

CORTISOL EN SALIVA EN TERNEROS LECHALES EN LA CUENCA LECHERA SANTAFESINA

LEVA, P. E.¹; GARCIA, M. S.¹; REY, F.²; SOSA, J. L.^{1,2};

TOFFOLI, G.¹ & VALTORTA, S. E.^{1,3}

RESUMEN

Se compararon sistemas de crianza: tradicional (ST) y modificado (SM), para evaluar confort térmico en terneros Holstein lechales durante el invierno y el verano. En ambas estaciones, el SM mejoraba la movilidad y permitía la interacción social de los animales. Durante el invierno, los animales del SM se cubrían con capas. En el verano todos tenían acceso a sombra. Se midió el cortisol en saliva (CS) en cuatro momentos del día para detectar ritmos circadianos. Se realizó análisis de variancia y de Cosinor. Las CS variaron entre $2,06 \pm 1,37$ y $1,97 \pm 1,21$ ng/ml en el invierno y $0,48 \pm 0,23$ y $0,38 \pm 0,22$ ng/ml durante el verano. No se detectaron diferencias significativas entre los dos sistemas de manejo ni ajuste a ritmos circadianos.

Palabras clave: confort térmico, sistemas de crianzas, terneros lechales, cortisol, ritmos circadianos.

SUMMARY

Saliva cortisol in suckling calves in the dairy Santa Fe.

Two calves rearing systems (traditional and modified (SM)) were compared in order to evaluate thermal comfort of suckling Holstein calves during summer and winter. Possibilities to move around and social interaction were improved by SM in both seasons. During winter, animals were protected with capes, while in summer all animals had access to shade. Salivary cortisol was measured at four times during the day to detect circadian rhythms. Data were subjected to analysis of variance and to Cosinor analysis. Concentration of cortisol in saliva ranged from 2.06 ± 1.37 to 1.97 ± 1.21 ng/ml in winter and from 0.48 ± 0.23 to 0.38 ± 0.22 ng/ml in summer. Neither management system effects nor adjustment to circadian rhythms were detected.

Key words: thermal comfort, rearing systems, suckling calves, cortisol, circadian rhythms.

1.- Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805 (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Email: pleva@fca.unl.edu.ar

2.- Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL).

3.- CONICET.

Manuscrito recibido el 30 de enero de 2012 y aceptado para su publicación el 12 de marzo de 2012.

INTRODUCCIÓN

Definir bienestar animal (BA) resulta complejo y difícil. Según Broom (1986) el BA es el estado de un individuo en relación a sus intentos por adaptarse al medio ambiente. Esta adaptación depende de muchos factores tales como el ambiente, la sanidad, el alojamiento y el manejo, las interacciones sociales entre animales y la posibilidad de llevar a cabo determinadas pautas de conducta (Tapki, 2006)

La crianza artificial de terneros es una actividad de alto riesgo, donde las condiciones ambientales juegan un papel muy importante durante las primeras semanas de vida de los terneros. Esto es particularmente cierto durante los meses invernales y estivales. Los terneros son más sensibles a la hipotermia cuando los inviernos son muy fríos y húmedos (Azzem *et al.*, 1993). Por otro lado, durante la época estival la exposición directa a la radiación solar, sobre todo durante las horas de máxima insolación, afecta severamente el desempeño de estos animales (Valtorta & Leva, 1998).

La raza que predomina en los rodeos de la Cuenca Lechera Central (Santa Fe, Argentina) es la Holstein-Frisian. La zona de termoneutralidad para terneros Holstein (ZTN) se encuentra comprendida entre 15°C y 27° (Hahn, 1985).

Las condiciones ambientales de los sistemas de crianza de terneros, distan mucho de la vida natural de un animal criado junto con su madre. Los terneros son obligados a vivir en áreas restringidas alimentados con leche o sucedáneos que suministran cantidades limitadas de energía y proteína sin considerar ni sus preferencias nutricionales y de comportamiento, como tampoco el BA.

El estrés, como una medida del BA, desempeña un papel importante en la salud y en desempeño de los terneros. Los animales

pueden sufrir estrés por causas físicas (hambre, sed, falta de confort térmico) o por causas psicológico (movimiento restringido, prácticas de manejo, imposibilidad de contacto social) (Grandin, 1997).

El estrés puede ser definido como la respuesta biológica generada cuando un individuo percibe una amenaza a su homeostasis. En este contexto, el cortisol resulta ser el marcador más sensible para medir el estrés psicológico y/o físico. El cortisol es una hormona glucocorticoide sintetizada por la corteza adrenal. Su producción es regulada por el eje corticotrópico, que puede ser alterado en diferentes circunstancias. La concentración de cortisol en plasma es uno de los indicadores más frecuentemente utilizados para medir el estrés (Sapolsky *et al.*, 2000.; Pacak & Palkovits, 2001). Otro fluido corporal, en el que también se pueden hacer mediciones de los niveles de cortisol es la saliva. Los corticosteroides entran en la saliva por difusión pasiva, por lo tanto, las concentraciones no son afectadas por el caudal de saliva (Riad-Fahmy *et al.*, 1982). Además, las muestras de saliva pueden ser fácilmente obtenidas en intervalos de tiempo fijo, antes y después de la ocurrencia de un estresor. En los últimos años, las mediciones de cortisol en saliva se han utilizado para evaluar las reacciones al estrés en ganado lechero (Fell y Shutt, 1986., Cooper *et al.*, 1989). Algunos autores han demostrado que la concentración de cortisol en saliva se relaciona directamente con el del plasma en humanos, perros, cerdos y rumiantes (Riad-Fahmy *et al.*, 1982., Fell *et al.*, 1985., Parrott *et al.*, 1989., Vincent & Michell 1992., Cook *et al.*, 1996., Schönreiter & Zanella, 2000; Cook, 2002., Negroao *et al.*, 2004).

La secreción de cortisol en ganado lechero exhibe un ritmo circadiano con valores máximos en la mañana (Thun *et al.*, 1981). En

estudios de evaluación de bienestar animal es más importante analizar el ritmo circadiano de concentración de cortisol, que un solo valor por día (Ruis *et al.*, 1997; Hillmann *et al.*, 2008). Bajo situaciones de estrés se ha observado un comportamiento caótico y arrítmico en humanos (Yehuda *et al.*, 1996). También en caballos se observó que los ritmos diarios de cortisol pueden desaparecer por perturbaciones menores (Irvine & Alexander, 1994). Estos últimos autores señalan la dificultad de determinar los niveles de cortisol, dado que las mediciones pueden verse afectadas por el momento del día, la ocurrencia de fluctuaciones de corto plazo y el grado de acostumbramiento al ambiente.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el grado de estrés térmico, como una medida del BA, al que están sometidos los terneros criados bajos dos sistemas de crianza, utilizando como indicador las concentraciones y variaciones diarias de cortisol en saliva en dos momentos del año. La hipótesis del presente trabajo es que los sistemas de crianzas ofrecen un bienestar no satisfactorio a los animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental

Las experiencias se llevaron a cabo en un tambo comercial ubicado en el departamento Las Colonias en la provincia de Santa Fe (Argentina) en dos épocas del año (fría y cálida) y abarcaron las etapas lechales hasta los 50 días. El tipo climático de la región es templado con veranos cálidos (Conde 2000).

Las fechas de realización de los ensayos estuvieron comprendidas entre el 3 julio hasta el 25 de agosto del 2007 para la etapa invernal y en la entre el 8 de febrero al 31 de marzo del 2009 para la estival.

Animales

Se emplearon 10 terneros raza Holstein (Holando Argentino) cuyos pesos medio fueron de 31,6 y el desvío estándar (DE) $\pm 3,1$ kg en el ensayo de la estación fría y 12 en la estación cálida presentaron un peso medio de 36,8 y DE $\pm 7,7$ kg.

Alimentación

A los terneros se les suministraron 4 litros de leche en dos tomas y balanceado iniciador. Durante la época cálida también se les ofreció agua.

Tratamientos

Los animales se asignaron al azar a dos tratamientos: 1) sistema tradicional (ST) y 2) sistema modificado (SM). Las modificaciones introducidas tanto en invierno como en verano, se diseñaron en función de factibilidad de su aplicación regional. A los terneros que ingresaron a los ensayos, se les realizó una prueba de calostro, a través del test de coagulación del glutaraldehído (Weaver *et al.*, 2000).

Los tratamientos fueron:

a) ST: convencional denominado en estaca. Este sistema (Fig. 1) consiste en una estaca con dos aros para colocar baldes destinados al balanceado iniciador, la leche y el agua. Los terneros se sujetan a la estaca por medio de un collar y una cadena de 1,5 - 2 m de longitud.

b) SM: los terneros fueron sujetos, con collar y cadena provista de un aro, a un alambre sostenido entre dos ganchos de hierro enterrados en el suelo a una distancia 10 m (Fig. 2). Esto permite el desplazamiento a lo largo del alambre. La estaca con los baldes se coloca cerca de uno de los extremos. Este sistema, denominado en corredera, brinda al ternero mayor posibilidad de movimientos y evita el enroscado de la cadena en la estaca,

disminuyendo las lesiones traumáticas en el bípedo anterior. Los terneros en este tratamiento fueron, además, protegidos utilizando capas (Fig. 2). Las correderas estaban ubicadas de manera tal que, al desplazarse, los animales podían entrar en contacto con sus vecinos.

En todos los casos, los animales del ST fueron cambiados de ubicación, según la necesidad.

Al igual que en la estación fría, los tratamientos en el ensayo de la estación cálida fueron:

a) ST: convencional en estaca, con acceso a sombra (Fig. 3).

b) SM: en corredera con acceso a sombra (Fig. 4).

Los terneros del ST se alojaron bajo una estructura pre-existente de media sombra de red 80%, orientada de E-O, con 18,0 m de largo, 4,0 m de ancho y 2,1 m de altura. La superficie disponible por animal fue de, aproximadamente 7,5 m². La distancia entre las estacas impedía el contacto entre animales.



Fig. 1: Terneros bajo el sistema tradicional (ST) en la época fría.



Fig. 2: Terneros bajo el sistema modificado (SM) en la época fría.

Para los terneros del SM se construyó una estructura similar a la anterior. En este caso, las correderas se ubicaron en forma perpendicular al eje longitudinal de la estructura, es decir, con E-O. La distancia entre correderas permitía el contacto entre animales vecinos y la superficie asignada por animal era de 12 m².

Datos meteorológicos

La información meteorológica: temperatura del aire máxima (°C) y mínima (°C), radiación solar (MJ/día), precipitación (mm),

humedad relativa (%) y velocidad del viento (m/s), se obtuvo de la estación meteorológica inalámbrica automática Pegasus EP2000 (Argentina) de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Determinación de cortisol salival

El cortisol se cuantificó con un kit comercial ELISA (Salimetrics LLC, State College, PA, USA). En el mismo ensayo se prepara una curva de calibrado con concentraciones conocidas de estándares de



Fig. 3: Terneros bajo el sistema tradicional (ST) en la época cálida



Fig. 4: Terneros bajo el sistema modificado (SM) en la época cálida

cortisol, que permiten la posterior cuantificación de las muestras. Para cada estación se utilizó un único kit. El coeficiente de variación inter-ensayo es de 3,75% y el intra-ensayo 3,35%. La sensibilidad fue 0,03 ng/ml.

Toma de muestras

Las extracciones de saliva se realizaron una sola vez en cada ensayo cuando los animales alcanzaron entre 30 y 35 días de edad. Para la toma de muestras se utilizó una esponja, previamente esterilizada, que se colocó en la boca del ternero durante no más de un minuto. Luego la esponja se introdujo en una jeringa y, presionando con el émbolo, se extrajo la saliva y se conservó a -20°C, hasta el análisis. Para detectar la presencia de ritmos circadianos, la recolección de muestras de saliva se realizó en los siguientes horarios: 08:00, 14:00, 20:00 y 02:00 horas, siguiendo la metodología de Scaglioni *et al.* (2000).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat profesional (Di Renzo *et al.*, 2009). El diseño fue completamente al azar en parcelas divididas con medidas repetidas en el tiempo, de acuerdo al siguiente modelo:

$$y = \mu + s_i + h_{ij} + \xi_{ij}$$

donde:

μ = efecto de la media general

s_i = efecto del i-ésimo sistema de crianza,
 $i = 1, 2$

h_{ij} = efecto de la hora j-ésima en el i-ésimo sistema de crianza

= efecto del error

ξ_{ij}

Ritmos circadianos

Para detectar la existencia de ritmos circadianos, cuando se observó variación horaria significativa los datos de CS fueron sometidos al análisis del Cosinor, de acuerdo a la metodología de Nelson *et al.* (1979):

$$CS = M + A \cos(\omega * t + \varphi)$$

donde:

M = Mesor (valor alrededor del cual están las oscilaciones).

A = amplitud estimada por el cosinor de la función coseno.

ω = frecuencia angular (radianes/ unidad de tiempo). El ciclo de 24 horas es representado por 4TT radianes).

φ = acrofase estimada por el cosinor que corresponde al ángulo de fase del valor máximo de la función coseno.

t = tiempo, en horas.

Nivel de significancia

Si bien para estudios a la intemperie, Kolver & Müller (1998) sugieren utilizar como límite de significancia una probabilidad del 10%, en todos los casos se consideraron las diferencias como significativas cuando se tenía ($p < 0,05$). Los valores de las diferentes variables, cuando correspondía, se indicaron como Media \pm DE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones meteorológicas

Las temperaturas medias mensuales registradas en los meses en que se llevó a cabo el ensayo durante la época fría fueron $9,3 \pm 3,5$ °C en julio y $9,9 \pm 3,9$ °C en agosto, más bajas que el promedio normal de la

región que es de 12,7 °C y 13,9 °C respectivamente (serie 1960-1990, SMN). Además, se presentaron 15 días con heladas meteorológicas, siendo superior a lo normal para la zona, que es de 11 días (García *et al.*, 2008).

Con respecto a la época cálida, las temperaturas medias fueron de $25,2 \pm 2,8^{\circ}\text{C}$ en febrero y $24,4 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$ en marzo, más elevadas que las normales para la región que son de 24,2 y 22,4°C para febrero y marzo, respectivamente (1960-1990, SMN). Durante todo el período llovieron 291 mm, mientras la media histórica es de 216 mm. Sin embargo, estas condiciones no afectaron la humedad atmosférica, que se mantuvo dentro de los valores normales para la zona. Durante el ensayo, la humedad relativa fue de 65% en febrero y 68% en marzo.

Además en el cuadro 1 se presentan las condiciones meteorológicas en los días en que se efectuó la recolección de saliva. El día en que se realizó la recolección de saliva, en la época invernal, la temperatura del aire se mantuvo siempre por debajo del al temperatura crítica inferior de acuerdo a la zona de termoneutralidad que esta comprendida entre los 15°C y 27°C (Hahn, 1985). Además, el tiempo meteorológico se presento nublado con elevado porcentaje de

HR% y una llovizna persistente (Cuadro 1). Durante el verano, el día de recolección de la saliva las condiciones meteorológicas fueron más confortables para los terneros, dado que las temperaturas del aire se mantuvieron dentro de la zona de termoneutralidad como se observa en el Cuadro 1.

Cortisol salival

Los resultados de la CS obtenidos en los terneros de la época invernal se presentan el cuadro 2. El intervalo de concentración basal de cortisol salival, según Fell and Shutt (1986) está comprendido entre $0,10 \pm 0,14$ ng/ml y $1,2 \pm 0,21$ ng/ml. Estos valores iniciales de CS también coincide con lo informado por Negro *et al.* (2004). En el presente ensayo los animales alcanzaron valores de CS fuera del los intervalo antes mencionado. Se puede inferir que estos valores de CS podrían indicar que las condiciones ambientales afectarían el confort de los animales y por ende el BA. La falta de confort térmico es una de las causas físicas por la cual los animales pueden sufrir estrés (Grandin, 1997).

Por otro lado, en el Cuadro 2 se observa que, las CS en los terneros no presentaron diferencias significativas entre los dos

Cuadro 1. Temperatura máxima (TMX), temperatura mínima (Tmn), precipitación (Pp), humedad relativa (HR), radiación solar (RS), velocidad del viento (VV) y WInd Cold Index (WCI) y índice de temperatura y humedad (ITH) registrados durante los días en que se realizaron las extracciones de saliva.

| Índice | Estación fría | Estación cálida |
|-------------|---------------|-----------------|
| Fecha | 02/08/07 | 26/03/09 |
| TMX (°C) | 7,0 | 27,2 |
| Tmn (°C) | 5,5 | 19,5 |
| Pp (mm) | 1,0 | 6,0 |
| HR (%) | 99 | 82 |
| RS (MJ/día) | 2,8 | 16,2 |
| VV (m/s) | 1,1 | 2,9 |

sistemas de manejo (ST y SM), pero si de detecto diferencia significativa entre individuos ($p=0,0004$).

En el Cuadro 3 se presentan las concentraciones de CS de los terneros criados bajo los dos sistemas durante la época estival. En este caso los valores de CS estuvieron comprendidos en el rango de CS basal informado por Fell y Shutt (1986) y Negrao (2004). Las modificaciones ambientales, sombras y agua son condiciones que favorecen el confort térmico (Valtorta *et al.*, 1998.).

Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas entre los sistemas, pero sí en los horarios de extracción ($p=0,0061$). Esto coincide con lo informado por Hillmann *et al.* (2008) en trabajos realizados con cerdos.

En la experiencia invernal, no se detectó una variación horaria significativa en la CS por la cual no se realizó el análisis de Cosinor. En la Figura 5 se muestra la marcha diaria de la concentración de CS. Se puede apreciar que el momento de máxima concentración en

ambos sistemas se presentó a las 08:00, mientras que el mínimo se registró a las 20:00 para el ST y a las 14:00 para el SM.

Por otro lado, en la época estival el análisis estadístico de la CS presentó una variación horaria significativa ($p=0,0004$). Razón por lo cual se efectuó el análisis de Cosinor (Nelson *et al.*, 1979) para detectar la existencia de variaciones rítmicas. Los resultados se pueden observar en el Cuadro 4. Sin embargo, los valores del verano no se ajustaron a un ritmo circadiano (Cuadro 4). En la figura 6 se muestra la variación horaria de la concentración de CS.

Piccione *et al.* (2010) trabajando con cachorros de perros de distintas razas concluyeron que algunas variables, como la frecuencia cardiaca, respiratoria o de algunas hormonas, se ajustan a un ritmo circadiano recién después de los dos meses de vida. Parecería que el reloj biológico controla primeramente las oscilaciones de unas pocas variables, y luego el control de los patrones

Cuadro 2: Valores medios de cortisol en saliva (CS) para los terneros bajo los dos sistemas de crianza: sistema tradicional (ST) y sistema modificado (SM), durante la época fría. Los valores se presentan como media \pm DE.

| Sistema de crianza | CS (ng/ml) |
|--------------------|------------------------------|
| ST | 2,06 \pm 1,37 ^a |
| SM | 1,97 \pm 1,21 ^a |

^a, Diferencia no significativa ($p = 0,7$)

Cuadro 3: Valores medios de cortisol en saliva (CS) para los terneros bajo los dos sistemas de crianza: sistema tradicional (ST) y sistema modificado (SM), durante la época cálida. Los valores se presentan como media \pm DE.

| Sistema de crianza | CS (ng/ml) |
|--------------------|------------------------------|
| ST | 0,43 \pm 0,23 ^a |
| SM | 0,38 \pm 0,22 ^a |

^a, Diferencia no significativa ($p = 0,51$)

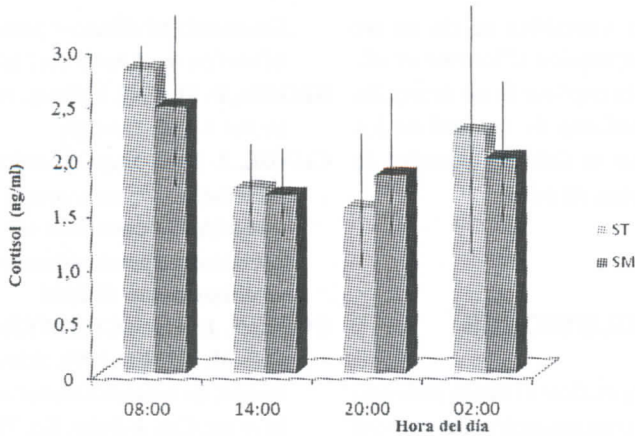


Fig. 5: Marcha diaria de la variación de la concentración de cortisol en saliva (ng/ml) para terneros bajo los dos sistemas de crianza: sistema tradicional (ST) y sistema modificado (SM), durante la época fría. Las barras verticales indican DE

Cuadro 4: Análisis circadiano de los valores del cortisol en saliva (CS, ng/ml) para terneros criados bajo los dos sistemas; sistema tradicional (ST) y sistema modificado (SM), durante la época cálida.

| Variable | Sistema de crianza | Mesor | Amplitud | Acrofase | P< |
|----------|--------------------|-------|----------|----------|------|
| CS | ST | 0,40 | 0,10 | 22:08 | 0,26 |
| | SM | 0,30 | 0,08 | 23:52 | 0,78 |

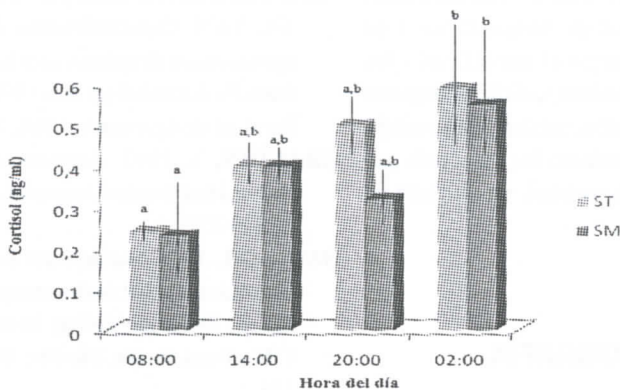


Fig. 6: Marcha de los niveles de cortisol en saliva (ng/ml) para los terneros bajo los dos sistemas de crianza: sistema modificado (SM) y sistema tradicional (ST). Las barras verticales indican DE. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

diarios de otras variables se da en un aparente orden jerárquico (Piccione *et al.*, 2010). Esto podría explicar la no detección de un ritmo circadiano de cortisol en los terneros, dado que se trata de animales de menos de dos meses de edad.

CONCLUSIONES

La medida para evaluar el estrés utilizado en este ensayo, concentración de cortisol en saliva, nos indica que el confort de los terneros es pobre durante la estación invernal. El sistema modificado intenta mejorar el estado de los animales proporcionándole protección, pero parece ser no suficiente para las condiciones invernales de la región.

Durante la estación estival, las concentraciones de cortisol en saliva de mantuvieron en los niveles considerados como basales, aparentemente la provisión de sombra para evitar la insolación directa y agua abundante, le proporcionaría a los terneros un bienestar más satisfactorio.

Por otro lado, tanto en el sistema tradicional como en el modificado los animales están atados e impedidos de desplazarse a su voluntad, sin embargo el modificado les permite en cierta medida satisfacer algunas necesidades comportamentales. Esta ventaja del sistema modificado no fue detectada por la concentración de cortisol, en ninguna de las dos estaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- AZZAM, S.M., J. E. KINDER; M. K. NIELSEN; L. A. WERTH; K. E. GREGOR.; L. V. CUNDIFFT & R. M. KOCH. 1993. Environmental effects on neonatal mortality of beef calves. *J Anim Sci* 71(2): 282-290.
- BROOM, D. M. 1986. Indicator of poor welfare *Br.Vet. J.* 142: 524-526.
- CONDE, J. 2000. Mapa climático de Köppen. Editoriales y opinión prensa internacional traducidos al castellano on line. <http://www.terra.es/personal/jesusconde> Acceso: 25 de noviembre de 2009.
- COOK, N. J.; A. L. SCHAEFER; P. LEPAGE & S. M. JONES. 1996. Salivary vs serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Can. J. Anim. Sci.* 76: 329-335.
- COOPER, T. R.; H. R. TRUNKFIELD; A. J. ZANELLA & W. D. BOOTH. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals. *J Endocrinol.* 123: R13-R16.
- FELL, L. R.; D. A. SHUTT & C. J. BENTLEY. 1985. Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma "free" cortisol arising from acute stress in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 62(12):403-406.
- FELL, L. R. & D. A. SHUTT. 1986. Adrenocortical response of calves to transport stress as measured by salivary cortisol. *Can. J. Anim. Sci.* 66:637-641.
- GARCÍA, M. S.; P. E. LEVA & S. E. VALTORA. 2008. Caracterización del régimen agroclimático de heladas para la provincia de Santa Fe durante el período 1979-2004. *Rev. Facultad de Agronomía UBA*, 28(1):53-26.
- GRANDIN, T. 1997. Assessment of Stress During Handling and Transport. *J. Anim. Sci.* 75:249-257
- HAHN, G. L. 1985. Management and housing of farm animals in hot environments. En: Yousef M (ed) *Stress physiology in livestock*, (2). CRC, Boca Raton, Florida, USA pp 151-174.
- HILLMANN, E. L.; C. SCHRADER; L. MAYER & L. GYGAX. 2008. Effects of weight, temperature and behaviour on the

- circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs. *Animal*, 2(3): 405-409.
- IRVINE, C. H. G. & S. L. ALEXANDER.** 1994. Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic Anim. Endocrinol.*, 11: 227-238.
- KOLVER, E. S. & L. D. MÜLLER.** 1998. Performance and Nutrient Intake of High Producing Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration. *J. Dairy Sci.* 81: 1403-1411
- NEGRAO, J. A.; M. A. PORCIONATO; A. M. PASSILLÉ & J. RUSHEN.** 2004. Cortisol in Saliva and Plasma of Cattle After ACTH Administration and Milking. *J. Dairy Sci.*, 87:1713-1718
- NELSON, W.; Y. LIANGTONG; LEE JUNG-KUEN & F. HALBERG.** 1979. Methods for cosinor rhythmometry, *Chronobiologia*, 6: 305-323.
- PACAK, K. & M. PALKOVITS.** 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrinol. Rev.*, 22:502-548.
- PARROTT, R. F.; B. H. MISSON & B. A. BALDWIN.** 1989. Salivary cortisol in pigs following adrenocotrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. *Br. Vet. J.*, 145:362-366.
- PICCIONE, G.; E. GIUDICE; F. FAZIO & J. P. MORTOLA .** 2010. The daily rhythm of body temperature, heart and respiratory rate in newborn dogs. *J Comp Physiol B*, 180(6):895-904.
- RIAD-FAHMY, D; G. F. READ; R. F. WALKER & K. GRIFFITHS.** 1982. Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocrinol. Rev.*, 4:367-395.
- RUIS, M. A. W.; J. H. A. TE BRAKE; B. ENGEL; E. D. EKKEL; W. G. BUIST; H. J. BLOKHUIS & J. M. KOOLHAAS.** 1997. The Circadian Rhythm of Salivary Cortisol in Growing Pigs: Effects of Age, Gender, and Stress. *Physiology & Behavior*, 62: 623-630
- SCAGLIONE, M. C.; R. D. CERUTTI; R. L. ALTHAUS; S. E. VALTORTA ; D. C. DIAZ & J. C. BOGGIO.** 2003 Variaciones diarias en concentraciones plasmáticas de sodio y potasio en bovinos Holstein. *Revista FAVE - Sección Ciencias Veterinarias* 2 (1): 73-80
- SCHÖNREITER, S. & A. J. ZANELLA.** 2000. Assessment of cortisol in swine by saliva: new methodological Approaches. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 43: 165-170
- SAPOLSKY, R. M.; L. M. ROMERO & A. U. MUNCK.** 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21: 55-89.
- THUN, R.; E. EGGENBERGER; K. ZEROBIN; T. LUSCHER & W. VETTER.** 1981. Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinology*, 109: 2208-2212.
- VALTORTA, S. E. & P. E. LEVA.** 1998. Características del ambiente físico. p 9-20. En: *Producción de leche en verano*. Ediciones UNL, Santa Fe.
- VINCENT, I. C. & A. R. MICHELL.** 1992. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res. Vet. Sci.*, 53:342-345.
- WEAVER, D. M.; J. W. TYLER; D. C. VANMETRE; D. E. HOSTETLER & G. M. BARRINGTON.** 2000. Passive Transfer of Colostral Immunoglobulins in Calves. *J. Vet. Intern. Med.*, 14:569-577
- YEHUDA, R.; M. H. TEICHER; R. L. TRESTMAN; R. A. LEVENGOOD & L. J. SIEVER.** 1996. Cortisol regulation in posttraumatic stress disorder and major depression. A chronobiological analysis. *Biol. Psychiatry*, 40: 79-88.