

AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CORTISOL E PROGESTERONA EM VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*) SUBMETIDAS A MANEJO DIÁRIO OU MANEJO SEMANAL

Rosiára Rosária Dias Maziero¹
Ian Martin²
Maria Clara Costa Mattos³
João Carlos Pinheiro Ferreira⁴

RESUMO

Este estudo avaliou os níveis séricos de cortisol e progesterona de fêmeas bovinas submetidas a manejo diário e semanal. Foram utilizadas 07 vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) primíparas e multíparas, em dois experimentos. No experimento 1, os animais foram manejados diariamente, acompanhados durante 21 dias consecutivos, tempo equivalente a um ciclo estral. Já no experimento 2, os animais foram acompanhados por 09 semanas consecutivas. Todos os animais foram conduzidos ao tronco de contenção, submetidos a palpação transretal e ultrassonografia do aparelho genital feminino, assim como venopunção jugular. As amostras de plasma foram congeladas e, posteriormente, utilizadas para a dosagem das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona pela técnica de radioimunoensaio. As concentrações plasmáticas de progesterona dos animais do experimento 1 variaram entre 0,13 a 4,42 ng/mL ($p < 0,05$), enquanto que os do experimento 2 não variaram entre as semanas (0,17 a 1,2 ng/mL; $p > 0,05$). A dosagem de cortisol apresentou valores médios entre 10 a 50 ng/mL nos animais do experimento 1, e 8,3 a 62 ng/mL nos do experimento 2. Houve correlação positiva entre o cortisol e a progesterona nos animais do experimento 2 ($r = 0,909$; $p < 0,05$), mas não nos do experimento 1 ($r = 0,03$; $p > 0,05$). Os procedimentos de manejo utilizados tanto no experimento 1 como no 2 foram capazes de induzir estresse nos animais.

Palavras-chave: vaca, manejo, estresse, cortisol, progesterona

PLASMA CONCENTRATION OF PROGESTERONE AND CORTISOL IN NELORE COWS (*Bos taurus indicus*) SUBMITTED TO DAILY OR WEEKLY HANDLING

ABSTRACT

This study evaluates the plasma concentration of progesterone and cortisol in cows submitted to daily or weekly handling. For this experiment, seven primiparous or multiparous Nelore cows (*Bos taurus indicus*) were monitored for 21 days (experiment 1) and 9 weeks (experiment 2) through rectal palpation and ultrasonographic examination of the female reproductive tract, as well as jugular venipuncture. Plasma concentration of progesterone and cortisol (ng/mL) was determined by radioimmunoassay from blood samples collected from jugular vein on the differently handling experiments. For experiment 1, the plasma concentration of progesterone ranged from 0.13 to 4.42 ng/mL, however, there were no

¹ Doutoranda - Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Botucatu – SP. Tel/Fax: (14) 38116249. E-mail: rosiaramaziero@yahoo.com.br, autor para correspondência.

² Pós-Doutorando - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Campus de Botucatu. E-mail: ianmartin@uol.com.br

³ Médica Veterinária autônoma E-mail: mmary_ccm@yahoo.com.br

⁴ Prof. Ass. Dr. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Campus de Botucatu. E-mail: jcpferreira@fmvz.unesp.br

differences in experiment 2 (0.17 to 1.2 ng/mL; $p > 0.05$). Plasma concentration of cortisol showed values between 10-50 ng/mL in experiment 1 and 8.3 to 62 ng/mL in the experiment 2. There were correlations between cortisol and progesterone in the experiment 2 ($r = 0.909$; $p < 0.05$) but not in the experiment 1 ($r = 0.03$; $p > 0.05$). The handling procedures used in experiments were able to induce stress in the treated animals.

Keywords: cow, handling, stress, cortisol, progesterone.

EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CORTISOL Y PROGESTERONA EN VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*) SOMETIDAS A CONDICIONES DE MANEJO DIARIO O SEMANAL

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los niveles séricos de cortisol y progesterona en hembras bovinas sometidas a condiciones de manejo diario o semanal. Fueron utilizadas siete vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) primíparas y múltiparas, en dos experimentos. En el experimento 1, los animales fueron sometidos a condiciones de manejo diario y acompañados durante 21 días consecutivos, tiempo equivalente a un ciclo estral. En el experimento 2, fueron acompañados por nueve semanas consecutivas. Todos los animales fueron conducidos a la manga de manejo, sometidos a palpación transrectal y ultrasonografía del aparato genital femenino, así como a extracción de sangre por medio de punción yugular. Las muestras de plasma fueron congeladas y posteriormente procesadas para medir la concentración de cortisol y progesterona por la técnica de radioinmunoensayo. Las concentraciones plasmáticas de progesterona de los animales del experimento 1, variaron de 0,13 a 4,42 ng/mL ($p < 0,05$), mientras que las del experimento 2 no variaron (0,17 a 1,2 ng/mL; $p > 0,05$). La concentración de cortisol presentó valores entre 10 y 50 ng/mL en los animales del experimento 1, y de 8,3 a 62 ng/mL en los del experimento 2. Hubo correlación positiva entre el cortisol y la progesterona en los animales del experimento 2 ($r = 0,909$; $p < 0,05$), pero no en los animales del experimento 1 ($r = 0,03$; $p > 0,05$). Los procedimientos de manejo utilizados tanto en el experimento 1 como en el experimento 2, demostraron inducir estrés en los animales.

Palabras clave: vacas, manejo, estrés, cortisol, progesterona

INTRODUÇÃO

O estresse é definido como a ruptura da homeostase dos organismos vivos em que existe uma resposta comportamental ou fisiológica contra estímulo nocivo ou condição adversa do ambiente. Esta alteração pode interferir no bem-estar ou na atividade reprodutiva do animal, assim como em alterações cardiovasculares, endócrinas e metabólicas (1, 2).

A resposta gerada pelo organismo sob estresse envolve a secreção de glicocorticóides e progesterona pelas glândulas adrenais (3-5). Esta resposta é desencadeada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), com o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH), secretado pelo hipotálamo e consequente liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela adenohipófise (6, 7).

A secreção de hormônios pela glândula adrenal em resposta ao estresse, controlada pelo CRH, afeta diretamente a reprodução por inibir a liberação de hormônios gonadotróficos pela adenohipófise. Alguns estudos mostraram que os efeitos negativos provocados pelo estresse podem inibir o pico pré-ovulatório de LH ou inibir a ovulação e até mesmo piorar a qualidade dos embriões produzidos (2-4, 8, 9). Outros constataram que a administração exógena de

ACTH resultou em efeitos similares aos da ocorrência de estresse agudo, com o aumento dos níveis séricos de cortisol e progesterona (3, 4, 8, 10).

Outros autores relataram que a administração de ACTH foi capaz de inibir o estro em vacas devido à diminuição na secreção de estrógenos. Com isso, o pico de LH foi retardado e a ovulação ocorreu mais tardiamente (11, 12). Esta baixa concentração de estradiol acarretou também uma diminuição na intensidade e ocorrência de estro (13).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar se as práticas rotineiras de manejo são capazes de alterar as concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), e se existem diferentes respostas destes hormônios indicadores de estresse em animais manejados diariamente ou semanalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 07 vacas Nelore, PO, adultas, com idades entre 3 e 14 anos ($6,6 \pm 0,81$) e escore corporal igual ou superior a 3 (escala de 0 a 5) (14), provenientes do rebanho da Fazenda Experimental São Manuel - FMVZ – UNESP (São Manuel - SP). Todas as fêmeas foram mantidas em regime de estabulação parcial recebendo feno de alfafa, farelo de milho, sal mineral proteinado e água *ad libitum*.

Experimento 1

Os animais (n= 3) foram submetidos a sincronização do estro com uma aplicação de 25 µg lecorelina (Gestran Plus®, IM) e, sete dias mais tarde de, 0,15 mg de D-Cloprostenol (Preloban®, IM) (15). Após a última administração os animais foram avaliados diariamente por palpação retal e ultrassonografia transretal (ALOKA SSD 500 com transdutor de 5,0 MHz) até comprovada a ovulação. Foram realizadas colheitas diárias de sangue por venopunção jugular. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 2500 x g por 15 minutos e o plasma obtido foi acondicionado em tubos plásticos e armazenados em freezer a -20°C.

Experimento 2

Os animais (n=4) apresentavam-se em anestro puerperal, com intervalo superior a 30 dias pós-parto. Os animais foram avaliados semanalmente por palpação retal e ultrassonografia transretal (ALOKA SSD 500 com transdutor de 5,0 MHz) do aparelho genital feminino. Foram realizadas colheitas semanais de sangue por venopunção jugular. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 2500 x g por 15 minutos e o plasma obtido foi acondicionado em tubos plásticos e armazenados em freezer a -20°C.

Dosagens hormonais

As dosagens plasmáticas de cortisol e progesterona foram realizadas em duplicatas utilizando-se kits comerciais em fase sólida (Coat A – Count DPC), com leitura por sistema de radioimunoensaio. O processamento das amostras foi realizado em dois ensaios, sendo o coeficiente de variação inter-ensaio de 10,4% para progesterona e 9,5% para cortisol e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 8,3% para progesterona e 6,8% para cortisol.

Análise Estatística

Para todas as variáveis foram determinadas a média e o erro padrão. A comparação entre dias e semanas dentro do grupo foi realizada empregando-se ANOVA e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste *Tukey*. Para a comparação das médias de cortisol entre

o grupo manejo diário e o manejo semanal foi utilizado o teste *t de Student*. Para a correlação entre os valores plasmáticos de cortisol e progesterona foi realizado o teste de *Pearson*. Os valores foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1

Na Figura 1 estão representadas as concentrações plasmáticas média e o erro padrão de cortisol e progesterona (ng/mL). Ao longo do estudo, não foram detectadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) para os valores plasmáticos de cortisol e estes oscilaram entre 10-50 ng/mL. Entretanto, os valores médios de progesterona modificaram-se ao longo dos dias ($p < 0,05$) e apresentaram valores entre 0,13- 4,42 ng/mL. Não houve correlação entre as concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona ao longo dos dias ($r = 0$; $p > 0,05$).

O primeiro aumento detectado nos níveis plasmáticos de progesterona do grupo manejo diário ocorreu no quinto dia, seguido de um novo aumento no dia sete, e a concentração máxima de progesterona foi observada no dia 10. A primeira queda de progesterona foi observada no dia 13, seguida de uma nova queda no dia 19, alcançando níveis inferiores a 1 ng/mL. Este perfil hormonal observado é semelhante ao descrito por diversos autores para a espécie bovina (16-20).

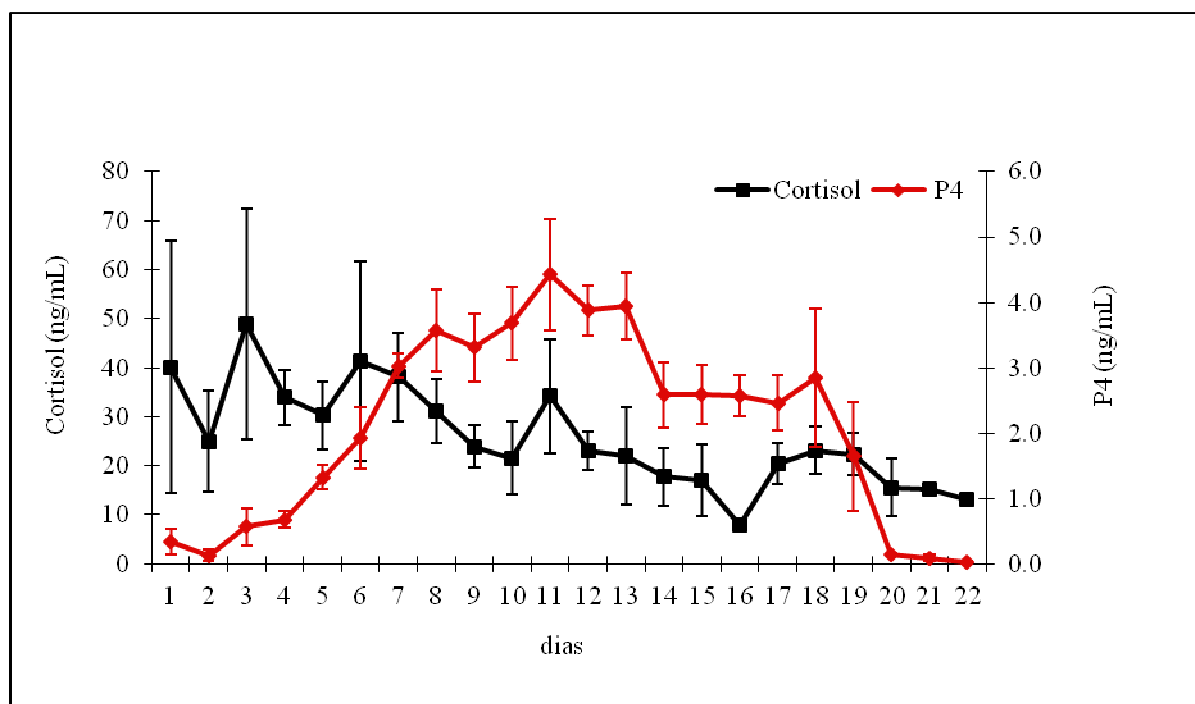


Figura 1. Concentrações plasmáticas média e erro padrão de cortisol (ng/mL) e progesterona (P4) (ng/mL) do experimento 1.

Experimento 2

Na Figura 2 estão demonstradas as concentrações plasmáticas média e o erro padrão de cortisol e progesterona. Para estas duas variáveis não foram detectadas diferenças ao longo do estudo ($p > 0,05$). Os níveis plasmáticos de cortisol oscilaram entre 8,3-62 ng/mL e os níveis de progesterona entre 0,17 – 1,2 ng/mL. Entretanto, ao ser realizado o teste de correlação entre os dois hormônios avaliados observou-se uma correlação positiva entre o cortisol e a progesterona durante as semanas de estudo ($r = 0,9$; $p < 0,05$).

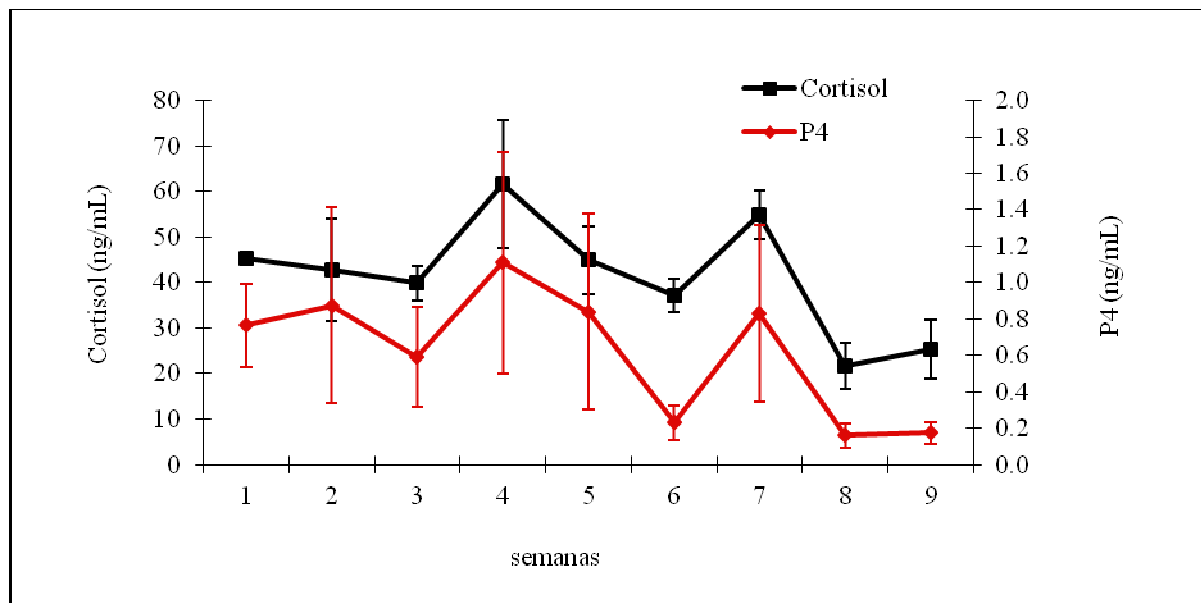


Figura 2. Concentrações plasmáticas média e erro padrão de cortisol (ng/mL) e progesterona (P4) (ng/mL) do experimento 2 - linha tracejada representa os valores basais de cortisol (ng/mL).

DISCUSSÃO

Os níveis séricos de cortisol tanto no experimento 1 como no experimento 2 apresentaram-se iguais ou superiores a 10 ng/mL, sendo que o valor basal determinado em bovinos varia entre 5 e 10 ng/mL (10). Esses valores elevados de cortisol sugerem que procedimentos rotineiros, como manejo dos animais em tronco, colheita de sangue e palpação transretal são suficientes para desencadear estresse nos animais, levando-se em conta que o cortisol é o principal hormônio indicador de estresse (2, 21). Estes valores são superiores aos encontrados por Hein e Allrich (8) em animais submetidos à colheita de sangue e administração de veículo aquoso intravenoso, no qual o valor sérico médio de cortisol foi de 12,4 ng/mL. Outros autores relatam que os níveis basais de cortisol encontrados foram de 3,8 e 4,4 ng/mL para animais submetidos também apenas à colheita de sangue (10). Deve-se considerar, entretanto, que diferenças nos resultados de dosagens hormonais entre estudos podem ser devido a diferenças nas técnicas laboratoriais adotadas e não na fisiologia animal.

Outros estudos mostram que demais procedimentos como injeção intramuscular em vacas taurinas elevam as concentrações de cortisol acima de 10 ng/mL (10). A partir desses resultados pode-se sugerir que os animais zebuínos, como os do presente estudo, são mais sensíveis e apresentam concentrações plasmáticas de cortisol superiores aos encontrados em animais de raças européias, quando submetidos a procedimentos rotineiros como vacinações e palpações retais. Contudo, o significado dessa maior elevação ainda requer novos estudos que relacionem os valores encontrados com outros indicadores de estresse/bem-estar, como os indicadores comportamentais.

Ao correlacionar as concentrações plasmáticas de cortisol entre os experimentos, observou-se que no experimento 2 (manejo semanal), os animais apresentaram concentrações médias superiores as observadas nos animais do experimento 1 (manejo diário) 41,53 *versus* 25,73 ng/mL ($p < 0,005$). Isto pode sugerir que os animais se acostumam ao manejo diário e apresentam níveis decrescentes desse hormônio, enquanto que os animais do manejo semanal não se adaptaram ao tipo de manejo e assim, os níveis plasmáticos mantiveram-se superiores por todo o estudo.

As concentrações plasmáticas médias de progesterona observadas nos animais do experimento 2 (manejo semanal), composto por vacas em anestro puerperal lactacional, foram superiores aos obtidos no experimento 1 (manejo diário) após a luteólise ($< 0,14$ ng/mL) e mantiveram-se sempre acima de $0,59$ ng/mL, exceto em três momentos (M6, M8 e M9). Valores relativamente elevados desse hormônio no experimento 2 (manejo semanal) sugerem a existência de uma fonte de progesterona extra-ovariana, as glândulas adrenais, mesmo porque não foram detectados sinais de ovulação nestes animais, utilizando-se a palpação retal e a ultrassonografia do aparelho genital feminino.

Nestes estudos os níveis de progesterona e cortisol apresentaram correlação positiva ($r = 0,9$; $p < 0,05$). Outros autores, também relataram que o aumento de cortisol foi acompanhado pelo aumento nos níveis séricos de progesterona (3, 10, 22, 23). Isto demonstra que as glândulas adrenais respondem ao estresse produzindo simultaneamente esses dois hormônios indicadores de estresse.

CONCLUSÕES

Os resultados destes estudos indicam que os dois tipos de manejo utilizados foram capazes de induzir o estresse, com uma maior resposta nos animais do experimento 2 (manejo semanal). Adicionalmente pôde ser observado que os animais em anestro (experimento 2) apresentam uma correlação positiva entre o aumento de cortisol e de progesterona em situações de estresse.

REFERÊNCIAS

1. Broom DM, Goode JA, Hall SJG, Lloyd DM, Parrot RF. Hormonal and physiological effects of a 15 hours road journey in sheep: comparison with the responses to loading, handling and penning in the absence of transport. *Br Vet J.* 1996;152:593-604.
2. Macedo GG, Zúccari CESN, Pinto de Abreu UG, Negrão JA, Costa e Silva EV. Human-animal interaction, stress, and embryo production in *Bos indicus* embryo donors under tropical conditions. *Trop Anim Health Prod.* 2011;43:1175-82.
3. Bage R, Forsberg M, Gustafsson H, Larsson B. Effects of ACTH-challenge on progesterone and cortisol levels in ovariectomised repeat breeder heifers. *Anim Reprod Sci.* 2000;63:65-76.
4. Hollenstein K, Janett F, Bleul U, Hassig M, Kahn W, Thun R. Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress. *Anim Reprod Sci.* 2005;11:1-1.
5. Sapolsky RM, Romero ML, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrinology.* 2000;89:21-55.
6. Rivier C, Rivest S. Effects of stress on the activity of hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod.* 1991;45:523-32.
7. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med.* 1998;129:229-40.
8. Hein KG, Allrich RD. Influence of exogenous adrenocorticotrophic hormone on estrous behavior in cattle. *J Anim Sci.* 1992;70:243-7.

9. Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:743-52.
10. Yoshida C, Nakao T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating dairy cows. *J Reprod Dev.* 2005;51:99-107.
11. Davidge ST, Wiebold JL, Sewer PL, Hillers JK. Influence of varying levels of blood progesterone upon estrous behavior in cattle. *J Anim Sci.* 1987;64:126-32.
12. Roelofs J, López-Gatius F, Hunter RHF, Van Eedenburg FJCM, Hanzen CH. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology.* 2010;74:327-44.
13. Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR. Is stress really all that important? *Theriogenology.* 2001;55:65-73.
14. Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Boman RL, Troutt Jr HF, Lesch TN. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J Dairy Sci.* 1982;65:495-501.
15. Barros CM, Moreira MB, Figueiredo RA, Teixeira AB, Trinca LA. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF $_{2\alpha}$ and estradiol benzoate. *Theriogenology.* 2000;15:1121-34.
16. Dobson H, Midmer SE, Fitzpatrick RJ. Relationship between progesterone concentrations in milk and plasma during the bovine oestrous cycle. *Vet Rec.* 1975;96:222-3.
17. Mucciolo RG, Barberio JC. Níveis de progesterona no plasma sanguíneo durante o ciclo estral e a gestação de vacas Nelore (*Bos indicus*). *Rev Bras Reprod Anim.* 1983;7:11-21.
18. Walters DL, Schallenberger E. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrus cycle in the cow. *J Reprod Fertil.* 1984;71:503-12.
19. Spano AA, Silva AAMR. Níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral e na fase inicial da gestação em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*). *Ars Vet.* 1992;8:131-41.
20. Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JM. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology.* 1997;47:1489-505.
21. Knights M, Smith GW. Decreased ACTH secretion during prolonged transportation stress is associated with reduced pituitary responsiveness to tropic hormone stimulation in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 2006;33:442-50.
22. Maziero RRD, Martins AC, Mollo MR, Martin I, Bastos MR, Ferreira JCP, et al. Ovarian function in cows submitted to acute stress during proestrus. *Livest Sci.* 2011;138:105-8.
23. Buckham Sporer KR, Weber PSD, Burton JL, Earley B, Crowe MA. Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. *J Anim Sci.* 2008;86:1325-34.

Recebido em: 19/07/12

Aceito em: 25/05/12