

ANÁLISE DO NÍVEL DE ESTRESSE EM EQUINOS ATLETAS ATRAVÉS DA MENSURAÇÃO DO CORTISOL NAS FEZES

CORTESE, Alam Rafael¹
GOMIERO, Rennê Leonardo Sant Ana²

RESUMO

É notável o crescente interesse em esportes que fazem uso de equinos, como o laço comprido, porém, ao mesmo tempo, se discute como essas práticas estão impactando o bem-estar destes animais. Durante o exercício, devido ao aumento das funções da bioenergia muscular, há um mecanismo compensatório no organismo do animal, com a elevação de frequência cardíaca e respiratória e consequente aumento de trocas gasosas e de lactato plasmático e cortisol. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o nível de cortisol de equinos antes, durante e após uma prova de laço comprido. Foram selecionados 16 equinos que foram submetidos à prova de laço comprido no município de Itapejara D'Oeste – PR, sendo oito da raça quarto de milha e oito da raça crioula. Foi feita uma ficha de identificação de cada animal, com resenha, parâmetros fisiológicos, temperatura (T) e frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR). Para mensuração do hormônio cortisol, foram coletadas seis amostras de fezes de cada animal, totalizando 96 amostras, que foram analisadas por meio do teste imunoenzimático ELISA. As coletas foram feitas entre as seis e oito horas da manhã, pois é necessário que sejam as primeiras fezes do dia. Este processo foi realizado em três etapas, a primeira durante o período de repouso que precedia a prova, ou seja, os dois primeiros dias. Na segunda, os dois dias que seguiram, as fezes foram coletadas durante a prova e a terceira etapa foi realizada nos dois últimos dias, após a prova. Os animais apresentaram um aumento significativo do nível cortisol fecal no período pós prova, quando comparado as demais etapas. A frequência cardíaca e a temperatura se apresentaram aumentadas logo após o exercício e a frequência respiratória não apresentou alteração em nenhuma das etapas.

PALAVRAS-CHAVE: esporte, mensuração, teste imunoenzimático ELISA, bem-estar, laço comprido.

1. INTRODUÇÃO

Cavalos são animais muito apreciados pela sua força, resistência e docilidade, características, estas, que os tornam ideais para serem utilizados no trabalho do campo. Com o passar do tempo, notou-se a oportunidade de transformar as práticas do campo em esporte, cultura e lazer.

Atualmente, é notável o crescente interesse em esportes que fazem uso de equinos, como o laço comprido, porém, ao mesmo tempo, se discute como estas práticas estão impactando o bem-estar destes animais.

No esporte de laço comprido, dentro de uma pista de 100 metros, cada cavaleiro, sobre seu cavalo, deve perseguir um boi e laçá-lo pelas orelhas ou cornos. Essa prova pode ter duração de um dia até uma semana.

Por este motivo, alguns estudos foram feitos em torno deste assunto a fim de determinar o impacto da realização deste esporte e qual o nível de estresse em que esses animais são submetidos. Algum aumento nos níveis de cortisol já é esperado, porém esta resposta varia conforme o estado

¹ Acadêmico do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação Assis Gurgacz – FAG, PR.

E-mail: alamcortese@hotmail.com

² Médico veterinário. Docente de medicina veterinária do Centro Universitário da Fundação Assis Gurgacz – FAG, PR.

E-mail: rennegomiero@hotmail.com

nutricional e físico do animal, o ritmo circadiano e a intensidade e duração da prova (RAMALHO, et al. 2012).

Esse trabalho tem como objetivo determinar o nível de cortisol de equinos antes, durante e após uma prova de laço comprido.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O animal de competição frequentemente é submetido a várias fontes estressoras, além do exercício físico. Confinamento, transporte, descanso insuficiente entre eventos ou após longo período de viagem, são alguns aspectos que merecem atenção, pois elevam o nível de estresse do animal e podem interferir no desempenho em provas (BOAS e MEDEIROS, 2016).

Durante o exercício, devido ao aumento das funções da bioenergia muscular, há um mecanismo compensatório no organismo do animal, com a elevação de frequência cardíaca e respiratória e consequente aumento de trocas gasosas, de lactato plasmático e cortisol (ARAÚJO, 2014).

O cortisol é um hormônio secretado pelas glândulas adrenais, sendo controlado pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH), que estão localizados na hipófise e hipotálamo, respectivamente (REECE, 2006).

O CRH é um polipeptídeo com 41 resíduos de aminoácidos secretados no hipotálamo, encontrado também em outras partes do cérebro. O CRH é transportado nos vasos do sistema porta hipofisário para a adeno-hipófise, onde estimula a secreção de ACTH. Os receptores de ACTH são encontrados nos corticotropos e na medula da supra-renal. O efeito do CRH sobre o ACTH é bloqueado por glicocorticoides naturais ou sintéticos. O CRH é considerado o principal hormônio estimulador da secreção de ACTH (REECE, 2006).

Ao longo do dia, ocorrem diversas variações no que diz respeito à secreção do cortisol, tendo um pico durante as primeiras horas da manhã (das seis às oito horas) (RECCE, 2006). Níveis elevados de ACTH são considerados um sinal clássico de estresse, e níveis plasmáticos de ACTH ou cortisol são utilizados em conjunto experimental para avaliar o estresse geral atribuído a um animal por qualquer tipo de estímulo físico ou emocional (FRANDSON, WILKE e FAILS, 2005).

Para mensurar o estresse, são usadas concentrações de cortisol aumentadas para quantificar o nível de estresse dos animais. O cortisol é medido com maior precisão através do sangue, mas também pode ser amostrado a partir da saliva e fezes, que são meios menos invasivos. Outra forma é a partir da frequência cardíaca, que aumenta à medida que os cavalos ficam mais estressados (PEARSON, 2012).

Entre os vários tipos de fluidos e excreções para a dosagem de cortisol, a técnica preferível é pela análise das fezes, devido ao grande número de amostras, facilidade de coleta, custo reduzido e por não ter a necessidade de manejo. Ele também cita que nas fezes há uma grande quantidade de hormônios esteroides incluindo o cortisol, pois na amostra fecal, ao contrário da amostra sanguínea, há níveis de metabólitos hormonais por longos períodos, levando a um mínimo de oscilações entre a dinâmica secretória normal e a resposta fisiológica improvável (PORTO et al. 2011).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo passou por aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário FAG, protocolo de número 010/2018.

Foram realizadas coletas de amostras frescas de fezes de 16 equinos – oito da raça Crioulo e oito da raça Quarto de Milha – dos dias 23 a 28 de agosto de 2018 no período da manhã, das seis as oito horas. Estes animais foram submetidos à prova de laço comprido nos dias 25 e 26 de agosto de 2018 no município de Itapejara D'Oeste – PR.

A coleta de amostras de fezes foi realizada em três etapas. A primeira ocorreu durante o período de repouso dos animais, ou seja, dois dias antes da prova. A segunda etapa foi realizada durante dois dias de prova e a terceira etapa ocorreu nos dois últimos dias, após a prova.

3.1 COLETA E ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FEZES

Antes da coleta, foi feita a ficha de identificação de cada animal, com resenha, parâmetros fisiológicos, como temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória. As primeiras fezes do dia foram coletadas no período da manhã, conforme a recomendação.

Foram coletadas seis amostras de cada animal durante o período do estudo. As fezes eram recolhidas diretamente do reto com luva de palpação ou do solo com sacos plásticos limpos, onde ficavam acondicionadas. Após serem identificadas, eram mantidas em congelador à -20°C até o momento da análise, no Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário FAG.

3.1.2 Teste imunoenzimático elisa

O método de análise utilizado foi o teste imunoenzimático (ELISA), que se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas, para a determinação quantitativa de cortisol livre nas fezes dos animais em cada etapa de análise.

O protocolo utilizado para a extração das fezes foi o de Brown et al. (1994), no qual foram pesadas 0,5g de fezes úmidas e maceradas, que em seguida foram transferidas para um tubo (T1) e acrescentado 5ml de etanol. O conjunto foi mantido em banho-maria a 90°C durante 20 minutos, sendo necessário completar o volume em 5mL sempre que o etanol evaporava.

Após esse processo, os tubos foram levados à centrífuga por 15min e a fase líquida foi transferida para outro tubo (T2). A fase sólida foi ressuspensa em 5ml de etanol e agitada por 30 segundos em agitador tipo Vortex e novamente centrifugada por 15min.

O sobrenadante de T1 da segunda centrifugação foi acrescentado ao conteúdo do tubo T2 e evaporado em banho-maria (38°C) sob o fluxo de ar. Quando totalmente evaporados, os tubos foram novamente preenchidos com 1ml de metanol e agitados em agitador tipo Vortex por cinco minutos, tampados e armazenados em congelador a -20°C até a análise.

Para a mensuração do cortisol, foi utilizado o teste DRG Cortisol ELISA em uma leitora de microplacas que até o momento da análise estava acondicionado em refrigerador. A manipulação só se iniciou depois que os componentes do kit atingiram a temperatura ambiente. Os tubos foram retirados do congelador e revertidos várias vezes até também ficarem em temperatura ambiente.

Utilizando uma micropipeta, foram dispostos 20UI de cada amostra com ponteiros descartáveis novas, nos poços adequados. Depois, mais 200UI do conjugado enzimático foram dispostos em todos os poços. Durante 10 segundos a placa foi homogeneizada e em seguida encubada durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Terminado o período de incubação, a placa foi agitada e enxaguada três vezes com solução de lavagem diluída (400UI por poço). Depois, foi adicionada 100UI de solução de substrato a cada poço e a placa ficou novamente em repouso durante 15 minutos em temperatura ambiente.

Por fim, foi adicionando 100UI de solução *stop solution* a cada poço para interrupção da ação enzimática. A placa foi introduzida na máquina leitora de microplacas a D.O a 450 +/- 10nm.

4. ANÁLISES E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os dados colhidos durante o estudo foram submetidos à análise estatística, sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% para a comparação de três ou mais amostras independentes através da média dos dados (OSTERTAGOVÁ, OSTERTAG e KOVÁČ, 2014), como mostra a Tabela 1. Os dados foram divididos em grupos (dias) e categorias (parâmetros físicos) e foi feita a média geral de cada categoria por dia.

Tabela 1 – Valores da média geral referentes à frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura e cortisol avaliados em equinos submetidos à exercício.

DIA	FC	FR	T	CORTISOL
1	47,50AB	17,50	37,18C	0,0232B
2	45,50B	15,75	37,30BC	0,0287B
3	50,50AB	19,00	38,10A	0,0264B
4	55,25A	21,50	38,37A	0,0437AB
5	44,00AB	17,50	37,83AB	0,0586A
6	43,50AB	18,75	37,73ABC	0,0696A

FC: frequência cardíaca por minuto; FR: frequência respiratória; T: temperatura retal
 A>B>C; AB: resultado de A é igual a B; BC: resultado de B é igual a C; ABC: A=B=C
 Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Na Tabela 1, os dias 1 e 2 mostram dados referentes aos dias que antecederam a prova, quando os animais se encontravam em repouso. Os dias 3 e 4 representam os momentos em que os animais foram submetidos ao exercício e os dias 5 e 6 foi o período que sucedeu a prova.

Os resultados apresentaram diferença significativa em todos os parâmetros avaliados, exceto o de frequência respiratória (FR). Os dados destacados apresentam um aumento significativo, pois foram colhidos logo após o exercício, sendo que os demais dados de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória e temperatura (T) foram colhidos juntamente com as fezes, entre as 6 e 8 horas da manhã.

Em relação à frequência cardíaca (FC), no dia 4 obteve-se um resultado maior em relação ao dia 2, e os resultados dos demais dias foram semelhantes para esse parâmetro. Quanto à temperatura, os maiores valores foram obtidos nos dias 3 e 4 logo após o exercício, enquanto que a menor temperatura foi registrada no dia 1.

Os maiores níveis de cortisol foram obtidos nos dias 5 e 6 e os menores nos dias 1, 2 e 3. Já o quarto dia teve um nível intermediário entre os demais. O cortisol é um hormônio que leva 24 horas para ser metabolizado e excretado nas fezes, o que explica os níveis aumentados no dia seguinte após a prova e um maior aumento após os dois dias de exercício.

Juntamente com o exercício físico os equinos sofrem o estresse do transporte até o evento, sonorização, aglomeração de pessoas e equinos, o que acarreta em um aumento ainda maior dos níveis de cortisol destes animais.

Comparando os resultados do presente estudo com os de Ramalho et al. (2012), que avaliaram o nível de cortisol sérico em equinos usados em prova de laço em dupla, foi possível verificar os mesmos resultados, apesar de o método de análise ser diferente. Assim, verificou-se que os níveis de cortisol após a prova de laço em dupla ficaram aumentados, quando comparados aos demais dias de análise. Os autores também destacam que, por se tratar de um estudo envolvendo a avaliação hormonal e conhecendo o ritmo circadiano da liberação do cortisol, a pesquisa deve ser realizada no período da manhã, que coincide com o pico de liberação do cortisol.

Lopes et al. (2009) mensuraram o nível de cortisol sérico em equinos submetidos à prova de vaquejada e o resultado também se mostrou aumentado após a prova, semelhante ao observado no presente estudo.

Utilizando a mesma metodologia de análise de Ramalho et al. (2012) e Lopes et al. (2009), Miyashiro et al. (2012) também confirmaram que a atividade física leva à uma maior liberação de cortisol. Neste estudo, realizado em equinos utilizados para prova de enduro, os níveis de cortisol sérico após a realização da prova se mostraram elevados em comparação com os níveis no início e durante a prova. Diferente dos outros estudos, Miyashiro et al. separaram os equinos em três grupos, conforme seus desempenhos e o grupo com menor desempenho apresentou um maior aumento dos níveis de cortisol séricos quando comparado aos demais grupos, o que nos mostra como a inexperiência e a falta de preparo físico interferem nos níveis de cortisol destes animais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após o término desta pesquisa, pode-se concluir que a prova de laço comprido causa estresse aos equinos, comprovado pelo aumento nos níveis de cortisol fecal.

A atividade física exercida pelos equinos durante a prova de laço comprido, juntamente com a poluição sonora, o transporte até o evento e a aglomeração de pessoas e equinos, são os principais fatores que causam estresse aos equinos de laço comprido.

Dentro das provas equestres os fatores que causam estresse aos animais são os mesmos, o que difere uma prova de outra é o nível e a duração do exercício físico em que os animais são submetidos. E o que difere os níveis de estresse de um animal para o outro é o estado nutricional e físico do animal,

pois quanto mais preparado e com melhor condicionamento físico estiver o animal, menor será o seu nível de cortisol.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. M. S. Treinamento e desempenho atlético de equinos. **PUBVET**, v. 8, n. 18, ed. 267, art. 1774, 2014.

Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/uploads/0920d982d8923bd45c85e6c44f091a0f.pdf>. Acesso em: 22/10/2018.

BOAS, J. D. V; MEDEIROS, M. A. **Comparação do nível de estresse de cavalos atletas de diferentes modalidades através do teste de sobressalto**. Rio de Janeiro, 2016.

Disponível em: <http://r1.ufrj.br/ciencia/ForumXI/trabs/pdf/110.954.647.pdf>. Acesso em: 22/10/2018

BROWN, J.L; WASSER,S.K; WILDT, D.E; GRAHAM, L.H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. **Biology of Reproduction**, v.51, n.4, p. 776-786, 1994.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7819459> Acesso em: 25/10/2018

FRANDSON, R. D; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. Rio de Janeiro: cap. 12, p. 187-188, 2005.

LOPES, K. R. F.; BATISTA, J. S.; DIAS, R. V. C.; SOTO-BLANCO, B. Influência das competições de vaquejada sobre os parâmetros indicadores de estresse em equinos. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n. 2, p. 539-542, 2009.

Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/962/4842>. Acesso em: 24/10/2018

MIYASHIRO, P.; MICHIMA, L. E. S.; BONOMO, C. C. M.; FERNANDES, W. R. Concentração plasmática de cortisol decorrente do exercício físico em cavalos de enduro. **ARS Veterinária**, v.28, n.2, p. 87-89, 2012.

Disponível em: <http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/viewFile/448/429>. Acesso em: 29/10/2018

OSTERTAGOVÁ, E.; OSTERTAG, O.; KOVÁČ, J. Methodology and application of the Kruskal-Wallis Test. **Applied Mechanics and Materials**. v. 611, p.115-120, 2014.

PORTO, L. P.; MACIEL, I. N.; CRISÓSTOMO, C.; FERREIRA DA LUZ, M. P.; BETOLONI, A. V.; SILVA, E. S. M.; SURIAN, C. R. S.; PUOLI FILHO, J. N. P.; CHIQUITELLI NETO, M. **Métodos para dosagem de cortisol em equinos**. Botucatu: p. 3-4, 2011.

Disponível em:

http://www.dracena.unesp.br/Home/Eventos/SICUD192/Metodos_para_dosagem_de_cortisol_em_Equinos.pdf.

Acesso em: 23/10/2018

PEARSON, G. No stress. **Horse & Hound**. United Kingdom: p. 14-15, 2012.

RAMALHO, L. O.; CAIADO, J. C. C.; SOUZA, V. R. C.; COELHO, C. S. Glicemia e concentrações séricas de insulina, triglicerídeos e cortisol em equinos da raça Quarto de Milha e mestiços usados em prova de laço em dupla. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 318-324, 2012.

Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/53568/57532>.

Acesso em: 30/10/2018

RECCE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: cap. 37, p. 606-608, 2006.