

DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DE GLUCOCORTICOIDES EN HECES DE GANADO PORCINO

Chacón, G.¹, Ruiz de la Torre, J. L.², Palacio, J.¹, Manteca, X.² y García-Belenguer, S.¹

¹ Dpto. Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

gchacon@unizar.es. ² Dpto. Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.

INTRODUCCIÓN

En los estudios de bienestar animal, la determinación de cortisol es un parámetro indispensable para valorar la respuesta de estrés y en consecuencia el estado de bienestar de los animales. Habitualmente se utilizan el cortisol plasmático o sérico, pero cada vez cobra más importancia otro tipo de muestra como la determinación de sus metabolitos en heces (metabolitos de glucocorticoides), ello se debe a que la toma de muestra no es estresante para el animal y a que la concentración de metabolitos de glucocorticoides en heces no se ve influenciada por pequeñas fluctuaciones en la actividad del eje corticotropo (ritmo circadiano, efecto del manejo en la toma de muestra, etc.), tal y como ocurre con el cortisol en sangre (Palme Möstl y Palme, 2002). Se han estandarizado métodos de determinación y su aplicación a estudios de bienestar en distintas especies (Palme et al., 1999; Schatz y Palme, 2001; Dehnhard et al., 2003; etc.), sin embargo en heces de cerdos no se ha conseguido hasta el momento, debido en gran medida a que en esta especie la mayoría de los metabolitos se eliminan por orina (93%) (Möstl et al., 1999).

El objetivo de este estudio consistió en la validación de una técnica de radioinmunoensayo para la determinación de metabolitos de glucocorticoides en muestras de heces de porcino. Para valorar la capacidad de la técnica para reflejar la actividad del eje corticotropo se determinaron los metabolitos en heces tras la estimulación del mismo comparándolos con la concentraciones de cortisol sérico. En segundo lugar se estudió la estabilidad de los metabolitos a temperatura ambiente con el fin de establecer el tiempo máximo que puede transcurrir entre la deposición y la recogida de la muestra.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 7 machos sanos de 20-30 Kg. de la especie porcina. Para determinar las concentraciones basales se tomaron muestras de suero y heces durante los 2 o 5 días previos a la prueba respectivamente. La estimulación del eje corticotropo se realizó mediante la administración 0,75 mg. de ACTH (Nuvacthen depot) via i.m., tras lo que se fueron tomando muestras de plasma y heces durante un periodo de 4 días.

La determinación de cortisol en plasma se realizó mediante una técnica de EIA "in home" (límite de detección de 0,024 ng/ml, precisión intraensayo e interensayo de 3,47-6,63% y 3,92-9,93% respectivamente).

La extracción de las heces frescas se realizó en dos fases: con metanol al 80% y posteriormente con dietileter; tras la evaporación del dietileter los metabolitos se reconstituyeron con 500 microlitros PBS. La concentración de metabolitos de cortisol se realizó con un Kit comercial de radioinmunoensayo (ICN corticosterone radioimmunoassay) siguiendo la adaptación descrita por Morrow et al. (2002) para muestras de heces de la especie bovina.

Para el estudio de la estabilidad de los metabolitos se utilizaron muestras de heces de 5 animales sanos. Las heces se extrajeron directamente de la ampolla rectal y se incubaron a temperatura ambiente (25-30°C) durante 24 horas. De cada muestra de heces se recogieron, a su vez, muestras a las 0, 2, 4, 8 y 24 horas de incubación, congelándose inmediatamente a -20°C hasta su análisis.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS v.9.0. Se aplicó la prueba de t de Student para muestras pareadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En plasma se observa un incremento de la concentración de cortisol en los 7 animales (Figura 1), reflejando la estimulación del eje corticotropo en todos los animales, la concentración máxima es a los 60-90 minutos tras la estimulación con ACTH con valores de cortisol de 5 a 12 veces superiores a los valores basales. Se recuperaron las concentraciones basales de cortisol a partir de las 24 horas.

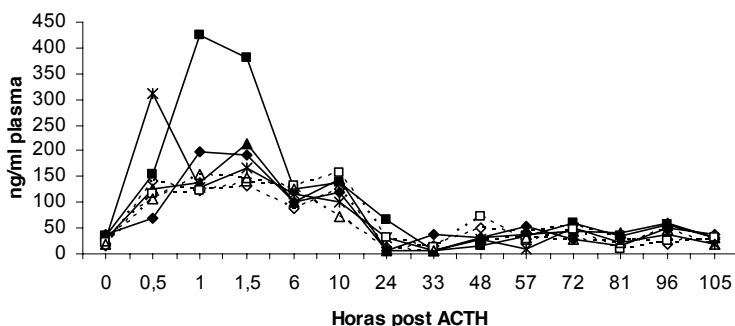


Figura 1. Cortisol plasmático tras la estimulación del eje corticotropo con ACTH. Cada línea corresponde a un animal diferente. La concentración basal (hora 0) es la media de las concentraciones de cortisol sérico de los 2 días previos a la prueba (3 muestras por día).

La concentración basal de metabolitos de glucocorticoides en heces es de $8,36 \pm 6,6$ ng/gr. La actividad del eje corticotropo se refleja en heces entre las 24 y 48 horas post ACTH (Figura 2), con incrementos significativos ($p=0,0027$, $n=7$) de 2,2 a 9,2 veces la concentración basal.

Estos resultados demuestran la validez de la técnica para reflejar la actividad del eje corticotropo. Sin embargo, debido a la gran variación individual (rango de concentración basal de 0 a 21,56 ng/gr), en estudios de estrés agudo se recomienda tomar varias muestras por animal cubriendo el periodo de 24 a las 48 horas posteriores al estímulo estresante para asegurarnos que detectamos el pico de máxima actividad corticotropa.

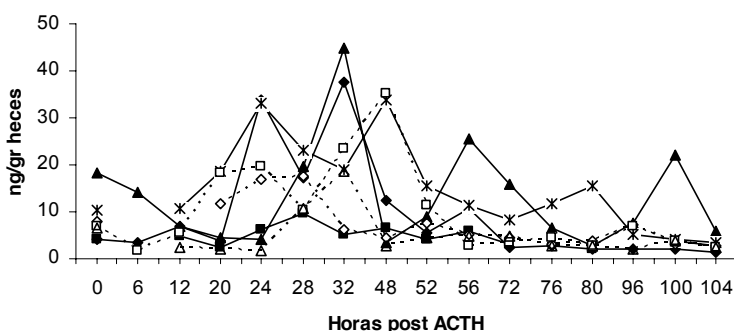


Figura 2. Metabolitos de glucocorticoides en heces tras la estimulación del eje corticotropo con ACTH. Cada línea corresponde a un animal diferente. La concentración basal (hora 0) es la media de las concentraciones metabolitos de los 5 días previos a la prueba (3 muestras por día).

En el estudio de la estabilidad de los metabolitos de glucocorticoides a temperatura ambiente no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones tras 2, 4 y 8 horas. A las 24 horas de incubación se observa un incremento de la concentración ($p=0,0983$) (Figura 3). Estos resultados nos indican que es posible la toma de muestra al menos hasta 8 horas tras la deposición sin que le afecte a los resultados obtenidos con esta técnica, facilitando el manejo de los animales durante los estudios.

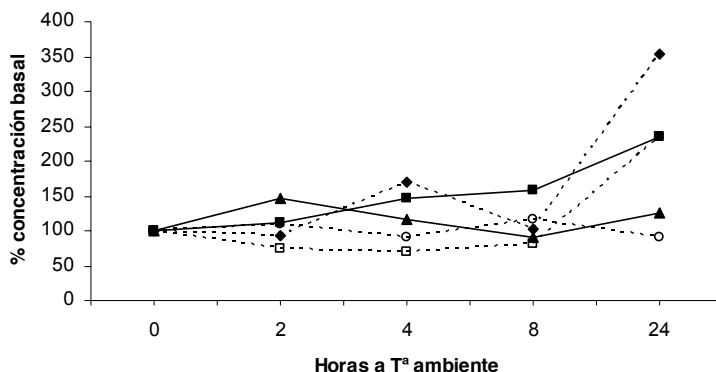


Figura 3. Estabilidad de los metabolitos de glucocorticoides en heces a temperatura ambiente. Los resultados reflejan la concentración de metabolitos en heces expresados en % en relación a la concentración a las 0 horas de incubación.

En conclusión, la determinación de metabolitos de glucocorticoides en heces de porcino determinados con un kit de corticosterone radioimmunoassay refleja la actividad del eje corticotropo entre las 24 y 48 horas postestimulación, siendo por tanto de utilidad su aplicación a los estudios de bienestar animal como alternativa a la determinación de cortisol plasmático o sérico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dehnhard, M., Schreer, A., Krone, O., Jewgnow, K., Krause, M., Grossmann, R. 2003. Gen. Comp. Endo. 131: 345-352.
- Morrow, C.J., Kolver, E.S., Verkerk, G.A., Matthews, L.R. 2002. Gen. Comp. Endo. 126: 229-241.
- Möstl, E., Messmann, S., Bagu, E., Robia, C., Palme, R. 1999. J. Vet. Med 46: 621-631.
- Schatz, S., Palme, R. Vet. 2001. Res. Commun. 25(4):271-287.
- Palme, R., Robia, C., Messman, S., Hofer, J., Möstl, E. 1999. Wien Tierärztl. Mschr 86: 237-241.

GLUCOCORTICOIDS METABOLITES DETERMINATION IN PORCINE FAECES

ABSTRACT: Faecal glucocorticoid metabolites (FGM) are used in animal welfare studies to evaluate the corticotrope axis activity. The aim of the present study was to validate a technique to determinate glucocorticoid metabolites in porcine faeces. FGM were measured with RIA assay at basal level and after ACTH administration. FGM increased from 2.2 to 9.2 times after 24-48 hours of corticotrope axis stimulation. Stability of FGM at room temperature was at least of 8 hours after defecation. FGM are a potentially valuable tool for monitoring stress in pigs.

Keywords: cortisol, faeces, porcine, welfare.