		
26	13	37,2	48	87,1		
26	14	37,1	48	87,1		
26	15	37,2	49	87,5		
26	16	36,1	51	86,5		
26	17	35,0	55	85,7		
26	18	30,0	54	78,9		
26	19	27,2	60	75,9		
26	20	26,3	65	75,2		
26	21	25,8	69	75,0		
26	22	25,8	69	75,0		
26	23	25,2	71	74,2		
26	24	24,6	75	73,7	29,4	67
27	1	24,0	78	73,1		
27	2	23,2	81	72,1		
27	3	22,2	85	70,8		
27	4	22,7	84	71,6		
27	5	22,7	85	71,6		
27	6	22,9	87	72,1		
27	7	25,6	81	76,0		
27	8	27,7	79	79,1		
27	9	28,0	76	79,1		
27	10	27,0	81	78,2		
27	11	27,8	79	79,1		
27	12	26,5	82	77,6		
27	13	25,7	79	75,9		
27	14	25,6	85	76,4		
27	15	25,9	86	77,0		
27	16	26,0	86	77,2		
27	17	27,8	77	79,0		
27	18	30,4	67	81,5		
27	19	30,7	64	81,4		
27	20	28,9	73	80,1		
27	21	26,9	79	77,7		
27	22	25,9	94	77,8		
27	23	25,0	97	76,6		
27	24	24,8	93	76,0	26,0	81

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

28	1	24,6	96	76,0		
28	2	24,6	94	75,8		
28	3	23,9	96	74,7		
28	4	23,8	98	74,7		
28	5	23,7	96	74,3		
28	6	23,0	97	73,1		
28	7	23,4	97	73,9		
28	8	26,8	79	77,7		
28	9	29,8	70	81,1		
28	10	31,2	64	82,2		
28	11	32,9	59	83,7		
28	12	33,7	58	84,6		
28	13	34,3	57	85,3		
28	14	33,9	60	85,3		
28	15	33,3	65	85,4		
28	16	32,0	69	84,3		
28	17	31,0	76	83,9		
28	18	29,0	87	82,4		
28	19	29,2	78	81,3		
28	20	30,8	46	78,6		
28	21	28,0	51	75,8		
28	22	27,0	63	76,0		
28	23	25,0	77	74,6		
28	24	23,9	83	73,4	28,3	76
29	1	22,9	83	71,8		
29	2	22,5	82	71,1		
29	3	22,9	88	72,3		
29	4	23,5	84	72,8		
29	5	23,0	88	72,4		
29	6	22,0	95	71,2		
29	7	22,2	97	71,7		
29	8	23,0	97	73,1		
29	9	24,0	93	74,5		
29	10	25,4	84	75,9		
29	11	27,5	74	78,0		
29	12	28,9	68	79,5		
29	13	32,0	58	82,4		
29	14	33,4	50	82,7		
29	15	34,8	44	83,4		
29	16	34,9	44	83,5		
29	17	34,9	44	83,5		
29	18	34,4	45	83,1		

"Estrés calórico en vacas Holando Argentino"

29	19	32,9	47	81,6		
29	20	29,7	57	79,1		
29	21	25,9	68	75,1		
29	22	23,8	81	73,2		
29	23	25,2	74	74,5		
29	24	25,1	79	74,8	27,3	72
30	1	24,2	83	73,8		77,5
30	2	24,3	81	73,8		
30	3	24,0	85	73,7		
30	4	23,9	91	74,1		
30	5	23,3	92	73,2		
30	6	22,2	97	71,7		
30	7	25,0	79	74,8		
30	8	29,8	65	80,3		
30	9	31,6	63	82,6		
30	10	33,4	59	84,4		
30	11	35,0	55	85,7		
30	12	36,0	49	86,0		
30	13	36,7	47	86,4		
30	14	37,6	47	87,5		
30	15	38,5	44	88,0		
30	16	32,4	51	81,6		
30	17	37,8	47	87,8		
30	18	37,2	49	87,5		
30	19	35,3	57	86,8		
30	20	32,7	53	82,5		
30	21	30,9	56	80,5		
30	22	29,4	56	78,5		
30	23	28,1	53	76,2		
30	24	22,7	69	70,3	30,5	64
31	1	23,5	74	71,9		81,1
31	2	22,7	73	70,6		
31	3	20,8	87	68,5		
31	4	20,4	84	67,8		
31	5	19,5	95	66,9		
31	6	18,9	99	66,0		
31	7	19,8	99	67,6		
31	8	20,6	99	69,0		
31	9	20,9	98	69,5		
31	10	21,6	97	70,8		
31	11	22,9	92	72,5		
31	12	23,7	87	73,4		

“Estrés calórico en vacas Holando Argentino”

31	13	24,9	81	74,9		
31	14	26,2	77	76,5		
31	15	26,8	74	77,1		
31	16	27,1	73	77,4		
31	17	27,9	73	78,6		
31	18	28,0	73	78,7		
31	19	27,9	78	79,3		
31	20	25,7	91	77,3		
31	21	23,9	95	74,6		
31	22	24,0	94	74,7		
31	23	22,9	97	72,9		
31	24	22,5	98	72,3	23,5	87 73,1

APÉNDICE B:

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE DATOS CORRESPONDIENTES A LAS VARIABLES
LINFOCITOS, NEUTRÓFILOS, CORTISOL

Para cada variable se consideraron los datos tomados en Primavera, durante la mañana y la tarde y en el Verano, también durante la mañana y la tarde. Se crearon entonces 4 variables por cada una de ellas y además se creó también una variable que muestra la proporción de Neutrófilos presentes en la sangre respecto de la cantidad de Linfocitos, como el cociente entre ellas.

En la Tabla 1 se muestra el resumen de medidas descriptivas de cada una.

Tabla 1: resumen de medidas descriptivas de las variables en estudio

Variable	N	Media	EEMedia	Desv.Est.	Mín	Q1	Mediana	Q3	Máx
Linfo_PM	20	62,8	0,675	3,019	60	61,25	62	63	72
Linfo_PT	26	61,81	0,31	1,58	60	61	61,5	62	66
Linfo_VM	30	55,1	0,4	2,23	50	53	55,5	57	58
Linfo_VT	27	54,56	0,44	2,31	50	53	54	56	58
Neutro_PM	20	31,55	0,66	2,93	24	31	32	33	36
Neutro_PT	25	32,16	0,34	1,7	30	31	32	33	36
Neutro_VM	30	39,07	0,34	1,87	35	38	39	40	44
Neutro_VT	27	39,52	0,39	2,045	36	38	40	40	46
Corti_PM	16	4,19	0,2	0,81	3,41	3,44	4,1	4,74	6,42

“Estrés calórico en vacas Holando Argentino”

Corti_PT	15	3,56	0,17	0,65	2,5	3,1	3,61	4,1	4,62
Corti_VM	18	6,14	0,26	1,08	3,5	5,95	6,31	6,8	7,3
Corti_VT	17	5,51	0,23	0,94	4,3	4,82	5,4	5,95	7,9
N/L_PM	20	0,51	0,015	0,06	0,33	0,49	0,52	0,53	0,6
N/L_PT	26	0,5	0,02	0,11	0	0,49	0,52	0,54	0,59
N/L_VM	30	0,71	0,01	0,06	0,6	0,67	0,7	0,74	0,88
N/L_VT	27	0,73	0,01	0,07	0,62	0,67	0,74	0,75	0,92

Análisis del cumplimiento de supuestos: para aplicación de test paramétricos y no paramétricos se realizaron los test de Komogorov Smirnof y Anderson Darling a cada variable para el análisis del cumplimiento de los supuestos de normalidad y el de Fisher para homocedasticidad.

Resultados: Se obtuvo que las variables Linfocitos y Neutrófilos no tienen distribución normal y las variables Cortisol y N/L sólo tienen distribución normal las correspondientes a la tarde.

Conclusión: se van a utilizar test no paramétricos para comparar medianas (Wilcoxon) y también en las correlaciones (Spearman).

Índice Temperatura Humedad: se utilizaron los valores de ITH recabados en los mismos días y se consideraron los promedios de las 10 horas anteriores a cada toma de sangre y se categorizaron según el siguiente criterio:

ITH Nivel de estrés Principales efectos fisiológicos/productivos

Menor a 72 Bajo: No ocasiona desordenes fisiológicos.

Mayor a 72 Leve: Ocasiona 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.

Mayor a 78 Moderado: 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.

Mayor a 82 Grave: Los mecanismos adaptativos colapsan y se altera significativamente el desempeño productivo; los trastornos metabólicos favorecen la ocurrencia de enfermedades y pueden desencadenar la muerte.

Los promedios resultaron ser los siguientes:

ITH = 65,6 corresponde a Bajo para la toma de Primavera de la mañana.

ITH = 74,3 corresponde a Leve para la toma de Primavera de la tarde.

ITH = 71 corresponde a Bajo para la toma de Verano de la mañana.

ITH = 80,08 corresponde a Moderado para la toma de Verano de la tarde.

En resumen tenemos que por “la mañana” la categoría de ITH es BAJO (sin diferencias entre estaciones) y por “la tarde” las categorías de ITH es LEVE en Primavera y MODERADO en Verano.

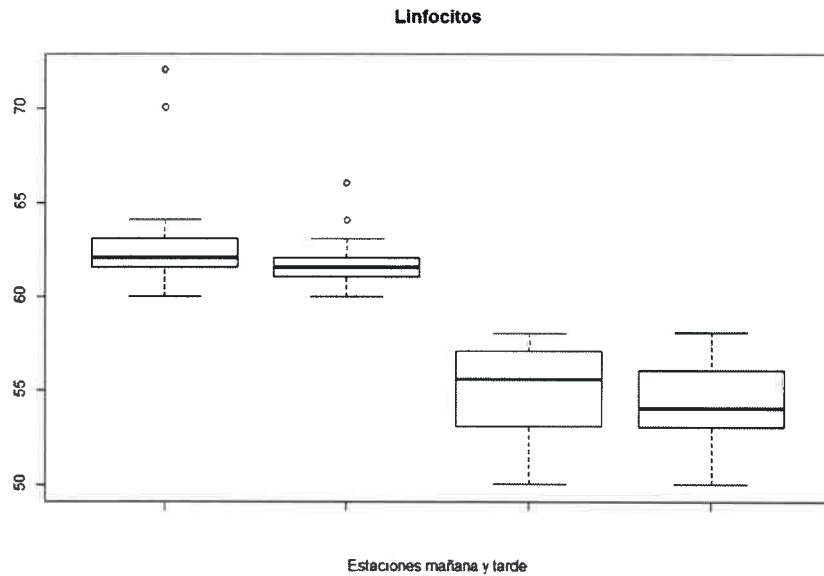
Se procede a comparar las variables de la mañana entre sí y de la tarde entre sí. Al existir diferencias significativas sólo por la tarde se piensa en concluir que esa diferencia se debe al estrés producido sobre el animal por las olas de calor.

Análisis del efecto de las olas de calor sobre las variables en estudio:

Gráfico de Cajas: se observan resumidos en una caja las medias limitadas por el primero y tercer cuartil correspondientes a la toma realizada para cada variable.

Variable Linfocitos:

Gráfico 1: Gráf.de cajas de resumen: Linfo_PM, Linfo_PT, Linfo_VM, Linfo_VT



Comparación de medianas:

En el gráfico 1 se observa que hay diferencias entre las medias de los grupos y tb entre las variancias.

En la tabla 1 con el resumen de las medidas descriptivas tenemos que:

Mediana (Linfo_PM) = 62 y Mediana (Linfo_VM) =55,5

sd (Linfo_PM) =3,019 y sd (Linfo_VM) =2,2

Luego de realizar los test correspondientes se concluye que según los datos esas diferencias entre las medianas de Linfocitos Primavera Mañana y Verano Mañana son significativas.

Para la tarde tenemos Mediana (Linfo_PT) = 61,5 y Mediana (Linfo_VT) = 54

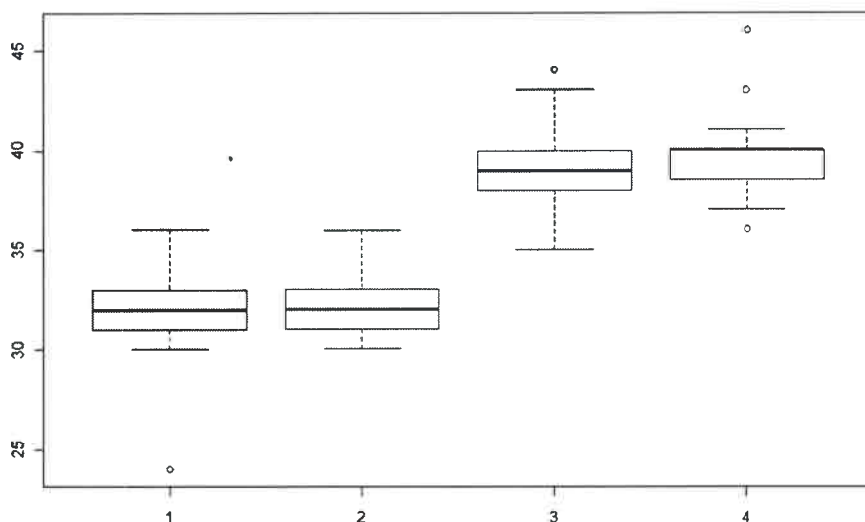
$sd(\text{Linfo_PT}) = 0,31$ y $sd(\text{Linfo_VT}) = 0,44$

Luego de realizar los test correspondientes se concluye que según los datos las diferencias entre las medianas de Linfocitos Primavera tarde y Verano tarde son significativas.

Conclusión: se encontraron diferencias significativas entre Primavera y Verano en coincidencia con el cambio de categoría para el ITH. Podemos pensar entonces que los valores de Linfocitos disminuyeron significativamente debido al estrés producido en el animal por las olas de calor.

Variable Neutrófilos:

Gráfico 2: de cajas que resume las medidas descriptivas. 1: Neutro_PM, 2: Neutro_PT, 3: Neutro_VM, 4: Neutro_VT



Comparación de medianas:

En el gráfico 2 se observa que hay diferencias entre las medianas de los grupos y también entre las variancias.

En la tabla 1 con el resumen de las medidas descriptivas tenemos que:

Mediana (Neutro_PM) = 32 y Mediana (Neutro_VM) = 39

sd (Neutro_PM) = 2,93 y sd (Neutro_VM) = 1,87

Luego de realizar los test correspondientes se concluye que según los datos esas diferencias entre las medianas de Neutrófilos Primavera y Verano por la mañana son significativas.

Para la tarde tenemos Mediana (Neutro_PT) = 32 y Mediana (Neutro_VT) = 40

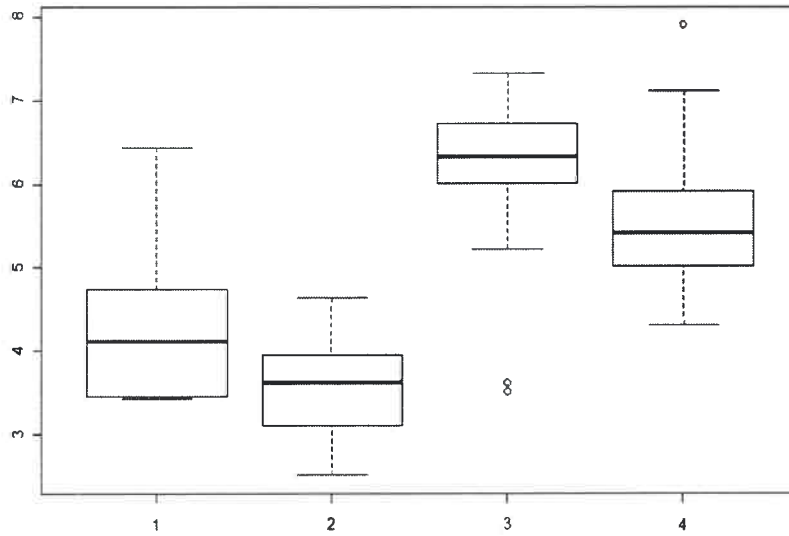
sd (Neutro_PT) = 1,7 y sd (Neutro_VT) = 2,045

Luego de realizar los test correspondientes se concluye que según los datos las diferencias entre las medianas de Neutrófilos Primavera y Verano por la tarde son significativas.

Conclusión: se encontraron diferencias significativas entre Primavera y Verano en coincidencia con el cambio de categoría para el ITH. Podemos pensar entonces que los valores de Neutrófilos aumentaron significativamente debido al estrés producido en el animal por las olas de calor.

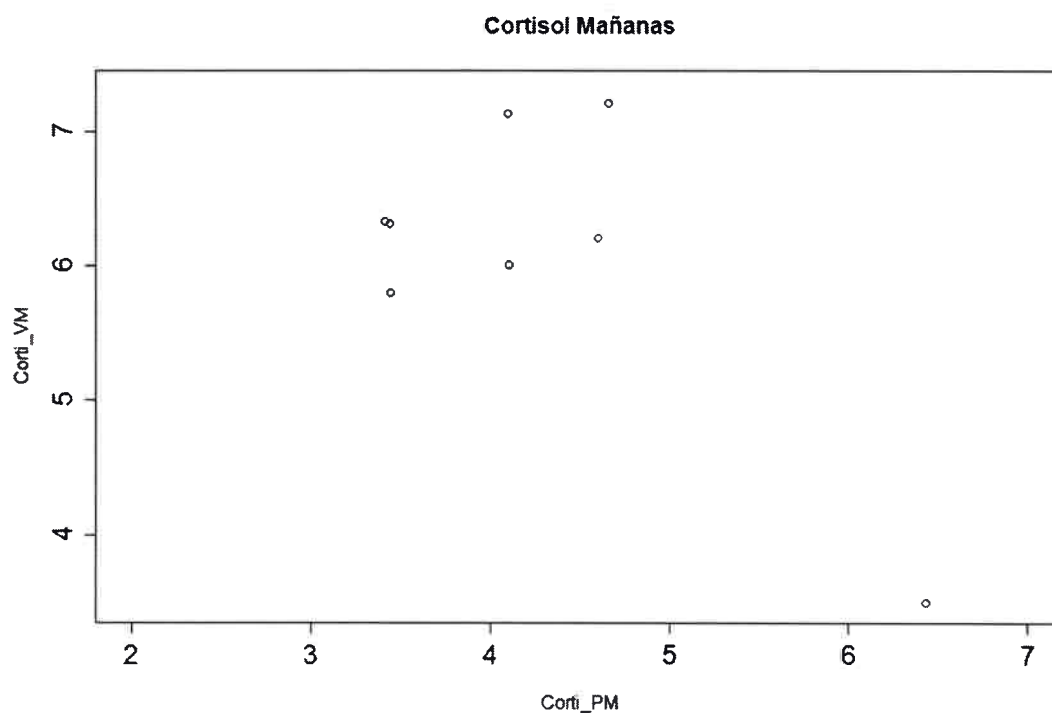
Variable Cortisol:

Gráfico 3: de cajas que resume las medidas descriptivas. 1: Corti_PM, 2: Corti_PT, 3: Corti_VM, 4: Corti_VT



Los gráficos de dispersión de las variables arrojan lo siguiente:

Gráfico 4: Gráfico de Dispersión



Comparación de medianas:

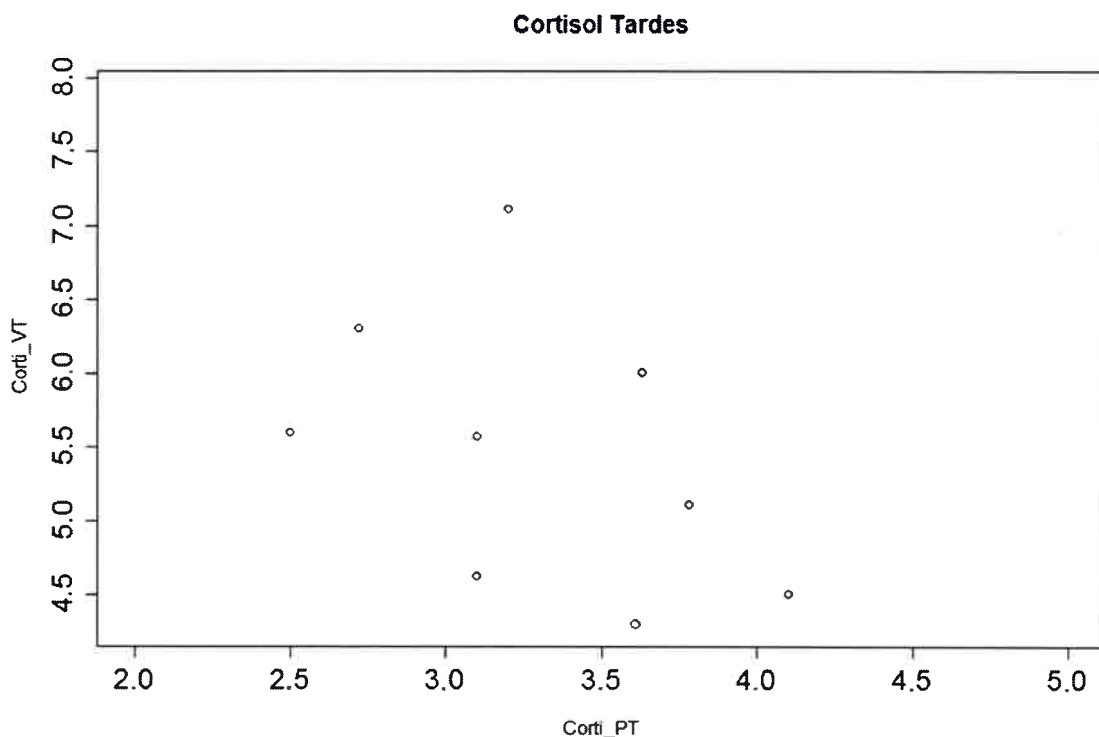
En el gráfico 3 se observa que hay diferencias entre las medianas de los grupos y también entre las variancias. En el gráfico 4 observamos que mientras en Primavera los valores son bajos y oscilan aproximadamente entre 3.5 y 5 los del Verano son más altos, siendo casi en su totalidad mayores a 6.

Según la tabla 1 tenemos que: Mediana (Corti_PM) = 4,1 con un desvío de sd (Corti_PM) =0,81 y Mediana (Corti_VM) =6,31 con un desvío sd (Corti_VM) = 1,08.

Conclusión 1: luego de realizar los test correspondientes a la variable Cortisol para la comparación entre las estaciones se obtuvo que las diferencias entre las medianas “de la mañana” NO resultaron significativas.

Análogamente analizamos los valores de la tarde. Según la tabla 1 tenemos Mediana (Corti_PT) =3,61 con un desvío sd (Corti_PT) = 0,65 y Mediana (Corti_VT) = 5,4 con un desvío sd (Corti_VT) =0,94. El gráfico 5 nos muestra que para valores bajos (menores a 4) en Primavera se corresponden valores altos (entre 4 y 7) de Verano.

Gráfico 5: Gráfico de Dispersión



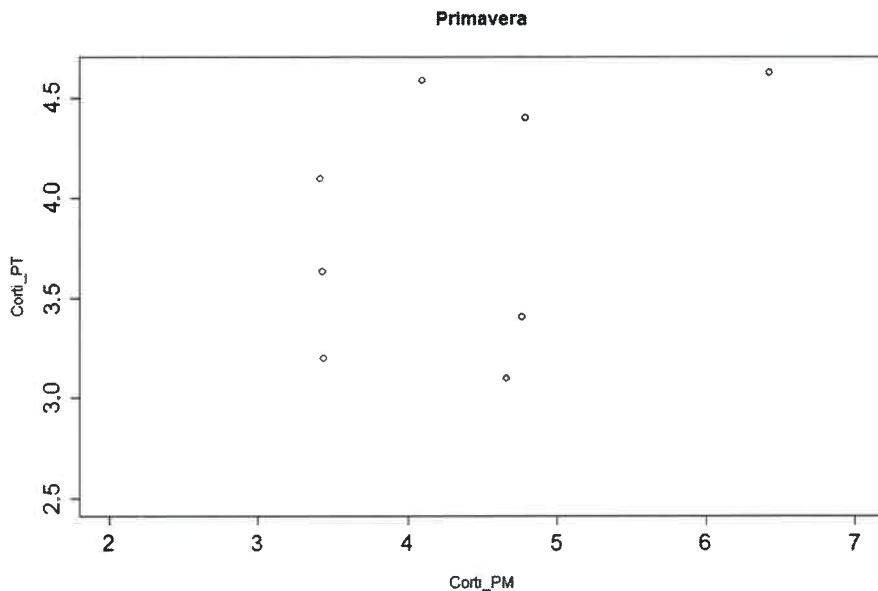
Conclusión 2: luego de realizar los test correspondientes para la comparación entre las estaciones se obtuvo que las diferencias observadas entre las medianas “de la tarde” SI son significativas.

Conclusión variable Cortisol en Primavera y Verano: luego de haber resultado que el aumento significativo de la mediana se produce en las tardes de Verano y que los valores de ITH corresponden a Leve en Primavera y Moderado en Verano, podemos decir que según los datos en la variable Cortisol se produce un aumento significativo debido a las diferencias producidas por los diferentes niveles de ITH.

Otro análisis interesante es la comparación de esta variable en las distintas estaciones entre mañana y tarde.

Según el gráfico 6 se observa que en la Primavera los valores de Cortisol oscilan entre 3 y 5. Según la tabla 1 tenemos que: Mediana (Corti_PM) = 4,1 con un desvío de sd (Corti_PM) = 0,81 y Mediana (Corti_PT) = 3,61 con un desvío sd(Corti_PT) = 0,65.

Gráfico 6: Gráfico de dispersión de Cortisol



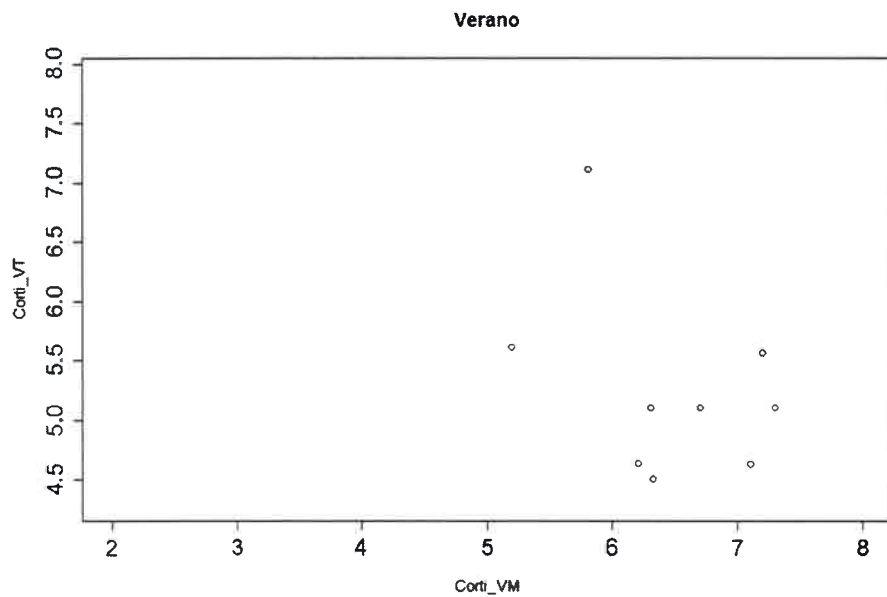
Luego de realizar el test de comparación de medianas podemos afirmar que según los datos NO se observaron diferencias significativas entre las medianas de Corti_PM y Corti_PT.

En el Verano en cambio, se observa en el gráfico 7 que los valores de Cortisol son bastante menores por la tarde (por la mañana mayores a 6 en su mayoría mientras que por la tarde son menores a 5.5).

Según la tabla 1 tenemos que: Mediana (Corti_VM) = 6,31 con un desvío de sd (Corti_VM) = 1,08 y Mediana (Corti_VT) = 5,4 con un desvío sd (Corti_VT) = 0,94 indicando una

disminución en los valores de Cortisol. Se aplicaron test de comparación de medianas para ver si es significativa.

Gráfico 7: Gráfico de dispersión de Cortisol



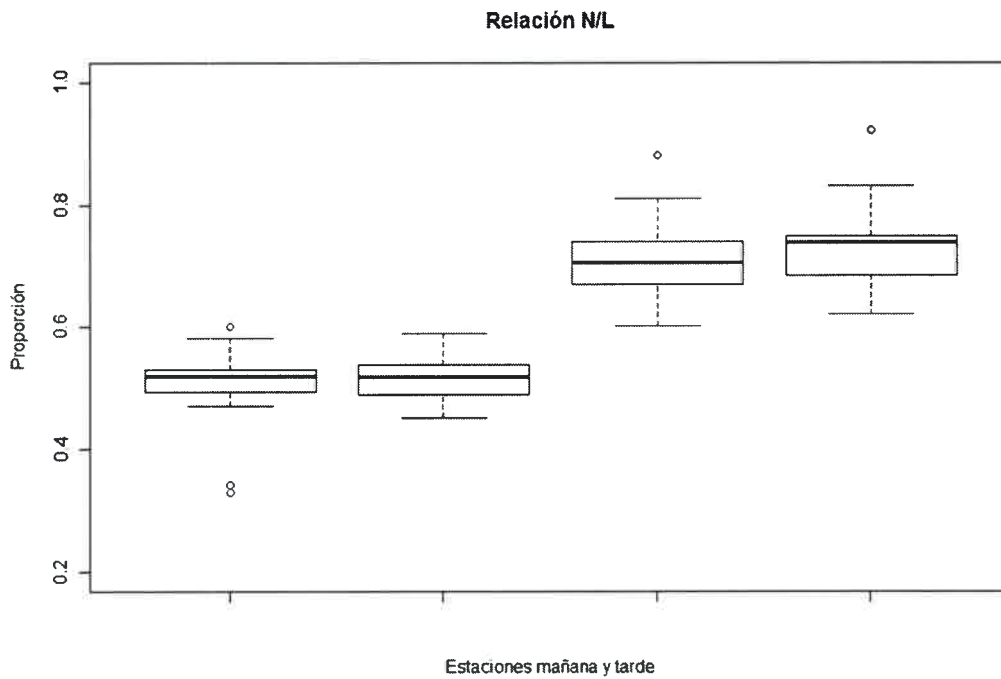
Luego de realizar el test de comparación de medianas podemos afirmar que según los datos las disminuciones producidas en el Cortisol en las tardes de Verano resultaron significativas respecto de las mañanas de la misma estación.

Conclusión comparación de la variable Cortisol entre Mañana y Tarde: la categoría de ITH cambia de Bajo a Leve en Primavera y de Bajo a Moderado en Verano y las diferencias entre la mañana y la tarde de Primavera no son significativas pero sí lo son en Verano. Podemos concluir que el aumento significativo producido en la variable Cortisol por la tarde del Verano es debido a la diferencia de ITH.

VARIABLE N/L:

Esta variable representa la proporción de Neutrófilos presentes en la sangre respecto de la cantidad de linfocitos, como el cociente entre ellas.

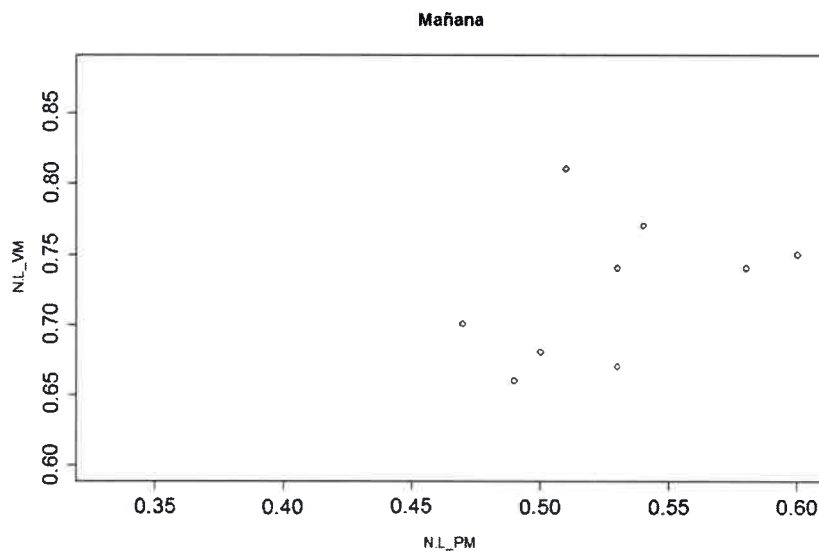
Gráfico 8: de Cajas de N/L en el momento de las mediciones PM, PT, VM, VT



Comparación de medianas:

En el gráfico 8 se observa que hay diferencias entre las medianas de los grupos y también entre las variancias. Teniendo en cuenta la tabla 1 tenemos que Mediana (N/L_PM) =0,52 con un desvío sd (N/L_PM) = 0,06 y Mediana (N/L_VM) =0,7 con un desvío sd (N/L_VM) = 0,06.

Gráfico 9: Gráfico de dispersión N/L



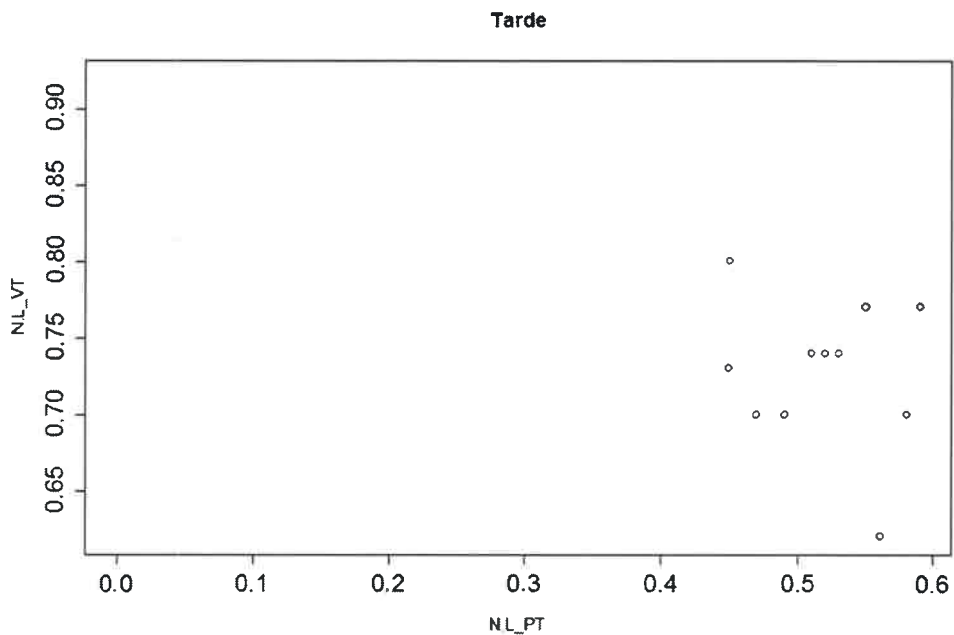
En el gráfico 9 se observa que mientras en primavera los valores son menores a 0.6, en verano todos superan 0.65.

Se analizan entonces si esas diferencias estacionales observadas en la relación N/L, que podrían producirse por las olas de calor son realmente significativas.

Luego de realizar los test correspondientes se obtiene que según los datos esas diferencias SI resultan significativas.

Por otro lado comparando las tardes (gráfico 10) que es cuando se produce la diferencia de nivel en ITH, para aproximadamente el mismo rango de variación en primavera, en verano en su mayoría superan 0.7 (la proporción es mayor).

Gráfico 10: Gráfico de dispersión N/L



Según la tabla 1 tenemos que Mediana (N/L _PT) = 0,52 con un desvío sd (N/L _PT) = 0,11 y Mediana (N/L _VT) = 0,74 con desvío sd (N/L _VT) = 0,07, se observa un leve aumento.

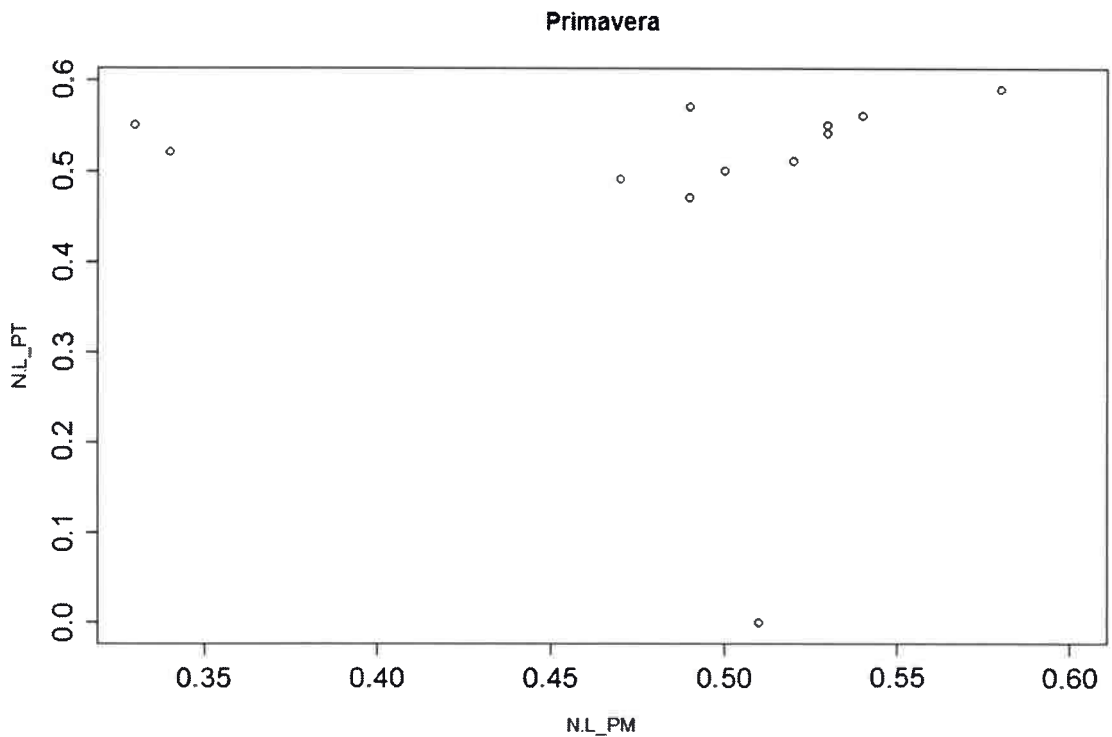
Luego de realizar los test correspondientes se obtiene que según los datos esas diferencias SI resultan significativas.

Conclusión: según los datos se produjeron aumentos significativos de la cantidad de neutrófilos en relación a la de linfocitos entre las mañanas y tardes en ambas estaciones. Esto puede relacionarse con los aumentos significativos producidos en el cortisol.

Además podemos también analizar la comparación de N/L en cada estación, por la mañana en primer lugar. Según la tabla 1 tenemos Mediana (N/L_PM)=0.52 con un sd (N/L_PM)=0.06 vs Mediana (N/L_PT)= 0.52 con un sd (N/L_PT)=0.11, no parece haber grandes diferencias.

El gráfico 11 muestra que tanto por la mañana como por la tarde en primavera las proporciones no parecen modificarse.

Gráfico 11: Gráfico de dispersión N/L



Luego de realizar el test se concluye que no hay diferencias significativas entre ellas.

Además, si observamos lo que ocurre en Verano con las mañanas y las tardes vemos en el gráfico 8 una leve diferencia. Según la tabla 1 tenemos que mediana (N/L_VM)=0.7 con un sd (N/L_VM)=0,06 vs Mediana (N/L_VT)=0.74 con un sd (N/L_VT)=0.07.

El gráfico 12 nos muestra que tanto durante la mañana como por la tarde las proporciones se encuentran entre 60 y 78%.

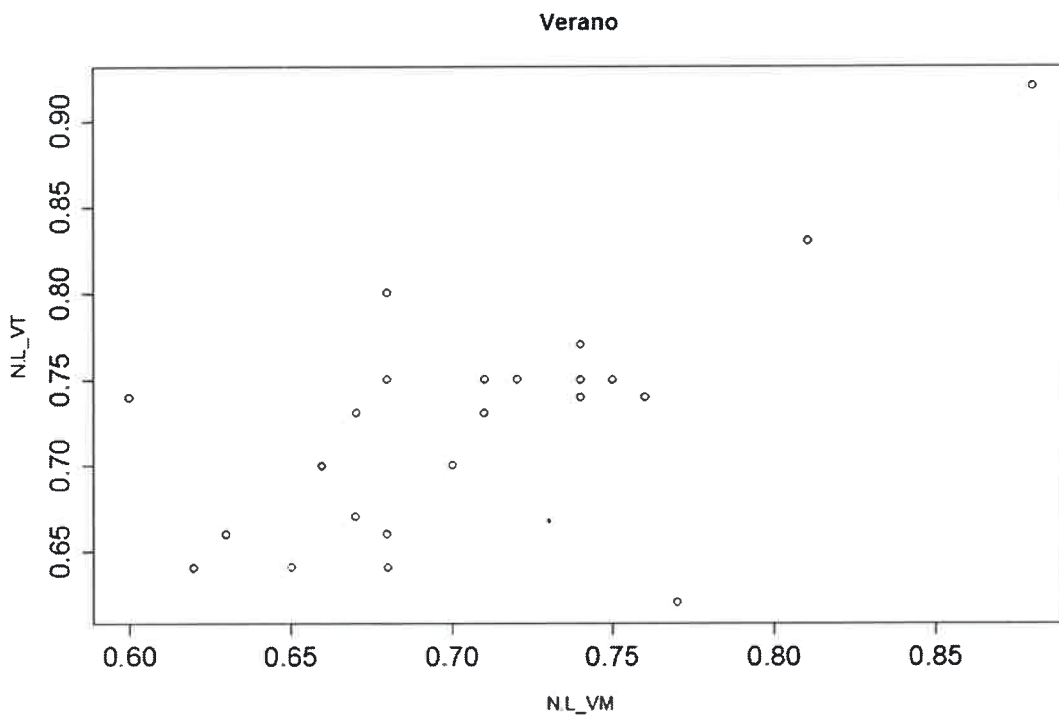


Gráfico 12: Gráfico de dispersión N/L

Al realizar el test correspondiente resultan ser significativas las diferencias por la tarde, no así por la mañana.

Conclusión: según los datos las diferencias producidas en el verano podemos decir que resultan significativas y esto puede relacionarse con lo ocurrido con el cortisol.

7071

71