

Cortisol fecal em ovinos: curva de excreção e estabilidade

Lina Fernanda Pulido Rodríguez¹, Ana Luisa Silva Longo², Henrique Barbosa Hooper³, Alfredo Manuel Franco Pereira⁴, Cristiane Gonçalves Titto⁶ Evaldo Antonio Lencioni Titto⁵

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia-Laboratório de Biometeorologia e etologia animal. FZEA/USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga-SP. lfpulido@usp.br

² Mestra em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia-Laboratório de Biometeorologia e etologia animal. FZEA/USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga-SP. analuisalongo@usp.br

³ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia-Laboratório de Fisiologia animal. FZEA/USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga-SP. henriquehooper@usp.br

⁴ Professor Associado do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora. alfmpereira@gmail.com

⁵ Professora Associada do Departamento de Zootecnia-Laboratório de Biometeorologia e etologia animal. FZEA/USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga-SP. crisgtitto@usp.br

⁶ Professor Titular do Departamento de Ciências Básicas-Laboratório de Biometeorologia e etologia animal. FZEA/USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga-SP. titto@usp.br

Resumo

Objetivou-se determinar a curva de excreção do cortisol fecal perante exposição a uma situação de estresse, correlacionando com concentrações de cortisol sanguíneo. Foram colhidas as fezes de seis fêmeas mestiças (Dorper x Santa Inês) durante 24 horas após a aplicação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), além de colheitas de sangue realizadas antes da aplicação do ACTH (0,6 UI por kg PV, Porcine ACTH 1-24, Sigma, St. Louis, MO, USA), 60, 120 e 300 minutos depois. Os dados da curva de excreção foram analisados por ANOVA, bem como pela correlação entre os valores de cortisol sanguíneo, fecal e reatividade. Para avaliação das variáveis comportamentais foi realizada a transformação de escala dos dados para “arco-seno raiz de porcentagem”, procedendo-se à análise de variância com efeitos de dia (1, 2 e 3) com análise individual por animal. Os parâmetros de cortisol sanguíneo, frequência respiratória e temperatura retal foram analisados pelo teste t e correlação de Pearson. Todas as comparações de médias foram realizadas por teste F e teste t (PDIFF). A reatividade durante a colheita não exerceu efeito significativo sobre os valores de cortisol sanguíneo. Os valores de cortisol sanguíneo apresentaram médias maiores aos 60 minutos após a aplicação do ACTH e, após 300 minutos as ovelhas apresentaram níveis de cortisol considerados normais para ovinos sem estresse. Por outro lado, o pico de cortisol nas fezes foi verificado aproximadamente 10 a 12 horas após o pico de cortisol no sangue, não sendo verificadas diminuições significativas nas concentrações que indicassem o retorno aos níveis basais durante o período de 24 horas ($P > 0,05$).

Palavras chaves: indicadores de estresse, cordeiros, cortisol.

Os autores deste trabalho são os únicos responsáveis por seu conteúdo e são os detentores dos direitos autorais e de reprodução. Este trabalho não reflete necessariamente o posicionamento oficial da Sociedade Brasileira de Biometeorologia (SBBiomet).

The authors of this paper are solely responsible for its content and are the owners of its copyright. This paper does not necessarily reflect the official position of the Brazilian Society of Biometeorology (SBBiomet).

Introdução

O estresse é caracterizado como mecanismo de reação frente a situações aversivas associadas a fatores ambientais, sociais ou de manejo. O desequilíbrio da homeostase por causa do estresse é determinado por respostas comportamentais e fisiológicas dos animais, podendo provocar falhas em processos imunológicos, reprodutivos e de crescimento. A resposta endócrina ao estresse envolve a secreção do hormônio liberador de corticotropina e subsequente produção do hormônio adrenocorticotrófico, o qual estimula a secreção do cortisol pela glândula adrenal, sintetizado a partir do colesterol (YEAGER; GUYRE; MUNCK, 2004). Com o objetivo de refletir o estado fisiológico de um indivíduo durante ou após uma situação de estresse, diversas metodologias são aplicadas ao estudo da dosagem de glicocorticoides, sendo algumas consideradas de caráter invasivo. A quantificação dos níveis de cortisol sanguíneo é considerada um importante indicador do estresse em ovinos, no entanto, a necessidade de contenção durante a colheita pode gerar um estresse adicional, produzindo reações de fuga ou defesa naturais da espécie. Além disso, tais procedimentos se tornam impossíveis ou até mesmo perigosos quando se trata do estudo de animais selvagens, sendo de grande importância a utilização de métodos não invasivos para a avaliação da função adrenal destes indivíduos (PALME; MÖSTL, 1996). A obtenção de uma estimativa do cortisol através de sua recuperação nas fezes garante uma melhor precisão dos dados, evitando possíveis interferências que possam afetar nos resultados. Entretanto, as fezes muitas vezes não podem ser obtidas no exato momento da defecação, sendo de extrema importância estabelecer intervalos de tempo confiáveis e assim poder determinar a estabilidade do cortisol fecal diante de diferentes condições de temperatura ambiente. Por outro lado, a quantificação da curva de excreção do cortisol após o estímulo estressor permite determinar em qual momento os metabólitos estarão presentes nas fezes, diminuindo a possibilidade do cortisol resultante ainda não estar totalmente contido no bolo fecal do animal, visto que alterações decorrentes do metabolismo são verificadas em relação às espécies. O objetivo deste estudo foi compreender o mecanismo de excreção do cortisol fecal após o estímulo estressor, como metodologia não invasiva para determinação do estresse em ovinos.

Material e Métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FZEA/USP, protocolado sob o CEUA n° 2231260116.

Foram utilizadas seis fêmeas mestiças das raças Dorper x Santa Inês com peso corporal dos animais 32.8 ± 1.4 kg e seis meses de idade. Os procedimentos de pesagem, seleção e embarque dos animais foram realizados no Biotério do Laboratório de Biometeorologia e Etologia (FZEA/USP), Posteriormente, os animais foram transferidos para um galpão experimental anexo ao edifício Noé Mazotti (FZEA/USP) e alojados em gaiolas metabólicas individuais e contíguas durante três dias, de forma a permanecerem com contato olfativo e visual, diminuindo o estresse devido à supressão social. As gaiolas eram providas de piso ripado, bebedouro e comedouro, com dimensões de 118x57x70cm. O galpão era construído em alvenaria, com cobertura de telha de barro e comprimento de 17m, largura de 8,5m e altura de pé-direito de 4m. As variáveis meteorológicas de temperatura do ar, umidade relativa e temperatura do globo negro, foram registradas a cada 30 minutos durante todo o período de colheita de dados através de um data logger (Onset HOBO® temp/RH/2 ext channels) instalado dentro do galpão.

Para o fornecimento de ração foi adotado um período de adaptação de dois dias antes da data de colheita, com acesso a água e alimento ad libitum. A alimentação era constituída por silagem de milho como alimento volumoso, e concentrado composto por milho grão moído (63,10%), farelo de soja (31,10%), calcário (0,80%) e núcleo vitamínico mineral (5,00%). No terceiro dia, uma quantidade pequena de alimento foi fornecida a cada 4 horas, sendo possível realizar a reposição com o mínimo de desperdício, com o intuito de fazer com que os animais se dirigissem à comida o maior número de vezes possível, aumentando a chance de ocorrer defecação várias vezes ao dia. A avaliação do comportamento individual foi realizada durante os 3 dias de alojamento nas gaiolas, das 13 às 18 horas (5 horas diárias). Os observadores foram treinados e possuíam conhecimento dos comportamentos próprios da espécie. Os parâmetros comportamentais de postura foram registrados pela observação direta, por rota de amostragem focal, registro instantâneo com intervalo amostral de 5 minutos e as atividades por registro contínuo (MARTIN; BATESON, 1993). As posturas analisadas foram em pé e deitado, e as atividades observadas foram ingerir, ruminar, ócio, beber, estereotípias, grooming, vocalização e agressão. Durante as colheitas de sangue foram atribuídos escores de reatividade para cada animal, a fim de identificar possíveis interações da contenção com os níveis de cortisol obtidos, sendo o escore 1 para animais calmos (animais que não

geravam resistência ou tentativa de fuga), 2 Animais se debatem no momento da contenção mas logo se acalma e 3 o animal continua relutante, com necessidade de fazer força para contê-lo.

No terceiro dia, na hora 0 (07:00h) foi injetado por via intravenosa o ACTH (0,6 UI por kg PV, Porcine ACTH 1-24, Sigma, St. Louis, MO, USA). Uma amostra de fezes de cada animal foi colhida antes da aplicação do ACTH e, posteriormente, todos foram observados continuamente, sendo recolhidas as fezes totais sempre que algum animal defecasse. Como os animais estavam sob observação constante, geralmente, as amostras eram colhidas antes mesmo de entrar em contato com o chão da gaiola. No entanto, foram colocados coletores abaixo do piso onde as fezes poderiam ser recolhidas caso caíssem. Os coletores foram cobertos com pedaços de papel cartão a fim de facilitar a limpeza desta estrutura. Além disso, a utilização de luvas era obrigatória, sendo as mesmas trocadas frequentemente, a fim de evitar o contato com as fezes colhidas. Foram colhidas durante 24 horas as amostras de fezes e imediatamente armazenadas em freezer a temperatura de 20°C, de acordo com procedimento descrito por Palme e Möstl (1997).

As amostras de sangue de cada animal foram distribuídas da seguinte forma: uma colheita antes da aplicação do ACTH, e colheitas subsequentes aos 60, 120 e 300 minutos após a mesma. O sangue foi colheitado em tubos secos mantidos em gelo. Logo após a colheita o mesmo era centrifugado a 1500 x g, a 4°C, durante 15 minutos, e o soro acondicionado em tubos e estocado a -20°C para posterior análise. As análises para determinação do cortisol fecal foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal (FZEA/USP), utilizando-se o kit comercial Cortisol ELISA (ADI900-071, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). As amostras de cortisol sanguíneo foram centrifugadas e, posteriormente, enviadas para laboratório comercial, tendo sua dosagem quantitativa avaliada a partir do método de eletroquimioluminescência.

Para análise da curva de excreção do cortisol nas fezes foi utilizada a análise descritiva dos dados por mediana e intervalo entre primeiro e terceiro quartil. Foi realizada análise de variância com efeito fixo de horas após a aplicação do ACTH e também correlação de Pearson entre os valores de cortisol sanguíneo e fecal. Para os dados de comportamento foram realizadas análises exploratórias utilizando o modelo ajustado à teoria de modelos lineares generalizados, com o procedimento GLIMMIX do software SAS. Para avaliação das variáveis comportamentais foi realizada a transformação de escala dos dados para “arco-seno raiz de porcentagem”, procedendo-se à análise de variância. O modelo estatístico contemplou os efeitos de dia (1, 2 e 3) com análise individual por animal, com o procedimento para comparações múltiplas com as médias transformadas pelo teste F e teste t (PDIFF). O efeito da reatividade durante a colheita de sangue nas dosagens de cortisol sanguíneo por variância e correlação de Pearson. Na análise do cortisol sanguíneo durante o experimento 1 utilizou-se os tempos como efeito fixo (0, 60, 120 e 300 minutos) e comparação de médias por PDIFF. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa Statistical Analysis System®, versão 9.2 (SAS, 2008), a 5% de significância.

Resultados e Discussão

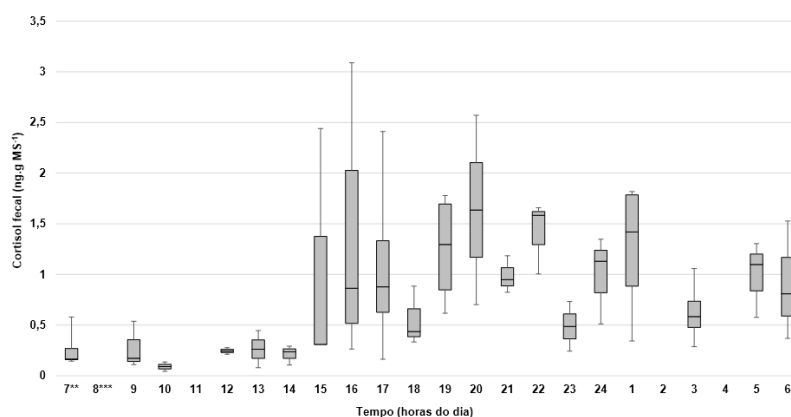
As frequências dos comportamentos de ingestão, ruminação e ócio não diferiram entre as datas para a maioria dos animais ($P > 0,05$). Em contrapartida, em relação ao comportamento deitado, foram observadas diferenças ($P < 0,05$) em todos os animais durante o período de avaliação. Não houve diferenças ($P > 0,05$) para os demais comportamentos analisados (beber, grooming, agressão e estereotipias), exceto para vocalização ($P < 0,05$).

A correlação entre os escores médios de reatividade e os valores de cortisol sanguíneo foi negativa ($r = -0,14$), indicando que, neste caso, o manejo de contenção não gerou estresse adicional significativo em nenhum dos horários. Os resultados obtidos neste estudo podem ser explicados pelo fato dos animais já estarem habituados às pessoas que executaram as atividades de contenção e colheita, visto que os mesmos são manejados com frequência desde o nascimento.

Observou-se maior concentração média de cortisol 60 minutos após a aplicação do ACTH (15,25 ng.mL⁻¹), que apresentou uma tendência decrescente, seguida dos valores aos 120 (6,91 ng.mL⁻¹) e 300 minutos (2,04 ng.mL⁻¹), quando os animais já apresentavam níveis considerados normais para ovinos sem estresse. A concentração média de cortisol sérico em ovinos encontra-se entre 6 e 14 ng.mL⁻¹ (ENCARNAÇÃO, 1989), podendo apresentar níveis mais baixos, entre 1,1 e 3,7 ng.mL⁻¹, os quais, segundo Silva, Kaltenbach e Dunn (1983) são considerados normais. Semelhantes no padrão de liberação de cortisol após a administração de ACTH, as fezes oferecem a possibilidade de definir somente reações de estresse agudo (FULKERSON; JAMIESON, 1982), uma vez que níveis de glicocorticoides em fluidos corporais podem voltar ao normal ou quase normal quando um estressor não persiste (REHBINDER; HAU, 2006).

As concentrações de cortisol fecal para cada horário, durante 24 horas, estão representadas no gráfico 1.

Gráfico 1. Boxplot * de concentrações agrupadas de cortisol fecal encontradas antes e após a aplicação do ACTH (**).



* Gráficos Boxplot demonstram as medianas, o primeiro e terceiro quartil (25% e 75%), bem como os extremos (valor mais alto e mais baixo observado). ** Aplicação do ACTH *** Pico de cortisol sanguíneo

Os valores para os tempos 08, 11, 02 e 04 não foram incluídos devido ao número insuficiente de amostras para análise. Valores mais altos de concentração do cortisol fecal puderam ser observados às 19h00 e 20h00 do dia. O pico de cortisol sanguíneo ocorreu 60 minutos após a administração do ACTH. Apesar do valor de mediana para o horário das 22 horas ser próximo ao observado às 19h00 e 20h00, a distribuição dos dados ocorre de forma assimétrica, demonstrando uma maior quantidade de dados com valores abaixo da tendência central apresentada. Desta forma, no período de 11 a 12 horas após o pico de cortisol sanguíneo, verifica-se uma maior simetria e homogeneidade nos dados, confirmando que os animais tiveram padrões de excreção semelhantes. Além disso, apesar das oscilações dos valores dentro do período de 24 horas de avaliação, não foram verificadas diminuições nas concentrações que indicassem o retorno aos níveis basais ($P > 0,05$), apesar das medianas observadas nos horários das 18 e 23 horas. Tais resultados corroboram com os de Palme et al. (1999) que verificaram concentrações superiores de metabólitos fecais de bovinos e ovinos aproximadamente 10 horas (6 a 18,7 horas) após o pico de cortisol plasmático, retornando aos níveis basais entre 18 e 44 horas.

Verifica-se uma alta correlação entre a concentração de cortisol fecal e sanguíneo 10 horas após o pico de cortisol sérico ($r = 0,50$; $p < 0,05$), seguida de correlações muito próximas às 8 horas ($r = 0,43$; $P < 0,05$) e 12 horas ($r = 0,42$; $P < 0,05$). Da mesma forma, maiores correlações puderam ser observadas dentro deste intervalo, sendo $r = 0,87$; $P < 0,05$ (8 e 12 horas), $r = 0,94$; $P < 0,05$ (8 e 10 horas) e $r = 0,77$; $P < 0,05$ (10 e 12 horas). Estudos conduzidos com vacas leiteiras recebendo ACTH sintético através de cateter relataram que os glicocorticoides de metabólitos fecais começaram a apresentar aumentos significativos 8 horas após a infusão do ACTH, apresentando picos entre as 14 e 18 horas, e permanecendo com valores elevados durante 16 horas (11,9 a 18,5 horas) (MORROW et al., 2002). Morrow et al. (2002) também verificaram o efeito do transporte sobre a concentração de metabólitos de cortisol nas fezes às 6, 24 e 30 horas depois, observando um aumento significativo nos valores às 6 horas, retornando aos níveis basais 24 horas após o transporte.

O intervalo entre o aumento de glicocorticoides no sangue e seu reflexo nas fezes está relacionado ao tempo de passagem intestinal (PALME, MÖSTL, 1996), o qual é influenciado pelo indivíduo e demais fatores como, por exemplo, o tipo de dieta e a ingestão de alimento, o maior consumo de fibra aumenta a excreção de metabólitos fecais de esteroides (DANTZER et al., 2011), o que pode ser atribuído ao aumento do tempo de transição de materiais ingeridos, desde o duodeno até ao reto. Isso se dá pelo fato de que hormônios não ligados ao plasma são metabolizados pelo fígado e excretados para o intestino através dos canais biliares (TAYLOR, 1971). Desta forma, presume-se que um aumento na frequência de defecação, devido ao aumento do consumo de fibras dietéticas pode diminuir a reabsorção de metabólitos no intestino delgado e, portanto, causar um aumento na excreção de metabólitos fecais de esteroides (GOLDIN et al. 1982). Por outro lado, El-Bahr e Albokhadaim (2014), verificou que as bactérias presentes no intestino são capazes de alterar a estrutura destes esteroides, revelando um metabolismo rápido. Segundo Mormède et al. (2007), as variações individuais também podem surgir a partir de influências ambientais.

Conclusões

A variação individual observada no padrão de excreção do cortisol fecal dificulta a determinação de respostas concretas frente a uma situação de estresse agudo. A quantificação do cortisol sanguíneo apresentou variações acentuadas entre os animais, porém, menores que as observadas nas amostras fecais, não justificando a substituição de metodologia proposta.

Referências

- DANTZER, B. et al. (2011). How do diet affect fecal steroid hormone metabolite concentrations? Na experimental examination in red squirrels. *General and Comparative Endocrinology*. Toronto, v. 174, n. 2, p. 124-131.
- ENCARNAÇÃO, R. O. Estresse e produção animal. In: *CICLO INTERNACIONAL DE PALESTRAS SOBRE BIOCLIMATOLOGIA ANIMAL*, 1. 1989, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FUNEP, 1989, p. 111-129.
- EL-BAHR, S. M.; ALBOKHADAIM, I. F. (2014). In vitro metabolic changes of glucocorticoids added to the faeces of ruminants. *International Journal of Biological Chemistry*. New York, v. 9, n. 1, p. 30-37,
- FULKERSON, W. J.; JAMIESON, P. A. (1982). Pattern of cortisol release in sheep following administration of synthetic ACTH or imposition of various stressor agents. *Australian Journal of Biological Sciences*. Clayton, v. 35, n. 2, p. 215-222.
- GOLDIN, B. R. et al. (1982). Estrogen excretion patterns and plasma-levels in vegetarian and omnivorous women. *New England Journal of Medicine*. Waltham, v. 307, p. 1542–1547.
- MARTIN, P.; BATESON, P. 1993. *Measuring Behaviour: an introductory guide*. 2. ed. Cambridge University Press: Cambridge, 222 p.
- MORMÉDE, P. et al. (2007). Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology and Behaviour*, v. 92, n. 3, p. 317-339.
- MORROW, C. J. et al. (2002). Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *General and Comparative Endocrinology*. Toronto, v. 126, p. 229-241.
- PALME, R.; MÖSTL, E. (1997) Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *International Journal of Mammalian Biology*. Muenchen, v. 62, p. 192 - 197.
- PALME, R.; MÖSTL, E. (1996). Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *International Journal of Mammalian Biology*. Muenchen, v. 62, n. 2, p. 192-197.
- REHBINDER, C.; HAU, J. (2006). Quantification of cortisol, cortisol immunoreactive metabolites, and immunoglobulin A in serum, saliva, urine, and feces for noninvasive assessment of stress in reindeer. *Canadian Journal of Veterinary Research*. Ottawa, v. 70, n. 2, p. 151-154.
- SILVA, M.; KALTENBACH, C. C.; DUNN, T. G. (1983). Serum cortisol and progesterone after administration of adrenocorticotrophin and (or) prolactina to sheep. *Journal of Animal Science*. Savoy, v. 57, p. 1525-1529.
- TAYLOR, W. (1971). The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. *Vitamins e Hormones*. Maryland Heights, v. 29, p. 201–285.
- YEAGER, M. P.; GUYRE, P. M.; MUNCK, A. U. (2004). Glucocorticoid regulation of the inflammatory response to injury. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. Hoboken, v. 48, n. 7, p. 799 - 813.