

## HAPTOGLOBINA COMO INDICADOR DE ESTRÉS EN VACAS DE LIDIA

Haptoglobin as an indicator of stress in lidia breeding cows

J. I. Seva<sup>1\*</sup>, J. S. Martínez<sup>3</sup>, S. Martínez-Subiela<sup>2</sup>, F. J. Pallarés<sup>1</sup>, J. J. Cerón<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Histología y Anatomía Patológica, <sup>2</sup>Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria Universidad de Murcia. 30100 Campus de Espinardo, Espinardo, Murcia. <sup>3</sup>Veterinario Plaza de toros de Cieza, Murcia.

\*Autor para correspondencia: Juan Ireño Seva. Tel: +34968364701. Email: jseva@um.es

### RESUMEN

Se ha estudiado la influencia del estrés físico y psicológico sobre las concentraciones plasmáticas de la proteína de fase aguda haptoglobina (Hp) en 20 vacas de raza bovina de lidia de 3 a 6 años de edad. Los animales se dividieron en 4 grupos, el primero, utilizado como control, corresponde a vacas en la ganadería sin estimulación aparente, los tres grupos restantes corresponden a vacas que se utilizaron en encierros tradicionales y que fueron sacrificados a las 30, 54 y 78 horas de la celebración del espectáculo. Las concentraciones medias de Hp en suero para las vacas control fueron 0,093 g/l y 0,13 g/l a las 30h, 0,19 g/l a las 54 h y 0,5 g/l a las 78 h de la celebración del encierro. Estos resultados indican que en los encierros tradicionales se estimula la producción de Hp en vacas de lidia, presentando valores estadísticamente significativos a partir de las 54 horas de la realización del mismo y situándose los valores máximos a las 78 horas. Como conclusión, hemos de considerar que en situaciones de estrés en vacas de lidia los niveles de Hp en plasma son superiores a los normales y estos parámetros podrían ser utilizados como un indicador del nivel de estrés sufrido por el animal.

**Palabras clave:** Toro lidia, encierro, haptoglobina, estrés.

### ABSTRACT

The influence of physical and psychological stress on the concentration in plasma of the acute phase protein haptoglobin (Hp) was studied in 20 fighting cows aged 3 to 6 years. Four groups were prepared, the first one or control group comprised livestock with no apparent stimulation. The other groups corresponded to animals of traditional bull running that were sacrificed at 30, 54 and 78 h after the end of the spectacle. The mean serum Hp concentration from control fighting cows was 0,093 g/l, while it was 0,13 g/l at 30h, 0,19 g/l at 54 h and 0,5 g/l at 78 h after the end of the spectacle. These results show that in the traditional bull running, Hp concentration

is elevated and significant differences are observed at 54 h, although the maximum levels appeared at 78 h. In conclusion, in fighting cows the serum hp concentration was more elevated due to a situation of physical and psychological stress and may be a useful indicator of stress levels in the animal.

**Key words:** Lidia, bull running, haptoglobin, stress.

## INTRODUCCIÓN

El estrés sufrido por los animales domésticos puede ser de dos tipos: físico y psicológico. Pueden padecer estrés físico por hambre, sed, fatiga, lesiones y temperaturas extremas, mientras que estrés psicológico por manejos inadecuados, restricción en su movimiento o situaciones novedosas (Gradin, 1997). Entre las situaciones responsables de producir estrés psicológico en bovino hemos de considerar alteraciones en las ganaderías por cambios en las condiciones de manejo o en las instalaciones y situaciones como el transporte y exposición a nuevos ambientes. En el toro de lidia hay que añadir las situaciones que se plantean en el transcurso de los espectáculos taurinos para los que son utilizados los animales. Además el toro de lidia constituye uno de los animales que más fácilmente sufre estrés, debido a su carácter, seleccionado a lo largo de tiempo y de los sistemas extensivos de producción (Zavy et al., 1992; Gradin, 1997).

Las proteínas de fase aguda (PFA) son un grupo de glicoproteínas hepáticas, entre las que se encuentran la haptoglobina (Hp), ceru-

loplasma, Amiloide A sérico y proteína C reactiva. Entre sus principales funciones destaca la de favorecer la producción de inmunoglobulinas y reparación de daños tisulares (Kent, 1992). Estas proteínas son estimuladas por mediadores de la inflamación, y forman parte de la respuesta inicial frente a infecciones, traumatismos y procesos como el estrés (Alsemgeest et al., 1995; Chan et al., 2004; Grönlund et al., 2005).

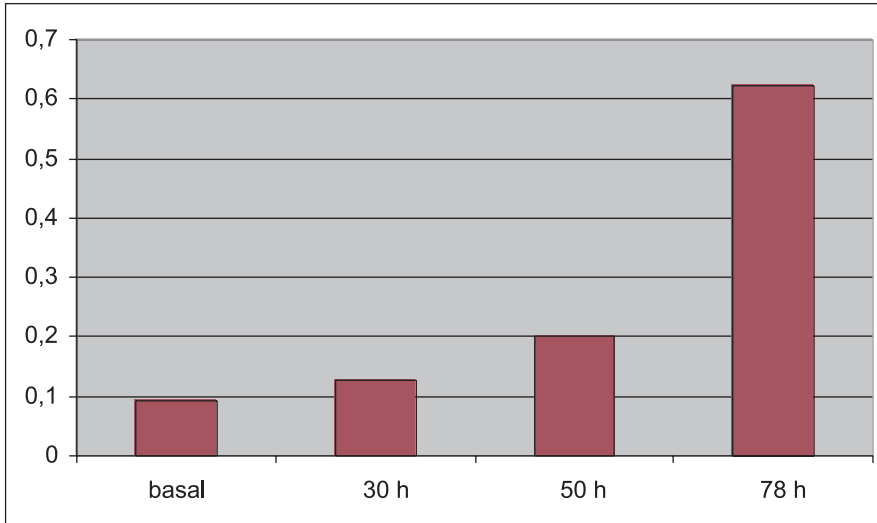
La Hp es una glicoproteína  $\alpha_2$  que participa en el transporte de la hemoglobina. Se trata de una de las PFA más sensibles que se producen en el bovino (Chan et al., 2004). Así las concentraciones de Hp pueden incrementarse en más de 100 veces a las 24 horas de haber sufrido un proceso inflamatorio (Conner et al., 1988). En esta especie existen pocos estudios sobre las concentraciones de Hp en suero de animales sometidos a procesos de estrés, para Alsemgeest et al. (1995) mientras el amiloide A aumenta, la Hp se mantiene en los mismos niveles en respuesta al estrés físico.

En bovino las concentraciones varían entre los diferentes estudios realizados, en función de determinadas características como época del

Cuadro 1. Concentración de haptoglobina (g/l) en suero de las vacas de lidia.

Controles	Lote I. 30 h.	Lote II. 54 h.	Lote III. 78 h.
0,09	0,11	0,14	0,91
0,054	0,13	0,22	0,63
0,072	0,12	0,19	0,43
0,081	0,12	0,23	0,42
0,17	0,15	0,23	0,69
0,093 ± 0,04	0,126 ± 0,01	0,202 ± 0,04	0,616 ± 0,2

**Figura 1. Evolución en el tiempo (horas) de la concentración de haptoglobina (g/l) en suero de vacas de lidia tras concluir el encierro.**



año y características higiénico-sanitarias de los animales. La mayoría de los autores consideran que las concentraciones en sangre de Hp en condiciones normales, y por tanto considerados valores basales, han de ser inferiores a 0,05 g/l (Skinner et al., 1991; Chan et al., 2004). La liberación de Hp comienza en las primeras horas tras la actuación de los agentes responsables de estimular su producción, aunque hasta las 24 horas no se detectan valores en sangre superiores a los valores basales, estableciéndose en el caso de procesos infecciosos agudos niveles máximos entre las 54-100 horas post-infección (Grönlund et al., 2005).

El objetivo de este estudio es cuantificar los niveles de Hp presentes en el ganado de lidia, para considerarlos parámetros basales, y determinar los niveles de Hp en animales que se corren en encierros tradicionales, con el fin de utilizar estos parámetros como indicador del estrés sufrido por los mismos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras empleadas en este estudio fueron de 20 vacas de la raza bovina de lidia de entre 3 y 6 años de edad. Los animales fueron divididos en 4 lotes de 5 animales cada uno de ellos. Uno como lote control, donde se extrajo sangre a los animales en la ganadería sin estímulos aparentes y 3 lotes de animales sacrificados a 30, 54 y 78 horas de la celebración del encierro tradicional. Estos animales utilizados en los encierros, estuvieron estabulados en corrales 24 horas antes del festejo. Los encierros tradicionales consistían en la suelta de los animales por un recorrido urbano de 1 km con la presencia de público, que corría junto a ellos, y una duración aproximada de 30 minutos. Posteriormente fueron trasladados al matadero para su sacrificio. Estos fueron inspeccionados ante y postmortem, no observándose signos de procesos infecto-contagiosos en ninguno de ellos.

De cada uno de los animales se tomaron muestras de sangre, al primer lote en la ganadería y a los tres restantes tras el sacrificio en matadero. En el primer lote los animales fueron sangrados por medio de venopunción coxígea y en los restantes por la sección de las venas yugulares en el matadero. Las muestras fueron recogidas en tubos con vacío sin anticoagulante Vacutainer Becton Dickinson™. Posteriormente fueron desueradas por centrifugación y fueron almacenadas en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis. Dado que la hemólisis puede interferir en los resultados de determinación de Hp (Eckersall et al., 1999), se midió la hemoglobina en el analizador Abacus Junior Vet (CVM analítica, Navarra, España) comprobándose que todas las muestras presentaban valores de hemoglobina que no causaban ningún tipo de interferencia en la medición ( $Hb < 0,4$  mm/L) (Verheyen et al., 2007).

Existen varios métodos para purificación y cuantificación de la Hp (Nakagawa et al., 1997), en este trabajo se ha implementado el uso de un método enzimático con posterior registro colorimétrico en ganado de lidia, utilizando el Phase™ Range Haptoglobin Assay. Dicho método se basa en la actividad peroxidasa que muestra la hemoglobina libre, la cual es inhibida a pH ácido, por lo que la Hp presente en nuestras muestras problema se combina con la hemoglobina y preserva su actividad peroxidasa en pH ácido, de tal forma que la actividad peroxidasa existente es directamente proporcional a la cantidad de Hp existente en los especímenes. Para calibrar el procedimiento se hizo un patrón con cinco concentraciones de Hp: 2,0 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml y 0 mg/ml. El ensayo se realizó a una temperatura estable de 25°C.

El estudio estadístico consistió en la realización de un diagrama de cajas con diversas medidas de centralización, media, mediana y cuartiles para valorar la dispersión de las medidas y si existían diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ). Igualmente se realizó

un modelo de regresión polinómica de segundo orden, con el que se calculó la ecuación de ajuste de los datos.

## RESULTADOS

Los valores en suero de Hp obtenidos en los bovinos de lidia estudiados se reflejan en el cuadro 1. La producción de Hp se incrementa al pasar las horas tras el encierro, presentando valores estadísticamente significativos a partir de las 54 horas de la realización del mismo, como se muestra en el diagrama de barras (Figura 1).

El diagrama de cajas de la figura 2 muestra la variable Hp (g/l) con diversas medidas de centralización, media, mediana y cuartiles que confirman la escasa dispersión de las medidas y la diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ). Sobre las cajas las letras diferentes indican diferencia estadística y a la inversa.

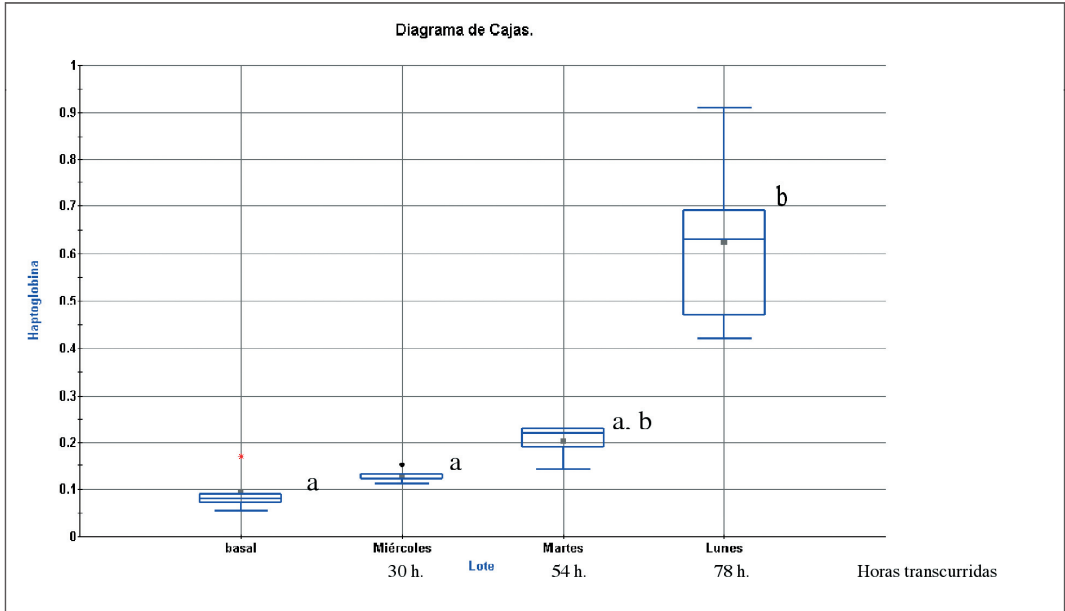
El modelo de regresión polinómica de segundo orden:  $Hp \text{ (g/l)} = 0.0002 \cdot \text{horas}^2 - 0.0055 \cdot \text{horas} + 0.1063$  demostró una elevada bondad de ajuste (para datos tomando como límite las 78 horas) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del mismo fue 81.96 (82%).

## DISCUSIÓN

El presente trabajo ha sido realizado con animales de la raza autóctona española, bovino de lidia, que han sido utilizados en encierros tradicionales. Aunque se trata de espectáculos taurinos, en este tipo de festejos los animales no sufren ningún tipo de maltrato, pues simplemente corren en un circuito preparado por las calles del pueblo, junto a personas, estando prohibido que sean agredidas e incluso que se les toque en el transcurso del encierro.

La técnica de detección de Hp empleada en nuestro estudio, Phase™ Range Haptoglobin Assay (Tridelta, USA), muestra su utilidad para la aplicación al toro de lidia, al igual que en otras especies (Tecles et al., 2007).

Figura 2. **Mediana, máximos, mínimos y cuartiles de la concentración (g/l) de haptoglobina en suero de vacas de lidia tras concluir el encierro.**



Los valores medios de Hp para el bovino de lidia fueron de 0,093 g/l, valores superiores a los encontrados en los estudios realizados en otras razas bovinas donde son inferiores a 0,05 g/l (Skinner et al., 1991; Chan et al., 2004). Aunque no sean valores estadísticamente significativos, se aprecia una tendencia que nos indica que en el toro de lidia hay una mayor liberación de Hp que en otras razas. Estos hechos estarían en concordancia con la idea de que se trata de animales que han sido seleccionados por su comportamiento, y que su respuesta a estímulos externos es mayor que en animales de otras razas bovinas, que presentan un carácter más linfático (Zavy et al., 1992). Además el hecho de haber sido criados en sistemas extensivos y con un manejo característico donde la presencia del hombre se evita en lo posible, les hace que

presenten mayores niveles de respuesta a situaciones cambiantes o estrés psicológico que los animales criados en sistemas intensivos (Gradin, 1997).

Los niveles de Hp encontrados en todos los animales estudiados tras los encierros son superiores a los observados en bovino de lidia en condiciones normales, lo que nos indicaría que durante el transporte y el desarrollo del encierro se producen unas condiciones que originan una producción de Hp. Al tratarse de animales donde no hemos observado procesos inflamatorios agudos o crónicos, ni traumatismos hemos de considerar que este aumento viene determinado por el estrés físico y psicológico al que se someten (Alsemgeest et al., 1995), pudiendo incluir el sufrido en el encierro y el del transporte de los mismos al festejo y al matadero. Los estudios realizados sobre

valores de Hp en suero como consecuencia del transporte en otras razas bovinas indican niveles muy bajos y siempre menores de 0,15 g/l, valores similares a los encontrados en nuestro estudio a las 30 h (Arthington et al., 2003). Así habría que considerar que el transporte podría influir ligeramente en los valores encontrados en este estudio, ya que las vacas fueron transportadas al festejo y con posterioridad al matadero, pero los niveles más altos encontrados asegurarían que la Hp es liberada en el transcurso de los encierros.

La curva de liberación de Hp que se observa como consecuencia del estrés físico y psicológico al que han sido sometidos los animales en los encierros son coincidentes con los estudios en procesos infecciosos agudos (Grönlund et al., 2005), apareciendo diferencias significativas a partir de las 54 horas, aunque en nuestro estudio los valores máximos se sitúan más tarde, a partir de las 78 horas. Los valores encontrados de Hp en suero son normalmente inferiores a los encontrados en procesos infecciosos agudos, aunque en ocasiones son superiores a determinados procesos subagudos o crónicos (Skinner et al., 1991; Grönlund et al., 2005).

Como conclusión podemos decir que aunque no existan diferencias estadísticas, los niveles de Hp en el suero de vacas de lidia tienen tendencia a ser superiores a los encontrados en otras razas bovinas. Además en los encierros tradicionales se estimula la producción de Hp en vacas de lidia y los niveles van aumentando al pasar las horas de la celebración del encierro, apareciendo los valores máximos a partir de 78 horas. Por lo que hemos de considerar que en situaciones de estrés en estos animales los niveles de Hp son superiores a los normales y estos parámetros podrían ser utilizados como un indicador del nivel de estrés sufrido por el animal. Aunque habría que realizar estudios posteriores con el fin de delimitar el porcentaje atribuido al transporte de los animales.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALSEMGEEST, S.P., LAMBOOY, I.E., WIRENGA, H.K., DIELEMAN, S.J., MEERKERK, B., VAN EDEREN, A.M., NIEWOLD, T.A. 1995. Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) in calves. *Vet. Q.* 17: 9-12.
- ARTHINGTON, J.D., EICHER, S.D., KUNKLE, W.E., MARTIN, F.G. 2003. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *J. Anim. Sci.* 18: 1120-1125.
- CHAN, J.P., CHU, C.C., FUNG, H.P., CHUANG, S.T., LIN, Y.C., CHU, R.M., LEE, S.L. 2004. Serum haptoglobin concentration in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 66 (1): 43-46.
- CONNER, J.G., ECKERSALL, P.D., WISEMAN, A., AITCHISON, T.C., DOUGLAS, T.A. 1988. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Res. Vet. Sci.* 44: 82-88.
- GRADIN, T. 1997. Assessment of stress during handling and transport. *J. Anim. Sci.* 75: 249-257.
- ECKERSALL, P. D., DUTHIE, S., SAFI, S., MOFFATT, D., HORADAGODA, N.U., DOYLE, S. PARTON, R., BENNETT, D., FITZPATRICK, J.L. 1999. An Automated Biochemical Assay for Haptoglobin: Prevention of Interference from Albumin. *Comparative Haematology International* 9:117-124.
- GRÖNLUND, U., SANDGREN, C.H., WÄLLER, K.P. 2005. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Vet. Res.* 36 (2): 191-198.
- KENT, J.E. 1992. Acute phase proteins: Their use in veterinary diagnosis. *Br. Vet. J.* 148: 279-282.
- NAKAGAWA, H., YAMAMOTO, O., OKAWA, S., HIGUCHI, H., WATANABE,

- A., KATOH, N. 1997. Detection of serum haptoglobin by enzyme-linked immunosorbent assay in cows with fatty liver. *Res. Vet. Sci.* 62: 137-141.
- FUENTES, P., CABEZAS HERRERAS, J., CERÓN, J.J., MARTÍNEZ, J.S., RAMIS, G. PARRA, M.D. European colloquium of Acute phase proteins. Dublin 14<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> March 2005.
- SKINNER, J.G., BROWN, R.A.L., ROBERTS, L. 1991. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *Vet. Rec.* 128: 147-149.
- TECLES, F., FUENTES, P., MARTÍNEZ-SUBIELA, S., PARRA, M.D., MUÑOZ, A., CERÓN, J.J. 2007. Analytical validation of commercially available methods for acute phase proteins quantification in pigs. *Res. Vet. Sci.* 83: 133-139.
- VERHEYEN, A.J., MAES, D.G., MATEUSEN, B., DEPREZ, P., JANSSENS, G.P., DE LANGE L., COUNOTTE, G. Serum biochemical reference values for gestating and lactating sows. *Vet J.* 2007 174: 92-8.
- ZAVY, M.T., JUNIEWICZ, P.E., PHILLIPS, W.A., VON TUNGELEN, D.L. 1992. Effects of initial restraint, weaning y transport stress on baseline and ACTH stimulated cortisol responses in beef calves of different genotypes. *Am. J. Vet. Res.* 53: 551-557.

