

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**Efectos del estrés por transporte en la bioquímica sanguínea, biometría hemática y
expresión de genes de citocinas en vaquillas**

TESIS

QUE PRESENTA

MVZ. Benito Avila Jaime

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER

EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

Escobedo, N.L., México.

Agosto del 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**




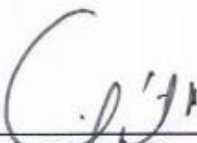
Efectos del estrés por transporte en la bioquímica sanguínea, biometría hemática y expresión de genes de citocinas en vaquillas

**Aprobación de tesis por el Comité Particular de
MVZ. Benito Avila Jaime**


Dr. Héctor Fimbres Durazo
Asesor Principal


Dra. Diana E. Zamora Avila
Asesor


PhD. Jorge R. Kawas Garza
Asesor


Dr. Juan J. Zárate Ramos
Asesor

Escobedo, N.L. México.

Agosto del 2014

Abreviaturas

μL	Microlitro
ACTH	Hormona adreno-corticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CRE	Elemento de respuesta de corticoesteroides
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DPA	Días post-arribo
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Ej.	Ejemplo
<i>et al</i>	y colaboradores
FNT- α	Factor de necrosis tumoral alfa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GR	Receptor de glucocorticoides
IFN- γ	Interferón gama
IL-2	Interleucina dos
km	Kilómetro
LT	Linfotoxina
mL	Mililitro
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

pCREB	Proteína de unión al elemento de respuesta
PEPCK	Fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa
RT-PCR	PCR con Transcriptasa reversa
TAT	Tirosín amino-transferasa

Dedicatoria

A mis hijas, a mi esposa y a mis papás.

Agradecimientos

A Dios.

Al Dr. Fimbres por la dirección y el invaluable apoyo en la realización de todo el proyecto.

A la Dra Diana, gracias por ser mi gurú y guía espiritual, en cuanto a biología molecular, siempre tuvo una respuesta. Gracias por todo su apoyo en todo.

Al Dr. Kawas por estar siempre al pendiente, por invertir su valioso tiempo en este proyecto, y por todo el apoyo.

A Phany por criticar todo lo que hago y por su apoyo en el laboratorio.

A mis compañeros por su amistad y apoyo.

A René Alvarado por su apoyo en la toma de muestras.

A Lulú y a Don Paco por su ayuda en el laboratorio.

Gracias todas las demás que apoyaron en la realización de esta tesis.

Índice de contenido

	Página
Índice de contenido	v
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
Resumen	ix
1. Introducción	1
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos	3
1.3. Hipótesis	4
1.4. Justificación	5
2. Revisión de literatura	6
2.1. Transporte de ganado	6
2.2. Estrés	7
2.2.1. Cortisol	11
2.2.1.1. Principales efectos del cortisol	14
2.2.1.2. Efectos del cortisol sobre el sistema inmune	14
2.2.1.3. Acción del cortisol en los genes	15
3. Materiales y métodos	17
3.1. Lugar de realización del estudio	17
3.2. Animales muestreados	17
3.3. Química sanguínea, biometría hemática y frotis	18
3.4. Extracción de ARN	19
3.5. Reacción de RT-PCR	19
3.6. Secuenciación	21
3.7. Análisis estadístico	21

4. Resultados	22
4.1. Resultados del análisis de química sanguínea	22
4.2. Resultados del análisis de biometría hemática	22
4.3. Resultados del análisis de cortisol sérico	23
4.4 Resultados de la extracción de ARN, RT-PCR y secuenciación	23
5. Discusión	30
6. Conclusiones	34
7. Bibliografía	35

Índice de tablas

Tabla	Página
1. Iniciadores usados en la RT-PCR	20
2. Valores de la química sanguínea de vaquillas a los 0 y 25 días post-arribo	24
3. Valores hematológicos de vaquillas a los 0 y 25 días post-arribo	25
4. Resultados de la cuantificación del ARN extraído con el espectrofotómetro	27

Índice de figuras

Figura	Página
1. El costo biológico del estrés	10
2. Estímulos adversos durante el transporte y la activación de la cascada del cortisol	12
3. Efecto de los glucocorticoides en la transcripción de los genes	16
4. Resultados del análisis de cortisol sérico en vaquillas a los 0 y 25 días post-arribo	26
5. Gel de agarosa al (1.5%) de FNT- α , IFN- γ , IL-2 y GAPDH (gen control)	28
6. Análisis de la intensidad promedio por pixel de los productos amplificados	29

Resumen

El transporte es considerado como uno de los eventos más estresantes en la vida del ganado afectando enormemente el bienestar de los animales, ocasionando considerables pérdidas económicas. Se obtuvieron muestras de sangre de 16 vaquillas transportadas durante 40 horas, 8 de ellas de 0 días post-arribo (DPA) y 8 de 25 DPA. Las muestras fueron analizadas por biometría hemática, química sanguínea, cortisol y RT-PCR para expresión de genes de las citocinas FNT- α , IFN- γ e IL-2, con el fin de obtener evidencia científica del efecto del transporte prolongado en vaquillas. En el grupo de animales del tratamiento 0 DPA se encontraron elevadas concentraciones de albúmina (P = 0.013), amilasa (P = 0.027), alanina-aminotransferasa (P = 0.003), bilirrubina (P = 0.001) y colesterol (P = 0.013).. En las biometrías hemáticas se observó que los valores de hematocrito y hemoglobina fueron menores en vaquillas a los 25 DPA. En el grupo de 0 DPA, la concentración de cortisol fue mayor (P= 0.001). En el análisis de expresión de genes de citocinas, en la amplificación de FNT- α , se encontraron, además de la banda producto amplificado, dos bandas inespecíficas únicamente en los animales de 0DPA, éstas bandas fueron secuenciadas, y el análisis por BLAST sugiere que corresponden a la linfotoxina bovina (LT). En el análisis cuantitativo de expresión, se observó que la expresión de FNT- α se incrementó en los animales del grupo de 25 DPA. Un desequilibrio homeostático y altos niveles de estrés fueron evidentes en los animales recién transportados. Se sugiere llevar a cabo estudios posteriores para determinar el mecanismo que promueve la expresión de LT en animales sometidos a estrés por transporte. También, se sugiere el posible uso de LT como biomarcador de estrés por el transporte de ganado.

1. Introducción

En la actualidad casi todos los bovinos son transportados por lo menos una vez en su vida. El transporte es posiblemente el evento más estresante al que el ganado es sometido, debido a la acumulación de estímulos adversos. Esta actividad afecta enormemente el bienestar de los animales, causa efectos negativos en su salud y considerables pérdidas económicas. Aunque el estrés por transporte no siempre produce una enfermedad *per se*, aumenta la susceptibilidad de los animales a ciertas enfermedades, así que aunque la mortalidad por transporte en bovinos (1-3%) es más baja que en otras especies de producción, la mortalidad aumenta si se suman las muertes por el incremento de susceptibilidad a enfermedades, siendo la más importante la fiebre de embarque. Se ha demostrado que el estrés por transporte disminuye la ganancia diaria de peso en corral de engorda, la calidad y vida de anaquel de la carne, y las malas condiciones de transporte aumentan las pérdidas por cortes con hematomas.

Se ha dado énfasis a la necesidad de profundizar en el conocimiento científico de las condiciones en que se transporta al ganado en América del Norte. Este conocimiento permitirá decisiones informadas para mejorar la normativa y la formulación de recomendaciones a los ganaderos y transportistas, ya que la mayoría de las directrices y recomendaciones para el bienestar de los animales se han desarrollado y se basan en estudios realizados en otros países, incluso en otros continentes, con diferentes condiciones de transporte. Estas condiciones incluyen la distancia y el tiempo en que el ganado es transportado, la infraestructura de caminos, la base genética del ganado, el clima extremo presente en nuestro subcontinente, entre otras.

El objetivo de este estudio fue medir y comparar las principales variables fisiológicas y bioquímicas asociadas con el estrés por transporte así como la expresión de los genes de factor de necrosis tumoral (TNF)- α , el interferón (IFN)- γ , y la interleucina (IL)-2, en vaquillas muestreadas recién llegadas al corral de engorda de un viaje por carretera de 40 horas, y a los 25 días post-arribo cuando han recuperado la merma.

1.1. Objetivo general

Medir el efecto de 40 horas de transporte realizado en pobres condiciones de bienestar en vaquillas a los 0 y 25 días después de su arribo al corral de engorda, mediante el análisis de química sanguínea, biometría hemática, cortisol en suero sanguíneo y la expresión de genes de citocinas.

1.2. Objetivos específicos

1. Medir el efecto del estrés por transporte en las concentraciones de glucosa, nitrógeno ureico en sangre, creatinina, fósforo, calcio, proteína total, albúmina, globina, alanino aminotransferasa, fostatasa alcalina, bilirrubina total, colesterol y amilasa mediante el análisis de química sanguínea.
2. Medir el efecto del estrés por transporte hematocrito, hemoglobina, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y la relación neutrófilo-linfocito, por medio del análisis de biometría hemática.
3. Medir el efecto del estrés por transporte en la concentración de cortisol en suero sanguíneo mediante inmuno-ensayo.
4. Medir el efecto del estrés por transporte en la expresión de los genes de las citocinas, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina-2 e interferón gama, mediante la técnica de RT-PCR, electroforesis en gel de agarosa y cuantificación *in silico* de bandas.

1.3. Hipótesis

El transporte de larga distancia realizado en pobres condiciones de bienestar animal, tiene efectos sobre las principales variables fisiológicas y bioquímicas asociadas al estrés, así como en la expresión de genes de citocinas.

1.4Justificación

Conocer los efectos del estrés por transporte en pobres condiciones de bienestar animal es importante para entender y eventualmente resolver la problemática que deriva de esta actividad. Tener dicha información, nos permitirá revisar la normatividad vigente en cuanto a este tema, así como también hacer recomendaciones de manejo y pre-acondicionamiento del ganado a las personas involucradas, con el fin de mejorar las condiciones de transporte para los bovinos y reducir las pérdidas económicas inherentes.

2. Revisión de literatura

2.1 Transporte de ganado

La necesidad de transportar el ganado puede haber existido desde el inicio de la ganadería. Hay evidencia científica de que el ganado se transportaba y era una parte importante de la economía regional, al menos desde el neolítico (Viner *et al*, 2010.; Sjögren y Price, 2013), en este mismo período según los datos arqueológicos, es cuando se observa un aumento en la actividad agrícola y el pastoreo del ganado (Lubbock, 1865).

Las razones más comunes por las cuales se transporta al ganado son: por cambio de potreros, porque serán enviados a corral de engorda o al matadero. El ganado se transporta a grandes distancias hacia los centros de engorda y consumo, principalmente por la diferencia de precios o la escasez de ganado en un determinado lugar, o cuando la diferencia de precios es considerable. Debido a los costos de transportación y para superar las pérdidas económicas que esto conlleva, esta actividad no sería posible sin los factores antes mencionados (Swanson *et al.*, 2001). Las pérdidas económicas directas del transporte a larga distancia son: la mortalidad, la pérdida de peso corporal, el costo de los fletes, moretones, heridas, etc (Speer *et al.*, 2001). Las pérdidas indirectas son: la mortalidad en el corral debido al aumento de la susceptibilidad a enfermedades (ej. fiebre de embarque), el aumento de los costos de tratamiento sanitario o metafilaxis, disminución de la ganancia de peso diaria, disminución en la calidad de la carne, etc. (Marques *et al.*, 2012).

En algunas referencias, se considera como transporte a larga distancia cuando este es mayor a 500 km o cuando tiene una duración superior a las 8 horas. Según la FAO (por sus siglas en inglés, Food and Agriculture Organization), los bovinos no deben viajar por más de 36 horas, y

después de 24 horas, se les debe bajar a descansar, tomar agua y comer. Sin embargo las iniciativas recientes en países desarrollados buscan limitar la duración del transporte a 8 horas o menos. En la Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, que lleva como título “Trato humanitario en la movilización de animales”, dice que el transporte en el caso del ganado bovino, no debe exceder las 18 horas sin descanso y sin agua de bebida, y que en el caso de movilizaciones mayores de 24 horas, además de los descansos cada 18 horas, se les debe de ofrecer alimento a los animales. En nuestro país es común que los becerros para engorda que proceden del sur sean transportados desde una distancia mayor a los 1500km, en periodos de tiempo superiores a las 50 horas, hasta las engordas en el Norte de México, ocasionándoles un estrés severo.

Actualmente, en nuestro país el ganado es transportado grandes distancias, y el considerar las normas de bienestar animal que aplican a esta actividad, no es un tema que produzca un gran impacto en la industria de la carne, sin embargo, será un tema importante en el mediano plazo debido a las barreras comerciales de otros países, que exigirán cumplir con estas normas. Además de que existe una tendencia entre los consumidores de preferir la carne de animales que sufran lo menos posible, de los que se obtiene carne de mejor calidad y con la cual los productores podrían obtener un mejor precio de venta.

2.2 Estrés

El estrés es un disturbio fisiológico que ha sido provocado por un estímulo adverso para el animal; dicho estímulo puede ser interno o externo. Los estímulos adversos externos son, por ejemplo, una situación que el animal perciba como peligro, algo físicamente demandante, o algo molesto. Algunos ejemplos de estímulos adversos internos son deshidratación, inanición y

malestar. La acumulación de factores anteriores, puede producir estrés severo. Cuando el estrés es severo, los mecanismos de regulación homeostática son sometidos a una enorme presión, el comportamiento del animal se vuelve desorganizado y puede haber efectos patológicos. La última consecuencia del estrés severo es la muerte.

La respuesta fisiológica de los animales al estrés puede llegar a tener varios niveles. El primer nivel es la respuesta inmediata por medio de la adrenalina. Cuando el animal percibe una amenaza, se estimula la liberación de adrenalina por la médula adrenal, la cual induce la producción de glucosa a partir del glucógeno del hígado para proveer una fuente de energía rápida. Cannon (1914) quien describió ésta primera respuesta, le dio el conocido nombre de *'fight or flight response'*. El menciona que se *"ocasiona un cese de la actividad del canal alimentario, un notable cambio de la circulación desde los grandes vasos abdominales hacia los pulmones, corazón, extremidades y sistema nervioso central"*.

La segunda respuesta al estrés es llamada respuesta aguda al estrés. Este es un mecanismo mediado por la hormona cortisol. La principal función de este mecanismo es proveer glucosa desde el alimento o desde la proteína muscular, para proporcionarle al animal la energía suficiente para sobrevivir o hacer frente a una situación difícil. Si el estresor cesa en un periodo corto de tiempo, no se genera ningún efecto patológico, sólo el uso de las reservas de energía. Si el estresor continúa, la respuesta sube a un tercer nivel: el estrés crónico. Este tercer nivel de estrés también es mediado por el cortisol, pero, mientras que en la fase aguda sus efectos son potencialmente beneficiosos, en la fase crónica se afecta negativamente el crecimiento, la reproducción y la salud en general, debido al incremento del catabolismo de las proteínas, al agotamiento de las reservas de energía y al efecto inmunodepresor (Moberg y Mench, 2000).

La clave para determinar cuánto afecta el estrés, es el costo biológico para el animal (Moberg y Mench, 2000). Cuando el costo biológico necesario para adaptarse ante un estresor

desvía recursos de otras funciones biológicas, tales como el sistema inmune, la reproducción o el crecimiento, el resultado es el agotamiento fisiológico; esto es lo que se denomina como estrés severo. Durante el estrés severo, el deterioro de las funciones sitúa al animal en un estado prepatológico, que lo hace vulnerable a diversas enfermedades. En el transporte la más importante es la fiebre de embarque (Duff, 2006).

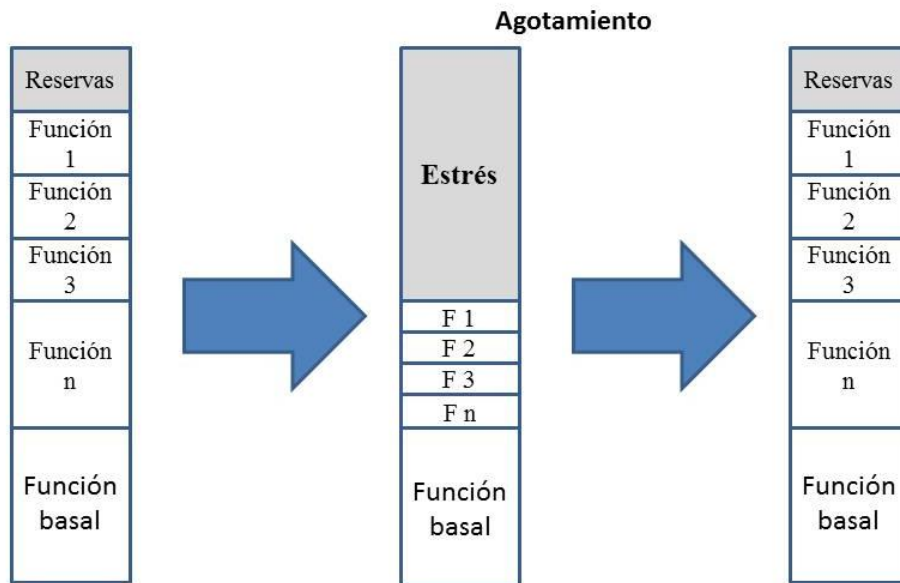


Figura 1. Con el costo biológico del estrés, en general, se utilizan las reservas del animal y las funciones básicas se ven afectadas (Moberg y Mench, 2000).

2.2.1 Cortisol

En la literatura que trata sobre el estrés, el cortisol es una hormona omnipresente debido a que se relaciona directamente con la respuesta al estrés por parte de los animales. Las mediciones de cortisol se usan en todo el mundo para determinar cuánto afecta cierto estímulo adverso a un animal o humano. El cortisol en bovinos se puede medir en sangre, leche, saliva, orina, heces, semen e incluso pelo, dependiendo del diseño del experimento, cada tipo de muestra puede darnos información diferente sobre el estrés al que está sometido el animal (Laudat *et al.*, 1988; Van Uum *et al.*, 2008; Whitten *et al.*, 1998; Graves y Eiler, 1979).

La biosíntesis del cortisol empieza con el colesterol. Las enzimas necesarias para su formación se encuentran en la mitocondria y el retículo endoplásmico liso (Pineda *et al.*, 2003). El cortisol es entonces secretado al torrente sanguíneo, y sus efectos en los tejidos diana pueden ser detectados en aproximadamente una hora después de que se inició la respuesta al estrés (Hill, 2004).

En el cerebro existen varias áreas que participan en la organización de respuestas a estímulos adversos o amenazadores. Las neuronas en el hipotálamo, la principal área del cerebro relacionada con la respuesta al estrés, son sensibles a estímulos internos y externos. El hipotálamo responde secretando la hormona liberadora de corticotropina o CRH (corticotropin releasing hormone; por sus siglas en inglés) hacia la hipófisis anterior y produce la liberación de ACTH u hormona corticotrópica, que a su vez viaja por el torrente sanguíneo hasta la corteza adrenal, donde estimula la producción de cortisol (Appleby *et al.*, 2008).

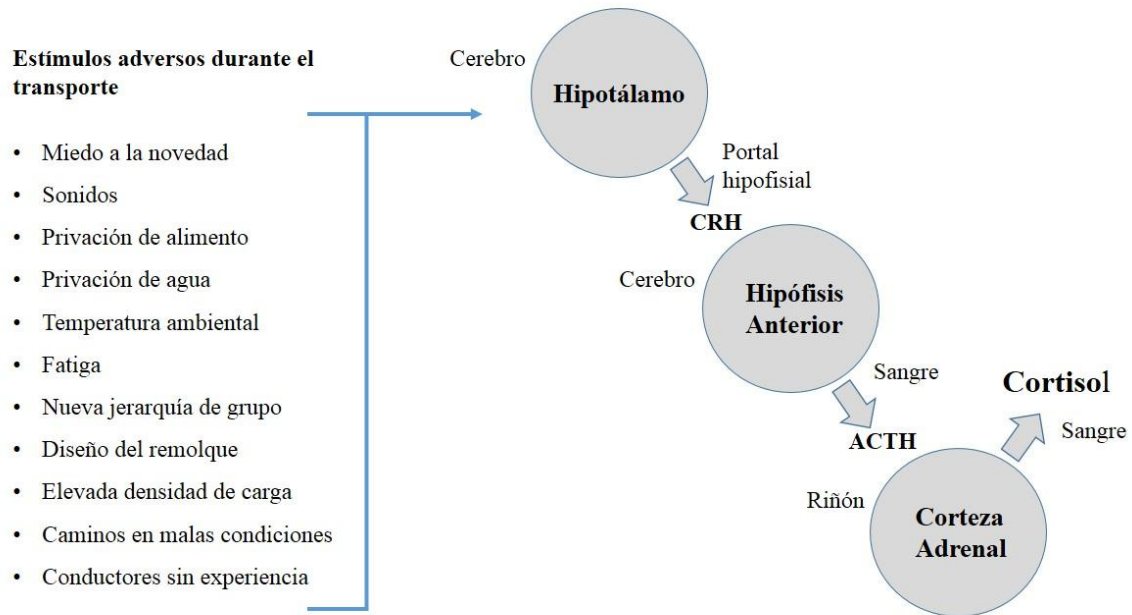


Figura 2. Estímulos adversos durante el transporte y la activación de la cascada del cortisol. Las flechas indican la dirección de la cascada del axis Hipotálamo-Hipófisis anterior-Corteza adrenal.

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) es un péptido sintetizado por neuronas parvocelulares en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Pineda *et al.*, 2003). Estas neuronas parvocelulares acumulan la CRH en gránulos secretores y la liberan cuando reciben un estímulo. La regulación de la transcripción de CRH depende de AMPc/Proteína-kinasa A, provocando el reclutamiento del elemento de respuesta AMPc-fosforilado-proteína de unión (pCREB) a un elemento de respuesta de corticoesteroides (CRE) localizado en la posición -230 en el promotor de CRH. Estudios recientes han demostrado que un factor denominado Transductor de la Actividad Regulada de CREB (TORC) es esencial para la activación de la transcripción del CRH (Liu *et al.*, 2011).

La CRH es enviada hacia la adenohipófisis a través del portal hipofisial, donde se une a receptores en la membrana celular de las corticotropas hipofisiales en la *pars distalis*. El complejo receptor de CRH activa la adenil ciclase en las células corticotropas, y en cuestión de segundos, se produce un incremento en el AMPc, el cual estimula la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) en la sangre (Pineda *et al.*, 2003).

La ACTH es un péptido de 39 aminoácidos derivado de un precursor llamado proopiomelanocortina. Esta viaja por el torrente sanguíneo hasta los corticocitos de la glándula adrenal, donde provoca un incremento en la talla de las mitocondrias, el retículo endoplásmico liso y el núcleo (Pineda *et al.*, 2003). La adquisición de lipoproteínas por las células adrenales, y su conversión a colesterol es estimulado por la ACTH. Estas acciones son mediadas por receptores de alta afinidad en la membrana plasmática de éstas células, por medio de la activación de adenilato ciclase, acumulación de AMPc, incremento de la actividad de la proteína quinasa y la fosforilación de proteínas reguladoras (Pineda *et al.*, 2003).

2.2.1.1. Principales efectos del cortisol

El cortisol tiene un efecto gluconeogénico utilizando el receptor de glucocorticoides (GR) incrementando la traducción del gen de la tirosin aminotransferasa (TAT) y el gen de la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK), esto en los hepatocitos (Newton, 2000). También como parte de su efecto proteolítico, aumenta la concentración de aminoácidos en plasma que podrían entrar a la ruta gluconeogénica (Simmons, 1984).

El cortisol, además induce la proliferación de eritroblastos, promoviendo la eritropoyesis (Zager, 1986). Se ha demostrado que el cortisol tiene una función en el metabolismo del hueso, disminuyendo la producción de osteocalcina por los osteoblastos (Kaspersen, 1991). También se conoce que esta hormona tiene un efecto proteolítico en casi todas las células excepto en las hepáticas). En la administración experimental se ha observado un incremento del nitrógeno uréico en plasma, un aumento en los aminoácidos libres en plasma y un incremento de la actividad de la di-peptidasa muscular, asimismo un incremento en la concentración plasmática de alanina como resultado de la proteólisis (Simmons, 1984).

2.2.1.2. Efectos del cortisol en el sistema inmune

La actividad inmunodepresora del cortisol está bien estudiada (Stites, 1983). El cortisol es usado por su actividad de supresión de la inflamación en enfermedades inflamatorias crónicas como el asma, la artritis reumatoide, etc. El cortisol se une a los receptores de glucocorticoide de las células diana, el cual se dimeriza y se transloca hacia el núcleo, donde se une a los elementos de respuesta de glucocorticoides (GRE, por sus siglas en inglés) a genes sensibles a

glucocorticoides resultando en un incremento en la transcripción de algunas proteínas antiinflamatorias. Pero el efecto más relevante del cortisol es la inhibición de la expresión de genes relacionados con el proceso inflamatorio (citocinas, enzimas, receptores y moléculas de adhesión). Esto se debe a la interacción inhibitoria directa entre los receptores activados para glucocorticoides y los factores de transcripción activados tales como el factor nuclear κ B y el activador de proteína-1, los cuales regulan la expresión de genes inflamatorios (Barnes, 1998).

2.2.1.3. Acción del cortisol en los genes

Es reconocido que el cortisol cambia la estructura de la cromatina interactuando con la proteína de unión CREB, la cual actúa como co-activador de la transcripción, uniendo otros factores de transcripción que compiten por los sitios de unión en esta molécula. El incremento en la transcripción está asociado con el desarrollo de una apertura en el ADN alrededor de la histona y la acetilación de los residuos de la histona por la acción enzimática del CBP. Además, el cortisol puede provocar la des-acetilación de la histona, resultando en un ADN más compacto y reduciendo el acceso a los factores de transcripción a sus sitios de unión, por lo tanto, suprimiendo la expresión de los genes (Barnes, 1998).

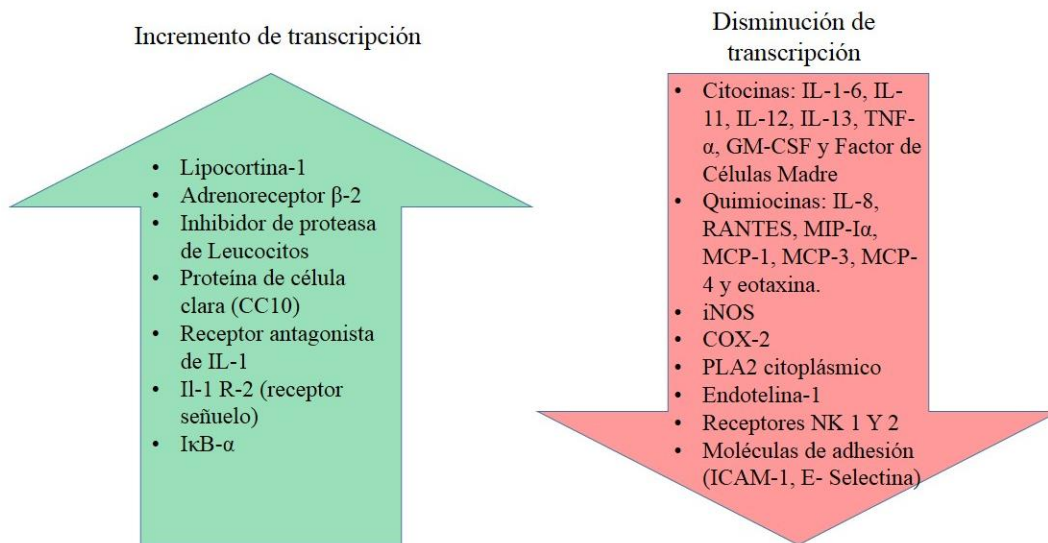


Figura 3. Efecto de los glucocorticoides en la transcripción de los genes adaptado de Barnes, 1998.

3. Materiales y métodos

3.1. Lugar de realización del estudio

La toma de muestras para este estudio se llevó a cabo en una engorda de ganado ubicada al sur del Estado de Nuevo León, México. Las muestras para química sanguínea y biometría hemática fueron procesadas en el laboratorio del Hospital de Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las muestras para expresión de genes de citocinas fueron procesadas en el Laboratorio de Genética de la FMVZ. Las muestras para cuantificación de cortisol en suero sanguíneo fueron procesadas en el laboratorio privado Data Médica de Laboratorio (Monterrey, N.L.). La secuenciación de bandas inespecíficas fue hecha en el CIDICS (Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud) de la UANL, en el laboratorio de Novogen.

3.2 Animales muestreados

Para el presente estudio se obtuvieron muestras de sangre de 16 vaquillas cruce de *Bos taurus* x *Bos indicus*, con un peso aproximado de 300 kg, divididas en dos grupos. El primer grupo de 8 vaquillas eran recién llegadas (0 días post-arribo [DPA]) al corral de engorda de un viaje terrestre de 40 horas desde Palenque, Chiapas, México. Las muestras fueron tomadas durante la revisión de rutina que reciben al llegar a la engorda, en una prensa hidráulica. El segundo grupo de 8 vaquillas tenían 25 días (25DPA) en la engorda después de haber llegado de un viaje del mismo origen y duración. Las muestras fueron tomadas durante el pesaje y manejo rutinario en una prensa hidráulica. Las muestras de ambos grupos fueron tomadas el mismo día.

El viaje del grupo de 0DPA fue de 1594 km a una temperatura ambiente promedio de 32.9°C. Los animales tuvieron agua y comida a libre acceso hasta el momento de ser embarcados. La densidad de carga fue de 0.90 m² por cabeza. Un solo chofer condujo durante todo el viaje. En la hora 28 del viaje, los animales fueron descargados en un punto de revisión zoonosanitaria, donde se les ofreció agua, y fueron cargados nuevamente, todo esto en un periodo de 2 horas. El grupo de 25DPA provenía del mismo origen y viajó en condiciones similares.

Todas las muestras fueron tomadas el mismo día utilizando tubos Vacutainer® (BD & Company, Franklin Lakes, NJ, USA) Se tomaron tres muestras de cada animal, dos en tubos con EDTA y una en un tubo sin aditivo. De uno de los tubos con el anticoagulante, se tomaron 500 µl de sangre para mezclarse en un tubo eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Alemania) de 2 mL con 1.3 mL de solución RNAlater® (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) para estabilizar el ARN que sería usado en el análisis de expresión de genes de citocinas.

3.3. Química sanguínea, biometría hemática y frotis.

Para la biometría hemática, se utilizó un equipo VetAutoread™ (Idexx Laboratories, Westbrook, ME, USA) en el cual se midió hematocrito, hemoglobina y plaquetas. Se hicieron frotis sanguíneos en portaobjetos con tinción de Wright para conteo de células blancas (neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos), y además, se calculó la relación neutrófilo-linfocito (N:L).

Para el análisis de química sanguínea, se utilizó el VetTest® Analyzer (Idexx Laboratories) para medir glucosa, nitrógeno ureico en sangre, creatinina, fósforo, calcio, proteína

total, albúmina, globina, alanino aminotransferasa, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, colesterol y amilasa.

3.4. Extracción de ARN

La extracción del ARN se realizó utilizando el kit RiboPure Blood (Ambion®, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se cuantificó utilizando el espectrofotómetro de micro volumen EPOCH (Biotek Instruments, Inc., Winoosky, VT).

3.5. Reacción de RT-PCR

La reacción de RT-PCR se procesó en un solo paso mediante el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), de acuerdo a las condiciones del fabricante, utilizando los iniciadores para FNT- α , IFN- γ , IL-2 y GAPDH, (gen control), publicados por Zaros, et al (2007) (Tabla 1). Se utilizó un termociclador Maxygen II de la marca Axygen (Corning Life Sciences, Union City, CA, USA). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Los geles fueron fotodocumentados utilizando un equipo PhotoDoc-it™ (UltraViolet Products, Ltd., Upland, CA), el cual cuenta con una cámara Canon con un sensor de 14.1 megapíxeles. Las fotografías obtenidas fueron analizadas mediante un software de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA), el cual asigna valores cuantitativos a las bandas de acuerdo a la intensidad promedio por píxel de cada una.

Tabla 1. Iniciadores usados en la reacción de RT-PCR (adaptado de Zaros *et al.*, 2000).

Gen	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)	Alineamiento (°C)	Fusión (°C)	Extensión (°C)
TNF- α	F- TAACAAGCCGGTAGCCCACG R- TCTTGATGGCAGACAGGATG	279	57	88.5	72
IFN- γ	F- GCCAAATTGTCTCCTTCTACTTC R- GGGTCAAGTGAAATAGTCACAGG	484	61	85	72
IL-2	F- TCCAAGCAAAAACCTGAACC R- CAGCGTTTACTGTTGCATCATC	198	57	82.5	72
GAPDH	F- GGCCTGAACCAACGAGAAGTATAA R- CCCTCCACGATGCCAAAGT	194	59	86	72

3.6. Secuenciación

Se realizó la secuenciación de dos bandas inespecíficas observadas en el gel de FNT- α , únicamente en los animales de ODPA.. La extracción de ADN del gel se llevó a cabo utilizando el kit comercial PureLink® (Invitrogen™). Se cuantificó el producto de la extracción utilizando un espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo Scientific™). Para la secuenciación, se utilizó un secuenciador IonTorrent™ (Life Technologies, Carlsbad, CA).

3.7. Análisis estadístico

Las variables hematológicas, de bioquímica sanguínea, de cortisol en suero sanguíneo y de expresión de genes de citocinas, fueron analizadas *in silico*, con un diseño completamente al azar, usando el software Statistix 9® (Tallahassee, FL, USA).

4. Resultados

4.1. Resultados del análisis de química sanguínea

Para el análisis de química sanguínea se compararon los valores de ambos grupos de vaquillas muestreadas a los 0 y 25 días post-arribo. En la Tabla 2, además de los resultados, se incluyen valores de referencia, obtenidos del Manual Merck de Veterinaria (The Merck Veterinary Manual, 2010). Se cuantificaron 11 parámetros, seleccionados en base a la literatura revisada, en los cuáles se encontraron elevadas concentraciones de albúmina ($P = 0.013$), amilasa ($P = 0.027$), alanino-aminotransferasa ($P = 0.003$), bilirrubina ($P = 0.001$) y colesterol ($P = 0.013$) en el grupo de animales muestreados a los 0 DPA, en comparación con los animales que recuperaron la merma a 25 DPA (Tabla 2).

4.2. Resultados del análisis de biometría hemática.

En la Tabla 3, se muestra el análisis de biometría hemática, y los valores de referencia para vaquillas. Además, se calculó la relación neutrófilo-linfocito. Al realizar el análisis de resultados, se observó que los valores de hematocrito ($P = 0.022$) y hemoglobina ($P = 0.001$) fueron menores en vaquillas a los 25 DPA (Tabla 4) en comparación con el grupo de animales muestreados a los 0 DPA. Los valores de hematocrito y hemoglobina estuvieron por encima de los valores de referencia solamente en el grupo de 0 DPA. Se observó un aumento en la relación neutrófilo-linfocito (N:L) en los animales recién transportados (0 DPA) en comparación con el valor de referencia. No se encontró diferencia significativa en cuanto a la concentración de

plaquetas entre ambos tratamientos, sin embargo los valores de ambos grupos estuvieron por encima del valor máximo de referencia.

4.3. Resultados del análisis de cortisol sérico

En animales recién llegados a la engorda, la concentración de cortisol fue mayor ($P= 0.05$) en comparación con los animales a los 25 días post-arribo. La media en los animales del grupo de 0 DPA fue de 68.3 ng/dL y en los animales de 25 DPA fue de 44.02 tal como se muestra en la Figura 4.

4.4 Resultados de la extracción de ARN, RT-PCR y secuenciación.

En la extracción se obtuvo ARN en buena cantidad y calidad, tal como lo muestran los resultados de la cuantificación en el espectrofotómetro. El rango 260/280 indica la pureza de la extracción, de acuerdo a las especificaciones del kit que se utilizó para la reacción de RT-PCR, una pureza superior a 1.8, es suficiente para realizar la reacción. La cantidad obtenida también fue suficiente de acuerdo a las especificaciones del fabricante del kit de RT-PCR.

En el análisis de la expresión de genes de citocinas por RT-PCR, en la amplificación de FNT- α , se encontraron, además de la banda producto amplificado, dos bandas inespecíficas únicamente en los animales de 0-días post-arribo (Figura 5), éstas bandas fueron secuenciadas. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando BLAST sugiere que corresponden a la linfotoxina bovina (LT). En el análisis cuantitativo de expresión, se observó que la expresión de FNT- α se incrementó en los animales del grupo de 25 días post-arribo (Figura 6).

Tabla 2. Valores de la química sanguínea de vaquillas a los 0 y 25 días post-arribo.

Análisis	Valores de referencia ^a	Días post-arribo		EE	Probabilidad
		0	25		
Glucosa (mg/dL)	40-100	68.4	80.0	5.79	0.180
BUN (mg/dL)	10-25	12.0	9.25	1.059	0.087
Creatinina (mg/dL)	0.5-2.2	0.95	0.07	0.052	0.866
Fósforo (mg/dL)	5.6-8.0	7.93	9.23	0.516	0.097
Calcio (mg/dL)	8.0-11.4	11.0	10.8	0.285	0.670
Proteína total (g/dL)	6.7-7.5	7.29	7.26	0.207	0.933
Albúmina (g/dL)	2.5-3.8	2.91	2.56	0.088	0.013
Globulina (g/dL)	3.0-3.5	4.63	4.71	0.108	0.570
Bilirrubina (mg/dL)	0.0-0.7	1.1	0.49	0.1039	0.001
Colesterol (mg/dL)	62-193	100.3	66.6	8.464	0.013
ALT (U/L)	6.9-35	74.4	40.1	6.959	0.003
ALP	18-153	153	136	26.148	0.650
Amilasa (U/L)	41-98	35.5	6.3	8.413	0.027

^aThe Merk Veterinary Manual, 2010.

EE, error estándar; BUN, nitrógeno uréico en sangre; ALT, alanina aminotransferasa; ALP, fosfatasa alcalina.

Tabla 3. Valores hematológicos de vaquillas a los 0 y 25 días DPA.

Análisis	Valores de referencia	DPA		EE	Probabilidad
		0	25		
Hematocrito (%)	25.0 - 42.0	48.4	40.6	2.14	0.022
Hemoglobina (g/dL)	8.0 - 14.0	15.7	13.0	0.48	0.001
Neutrófilos (%)	15 - 61	32.9	28.8	3.46	0.414
Linfocitos (%)	26 - 68	54.0	61.0	3.91	0.226
Monocitos (%)	0 - 12	7.6	8.5	1.41	0.666
Eosinófilos (%)	0 -28	5.25	1.75	1.29	0.074
N:L ^a	0.5	0.69	0.49	0.129	0.297
Plaquetas (K/ μ L)	175-500	571.9	687.8	125.1	0.510

^aN:L, relación neutrófilo-linfocito, EE, error estándar

Figura 4. Resultados del análisis de cortisol sérico de vaquillas a los 0 y 25 días post-arribo.

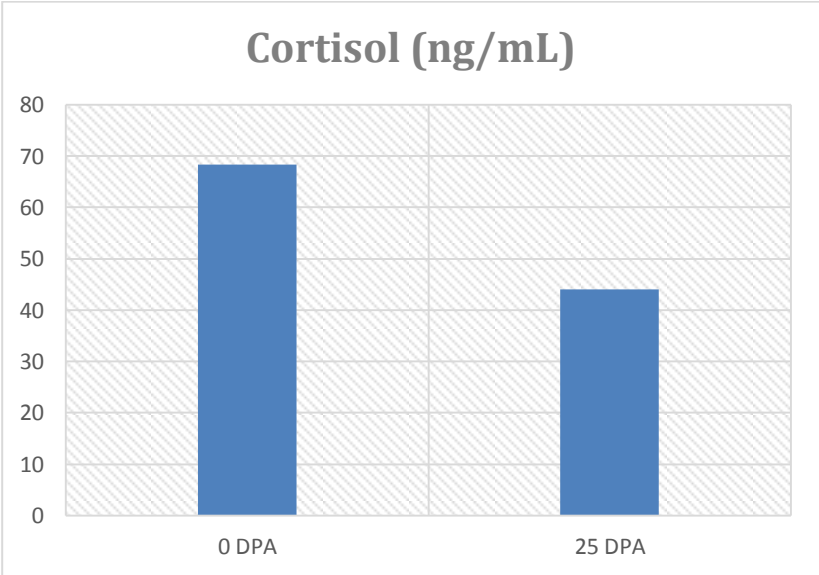


Tabla 4. Resultados de la cuantificación del ARN extraído en el espectrofotómetro.

Las muestras 1-8 son del grupo de 0 DPA y del 9-16 pertenecen al grupo de 25 DPA.

Extracción	ARN ng/ μ L	Rango 260/280
1	31.188	2.1
2	55.331	2
3	54.075	2.1
4	41.943	2.1
5	5.85	1.8
7	43.831	2.1
8	57.149	2
9	42.39	2.1
10	102.874	2.1
11	44.466	2
12	29.166	1.9
13	42.136	2.1
14	55.904	2.1
15	37.433	1.9
16	30.883	2.1

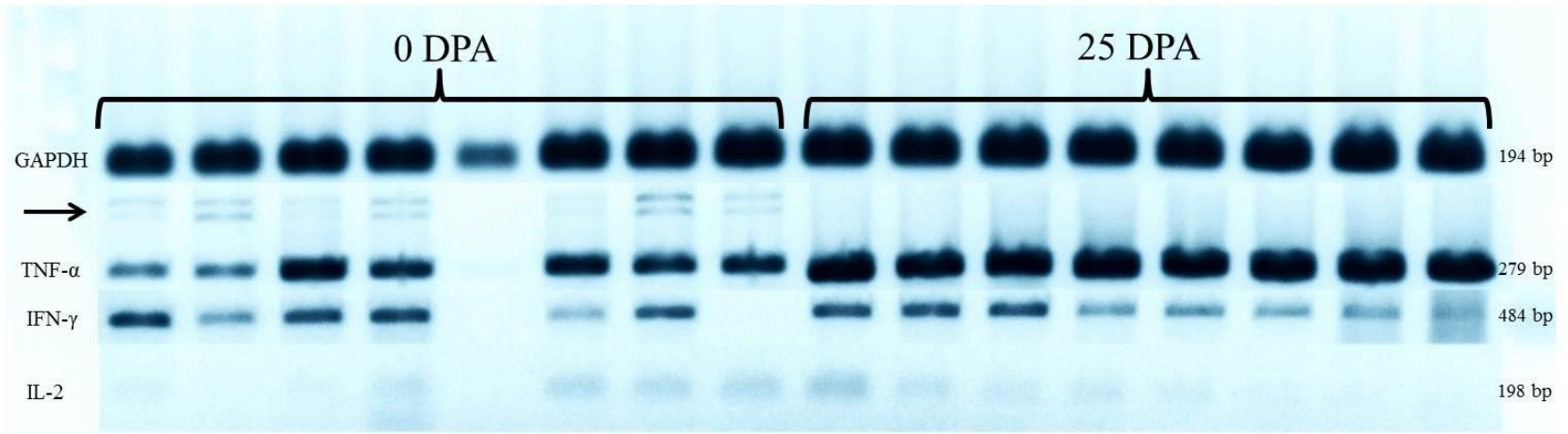


Figura 5. Gel de agarosa (1.5%) de FNT- α , IFN- γ , IL-2, and GAPDH (como gen control). Las primeras 8 columnas corresponden al grupo 0 DPA, las siguientes 8 corresponden al grupo de 25 DPA. Las amplificaciones inespecíficas se observan solo en los animales del grupo de 0 DPA. La flecha indica las bandas inespecíficas en el gel de TNF- α .

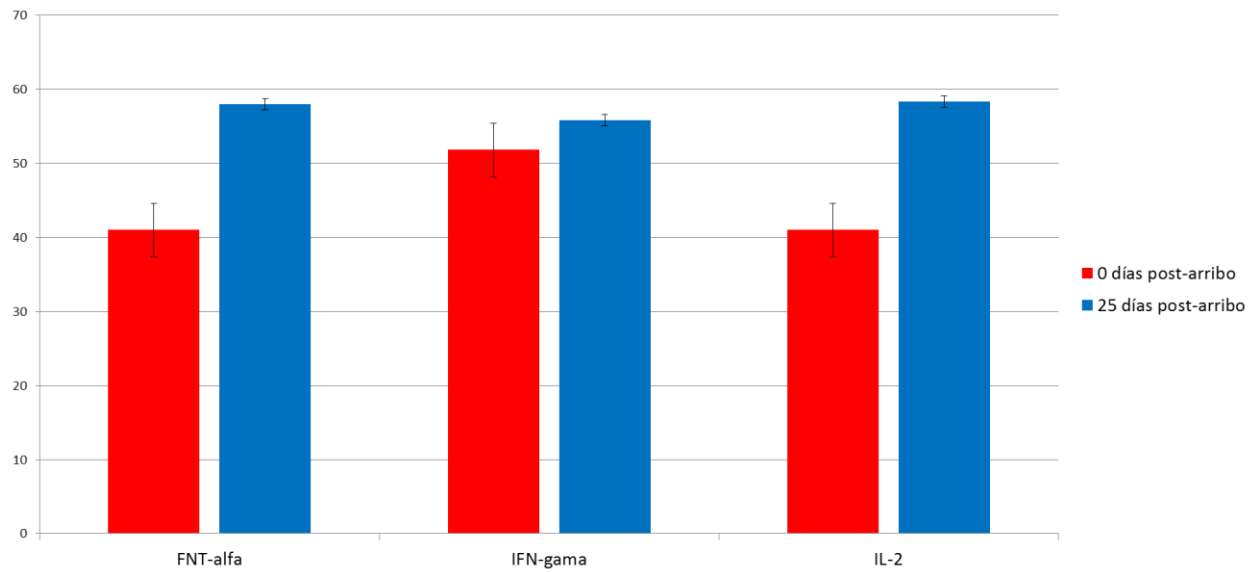


Figura 6. Análisis de la intensidad promedio por pixel de los productos amplificados de las citocinas FNT- α , IFN- γ e IL-2 en relación a su gen control GAPDH, con el software de ThermoScientific, en vaquillas a los 0 y 25 días post-arribo.

5. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio ofrecen información necesaria para determinar algunos de los efectos adversos del estrés por transporte en vaquillas, e inferir medidas para contrarrestarlos. Los hallazgos encontrados concuerdan con lo esperado según la literatura y otros experimentos similares que tratan sobre el transporte de larga distancia en ganado, aunque algunos de los resultados contrastan, no son contradictorios y refuerzan la hipótesis de que esta actividad produce niveles de estrés elevados y un desequilibrio homeostático en los animales.

En el caso de las concentraciones de glucosa en sangre, no se encontró diferencia significativa entre grupos; la privación de alimento en los animales del grupo de 0 DPA debió provocar una disminución en las concentraciones de esta variable en algún momento del viaje. Sin embargo, la alta concentración de cortisol en dicho grupo debió haber favorecido la liberación de glucosa desde las reservas o producirla a partir de aminoácidos liberados mediante el catabolismo de proteínas. Otros estudios tampoco han encontrado diferencias significativas en glucosa sérica entre sus grupos control y transportados en ovinos ; transportados por 31 horas (Parrot et al., 1998) o novillos transportados durante 48 horas (Parker et al., 2007). En ninguno de los dos grupos se encontró el nivel de colesterol por encima del valor máximo de referencia. Sin embargo, se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos, encontrándose el valor más alto en los animales del grupo de 0 DPA. En este grupo también se encontraron los niveles más altos de cortisol. En varios estudios se ha encontrado una relación positiva entre el cortisol y el colesterol. Por ejemplo, en un estudio hecho con hámsteres sirios expuestos a cortisol, se observó un aumento significativo en el colesterol (Solomon *et al.*, 2011).

La elevada concentración de albúmina encontrada en los animales de 0 días post-arribo podría sugerir deshidratación, y en este caso, podría atribuirse al estrés por transporte (Romero *et al.*, 2011).

Se observó una marcada diferencia ($P = 0.01$) en cuanto a la enzima hepática alanino aminotransferasa entre ambos grupos muestreados a los 0 y 25 DPA, obteniéndose un valor (74.4 U/L) muy superior al máximo de referencia (35 U/L) en los animales del grupo de 0 DPA. Según The Merck Veterinary Manual (2010), el aumento de dicha enzima se asocia a daño hepatocelular o daño muscular. No se ha encontrado ninguna referencia que asocie los niveles elevados de esta enzima con el estrés por transporte, pero es posible que el mantener la postura en un vehículo en movimiento sea la causa del daño muscular.

El hematocrito es un indicador confiable de deshidratación, probablemente debido a la privación de agua y al estrés por transporte (Tadich *et al.*, 2003). En el grupo de animales transportados se observó un aumento significativo en el hematocrito, indicando un nivel alto de deshidratación, lo cual se ha asociado a la privación de agua durante las 40 horas del viaje. Sin embargo, Parker *et al.* (2004) no encontraron cambios en los valores de hematocrito en novillos *Bos indicus* privados de agua por 90 horas. Esta diferencia puede atribuirse a las condiciones climáticas o a la variación genética en cada experimento, así como al transporte, dado que en este estudio, los animales no fueron transportados. En varios estudios se ha reportado un incremento en la relación neutrófilo-linfocito (Stockman *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2011) en bovinos sometidos a estrés por transporte. Los valores en los animales recién transportados (0 DPA) fueron 38% mayores a los valores de referencia.

El cortisol es la hormona más importante asociada al estrés. En nuestro estudio, se encontró una mayor concentración de cortisol en animales recién transportados a los corrales, lo que sugiere un mayor estrés en este grupo. Esto concuerda con lo reportado por (Buckham *et al.*, 2008). En nuestro estudio, la media de cortisol en el grupo de animales más estresados (0 DPA) fue de 68.3 ng/mL. En algunos estudios se muestra que una media de 70 ng/mL sugiere un manejo muy brusco (Grandin, 1997). Según Grandin y Deesing (2008), niveles por encima de 60 ng/mL en ganado bovino podría reflejar un pánico total o que se encuentran aterrorizados. Como otro dato necesario dentro de esta comparación, en un estudio realizado con ganado lechero para determinar el efecto de la venipuntura en las concentraciones de cortisol en sangre, se encontró una concentración de 2.07 a 3.81 ng/mL como promedio diario, en vacas acostumbradas a este manejo, lo cual podría considerarse como la concentración basal de esta hormona (Hopster *et al.*, 1999). Lo que se considera como valores máximos o extremos de cortisol en bovinos, Dunn (1990) obtuvo un nivel de 93 ng/mL, al invertir una vaca sobre su espalda durante 103 segundos.

Respecto a la expresión de genes de citocinas, se encontró una sobreexpresión significativa de FNT- α en los animales de 25 DPA. Estos resultados contrastan con el estudio de Cooke *et al.* (2012), quienes reportaron un aumento significativo del FNT- α sérico en becerras sometidas a una infusión de hormona liberadora de corticotropina, en comparación con el grupo control al que se aplicó únicamente solución salina, lo que sugiere una interacción positiva entre el cortisol y el FNT- α . En nuestro experimento, ocurrió exactamente lo contrario. El FNT- α es sintetizado y liberado en las células adrenales. Barney *et al.* (2000) investigaron la posible relación de TNF- α e IL-6 en la liberación de cortisol, y encontraron que el FNT- α inhibe la liberación de dicha hormona. Los animales de 25 DPA, fueron los que presentaron los niveles

más bajos de cortisol de ambos grupos, se encontró una sobre-expresión del gen de FNT- α , aunque no hemos relacionado esto con alguna causa. Si tomamos en cuenta los hallazgos de Barney *et al.*, (2000), posiblemente las concentraciones de cortisol hubieran sido superiores en este grupo si no se hubiera sobre-expresado FNT- α . Hulbert *et al.*, (2012) encontraron un aumento significativo de IFN- γ sérico después de administrar CRH a vaquillas recién transportadas. En el presente estudio, no se encontró diferencia significativa en cuanto a la expresión del gen de IFN- γ en el grupo de vaquillas recién transportadas (0 DPA), las cuales mostraron el nivel de cortisol más alto.

Se utilizaron iniciadores específicos para FNT- α , sin embargo, en los animales de 0 DPA, se observó la expresión de LT. La literatura indica que los genes de ambas citocinas se encuentran codificados en tándem, y se encuentran estrechamente vinculados, Sin embargo, cada uno tiene sus propios promotores y secuencias de poliadenilación (Cludts *et al.*, 1993). Por lo tanto los iniciadores que utilizamos, pueden bajo ciertas condiciones, amplificarse para LT, si está expresado dentro de la muestra. Se sugiere que en el caso de los animales de 0 DPA, los cuales son los que presentan niveles más altos de estrés, existen factores que activan la expresión de LT.

6. Conclusiones

En este estudio se concluye que el estrés por transporte provoca un desequilibrio homeostático en las vaquillas, evidenciado por el aumento en concentraciones sanguíneas de hematocrito, hemoglobina, albúmina, amilasa, ALT, bilirrubina, colesterol y cortisol. También se observó una disminución en las expresiones de la citocina FNT- α y la co-expresión de LT en animales de ODP. Se sugiere llevar a cabo estudios posteriores para determinar el mecanismo que promueve la expresión de LT en animales sometidos a estrés por transporte para su posible uso como biomarcador. Podemos inferir que el transporte prolongado afecta enormemente el bienestar de los bovinos. Se necesitan más estudios para determinar las condiciones óptimas de transporte a larga distancia, así como medidas de pre-acondicionamiento y manejo, sin embargo, el ideal sería disminuir el tiempo de transporte. Se recomienda evitar el transporte de larga distancia en la medida de lo posible.

7. Bibliografia

- Appleby, M. C., Cussen, V., & Garces, L. (2008). *Long Distance Transport and Welfare of Farm Animals*. UK:CABI.
- Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science*. 94, 557-572.
- Barney, M., Call, G. B., McIlmoil, C. J., Husein, O. F., Adams, A., Balls, A. G., Judd, A. M. (2000). Stimulation by interleukin-6 and inhibition by tumor necrosis factor of cortisol release from bovine adrenal zona fasciculata cells through their receptors. *Endocrine*, 13(3), 369-377.
- Buckham, 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 expressions in beef bulls. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 121, 300-320.
- Buckham, S., Xiao, L., Tempelman, R. J., Burton, J. L., Earley, B., & Crowe, M. A. (2008). Transportation stress alters physiological circulating parameters that may be effective biomarkers of stress. *Journal of Animal Science*. 86, 1325-1334.
- Cannon, W. (1914). The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *American Journal of Physiology*. 33, 357-372.
- Cernicchiaro, N., White, B. J., Renter, D. J., Babcock, A. H., Kelly, L., & Slattery, R. (2012). Associations between the distance traveled from sale barns to commercial feedlots in the United States and overall performance, risk of respiratory disease, and cumulative mortality in feeder cattle during 1997-2009. *Journal of Animal Science*. 90, 1929-1939.
- Cludts, I., Cleuter, Y., Kettmann, R., Burny, A., & Droogmans, L. (1993). Cloning and characterization of the tandemly arranged bovine lymphotoxin and tumour necrosis

- factor-alpha genes. *Cytokine*, 5(4), 336-341.
- Cooke, R. F., Carroll, J. A., Dailey, J., Cappelozza, B. I., & Bohnert, D. W. (2012). Bovine acute-phase response after different doses of corticotropin-releasing hormone challenge. *Journal of Animal Science*, 90(7), 2337-2344.
- Duff, G. C., & Galyean, M. L. (2007). Board-Invited Review: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 85, 823-840.
- Dunn, C. S. (1990). Stress reactions of cattle undergoing ritual slaughter using two methods of restraint. *Veterinary Record*. 126(21), 522-525.
- Grandin, T. (1997). Assessment of stress during handling and transport. *Journal of Animal Science*, 75(1), 249-257.
- Grandin, T., Deesing, M., (2008). *Humane livestock handling: Understanding livestock behavior and building facilities for healthier animals*: Storey Publishing.
- Graves, C. N., & Eiler, H. (1979). Cortisol content of semen and the effect of exogenous cortisol on the concentration of cortisol and minerals (Ca, Mg, K and Na) in semen and blood plasma of bulls. *Biology and Reproduction*. 21(5), 1225-1229.
- Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson, M. (2012). *Animal Physiology*. Sinauer Associates, Inc.
- Hopster, H., van der Werf, J. T., Erkens, J. H., & Blokhuis, H. J. (1999). Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *Journal of Animal Science*. 77(3), 708-714.
- Hulbert, L. E., Carroll, J. A., Ballou, M. A., Burdick, N. C., Dailey, J. W., Caldwell, L. C., Randel, R. D. (2013). Sexually dimorphic stress and pro-inflammatory cytokine responses to an intravenous corticotropin-releasing hormone challenge of Brahman cattle following transportation. *Journal of Innate Immunology*, 19(4), 378-387
- John Lubbock, S. (1865). *Pre-Historic Times, as Illustrated by Ancient Remains, and the*

- Manners and Customs of Modern Savages* (Séptima Edición ed.): Williams and Norgate.
- Kaspersen, H., Laurberg, P., Brixen, K., & Mosekilde, L. (1991). Relations between diurnal variations in serum osteocalcin, cortisol, parathyroid hormone, and ionized calcium in normal individuals. *Acta Endocrinológica*. 124, 391-398.
- Laudat, M. H., Cerdas, S., Fournier, C., Guiban, D., Guilhaume, B., & Luton, J. P. (1988). Salivary cortisol measurement: a practical approach to assess pituitary-adrenal function. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 66(2), 343-348.
- Liu, Y., Knobloch, H. S., Grinevich, V., & Aguilera, G. (2011). Stress induces Parallel Changes in Corticotropin Releasing Hormone (CRH) Transcription and Nuclear Translocation of Transducer of Regulated CREB Activity 2 (TORC 2) in Hypothalamic CRH Neurons *Journal of Neuroendocrinology*. 23, 219-223.
- Marques, R. S., Cooke, R. F., Francisco, C. L., & Bohnert, D. W. (2012). Effects of twenty-four hour transport or twenty-four hour feed and water deprivation on physiologic and performance responses of feeder cattle. *Journal of Animal Science*, 90(13), 5040-5046.
- Moberg, G. P., & Mench, J. A. (2000). The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare. UK: CAB International.
- Newton, R. (2000). Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*. 55, 603-613.
- Parker, A. J., Dobson, J. P., & Fitzpatrick, L. A. (2007). Physiological and metabolic effects of prophylactic treatment with the osmolytes glycerol and betaine on *Bos indicus* steers during long duration transportation. *Journal of Animal Science*. 85, 2916-2923.
- Parker, A. J., Hamlin, G. P., Coleman, C. J., & Fitzpatrick, L. A. (2003). Quantitative analysis of acid-base balance in *Bos indicus* steers subjected to transportation of long duration. *Journal of Animal Science*. 81(6), 1434-1439.

- Parker, A. J., Hamlin, G. P., Coleman, C. J., & Fitzpatrick, L. A. (2004). Excess cortisol interferes with a principal mechanism of resistance to dehydration in *Bos indicus* steers. *Journal of Animal Science*. 82(4), 1037-1045.
- Parrott, R. F., Hall, S. J. G., Lloyd, D. M., Goode, J. A., & Broom, D. M. (1998). Effects of a maximum permissible journey time (31 h) on physiological responses of fleeced and shorn sheep to transport, with observations on behaviour during a short (1 h) rest-stop. *Animal Science*. 66(01), 197-207.
- Pineda, M. H., & Dooley, M. P. (2003). *Veterinary endocrinology and reproduction*. Blackwell Publishing.
- Romero, M. H., Uribe-Velásquez, L. F., & Sánchez, J. A. (2011). Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud*. 10, 71-87.
- Simmons, P. S., Miles, J. M., Gerich, J. E., & Haymond, M. W. (1984). Increased proteolysis. An effect of increases in plasma cortisol within the physiologic range. *Journal of Clinical Investigation*. 73, 412-420.
- Sjögren, K. G., & Price, T. D. (2013). A complex Neolithic economy: isotope evidence for the circulation of cattle and sheep in the TRB of western Sweden. *Journal of Archaeological Science*. 40(1), 690-704.
- Solomon, M. B., Sakai, R. R., Woods, S. C., & Foster, M. T. (2011). Differential effects of glucocorticoids on energy homeostasis in Syrian hamsters. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 301(2), E307-E316.
- Speer, N. C., Slack, G., & Troyer, E. (2001). Economic factors associated with livestock transportation. *Journal of Animal Science*. 79, E166-E170.
- Stites, D. P., Bugbee, S., & Siiteri, P. K. (1983). Differential actions of progesterone and cortisol on lymphocyte and monocyte interaction during lymphocyte activation relevance to

- immunosuppression in pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 5, 215-228.
- Stockman, C. A., Collins, T., Barnes, A. L., Miller, D., Wickham, S. L., Beatty, D. T., Fleming, P. A. (2011). Qualitative behavioural assessment and quantitative physiological measurement of cattle naïve and habituated to road transport. *Animal Production Science*, 51(3), 240-249.
- Swanson, J. C., & Morrow-Tesch, J. (2001). Cattle transport: Historical research and future perspectives. *Journal of Animal Science*. 79, E102-E109.
- Tadich, N., Gallo, C., Echeverria, R., & Van Schaik, G. (2003). Effect of fasting during two periods of confinement and road transport on some blood constituents indicators of stress in steers. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 35, 171-185.
- Van Uum, S. H., Sauve, B., Fraser, L. A., Morley-Forster, P., Paul, T. L., & Koren, G. (2008). Elevated content of cortisol in hair of patients with severe chronic pain: a novel biomarker for stress. *Stress*, 11(6), 483-488.
- Viner, S., Evans, J., Albarella, U., & Parker Pearson, M. (2010). Cattle mobility in prehistoric Britain: strontium isotope analysis of cattle teeth from Durrington Walls (Wiltshire, Britain). *Journal of Archaeological Science*. 37(11), 2812-2820.
- Waynert, D. F., Stookey, J. M., Schwartzkopft-Genswein, K. S., Watts, J. M., & Waltz, C. S. (1999). The response of beef cattle to noise during handling. *Applied Animal Behaviour Science*. 62, 27-42.
- White, B. J., Blasi, D., Vogel, L. C., & Epp, M. (2009). Associations of beef calf wellness and body weight gain with internal location in a truck during transportation. *Journal of Animal Science*. 87, 4143-4150.
- Whitten, P. L., Stavisky, R., Aureli, F., & Russell, E. (1998). Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal of Primatology*. 44(1), 57-69

- Zager, P. G., Frey, H. J., Spalding, C. T., Wengs, W. J., & Britternham, M. C. (1986). Distribution of 18-hydroxycorticosterone between red blood cells and plasma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *64*, 64-69.
- Zaros, L. G., Bricarello, P. A., Amarante, A. F. T., & Coutinho, L. L. (2007). Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR methodology. *Genetics and Molecular Biology*, *30*, 575-579.