

ESTRESSE CRÔNICO EM OVELHAS OVARIETOMIZADAS

(Cronic stress in ovariectomized ewes)

Angela Maria Xavier ELOY¹ & Richard RODWAY²

¹EMBRAPA/CNPC Caixa Postal D-10, Sobral, Brasil; CEP 62.011-970, e-mail angela@cnpic.embrapa.br

²University of Leeds; Department of Animal Physiology and Nutrition; Leeds, LS2 9JT, Inglaterra.

RESUMO

Com a finalidade de investigar o efeito da hipoglicemia crônica sobre a liberação do hormônio luteinizante (LH), β -endorfina e cortisol, foram utilizadas seis ovelhas ovariectomizadas há aproximadamente um ano ($65,7 \pm 3,6$ kg), da raça Mule x Suffolk. Um dia antes do início do experimento, os animais foram canulados na veia jugular para receberem infusão e coleta de sangue. No primeiro dia do experimento, os animais receberam infusão de solução salina fisiológica (0,7 ml/min) durante 12 horas (6 h às 18 h) e no segundo dia, os animais receberam infusão de insulina (2 mU/kg/min) durante o mesmo período (6 h às 18 h). As coletas de sangue tiveram início quatro horas após o início das infusões (10 h), e aconteceram a intervalos de 15 minutos até o final do experimento. As análises de β -endorfina, cortisol e LH foram realizadas através de radioimunoensaio e as de glicose através do método enzimático glicose/peroxidase. Observou-se um efeito significativo ($p < 0,05$) da infusão de insulina sobre as concentrações plasmáticas de glicose e cortisol, não havendo, no entanto, efeito deste tratamento sobre os níveis de β -endorfina e LH. A frequência e amplitude média dos pulsos de LH também não foram afetadas significativamente durante a infusão de insulina. Assim, conclui-se que o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) mantém-se ativado durante a hipoglicemia crônica em ovelhas ovariectomizadas, e que o feedback negativo exercido pelos glicocorticóides sobre o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) parece estar incompleto.

PALAVRAS-CHAVE: stress, ovelhas, ovariectomia

ABSTRACT

Aiming to investigate the effect of chronic hypoglycemia on the β -endorphin, LH and cortisol release, six ovariectomized ewes (65.7 ± 3.6 kg) Mule x Suffolk crosses were used in this work. The day before each experiment, one jugular vein from each ewe was cannulated for blood sampling and infusion. In the first day of the experiment the animals received saline infusion (0,7 ml/min) over 12 hours (6.00-18.00) and on the second day the animals received insulin infusion (2mU/kg/min) over 12 hours (6.00-18.00). Blood collection have started four hour after the beginning of the infusion period (10.00) until the end (18.00), at 15 min intervals. The β -endorphin, LH and cortisol were analysed through radioimmunoassay and glucose through glucose/peroxidase method. There was a significant ($p < 0.05$) effect of insulin infusion on glucose and cortisol concentrations, although this treatment did not significantly alter the plasma β -endorphin and LH. The mean LH pulse frequency and amplitude were not affected significantly during insulin infusion. We can conclude that the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is activated during the chronic hypoglycemia in ovariectomized ewes and the negative feedback exerted by the glucocorticoids on adrenocorticotrophic hormone (ACTH) seems to be incomplete.

KEY-WORDS: stress, ewes, ovariectomized

INTRODUÇÃO

O aumento dos níveis de corticosterona, ACTH e β -endorfina durante estresse agudo já é bem documentado (ENGLER et al., 1989; GUILLAUME et al., 1989; CARATY et al., 1990). Contudo, poucas informações têm sido direcionadas para investigar as variações hormonais por ocasião do estresse repetido ou persistente. Isto causa surpresa uma vez que a maioria dos fatores estressantes que afetam a vida dos animais tem um componente crônico.

É muito bem conhecido que o estresse agudo produz uma rápida ativação do eixo hipotálamo-pituitária-hipófise (HPA), resultando na secreção de glicocorticóides pelas adrenais. Os glicocorticóides exercem várias funções sobre as células do corpo e acredita-se que esses efeitos sejam benéficos pelo fato de preparar o organismo para enfrentar as demandas do estresse agudo (MUNCK et al., 1984). No entanto, as conseqüências advindas da hipersecreção em resposta ao estresse crônico ainda não estão bem esclarecidas.

BOBEK et al. (1986) observaram que, submetendo uma mesma ovelha a um segundo período de isolamento após uma semana de intervalo, os níveis de cortisol e glicose foram menores que os observados no primeiro isolamento, sugerindo adaptação do animal ao estresse emocional. Estudos em ratos mostram que os níveis de corticosterona diminuíram quando os animais foram expostos repetidamente ao estresse controle dos movimentos (DE SOUZA & VAN LOON, 1982; PITMAN et al., 1988) e barulho (DE BOER et al., 1988). KANT et al. (1983) demonstraram em diversos trabalhos a ocorrência de adaptação e hiper sensibilidade durante períodos de repetidos estresses.

GONZÁLEZ-QUIJANO et al. (1991) observaram que a imobilização crônica em ratos causou uma diminuição nas concentrações plasmáticas de LH e FSH, tanto em animais tratados com solução salina como com naltrexone. Também o estresse crônico induziu a uma diminuição significativa no conteúdo hipotalâmico dos hormônios liberadores das gonadotrofinas (GnRH). Durante subnutrição crônica, os níveis circulantes de LH, hormônio tireotrófico (TSH), hormônio de crescimento (GH) e prolactina (PRL), foram inibidos significativamente, sugerindo que reduções severas no consumo de alimento resultaram, primariamente, na redução do estímulo hipotalâmico do que na incapacidade da pituitária em secretar hormônios (CAMPBELL et al., 1977).

O presente trabalho investiga o efeito do estresse crônico (prolongado e persistente) sobre a regulação das secreções de cortisol, β -endorfina e LH em ovelhas ovariectomizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas seis ovelhas adultas da raça Mule x Suffolk ($65,7 \pm 3,6$ kg), ovariectomizadas há, aproximadamente, um ano antes do início do experimento. Os animais habitavam gaiolas individuais (4 m^2), e eram submetidos à luz artificial (12 hLuz/12 hEscuro). Feno e concentrado eram oferecidos uma vez ao dia, e a água era disponível "ad libitum". Um dia antes do início do experimento, os animais foram canulados na veia jugular para coleta de sangue e infusão.

No primeiro dia do experimento, os animais receberam infusão de solução salina (0,7 ml/min) durante o período de 12 horas (6 h às 18 h) e no segundo dia, os animais receberam infusão de insulina (2 mU/kg/min) durante o mesmo período (6 h às 18 h). As coletas de sangue

aconteceram quatro horas após o início das infusões (10 h) a intervalo de 15 min até o final do experimento (18 h).

Os níveis de glicose, β -endorfina e LH foram comparados entre tratamentos através das medidas repetidas (WINER, 1971), usando MANOVA do SPSS (KINNEAR & GRAY, 1994). O programa Pulsar (MERRIAN & WACHTER, 1982) foi usado para identificar a pulsatilidade do LH (frequência dos pulsos/h e amplitude/ng/ml). Os pulsos, uma vez identificados, foram submetidos à análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se um efeito significativo ($p < 0,05$) do tratamento insulina sobre as concentrações plasmáticas de glicose ($3,07 \pm 0,2$ vs $1,30 \pm 0,3$ mmol/l) (Fig.1) e cortisol ($7,70 \pm 0,0$ vs $45,32 \pm 4,4$ nmol/l) (Fig.2). A infusão de insulina não alterou significativamente as concentrações plasmáticas de β -endorfina ($225 \pm 1,2$ vs $273 \pm 5,5$ pg/ml) (Fig.3) e LH ($3,16 \pm 0,1$ vs $2,78 \pm 0,1$ ng/ml) (Fig.4). Houve um efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo de coleta sobre os níveis de glicose, β -endorfina e cortisol, mas não sobre os níveis de LH. A interação tempo vs tratamento afetou significativamente ($p < 0,05$) as concentrações de glicose, mas não as de β -endorfina, cortisol e LH.

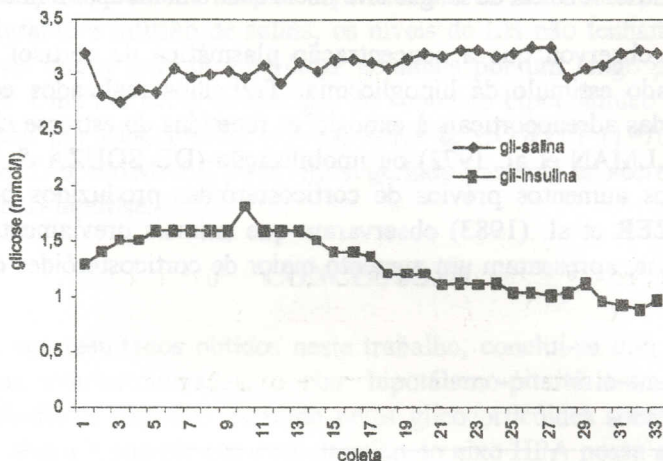


Figura1. Concentração plasmática de glicose durante infusão de solução salina e insulina durante 12 horas em ovelhas ovariectomizadas. A coleta de sangue teve início quatro horas após o início da infusão.

A frequência média ($7,25 \pm 0,9$ vs $7,33 \pm 0,9$ /8hs) e a amplitude média ($1,87 \pm 0,3$ vs $1,15 \pm 0,2$ ng/ml) dos pulsos de LH não foram alteradas significativamente pela infusão de insulina.

A concentração plasmática de β -endorfina permaneceu nos níveis basais quatro horas após o início da infusão de insulina até o final da mesma. Este resultado tem o suporte de PRZEWLOCKI et al. (1987) que encontraram níveis de β -endorfina baixos similares aos do grupo controle por ocasião do estresse crônico causado por choque nas patas em ratos. Esses mesmos autores observaram que o estresse crônico resultou em um aumento no conteúdo de β -endorfina nos lóbulos da pituitária, mas não houve alteração dos níveis plasmáticos deste endógeno opioide. No entanto, COPPINGER et al. (1991) demonstraram que o eixo pituitária-adrenal em cordeiros continua a ser ativado (ACTH), mesmo com três períodos consecutivos de 6 horas de isolamento e restrição dos movimentos.

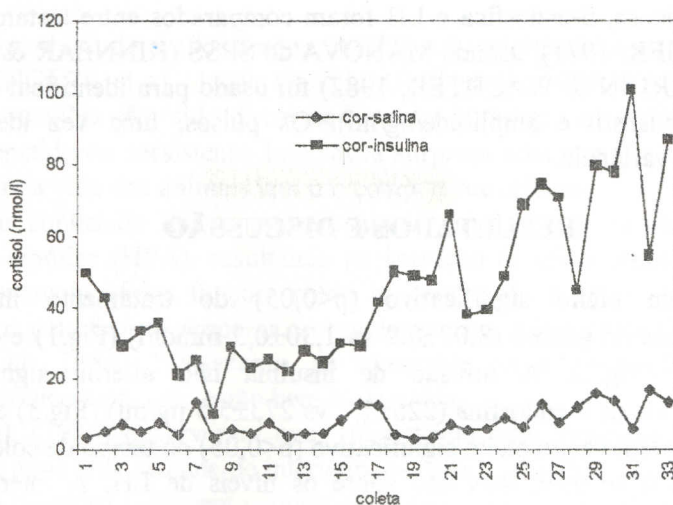


Figura2. Concentração plasmática de cortisol durante infusão de solução salina e insulina durante 12 horas em ovelhas ovariectomizadas. A coleta de sangue teve início quatro horas após o início da infusão.

O presente trabalho observou que a concentração plasmática de cortisol mostrou uma elevação durante o prolongado estímulo da hipoglicemia. Trabalhos realizados com ratos têm demonstrado que a resposta das adrenocorticais à exposições repetidas do estresse choque elétrico (FORTIER et al 1970; DALLMAN et al. 1972) ou imobilização (DE SOUZA & VAN LOON, 1982) não foi reduzida pelos aumentos prévios de corticosteróides produzidos pelos estresses anteriores. Também DANTZER et al. (1983) observaram que animais previamente estressados, submetidos a um novo estresse, apresentam um aumento maior de corticosteróides do que os não estressados.

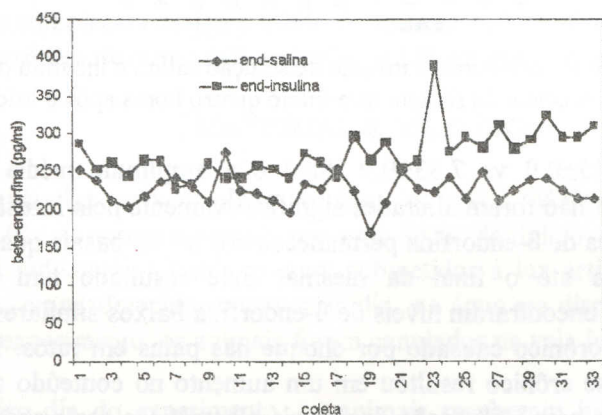


Figura 3. Concentração plasmática de β -endorfina durante infusão de solução salina e insulina durante 12 horas em ovelhas ovariectomizadas. A coleta de sangue teve início quatro horas após o início da infusão.

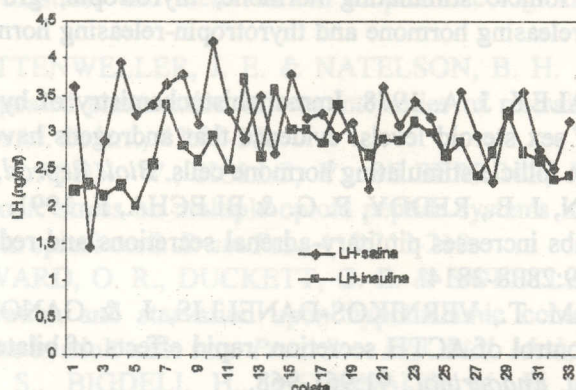


Figura 4. Concentração plasmática de LH durante infusão de solução salina e insulina durante 12 horas em ovelhas ovariectomizadas. A coleta de sangue teve início quatro horas após o início da infusão.

Embora as concentrações de LH durante infusão de insulina tenham diminuído neste experimento, a variação observada não foi significativa. Possivelmente, isto possa ser explicado pelo fato de que durante a infusão de salina, os níveis de LH não tenham sido elevados como se esperava. É possível que a falta de esteróides gonadais por um longo período tenha alterado o conteúdo de GnRH. Uma marcante diminuição do conteúdo hipotalâmico de GnRH foi observada em animais castrados por ROOT et al. (1975); SHIN & HOWITT (1976); RUDENSTEIN et al (1979) e CAMPBELL & RAMALEY (1978), sugerindo aumento na secreção de GnRH dentro da circulação hipotálamo-hipófise.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que, durante a hipoglicemia crônica em ovelhas ovariectomizadas, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é mantido ativado, e que o feedback negativo exercido pelos glicocorticóides sobre o ACTH parece estar incompleto. Isto leva-nos a sugerir que esta ativação do eixo HPA possa alterar o metabolismo de várias funções do organismo, uma vez que em condições normais, as concentrações de cortisol devem manter-se em níveis basais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOBEK, S. R., NIEZGODA, J., PIERZCHALA, K., LITYNSKI, P. & SECHMAN, A. 1986. Changes in circulation levels of iodothyronines, cortisol and endogenous thiocyanate in sheep during stress caused by isolation of the animal from the flock. *J. Vet. Med. A.*, 33:698-705.
- CARATY, A., GRINO, M., LOCATELLI, A., GUILLAUME, V., BOUDOURESQUE, F., CONTE-DELVOX, B. & OLIVER, C. 1990. Insulin-induced hypoglycemia stimulates corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. *J. Clin. Investigat.*, 85:1716-1722.

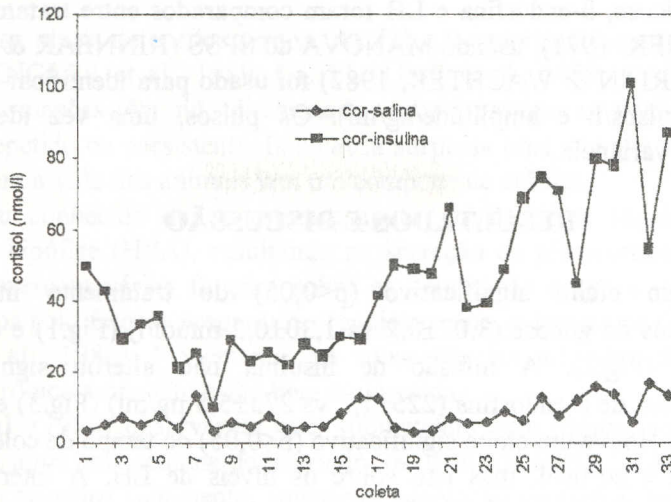


Figura2. Concentração plasmática de cortisol durante infusão de solução salina e insulina durante 12 horas em ovelhas ovariectomizadas. A coleta de sangue teve início quatro horas após o início da infusão.

O presente trabalho observou que a concentração plasmática de cortisol mostrou uma elevação durante o prolongado estímulo da hipoglicemia. Trabalhos realizados com ratos têm demonstrado que a resposta das adrenocorticais à exposições repetidas do estresse choque elétrico (FORTIER et al 1970; DALLMAN et al. 1972) ou imobilização (DE SOUZA & VAN LOON, 1982) não foi reduzida pelos aumentos prévios de corticosteróides produzidos pelos estresses anteriores. Também DANTZER et al. (1983) observaram que animais previamente estressados, submetidos a um novo estresse, apresentam um aumento maior de corticosteróides do que os não estressados.

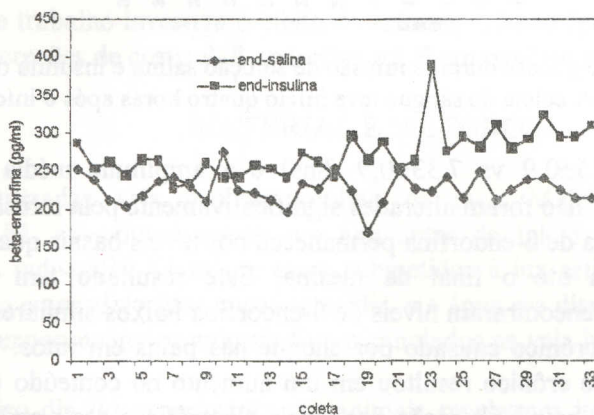


Figura 3. Concentração plasmática de β -endorfina durante infusão de solução salina e insulina durante 12 horas em ovelhas ovariectomizadas. A coleta de sangue teve início quatro horas após o início da infusão.

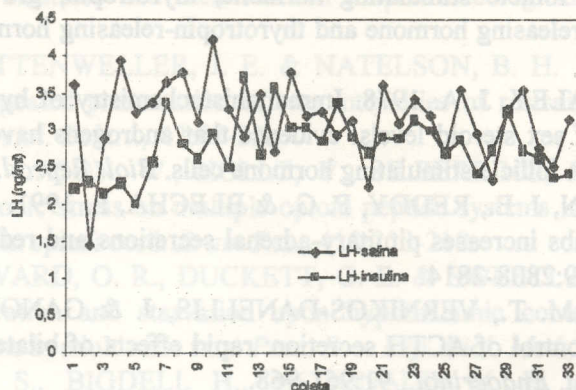


Figura 4. Concentração plasmática de LH durante infusão de solução salina e insulina durante 12 horas em ovelhas ovariectomizadas. A coleta de sangue teve início quatro horas após o início da infusão.

Embora as concentrações de LH durante infusão de insulina tenham diminuído neste experimento, a variação observada não foi significativa. Possivelmente, isto possa ser explicado pelo fato de que durante a infusão de salina, os níveis de LH não tenham sido elevados como se esperava. É possível que a falta de esteróides gonadais por um longo período tenha alterado o conteúdo de GnRH. Uma marcante diminuição do conteúdo hipotalâmico de GnRH foi observada em animais castrados por ROOT et al. (1975); SHIN & HOWITT (1976); RUDENSTEIN et al (1979) e CAMPBELL & RAMALEY (1978), sugerindo aumento na secreção de GnRH dentro da circulação hipotálamo-hipofíse.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que, durante a hipoglicemia crônica em ovelhas ovariectomizadas, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é mantido ativado, e que o feedback negativo exercido pelos glicocorticóides sobre o ACTH parece estar incompleto. Isto leva-nos a sugerir que esta ativação do eixo HPA possa alterar o metabolismo de várias funções do organismo, uma vez que em condições normais, as concentrações de cortisol devem manter-se em níveis basais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOBEK, S. R., NIEZGODA, J., PIERZCHALA, K., LITYNSKI, P. & SECHMAN, A. 1986. Changes in circulation levels of iodothyronines, cortisol and endogenous thiocyanate in sheep during stress caused by isolation of the animal from the flock. *J. Vet. Med. A.*, 33:698-705.
- CARATY, A., GRINO, M., LOCATELLI, A., GUILLAUME, V., BOUDOURESQUE, F., CONTE-DELVOX, B. & OLIVER, C. 1990. Insulin-induced hypoglycemia stimulates corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. *J. Clin. Investigat.*, 85:1716-1722.

- CAMPBELL, G. A., KURCZ, M., MARSHALL, S. & MEITES, J. 1977. Effects of starvation in rats on serum levels of follicle stimulating hormone, thyrotropin, growth hormone and prolactin response to LH-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinol.*, 100:580-587.
- CAMPBELL, G. T. & RAMALEY, J. A. 1978. Immunohistochemistry of hypothalamic GnRH following manipulation of sex steroid levels: evidence that androgens have divergent effects on GnRH stores and serum follicle stimulating hormone cells. *Biol. Reprod.*, 19:620-627.
- COPPINGER, T. R., MINTON, J. E., REDDY, P. G. & BLECHA, F. 1991. Repeated restraint and isolation stress in lambs increases pituitary-adrenal secretions and reduces cell-mediated immunity. *J. Anim. Sci.*, 69:2808-2814.
- DALLMAN, M. F., JONES, M. T., VERNIKOS-DANELIS, J. & GANONG, W. F. 1972. Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: rapid effects of bilateral adrenalectomy on plasma ACTH in the rat. *Endocrinol.*, 91:961-968.
- DANTZER, R.; MORMÈDE, P. & HENRY, J. P. 1983. Physiological assesment of adaptation in farm animals. In: *Farm Animal Housing and Welfare*. S.J. BAXTER, M.R. BAXTER AND J.A.D. MAC CORMACK, Boston. p.8-19.
- DE BOER, S. F., SLANGEN, J. L. & GUGTEN, J.V.D. 1988. Adaptation of plasma catecholamine and corticosterone responses to short-term repeated noise stress in rats. *Physiol. Behavi.*, 44:273-280.
- DE SOUZA, E. B. & VAN LOON, G. R. 1982. Stress-induced inhibition of the plasma corticosterone response to a subsequent stress in rats: a nonadrenocorticotropin-mediated mechanism. *Endocrinol.*, 110:23-33.
- ENGLER, D., PHAM, T., FULLERTON, M. J., OOI, G., FUNDER, J. W. & CLARKE, I. J. 1989. Studies of the secretion of the corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin into the hypophysial-portal circulation of the conscious sheep. I. effect of an audiovisual stimulus and insulin-induced hypoglycemia. *Neuroendocrinol.*, 49:367-381.
- FORTIER, C., DELGADO, A., DUCUMMON, P., DUCUMMON, S., DUPONT, A., JOBIN, M., KRAICER, J., MCINTOSCH-HARDT, B., MARCEAU, H., MAIHLE, P., MAIHLE-VOLOSS, C.; RERUP, C. & VAN REES, G. P. 1970. Functional interrelationships between the adenohipophysis, thyroid, adrenal cortex, and gonads. *Can. Med. Assoc. J.* 103:864-874
- GONZÁLEZ-QUIJANO, M. I., ARIZNAVARRETA, C., MARTIN, A. I., TREGUERRES, J. A. F. & LÓPEZ-CALDERÓN, A. 1991. Naltrexone does not reverse the inhibitory effect of chronic restraint on gonadotropin secretion in the intact male rat. *Neuroendocrinol.*, 54: 447-453.
- GUILLAUME, V., GRINO, M., CONTE-DEVOLX, B., BOUDOURESQUE, F. & OLIVER, V. 1989. Corticotropin-releasing factor secretion increases in rat hypophysial portal blood during insulin-induced hypoglycemia. *Neuroendocrinol.*, 49:676-678
- KANT, G. J., BUNNELL, B. N., MOUGEY, E. H., PENNINGTON, L. L. & MEYERHOFF, J. L. 1983. Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP, and plasma prolactin, corticosterone and growth hormone in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18:967-971
- KINNEAR, P. R. & GRAY, C. D. 1994. SPSS for Windows Made Simple. Lawrence Erlbaum Associates, p. 121-137.
- MERRIAN, G. R. & WACHTER, K. W. 1982. Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Am. J. Physiol.*, 243:310-318.

- MUNCK, A., GUYRE, P. M. & HOLBROOK, N. J. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrinol. Rev.*, 5:25-44.
- PITMAN, D. L., OTTENWELLER, J. E. & NATELSON, B. H. 1988. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol. Behav.*, 43:47-55.
- PRZEWLOCKI, R., LASON, W., HÖLLT, V., SILBERRING, J. & HERZ, A. 1987. The influence of chronic stress on multiple opioid peptide systems in the rat: pronounced effects upon dynorphin in spinal cord. *Brain Res.*, 413:213-219.
- ROOT, A. W., EDWARD, O. R., DUCKETT, G. E. & SWEETLAND, M. L. 1975. Effect of short-term castration and starvation upon hypothalamic content of luteinizing hormone-releasing hormone in adult male rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 150:602-605.
- RUDENSTEIN, R. S., BIGDELI, H., MCDONALD, M. H. & SNYDER, P. J. 1979. Administration of gonadal steroids to the castrated male rat prevents a decrease in the release of gonadotropin-releasing hormone from the incubated hypothalamus. *J. Clin. Investigat.*, 63:262-267.
- SHIN, S. H. & HOWITT, C. J. 1976. Effect of testosterone on hypothalamic LH-RH content. *Neuroendocrinol.*, 21:165-174.
- WINER, B. J. 1971. *Statistical Principles in Experimental Design*, 2^a ed., McGraw-Hill, New York. p. 545-571.

PALAVRAS-CHAVE: coprológico, parasitoses gastrointestinais, diagnóstico, técnica.

ABSTRACT

Several variables affect coprological techniques, such as the dilution of faecal samples, the specific gravity of the solution, animal species and helminthic faeces. The aim of this work was to compare the efficiency of modified Gordon & Whitlock and Reynaud techniques for goat faeces. Twenty goat faeces samples were divided in 40 sub-samples, each half for one technique. The results were not statistically different. Nevertheless the modified Gordon & Whitlock technique is advised considering its simplicity and speed. McMaster technique can be performed with sodium chloride (d=1.20) or zinc sulfate (d=1.35) solutions.

KEY WORDS: coprological, gastrointestinal parasitoses, diagnostic, technique.

INTRODUÇÃO

O exame coprológico de rebentos de ruminantes estima o parasitismo por helmintos a fornecer informações essenciais para o tratamento e controle dos helmintos gastrointestinais. As diferentes técnicas de coproscopia baseiam-se na separação e posterior coloração dos ovos de helmintos, da massa fecal por flutuação ou sedimentação. As técnicas coprológicas variam de acordo com a espécie animal devido a consistência, quantidade de fezes eliminadas, e os parasitos envolvidos. Características como, gradiente de concentração da solução para proporcionar a flutuação dos ovos e a proporção fezes/solução saturada interferem no resultados. O tempo de flutuação é outro fator a ser observado em exames de fezes, quando se usa solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), onde inicialmente ocorre flutuação e após um certo tempo há deformação dos ovos por perda de água e submersão dos mesmos. Este trabalho