

Trabajo de investigación

## Estrés por calor: su efecto sobre el estado inmunológico de las vacas lecheras

### *Heat stress: its effect on the immune status of dairy cows*

Pamela Anahí Lendez<sup>1</sup>; María Victoria Nieto Farias<sup>1</sup>; Lucía Martínez Cuesta<sup>1</sup>; Adrián Alejandro Vater<sup>3</sup>, Marcelo Daniel Ghezzi<sup>2</sup>; Daniel Mota-Rojas<sup>4</sup>; Guillermina Laura Dolcini<sup>1</sup>, María Carolina Ceriani<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Área Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil; Centro de Investigación Veterinaria de Tandil-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIVETAN - CONICET); Arroyo Seco S/N, Campus Universitario, 7000-Tandil, Argentina

<sup>2</sup>Área Bienestar Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Arroyo Seco S/N, Campus Universitario, 7000-Tandil, Argentina.

<sup>3</sup>Escuela de Educación Secundaria Agraria N°1 "DR. RAMÓN SANTAMARINA", Pje. La Porteña Ruta Provincial N° 30 KM 122.5 – Tandil, Argentina.

<sup>4</sup>Fisiología del Estrés y Bienestar de los Animales Domésticos, Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Ciudad de México. México.

e-mail: cceriani@vet.unicen.edu.ar

(Recibido 2 de junio 2020; aceptado 13 de septiembre 2020)

#### RESUMEN

*El estrés por calor constituye un desafío importante para la industria láctea. Los bovinos de raza europea (*Bos taurus*) están adaptados al clima frío, presentando características morfo-fisiológicas que los vuelven vulnerables al estrés por calor. El aumento de la temperatura global, del número de vacas lecheras de alta producción (VLAP) y la intensificación de los sistemas productivos puede afectar su potencial productivo, reproductivo y su sistema inmune. Por primera vez se evalúa el patrón de expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  y sus receptores en animales expuestos a estrés por calor. La expresión de ARNm de esta citoquina proinflamatoria y sus receptores se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR), en bovinos Holando Argentino, en Tandil, Argentina. Los animales se evaluaron durante un año, en tres períodos: primavera ( $n = 15$ ), verano ( $n = 14$ ) y otoño ( $n = 11$ ). Se utilizaron los registros del Sistema Meteorológico Nacional de Argentina para estimar el índice de temperatura y humedad (ITH). Durante el verano se analizaron 609 eventos, 471 (77.33%) excedieron el umbral crítico de 72. En primavera, 6 de 537 eventos analizados (1.11%) superaron el umbral, y en otoño, ninguno de los 993 eventos tenía un ITH > 72. Los resultados demuestran una disminución en la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  y sus receptores en animales expuestos a condiciones ambientales compatibles con diestrés durante  $8,5 \pm 1,09$  h diarias. Este diestrés produce efectos negativos en el sistema inmune, que podrían afectar la respuesta a vacunas y aumentar la susceptibilidad a infecciones oportunistas.*

**Palabras clave:** bovinos Holando Argentino, estrés por calor, TNF- $\alpha$ , TNFRI, TNFRII

#### ABSTRACT

*Heat stress constitutes a major challenge for dairy industry. European breed cattle (*Bos taurus*) are adapted to low temperatures, with morpho-physiological characteristics that make them vulnerable to heat stress. The increase in global temperature, the number of high production dairy cows, and the intensification of productive systems might affect their productive and reproductive potential, and immune system. For the first time, expression pattern of TNF- $\alpha$  mRNA and its receptors is evaluated in animals exposed to heat stress. Expression of this inflammatory cytokine and its receptors in Holando Argentino cows from Tandil, Argentina, was evaluated by real time PCR (qPCR). Animals were evaluated throughout a year, in three periods: spring ( $n=15$ ), summer ( $n=14$ ) and autumn ( $n=11$ ). Data from the Sistema Meteorológico Nacional from Argentina were used to estimate the Humidity and Temperature Index (HTI). During the summer, 609 events were analyzed, and 471 (77.33%) exceeded the critical threshold of 72. In spring, 6 out of 537 analyzed events (1.11%) exceeded the threshold, and during the autumn season none of the 993 events had an HTI > 72. Our results show a decrease in TNF- $\alpha$  and its receptors mRNA expression in animals in environmental conditions compatible with distress along  $8,5 \pm 1,09$  daily hours. This discomfort provokes negative effects in immune system that could affect vaccine response and increase susceptibility to opportunistic infections.*

**Keywords:** Holando Argentino cattle, heat stress, TNF- $\alpha$ , TNFRI, TNFRII

## INTRODUCCIÓN

El estrés por calor (calórico) es uno de los factores ambientales que más afecta a la industria láctea, comprometiendo la producción<sup>1</sup>, la función inmune y el rendimiento reproductivo<sup>2</sup>. Polsky y von Keyserlingk<sup>3</sup> lo definen como la suma de las fuerzas externas que actúan sobre un animal que causa un aumento de la temperatura corporal y provoca una respuesta fisiológica.

Los bovinos, generalmente, son capaces de mantener su temperatura corporal, independientemente de la temperatura ambiental. Por sus características morfológicas las razas derivadas de *Bos taurus* son más vulnerables a sufrir estrés por calor debido al reducido tamaño relativo de sus pulmones, respecto a las razas adaptadas al clima tropical<sup>4,5</sup>. La temperatura y la humedad son factores que originan procesos que afectan el desempeño productivo y reproductivo del animal, por alteraciones en el consumo de alimentos y la necesidad de disipar un mayor calor corporal. El proceso adaptativo consiste en la modificación del comportamiento y cambios morfo-fisiológicos, tendientes a mejorar la disipación térmica y el metabolismo<sup>6</sup>. Combinado con el creciente número de vacas lecheras de alta producción (VLAP) y la intensificación de los sistemas productivos, el estrés por calor se ha convertido en uno de los desafíos más importantes que enfrenta la industria láctea en la actualidad<sup>3</sup>. Definimos a la VLAP, según procedimiento utilizado en nuestro medio, con sistemas de dos ordeños y sin usar hormona de crecimiento, a la vaca lechera con una producción láctea diaria estimada en 32-37 litros. El estrés por calor se provoca cuando el organismo del animal no es capaz ni de disminuir su temperatura corporal, ni de sobreponerse al calor existente.

La zona termoneutral se define como el rango de temperatura necesario para mantener la homeostasis, que para el ganado lechero se encuentra entre los 5°C y 25°C<sup>7</sup>. Por lo general, la temperatura corporal central es más alta que la temperatura ambiente, lo que garantiza que el calor generado por el metabolismo se disipe al medio<sup>1</sup>. La desviación fuera de este rango, conduce a aumentos en el metabolismo en reposo, modificaciones en la bioquímica y fisiología celular, así como a cambios en el comportamiento del animal<sup>8</sup>.

Este estudio se llevó a cabo en bovinos Holando Argentino, VLAP. Esta raza por sus características tiene mayores requerimientos nutricionales para poder mantener el normal funcionamiento de los procesos vitales, la lactogénesis y la reproducción. Existe una correlación positiva entre la cantidad de leche producida, la ingesta de alimento y la producción de calor metabólico. El calor metabólico contribuye a mantener la temperatura corporal en un ambiente frío; sin embargo, en un ambiente cálido este calor debe disiparse si se quiere mantener la neutralidad térmica, un requisito previo para mantener la función fisiológica normal, por lo que se necesitan mecanismos termorreguladores efectivos<sup>9</sup>. Inicialmente el animal elimina el exceso de calor por vasodilatación subcutánea y evaporación de agua a nivel respiratorio. Si esto no es suficiente, continúa minimizando sus movimientos de locomoción y por último disminuyendo el consumo de alimentos. A partir de ciertas condiciones ambientales se considera que la vaca no podrá manejar su homeostasis y entrará en estrés por calor. Además de la temperatura, también tiene importancia la humedad ambiental, que impide la pérdida de calor por evaporación, y torna al ambiente aún más estresante<sup>10</sup>.

Se ha desarrollado un índice para estimar el estrés por calor<sup>11</sup>, definido en función de la temperatura y la humedad (ITH), cuyo umbral más bajo se ha establecido en 68, luego de una reciente reevaluación, debido a las mejoras

en la producción de leche<sup>12</sup>; el aumento de 10 kg/día en la producción de leche disminuye el umbral de estrés por calor en 5°C<sup>13</sup>. Por encima de ese valor, los bovinos comenzarían a sufrir estrés especialmente las VLAP<sup>14</sup>. Para estimar la severidad del estrés por calor se debe considerar, además de la intensidad, la duración y la frecuencia de exposición al mismo<sup>15</sup>.

Diferentes estudios han demostrado que la función inmune de las vacas lecheras puede verse afectada negativamente por efecto del estrés por calor<sup>16-19</sup>, así como también los rendimientos productivos y reproductivos<sup>20</sup>. Durante estos períodos, y con el fin de mantener la homeostasis, el eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal y el eje simpático-adrenal-medular se activan liberando al torrente sanguíneo glucocorticoides y catecolaminas respectivamente<sup>21</sup>. El aumento de las concentraciones de estos mediadores en sangre suprime la síntesis y liberación de ciertas citoquinas como la IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ <sup>22</sup>.

El TNF- $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria que participa en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis y ha sido estudiada junto al patrón de expresión de sus receptores en procesos de transformación celular<sup>23</sup>. Su acción es mediada través de dos receptores proteicos, TNFRI y TNFRII<sup>24</sup>, con diferentes actividades, que regulan el equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis<sup>25</sup>. Tanto los receptores como su ligando participan en la respuesta inmune desarrollada por los animales frente a diferentes estímulos, que en este caso sería el estrés por calor, e infecciones por patógenos, cumpliendo un rol primordial frente a las infecciones virales<sup>23</sup>. La interacción entre dicha citoquina y sus receptores representa un ejemplo en el que el equilibrio entre las señales apoptóticas y anti-apoptóticas activadas por el TNF- $\alpha$  determinan si la salida final será la muerte o la supervivencia celular<sup>26</sup>, de aquí la importancia de estudiarlos en forma conjunta.

Se planteó la hipótesis que en las vacas estresadas por calor disminuirían la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  y sus receptores en los linfocitos, lo que finalmente afectaría al sistema inmune.

El objetivo de este estudio fue analizar la expresión génica de la citoquina TNF- $\alpha$ , en conjunto con la de sus receptores, en vacas lecheras sometidas a diferentes condiciones ambientales y bajo estrés por calor, en la región de Tandil. Se consideró la dinámica de expresión de los genes a lo largo de tres estaciones del año.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Selección de animales

Se seleccionaron bovinos hembras Holando Argentino de dos a ocho años de edad que se encontraban entre los días 45 y 300 de producción láctea y entre la segunda y la tercera lactancia, sin enfermedad aparente ni tratamiento veterinario, que no habían sido vacunadas recientemente y que no estaban dentro de las categorías descarte o venta. Los animales estaban en sistema pastoril, y pertenecían a dos establecimientos lecheros ubicados a 6,3 km. de la ciudad de Tandil, Provincia de Buenos Aires (37°19'18.0"S 59°07'59.4"W). Los animales se evaluaron a lo largo de tres períodos durante el año 2018: primavera (n=15), verano (n=14) y otoño (n=11). La variabilidad en el número de animales es debida a que algunos de ellos tuvieron que ser eliminados del tambo por diferentes razones a lo largo del estudio. Los procedimientos fueron aprobados por la Comisión de Bienestar Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA.

### Obtención de ARN

A cada animal se le extrajo sangre de la vena yugular,

recogida en tubos heparinizados, inmediatamente después del primer ordeño del día. Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBMC) por el método de cloruro de amonio. Las extracciones se realizaron entre las 8 y 9 a. m.; el ITH promedio al momento de la toma de muestras fue de 58,9 (DS: 0,42) para verano, 48,46 (DS: 0,4) durante el otoño y 57,6 (DS: 0,14) en el periodo de primavera.

Se extrajo ARN total a partir de PBMC, siguiendo el protocolo de *Trizol Reagent®* (Thermo Fisher Scientific)<sup>26</sup>; su concentración se determinó mediante absorbancia a 260nm y la calidad fue evaluada por la relación 260/280–260/230 en espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific™, USA). Para comprobar la integridad de los ARN se realizó una corrida electroforética en condiciones desnaturizantes y se visualizaron en un gel de agarosa teñido con *SybrSafe* (Invitrogen). El ARN obtenido fue tratado, según indicaciones del fabricante, con DNasa (*DNase I Solution, 1 unit/ul, RNase-free* (Thermo Scientific™) para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico y retrotranscripto utilizando el kit comercial *cDNA Transcriptor First Strand* (Roche). Se incluyó un control negativo para la síntesis de ADNc para cada muestra. El ADNc se utilizó inmediatamente o se almacenó a -20°C hasta su uso.

### Cálculo de Índice de Temperatura y Humedad (ITH)

Se utilizaron los registros meteorológicos brindados por

el Centro de Información Meteorológica (CIM) perteneciente al Servicio Meteorológico Nacional. Estos registros brindan datos diarios de Temperatura del ambiente (Ta) y de Humedad Relativa (HR) por hora. Para el cálculo de ITH se utilizó la ecuación propuesta por Armstrong<sup>27</sup>:

$$ITH = (1,8 \cdot Ta + 32) - \left[ (0,55 - 0,55 \cdot \frac{HR}{100}) \cdot (1,8 \cdot Ta - 26) \right]$$

HR = Humedad relativa del aire (%)

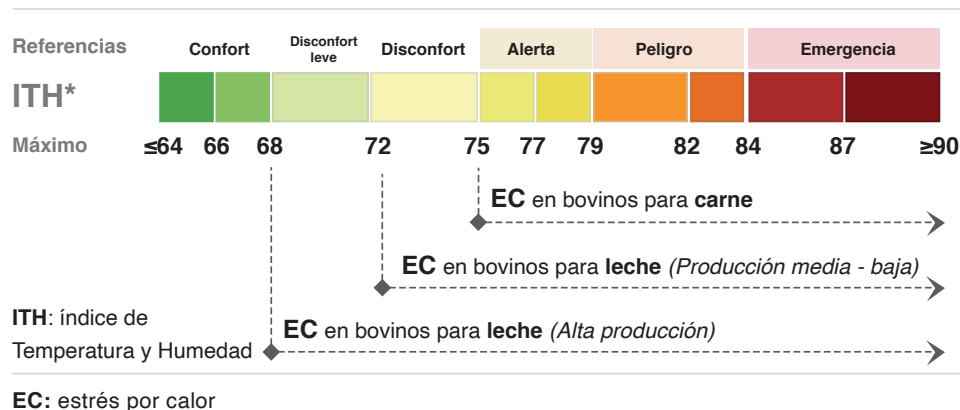
Ta = Temperatura del aire (°C)

Se calculó el ITH diario promedio y las horas diarias en las que los animales estaban en desconfort térmico. Para la estimación de las horas de desconfort, se utilizó la escala de la Figura 1.

### Cuantificación relativa de ARNm de TNF-α y sus receptores

Para la cuantificación relativa por qPCR, se utilizó *SybrGreen* (*FastStart Universal SYBR Green Master Rox, Roche*) como fluoróforo y los *primers* específicos detallados en la Tabla 1.

La amplificación y detección de los productos específicos se realizó en un termociclador *Applied Biosystems 7500*. Las condiciones de ciclado fueron 2 min a 50°C, 10 min



**Figura 1:** Referencia de escala de valores de ITH para bovinos de alta producción. (SDVE INTA Balcarce 2020). [https://www.campolitoral.com.ar/?m=interior&id\\_um=228217-emergencia-ganadera-por-calor-que-hacer-en-planteos-de-engorde-para-evitar-problemas-ganaderia-campolitoral.html](https://www.campolitoral.com.ar/?m=interior&id_um=228217-emergencia-ganadera-por-calor-que-hacer-en-planteos-de-engorde-para-evitar-problemas-ganaderia-campolitoral.html)

**Tabla 1.** *Primers* utilizados para la cuantificación de citoquinas.

GEN	Sentido	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO	REFERENCIA
GAPDH	Forward	CACCCTCAAGATTGTCAGCA	142	Okuda y col. 2010 <sup>39</sup>
	Reverse	GGTCATAAGTCCCTCCACGA		
TNF-α	Forward	AGCCTCAAGTAACAAGCC	176	Konnai y col., 2005 <sup>40</sup>
	Reverse	TGAAGAGGACCTGTGAGT		
TNFRI	Forward	AAGCCCAAGCTCTACTCCATCA	64	Primer express*
	Reverse	GTTCTGGCTCCCCCTCTTTT		
TNFRII	Forward	CAGGCTGTGTTTACCCCCTA	142	Sakumoto y col., 2011 <sup>41</sup>
	Reverse	TGTCCAAGGTCATGTTGCAT		

(\*) *Primers* diseñados con el programa *Primer Express software v. 3.0.* (Applied Biosystems).

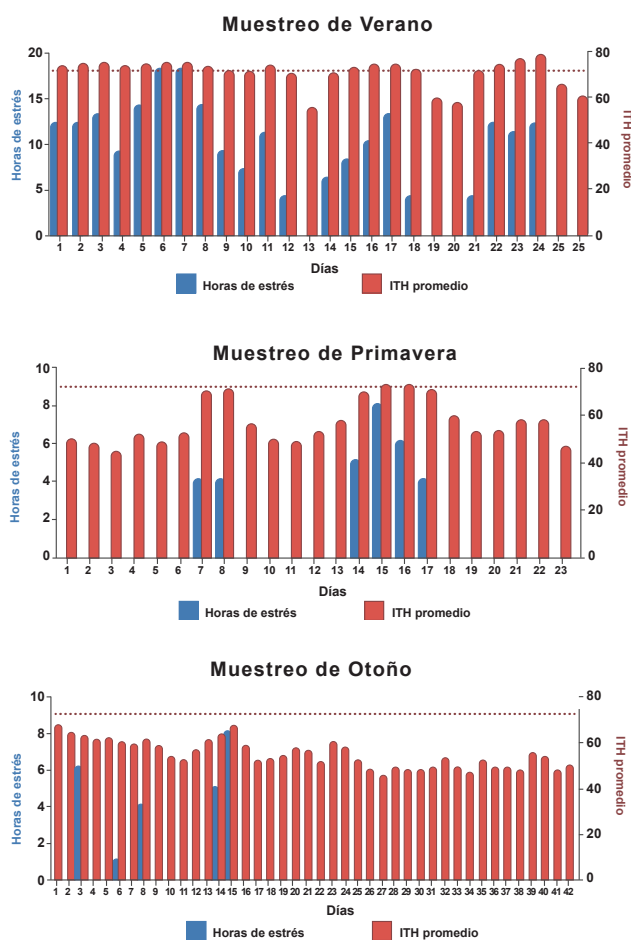
a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C, y por último 60 seg a 60°C. Cada punto de la curva se amplificó por triplicado y la eficiencia de amplificación se determinó mediante un modelo de regresión lineal de acuerdo a la ecuación  $E = 10[-1/\text{slope}]^{2.8}$ . Se seleccionaron aquellos pares de primers cuyo rango dinámico de amplificación fuera similar al del gen GAPDH utilizado como gen endógeno normalizador.

Para analizar los niveles de expresión de ARNm de los genes evaluados se utilizaron programas específicos. Se utilizó el programa LinRegPCR (*Analysis of quantitative RT-PCR data—Versión 2014.2*) para determinar el *threshold* o umbral (punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal y da comienzo a la reacción de amplificación). La expresión de los genes de interés se normalizó al gen endógeno *GADPH*, y los resultados de expresión relativa fueron analizados con el software *FgStatistics (Statistical software for the analysis of microarray data-2009)*. Valores de  $P \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

### Determinación de ITH en el período en estudio

Se calculó el ITH diario promedio y las horas diarias en las que los animales estaban en disconfort térmico en tres períodos a lo largo del año. Para el muestreo de verano,



**Figura 2:** Estimación del ITH diario, y las horas de estrés por calor a las que estuvieron sometidas las vacas lecheras de alta producción cada día, durante el período de verano, primavera y otoño. En todos los gráficos se señala el valor promedio de ITH diario, y las horas de estrés a lo largo del día. La línea punteada indica el valor de ITH a partir del cual el animal está en estrés por calor

se tomaron datos desde el 1 al 26 de febrero, para el de primavera del 1 al 23 de octubre, y para el de otoño del 1 de abril al 12 de mayo (Figura 2).

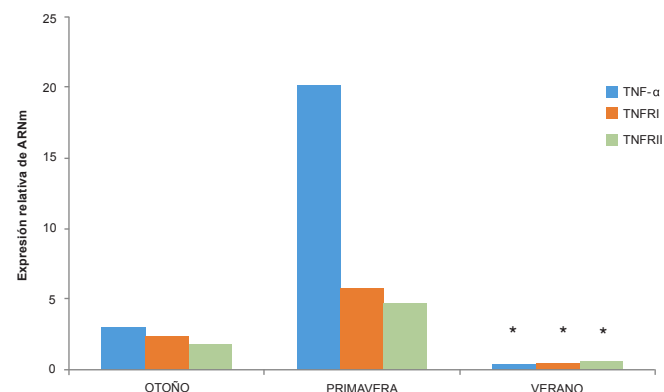
En el muestreo de verano, de los 609 eventos analizados, 471 (77,33%) superaron el umbral crítico ITH de 72 y los animales estuvieron expuestos a  $8,5 \pm 1,09$  h diarias de estrés por calor. En primavera, de los 537 eventos analizados, sólo 6 (1,11%) superaron dicho umbral y el estrés por calor diario fue de  $1,4 \pm 0,5$  h. En otoño ninguno de los 993 eventos analizados presentó un ITH mayor a 68.

### Expresión del ARNm de TNF- $\alpha$ y sus receptores

Se cuantificó la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$  por qPCR, en los tres períodos del año mencionados y se comparó la misma en los meses de otoño/verano y de primavera/verano. Se observó una expresión 0,05 veces ( $P = 0,0021$ ) y 0,34 veces ( $P = 0,0102$ ) menor en PBMC obtenidos en el mes de verano respecto a los meses de primavera y de otoño respectivamente.

El nivel de expresión de ARNm de TNFR1 disminuyó 0,16 veces ( $P = 0,0010$ ) y 0,42 veces ( $P = 0,0008$ ) en el mes de verano respecto a los meses de primavera y otoño respectivamente.

Al evaluar la expresión de ARNm de TNFR2 durante el verano, se observó una disminución 0,21 veces ( $P = 0,0004$ ) respecto al período de primavera y 0,57 veces ( $P = 0,0498$ ) respecto al otoño (Figura 3).



**Figura 3:** Cuantificación por qPCR de la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$  y sus receptores TNFR1 y TNFR2 en linfocitos de sangre periférica de vacas lecheras de alta producción. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $P = 0,05$ ) entre los animales testeados en el período de verano comparado con animales en confort térmico.

## DISCUSIÓN

En este estudio, los bovinos hembra de raza Holando Argentino, de dos a ocho años de edad, fueron susceptibles al estrés por calor durante el período de verano.

El estrés por calor ocurre cuando un animal no puede mantener el equilibrio entre la acumulación de calor y la disipación del mismo<sup>22</sup> y puede tener una influencia negativa en el bienestar del ganado y más allá del impacto directo que el estrés por calor tiene sobre la salud y la productividad de los animales, también debe considerarse su impacto económico<sup>29</sup>. Los efectos del estrés por calor dependen de la raza, del nivel de producción, la cantidad y calidad del alimento, el estado de salud y la hidratación del animal. De acuerdo a von Keyserlingk<sup>30</sup>, la vaca lactante



que no puede encontrar sombra, agua fresca o refrescarse en un día caluroso de primavera o verano (estado natural) probablemente se sentirá incómoda con temperatura alta (estado afectivo) y experimentará una producción reducida en cantidad y calidad de leche (funcionamiento biológico inadecuado). Así, por ejemplo, una VLAP (más de 30 kg/día) genera un 48% más de calor que una vaca seca, lo que aumenta el riesgo de estrés por calor<sup>31</sup>. La escalada de las temperaturas globales combinado con el aumento en el número de VLAP y la intensificación de la agricultura, incluyendo a las economías emergentes, han provocado que el estrés por calor se convierta en un desafío importante que enfrenta la industria láctea<sup>3</sup>. De acuerdo con ello, en este estudio se seleccionaron VLAP procedentes del partido de Tandil, Provincia de Buenos Aires, Argentina, región que se caracteriza por presentar un clima templado continental con grandes variaciones térmicas y altas temperaturas entre los meses de octubre y marzo, que se correlacionan con el período de mayores precipitaciones<sup>32</sup>. De acuerdo con las condiciones climáticas de la región, en el período de verano los animales estudiados estuvieron expuestos  $8,5 \pm 1,09$  h diarias a condiciones compatibles con estrés por calor; mientras que, en el período de primavera, las vacas estuvieron sometidas a  $1,4 \pm 0,5$  h diarias a estas condiciones; y en otoño no se registraron condiciones de estrés por calor. Varios estudios han demostrado que la función inmune de las vacas lecheras puede verse afectada negativamente por efecto del estrés por calor<sup>16-19</sup> así como también los rendimientos productivos y reproductivos<sup>20</sup>. El estrés por calor aumenta la concentración de catecolaminas y glucocorticoides en la sangre, afectando en forma negativa la síntesis y liberación de ciertas citoquinas, particularmente TNF- $\alpha$ <sup>22</sup>, suprimiendo de alguna manera la inmunidad mediada por células<sup>33,34</sup>, lo cual provocaría que los animales fueran más susceptibles a infecciones oportunistas<sup>26,35</sup>. En este trabajo, a partir de PBMC de los animales seleccionados se obtuvo el ARN total y se cuantificó la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$ , TNFR1 y TNFR2. Se consideró un ITH > 72 como valor crítico ya que de esta manera se incluyen a los bovinos de mediana y baja producción (Figura 1) y porque se establece que a partir de dicho valor se deben tomar medidas médico-sanitarias para evitar efectos negativos en la producción que pueden llevar a una disminución de 2kg/vaca/día<sup>36</sup>. Nuestros resultados indican que el estrés por calor disminuye la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  y sus receptores en las vacas lecheras expuestas a condiciones de estrés por calor durante  $8,5 \pm 1,09$  h diarias. Esta disminución en la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  se condice con lo reportado por algunos autores y apoya la hipótesis

que el estrés por calor afecta la expresión de esta citoquina y, por ende, al sistema inmune de los animales expuestos a altos índices de temperatura y humedad<sup>16,19</sup>.

Con respecto a los receptores de TNF- $\alpha$ , hasta el momento no hay trabajos que relacionen la expresión de estos receptores con el estrés por calor en vacas lecheras. Los reportes bibliográficos disponibles indican que existen cambios en las concentraciones séricas de los TNFR solubles en personas bajo estrés por calor<sup>37</sup> y que existe una relación entre el TNFR1 y la inducción de la expresión de las proteínas de choque térmico como respuesta adaptativa al estrés celular en ratones<sup>38</sup>. Como ya se mencionó, el desbalance en la expresión de los receptores podría determinar la dirección de las células del sistema inmune hacia la proliferación o hacia la apoptosis, y en nuestro trabajo resultó que este equilibrio está muy influenciado por el estrés por calor.

## CONCLUSIONES

Este estudio constituye el primer reporte, a nivel regional y nacional, sobre el posible efecto que provoca el estrés por calor en la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  y sus receptores. Si bien son múltiples los factores que afectan la expresión de esta citoquina y sus receptores, no se ha hallado en la bibliografía estudios que relacionen variables ambientales con la expresión de estos mediadores inmunológicos. En el presente estudio se demuestra la disminución en los niveles de expresión de los genes mencionados en las vacas lecheras expuestas a condiciones de estrés por calor durante  $8,5 \pm 1,09$  h diarias. Esta citoquina juega un rol importante frente a los agentes patógenos y principalmente frente a las infecciones virales. Los efectos negativos sobre el sistema inmune podrían traducirse en una disminución en la respuesta a las vacunas y a una mayor susceptibilidad a las infecciones oportunistas. El estudio del efecto de las variables ambientales sobre el sistema inmune de los animales de producción resulta fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias en pos del bienestar de los mismos, la sostenibilidad y la rentabilidad de los sistemas productivos, en un contexto mundial donde el cambio climático podría favorecer la supervivencia de los microorganismos y/o vectores y, en consecuencia, la aparición de nuevas enfermedades emergentes.

## Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## REFERENCIAS

- Collier RJ, Dahl GE, Vanbaale MJ. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *J Dairy Sci* [En línea]. 2006 89:1244–1253. (consultado 14 noviembre 2019). Disponible en: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72193-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72193-2)
- Hansen PJ. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [En línea]. 2009; 364:3341-3350. (consultado 13 noviembre 2019). Disponible en: <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0131>
- Polsky L, von Keyserlingk MAG. Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *J Dairy Sci* 2017; 100(11):8645–8657.
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *Anatomía Veterinaria*. 2da ed. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana; 1999; 732-735.
- Hansen PJ. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim Reprod Sci* 2004; 82:349-360.
- Valle A. Importancia del porcentaje de área negra en animales Holstein sobre el proceso adaptativo. III. Respuestas fisiológicas a la exposición solar directa. *Zootec Trop* 1985; 2:3-20.
- Roelfeldt S. You can't afford to ignore heat stress. *Dairy Manag* 1998; 35:6–12.
- Shearer JK, Beede DK. Thermoregulation and physiological responses of dairy cattle in hot weather. *Agri-Practice* [En línea]. 1990 11:5-17. (consultado 7 noviembre 2019). Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19912215532>
- Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E. Heat stress in lactating dairy cows: A review. *Livest Prod Sci* 2002; 77(1):59-91.

10. Valtorta SE, Gallardo MR. El estrés por calor en producción lechera. *INTA Miscelánea* 1996; 173-185.
11. Hahn GL, Gaughan JB, Mader TL, Eigenberg RA. Thermal Indices and Their Applications for Livestock Environments. En JA DeShazer ed. *Livestock Energetics and Thermal Environmental Management*. St. Joseph, Mich. . Editorial American Society of Agricultural and Biological Engineers; 2009, 113-130.
12. Zimbelman RB, Rhoads RP, Rhoads ML, Duff G, Baumgard LH, Collier RJ. A Re-evaluation of the Impact of Temperature Humidity Index (THI) and Black Globe Humidity Index (BGHI) on Milk Production in High Producing Dairy Cows. *Arizona and New Mexico Dairy Newsletter* [En línea]. 2009; 158-169. (consultado 31 octubre 2019). Disponible en: [https://cals.arizona.edu/extension/dairy/az\\_nm\\_newsletter/2009/jan.pdf](https://cals.arizona.edu/extension/dairy/az_nm_newsletter/2009/jan.pdf)
13. Berman A. Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. *J Anim Sci* [En línea]. 2005; 83(6):1377-1384. (consultado 31 octubre 2019). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890815>.
14. López G, Brizuela A, Rondán G, Lissaso C, Kemerer A, Santos M. Determinación del índice de temperatura y humedad (ITH) para vacas lecheras, en el Departamento Nogoyá, Entre Ríos. *Rev Científica Agropecu* 2016; 20:57-65.
15. Brown-Brandl TM, Eigenberg RA, Hahn GL, Nienaber JA, Mader TL, Spiers DE y col. Analyses of thermoregulatory responses of feeder cattle exposed to simulated heat waves. *Int J Biometeorol* 2005; 49(5):285-96.
16. Do Amaral BC, Connor EE, Tao S, Hayen J, Bubolz J, Dahl GE. Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. *Domest Anim Endocrinol* 2010; 38(1):38-45.
17. Carroll JA, Burdick NC, Chase CC, Coleman SW, Spiers DE. Influence of environmental temperature on the physiological, endocrine, and immune responses in livestock exposed to a provocative immune challenge. *Domestic Anim Endocrinol* 2012; 43:146–153.
18. Huang K, Sun Y, Liao S, Gan F, Liu J, Ye G y col. Protective effects of zymosan on heat stress-induced immunosuppression and apoptosis in dairy cows and peripheral blood mononuclear cells. *Cell Stress Chaperones* 2018; 23(5):1069-1078.
19. Tao S, Connor EE, Bubolz JW, Thompson IM, do Amaral BC, Hayen MJ y col. Short communication: Effect of heat stress during the dry period on gene expression in mammary tissue and peripheral blood mononuclear cells. *J Dairy Sci* [En línea]. 2012; 96(1):378–383. (consultado 2 noviembre 2019). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5811>
20. Kadokawa H, Sakatani M, Hansen PJ. Perspectives on improvement of reproduction in cattle during heat stress in a future. *Japan Anim Sci J* 2012; 83:439-445.
21. Sejian V, Bhatta R, Gaughan JB, Dunshea FR, Lacetera N. Review: Adaptation of animals to heat stress. *Animal* 2018; 12:S431–444.
22. Bagath M, Krishnan G, Devaraj C, Rashamol VP, Pragna P, Lees AM y col. The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. *Res Vet Sci* 2019; 126:94-102.
23. Kabeya H, Ohashi K, Oyunbileg N, Nagaoka Y, Aida Y, Sugimoto C y col. Up-regulation of tumor necrosis factor  $\alpha$  mRNA is associated with bovine leukemia virus (BLV) elimination in the early phase of infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 68:255–265.
24. Fragoso JM, Vargas Alarcon G, Jimenez Morales S, Reyes Hernandez OD, Ramirez Bello J. El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*, 2014; 150:334-344.
25. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* [En línea]. 2012; 24:1297–1305. (consultado 15 noviembre 2019). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.02.006>
26. Nieto Farias MV, Lendez PA, Marin M, Quintana S, Martínez-Cuesta L, Ceriani MC y col. Toll-like receptors, IFN- $\gamma$  and IL-12 expression in bovine leukemia virus-infected animals with low or high proviral load. *Res Vet Sci* 2016; 107:190–5.
27. Armstrong D V. Heat Stress Interaction with Shade and Cooling. *J Dairy Sci* 1994; 77(7):2044–50.
28. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9):45e–45.
29. Quiñones, G. Evaluación de inversión de un sistema de refrescado y ventilación para vacas en lactancia en un tambo en el centro este de la provincia de Córdoba. Repositorio Digital Universidad Nacional de Córdoba [En línea]. 2018 (consultado 25 noviembre 2019). Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/6762/Quin%cc%83ones%2c%20G.%20Evaluaci%cc%83n%20de%20inversi%cc%83n%20de%20un%20sistema%20de%20refrescado%20y%20ventilaci%cc%83n%20para%20vacas%20en%20lactancia...pdf?sequence=1&isAllowed=y>
30. von Keyserlingk MAG, Rushen J, de Passillé AM, Weary DM. Invited review: The welfare of dairy cattle—key concepts and the role of science. *J Dairy Sci* 2009; 92: 4101–4111.
31. Temple D, Bargo F, Mainau I, Ipharraguerre I, Manteca X. Efecto del estrés por calor en la producción de las vacas de leche: una visión práctica. *Farm Anim Welf Educ Cent* [En línea]. 2015 4(12):45–52. (consultado 30 octubre 2019). Disponible en: [https://www.fawec.org/media/com\\_lazypdf/pdf/fs12-es.pdf](https://www.fawec.org/media/com_lazypdf/pdf/fs12-es.pdf)
32. Picone N, Campo A. Comparación urbano-rural de parámetros meteorológicos en la ciudad de Tandil, Argentina. *Rev Climatol* [En línea]. 2014 14:13–23. (consultado 12 noviembre 2019). Disponible en: <http://www.climatol.eu/reclim/reclim14b.pdf>
33. Lacetera N, Bernabucci U, Scalia D, Ronchi B, Kuzminsky G, Nardone A. Lymphocyte functions in dairy cows in hot environment. *Int J Biometeorol* 2005; 50:105–110.
34. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20(1):125–63.
35. Usui T, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. Interferon- $\gamma$  expression associated with suppression of bovine leukemia virus at the early phase of infection in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 115(1–2):17–23.
36. Cerqueira J, Araujo JP, Blanco I, Pedernera C. Estrés térmico en explotaciones de ganado vacuno: detección precoz y posibles soluciones. *Researchgate* [En línea]. 2014;80–85. (consultado 02 diciembre 2019). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/318351128\\_ESTRES\\_TERMICO\\_EN\\_EXPLORACIONES\\_DE\\_GANADO\\_VACUNO\\_DETECCION\\_PRECOZ\\_Y\\_POSIBLES\\_SOLUCIONES?channel=doi&linkId=5965209ea6fdcc69f148ba9d&showFulltext=true](https://www.researchgate.net/publication/318351128_ESTRES_TERMICO_EN_EXPLORACIONES_DE_GANADO_VACUNO_DETECCION_PRECOZ_Y_POSIBLES_SOLUCIONES?channel=doi&linkId=5965209ea6fdcc69f148ba9d&showFulltext=true)
37. Hammami MM, Bouchama A, Al-Sedairy S, Shail E, AlOhalay Y, Mohamed GED. Concentrations of soluble tumor necrosis factor and interleukin-6 receptors in heatstroke and heatstress. *Crit Care Med* 1997; 25(8):1314–9.
38. Heimbach JK, Reznikov LL, Calkins CM, Robinson TN, Dinarello CA, Harken AH y col. TNF receptor I is required for induction of macrophage heat shock protein 70. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2001; 281(1 50-1):241–247.
39. Okuda K, Sakumoto R, Okamoto N, Acosta TJ, Abe H, Okada H y col. Cellular localization of genes and proteins for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF), TNF receptor types I and II in bovine endometrium. *Mol Cell Endocrinol* [En línea]. 2010 330(1–2):41–48. (consultado 30 noviembre 2019). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.07.025>
40. Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata TI, Okada K y col. Imbalance of tumor necrosis factor receptors during progression in bovine leukemia virus infection. *Virology* 2005; 339(2):239–48.
41. Sakumoto R, Vermehren M, Kenngott RA, Okuda K,

Sinowatz F. Localization of gene and protein expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  and tumor necrosis factor

receptor types I and II in the bovine corpus luteum during the estrous cycle. J Anim Sci 2011; 89(10):3040–7.



Este artículo está bajo una Licencia Creative Commons. Atribución-No Comercial-Sin Derivadas 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>