

Medición de cortisol en leche como indicador de bienestar animal, resultados preliminares

LAGGER J¹.; SCHMIDT E¹.; WARAN, N².; OTROSKY R¹.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLPam.

²Escuela de Veterinaria (Dick) - Universidad de Edimburgo-UK.

jlagger@fvet.uba.ar

RESUMEN

Se realizó un ensayo experimental para evaluar el bienestar animal en vacas lecheras, midiendo la concentración de cortisol en leche, quien esta en correlación directa con el cortisol del plasma. Se seleccionaron al azar un lote de 6 vacas en lactancia, apartadas del rodeo (total 349 vacas Holando Argentino) y fueron sometidas a un tratamiento de estrés, mediante una cinta magnetofónica con ladridos de perros, durante 2 horas, antes del ordeño (LT = lote tratado). 1) Se tomaron muestras de los primeros chorros de leche (despunte) en un pool de cuartos del LT. 2) Se ordeño a fondo cada vacas tratadas y se tomo una muestra pool de LT. Se seleccionaron al azar 14 vacas en lactancia, como grupo control, del mismo rodeo, que recibió el manejo de rutina normal (LC = lote control) y 3) se tomaron muestras de los primeros chorros de leche, formando un pool de cuartos y 4) se tomo una muestra de leche de tanque al final del ordeño de todo el rodeo. 1) LT muestra de despunte promedio fue de $3,34 \pm 1,90$ ng/ml (DE) de cortisol/leche. 2) LT pool de leche $6,55$ ng/ml de cortisol/leche. 3) LC muestra de despunte promedio fue $0,96 \pm 0,41$ ng (DE) de cortisol/leche. 4) Muestra leche del tanque $0,98$ ng/ml de leche de cortisol/leche. Las diferencias entre lote LC y LT fueron significativas ($p < 0.01$) realizadas mediante el test ANOVA. En conclusión, 1) el LT muestra un importante aumento de cortisol en leche en relación a LC, siendo este un buen indicador para medir estrés en un rodeo lechero, y 2) la concentración de cortisol en leche del tanque del rodeo fue de $0,98$ ng/ml de leche de cortisol por ml/leche, elevada en comparación con otras determinaciones $0,3$ a $0,5$ ng/ml cortisol/leche y similares a los valores $1,2$ ng/ml cortisol/leche, hallado por Veckerk. Se continuarán realizando ensayos en esta línea, buscando la correlación de cortisol, composición de la leche, RCS y de UFC.

SUMMARY

A trial was done to assess dairy cow welfare measuring milk cortisol concentration, which has a high and direct correlation with plasma cortisol. A group of cows in lactation were selected randomly from an Argentinean Holland herd (n = 349 dairy cows), and were put on a stress treatment (ST group n= 6) by a magneto phonic recording of dogs barking. Treatment was done during two hours before milking, then 1) foremilk samples were taken from each cow forming a milk pool from each mammary quartile, and 2) each cow was completely milked and a milk pool was taken. Another group of cows handled routinely were selected randomly as a control group (CG n = 14), 3) foremilk samples were taken idem (1) and 4) a bulk milk tank sample was taken at the end of the milking. Milk samples were frozen and sent to laboratory. Cortisol was measured by electroquimioluminescente technique. 1) ST Foremilk samples average: 3.34 ± 1.90 ng (SD) (a) ml/milk. 2) ST pool milk : 6,55 ng/ml. 3) CG Foremilk samples average: 0.96 ± 0.41 ng (SD) (b) ml/milk. 4) CG Bulk milk tank: 0,98 ng/ml. Difference between ST (a) and CG (b) were positively significant ($p < 0.01$) test ANOVA. Conclusion: 1) ST shows an important increase of cortisol regards CG, being this a good indicator for measuring stress situation and therefore dairy cow welfare, 2) CG bulk milk tank in this herd was 0,98 ng ml/milk. Cortisol in milk was high in comparison with other determinations: 0.3 to 0.5 ng/ml (Fox, L. 1981; Termeulem, S. 1981; Shutt, D. 1985; y Dobson, H. 1986), but similar to Verkerk, G. 1998) 1.2 ng/ml. Trials will be to find bulk milk tank cortisol concentration and its correlation with milk composition, SCC and TBC. Objective will be to find which the real level of milk cortisol is in a healthy dairy herd.

INTRODUCCIÓN

La respuesta fisiológica del estrés agudo es el aumento de la secreción de glucocorticoesteroides de la corteza de la glándula adrenal. Está regulada por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). Cualquier trauma, dolor, frío, puede estimular el hipotálamo, que libera la hormona corticotrofina (HCR) que produce la liberación de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) de la adenohipofisis. La ACTH estimula la corteza adrenal y libera glucocorticoesteroides: el cortisol y la cortisona en el torrente sanguíneo. La ACTH tiene un efecto trópico en la corteza adrenal y además estimula la

síntesis de los glucocorticoesteroides en la zona fascicular de la glándula adrenal (Mac Donald, 1989).

El cortisol incrementa la gluconeogénesis, inhibe la utilización de glucosa periférica y acumula glucógeno en el hígado. Causa degradación de la proteína muscular y produce la conversión de aminoácidos a glucosa, proceso conocido como gluconeogénesis (Mac Donald, 1989).

El cortisol entra en la corriente sanguínea como molécula libre o está unido a proteínas del plasma. Sólo los corticosteroides libres son biológicamente activos e ingresan a las células donde actúan (Mac Donald, 1989).

La vida media de cortisol es menor a 2 horas, la degradación metabólica tiene lugar en los hepatocitos y en pequeña proporción en los riñones. La célula hepática reduce el grupo 3 cetona a hidroxil, luego éste se conjuga a glucorónido o sulfato, soluble en agua. El 75 % es excretado por orina y el 25 % por las heces (Mac Donald, 1989).

Acciones simples en los animales puede ocasionar aumento de la concentración de cortisol como la vaginoscopía, la inseminación artificial y otras interacciones como alojar las vacas en lugares desconocidos o no habituales, cambios como pasar al ordeño mecánico e incluso la aparición de celo (Weltz et al., 2001).

Cortisol en plasma

Wagner and Oxenreider (1972) midieron cortisol en plasma de vacas lecheras estabuladas. Las muestras de sangre fueron obtenidas de vacas en lactancia con ternero al pie, de vacas en ordeño mecánico y de vacas secas (Tabla 1).

Tabla 1.-

CONCENTRACIÓN DE CORTISOL EN PLASMA

	Cortisol ng/ml \pm DE*
Vacas amamantando	9,42 \pm 0,09
Vacas ordeño/mecánico	6,78 \pm 0,05
Vacas secas	4,46 \pm 0,04

*Desviación estándar. Wagner y Oxenreider 1972

Los niveles en vacas secas tuvieron diferencias significativas respecto a las vacas amamantando ($P < 0,05$). El patrón diurno de cortisol en plasma fue estudiado

mediante cánulas intravenosas tomando muestras de sangre cada 30 minutos durante 24 horas corridas (Wagner y Oxenreider 1972).

Los mismos autores estudiaron el patrón diurno de cortisol en plasma de vacas lecheras (Tabla 2), que luego fue confirmado en trabajos de Verkerk et al (1998).

Tabla 2.-

PATRÓN DIURNO DE CORTISOL EN PLASMA

Intervalos entre horas	Cortisol ng/ml
	Promedio ± DE
02:00-10:00 AM	7,34 ± 0,53
10:00-18:00 AM – PM	7,51 ± 0,68
18:00-02:00 PM- AM	5,31 ± 0,40

Wagner y Oxenreider 1972

Los valores entre las 18:00-02:00 fueron significativamente bajos respecto a los otros dos periodos, lo que sugiere que la disminución de las actividades al atardecer y la noche, disminuye las actividades y las respuestas de cortisol en sangre son menores.

Wagner y Oxenreider encontraron un aumento significativo de cortisol en plasma 15 minutos después del ordeño, tanto en el ordeño mecánico, como con el ternero mamando. El nivel de cortisol en plasma fue de $8,3 \pm 0,40$ ng/ml durante el período de estimulación y de 5,4 ng/ml antes y después de dicho período.

Cortisol en leche

La concentración de cortisol en leche esta directamente relacionada con la concentración en plasma. Distintos reportes señalan una positiva y alta correlación de cortisol en plasma y leche (Fox et al., 1981; Termeulen et al., 1981; Shutt et al., 1985; Dobson et al., 1986; Verkerk et al., 1998).

Tabla 3.-

**CONCENTRACIÓN DE CORTISOL EN PLASMA Y LECHE EN
VACAS LECHERAS**

Autores	Cortisol en plasma ng/ml	Cortisol en leche ng/ml
	Promedio ± DE	Promedio ± DE
Fox et al (1981)	5,73 ± 2,10	0,55 ± 0,07

Termeulen et al (1981)	3,55 ± 1,12	0,36 ± 0,13
Shutt et al (1985)	4,5 ± 0,7	0,35 ± 0,6
Dobson et al (1986)	2,0 hasta 4,0	0,5
Verkerk et al (1998)	7,1 ± 1,9	1,20 ± 0,20

Tratamiento de estrés en vacas lecheras

Termeulen et al (1981) inyectaron de 40 UI ACTH (vía yugular) a un lote de vacas lecheras. En el momento de la inyección la concentración de cortisol en plasma y leche fue de $5,1 \pm 2,2$ y de $0,3 \pm 0,1$ ng/ml respectivamente. A los 60 minutos, la concentración de cortisol se incrementó en plasma y leche, fue de 30,9 ng/ml y 2,6 ng/ml respectivamente.

Luego de 4 horas, el nivel de cortisol descendió a los valores basales (Tabla 4).

Tabla 4.-

RESPUESTA DE CORTISOL LUEGO DE LA INYECCIÓN DE ACTH

Tiempo (h) relativo a la inyección	Cortisol en plasma ng/ml Promedio ± DE	Cortisol en leche ng/ml Promedio ± DE
0	5,1 ± 2,2	0,3 ± 0,2
1	30,9 ± 10,2	2,6 ± 0,8
2	23,1 ± 6,9	2,2 ± 0,3
4	10,6 ± 0,9	0,8 ± 0,1

Termeulen et al., 1981

En otros estudios, Dobson et al (1986), midió en un grupo control que la concentración de cortisol en plasma fue de 2,00 a 4,00 ng/ml y luego de la inyección de ACTH, entre 15 a 30 minutos, el cortisol en plasma aumentó de 18 a 26 ng/ml y los valores máximos de cortisol en leche fue observado por Dobson entre los 105 a los 150 minutos.

La concentración de cortisol en leche fue altamente correlativa con los niveles en plasma durante el ordeño. Shutt et al (1985) estudiaron en bovinos el cortisol total y el libre en plasma y calostro-leche. Una a dos horas luego de una inyección de ACTH cortisol total en plasma y en calostro fue de $16,6 \pm 1,6$ ng/ml y $4,4 \pm 1,3$ ng/ml

respectivamente. El cortisol libre fue de $2,4 \pm 0,4$ y $1,8 \pm 0,5$ ng/ml respectivamente. Existe una alta correlación entre cortisol libre en plasma y en calostro o leche (Shutt et al., 1985). Solo cortisol libre es activo y puede difundir dentro de las células (Mac Donald, 1989).

Verkerk (1998), estableció que existe una relación entre la concentración de cortisol en la leche del despunte y la leche total con muestras de plasma tomadas antes del ordeño. La leche del despunte esta localizada en la cisterna del pezón y la leche total en el resto de la glándula mamaria, es decir en la luz de los alvéolos, conductos y cisterna de la glándula.

La vida media de cortisol en plasma es menor a las 2 horas, éste es degradado en el hígado y es excretado por riñón y heces (Mac Donald, 1989), cuando el cortisol en plasma desciende a los valores basales, el cortisol colectado en la leche, regresa a la corriente sanguínea, aparentemente siguiendo un patrón de concentraciones. Verkerk (1998), sugiere que el cortisol puede retornar a la sangre más fácilmente desde los alvéolos que desde la cisterna del pezón. Esto probablemente sea por la diferente irrigación de ambas zonas, están más vascularizados los alvéolos que la cisterna.

Wilson et al (2002), trataron de determinar el efecto del estrés ambiental en tres grupos de novillos durante 42 días. Uno de ellos, el grupo A estuvo en pastoreo y los otros B y C estabulados en sistema feed-lot. De los grupos en feed-lot el B tenía una densidad de 6 m^2 por cabeza, en un piso con barro y humedad y el otro grupo C tenía mayor espacio, 12 m^2 por cabeza y el piso era firme y limpio. Hubo una gran variación de cortisol en pero no se encontró una diferencia significativa entre los grupos (datos no mostrados en el trabajo). Lo que hallaron fue una diferencia significativa entre el peso de la glándula adrenal del grupo A (pastoreo) respecto a los grupos B y C (feed-lot). Una formación nodular (hiperplasia) fue observada en los grupos B y en C (feed-lot) (Tabla 5).

Tabla 5.-

PESO DE LA GLÁNDULA ADRENAL

Grupos del ensayo	Peso Adrenal \pm DE
A = en pastoreo	9,42 g \pm 0,28
B = feed lot (alta)	11,08 g \pm 0,48
C = feed lot (baja)	11,27 g \pm 0,36

Wilson et al., 2002

Este incremento del tamaño y del peso de las glándulas adrenales, en particular del área fascicular podría indicar un efecto de estrés crónico. Aún no está claro si el estrés crónico aumenta la concentración de cortisol en plasma y luego en leche y si esto se puede verificar en la leche del tanque de frío.

Verkerk et al (1998), realizaron varios ensayos con grupos de vacas lecheras, un lote recibió una inyección de ACTH y otro fue transportado en un camión (transportado por 45 minutos). El tratamiento no afectó la composición de leche (datos no mostrados) pero se observó un aumento del recuento de células somáticas (RCS) ($P < 0,10$) en el grupo que recibió la inyección de ACTH, seguida por el grupo transportado en relación al grupo control ($122 \times 10^3 \pm 23 \times 10^3$; $149 \times 10^3 \pm 25 \times 10^3$ y $66 \times 10^3 \pm 23 \times 10^3$ x 10^3 RCS, respectivamente).

En otro estudio se observó que vacas lecheras defecaban, orinaban y vocalizaban más y daban más pasos cuando se las ordeñaba en un lugar extraño al habitual, mostrando signos característicos de estrés, pero la visualización o contacto con personas conocidas disminuían estos efectos (Rushen, et al., 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue realizado en un tambo comercial de la localidad de Bernardo Larroudé, provincia de La Pampa-Argentina, región con lluvias de 600 mm anuales, en la primavera de noviembre del 2003. El rodeo tenía un total de 349 vacas Holando Argentino en lactancia. La alimentación base del establecimiento es pastoreo de alfalfa y se suplementa con 6 kg de una ración mezcla de balanceado 16 % y pellet de trigo, con agregados de rastrojos molidos de maíz y de soja.

Comportamiento al tratamiento de estrés

Lote tratado (LT): se seleccionaron al azar y se apartaron 6 vacas Holando multiparas entre 3 y 6 años de edad en lactancia. Dos horas previo a ordeño habitual (1:00 pm), fueron separadas y trasladadas a un corral de espera, lindero a las instalaciones de ordeño. Las vacas se agruparon y estaban tranquilas. Se las comenzó a estresar mediante la reproducción de una cinta magnetofónica con ladridos de perros, de 5 minutos de duración. Luego de 10 minutos se repetía la audición de la cinta. Cada vez que se reproducía la cinta las vacas se asustaban, tratando de escapar, de huir del corral, se acercaban una a otra, caminaban tratando de esconderse entre ellas. El número de

pasos por animal aumentó en un 100 %, dos de las vacas orinaron y otras dos defecaron. No vocalizaron y no vieron un solo perro, solo escuchaban los ladridos de la cinta. A las 03:00 se ingresaron a la sala de ordeño, tipo espina de pescado, para la toma de muestras.

A las 03:00 pm se trajo el resto del rodeo para realizar el ordeño habitual. Del rodeo se seleccionaron al azar, en la sala de ordeño, 14 vacas entre 3 y 6 años de edad, a las cuales se les tomó la muestra de los primeros chorros de leche (LC).

Tanto las muestras del (LT) lote estresado, como del (LC) lote control, fueron tomadas de cada pezón, en un recipiente de plástico estériles (ad-hoc) haciendo un “pool de cuartos”, correspondiendo a los primeros chorros de leche del ordeño, ubicados en la cisterna del pezón. Las muestras de leche colectadas en recipientes y fueron colocadas en una conservadora con refrigerantes, luego fueron trasladadas a un freezer para luego ser analizadas en el laboratorio.

El método de diagnóstico

El cortisol fue medido mediante la técnica de electroquimioluminiscencia, que básicamente consiste en reacciones químicas donde un precursor quimioluminiscente es tratado con sustancias oxidantes y catalizadores para producir un producto intermedio que, excitado electrónicamente produce radiaciones electromagnéticas en el espectro visible (fotones). En todos los procesos quimioluminiscentes la intensidad de emisión producida (IQL o fotones/segundo) depende de la eficacia al generar moléculas en estado excitado y de la proporción en que el precursor lumínico es consumido. La intensidad de la emisión de luz depende de la cantidad de sustrato que reaccione con el precursor. (División Veterinaria - Laboratorio Rapella-Buenos Aires, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de estrés durante el ordeño

Las vacas del (LT) lote estresado, que fueron llevadas a la sala de ordeño y estaban muy nerviosas. Había una notoria retención de leche, las glándulas estaban como sumidas y los pezones muy retraídos. Fue muy difícil la toma de muestra de leche. Al tratar de estimular la bajada de la leche, tocando y presionando con los dedos, los pezones, las vacas se resistían pateando constantemente, y no respondieron inmediatamente a los estímulos realizados. Luego de reiterados estímulos donde

transcurrieron entre 3 y 5 minutos y en algunas vacas hasta 8 minutos, se logró que bajara leche a la cisterna del pezón para poder llenar los recipientes con 75 cc de capacidad. Esto demuestra el fuerte efecto del estrés impidiendo la bajada de leche. El lote control tuvo un comportamiento normal al estímulo y bajada de leche y fue muy fácil la extracción de muestras de leche, a diferencia del lote tratado.

La concentración promedio de cortisol en leche del lote LT fue de $3,34 \pm 1,90$ ng, equivalente a recibir una dosis de 40 UI de ACTH endovenosa (Termeulen et al., 1981). En el (LC) lote control, el promedio fue $0,96 \pm 0,41$ ng de cortisol por ml de leche. Las diferencias de estos resultados fueron significativas (Test ANOVA).

Este último dato resulta elevado en relación a otras determinaciones de 0,5 a 0,3 ng/ml de cortisol en leche hallados por Fox et al (1981), Termeulem et al (1981), Shutt y Fell (1985), y Dobson et al (1986), y se aproxima a las determinaciones de Verkerk et al (1998) que fueron de 1,2 ng/ml de cortisol en leche.

La concentración de cortisol en el pool de la vacas tratadas-estresadas fue de 6,55 ng/ml de cortisol en leche, muy elevada respecto al promedio de leche individual del despunte, lo que sugiere que la concentración de cortisol en el total de la leche en glándula mamaria era sugestivamente mayor. Al final del ordeño de las 349 vacas, se tomó una muestra de leche del tanque y dio 0,98 ng/ml de cortisol en leche.

Estos resultados sugieren que la medición de cortisol en leche individual y de leche de tanque puede ser utilizado en un índice para diagnosticar el estrés de las vacas lecheras y ser utilizado como índice para evaluar el bienestar animal del conjunto de vacas en un tambo.

Se continuarán realizando ensayos en esta línea, buscando la correlación de cortisol en leche con la composición físico-química de la leche, RCS y UFC.

BIBLIOGRAFÍA

- DOBSON HILARY; OWEN, J. AND FOSTER R.** 1986. Dpt. Vet. Clinical Scie. University of Liverpool. "14th World Congress Disease of Cattle Dublin 1986.
- FOX,L., BUTLER,W.R; EVERETT, R.W. AND NATZE, R.P.** 1981 "Effect of Adrenocorticotropin on milk and plasma cortisol concentrations" Journal Dairy Science 64:1794-1803
- HEMSWORTH, P.H.; COLEMAN, G.J.; BARNETT, J.L. Y BORG, S.** Journal Animal Science 2000. 78:2821-2831

- HOCKETT, M. E.; HOPKINS, F. M., LEWIS, M. J. SAXTON, A. M.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S. P. AND SCHRICK, F. N.** 2000. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation” *Animal Reproduction Science* 58, 3-4: 241-251.
- MC DONALD, L.E.** 1989 *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Ed. Hemisferio Sur 1989.
- MC DONALD, P.; EDWARDS, R. A. AND GREENHALGH, J. F. D.** 1995 “Animal Nutrition” 5th edition Longman Scientific & Technical US.
- RUSHEN, J.; MUNKSGAARD, L.; MARNET, P. G.; PASSILLE, A. M.** 2001. “Human contact and the effects of acute stress on cows at milking”. *Applied Animal Behaviour Science* 73: 1, 1-14. Sainsbury D. & Sainsbury Peter 1988 “Livestock health and housing” Third edition.
- SHUTT, D. A. AND FELL, L.R.** 1985. Comparison of total and free cortisol in bovine serum and milk of colostrum. *Journal Dairy Science* 68:1832-1834.
- TERMEULEN, S. B.; BUTLER, W. R. AND NATZKE, R.P.** 1981. Rapidity of Cortisol transfer between blood and milk following Adrenocorticotropin injection” *Journal Dairy Science*, 64: 2197-2200.
- VERKERK, G. A.; PHIPPS, A. M.; CARRAGHER, J. F., MATTHEWS, L. R. AND STELWAGEN, K.** 1998. Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Animal Welfare* 1998, 7: 77-86
- WAGNER W.C. AND OXENREIDER, S. L.** 1972 Adrenal function in the cow, diurnal changes and the effects of lactation and neurophyseal hormones. *Journal Dairy Science* 34, 4: 630-635
- WELLNITZ, O.; BRUCMAIER, R. M.; BALDI, A.; STELWAGEN, K.** 2001. Central and peripheral inhibition of milk ejection. *Livestock Production Science*, 70: 1-2,135-140. EAAP publication N 1-2001; 41 Ref.
- WILSON, S. C.; FELL, L. R.; COLDITZ, I. G. y COLLINS, D. P.** 2002. An examination of some physiological variables for assessing the welfare of beef cattle in feedlots. *Animal Welfare*, 11: 305-316.