

NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COLESTEROL TOTAL, LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE (HDL) E CORTISOL, E SUA BIORRITMICIDADE, EM CARNEIROS IDEAL-POLWARTH¹

MARIA INÊS LENZ SOUZA,² LUIS FERNANDO URIBE-VELÁSQUEZ,³ ALCIDES DE AMORIM RAMOS⁴ E EUNICE OBA⁵

1. Trabalho suportado financeiramente pela Fapesp, São Paulo, SP.
2. Departamento de Morfofisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil, mariaines@nin.ufms.br .
3. Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia.
4. Departamento de Produção e Exploração Animal, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brasil.
5. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

RESUMO

Visando avaliar as concentrações médias de colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidade (HDL) e cortisol plasmáticos, foram colhidas amostras de sangue de cinco carneiros Ideal-Polwarth, alocados em latitude 22°53'S, em regime de semiconfinamento, a cada dois meses, ao longo de um ano, com as colheitas em um período de 24 horas, e intervalos de duas horas entre elas. O CT oscilou entre 40,70±1,11mg/dL (abril) e 61,48±1,11mg/dL (dezembro), entre os meses, enquanto HDL variou de 22,16±0,23mg/dL (dezembro) a 33,40±0,23mg/dL (fevereiro), mas não evidenciando um ritmo circanual em seus níveis. O CT apresentou seu valor mínimo na colheita das

16h30min (50,40±1,57mg/dL) e o máximo às 8h30min (54,67±1,57mg/dL); o menor valor de HDL foi obtido às 10h30min (27,04±0,33mg/dL) e o mais alto também às 8h30min (28,49±0,33mg/dL), não permitindo a determinação de um ritmo circadiano em suas concentrações plasmáticas. De forma similar, as concentrações de cortisol plasmático, entre os meses de colheita, apresentaram-se variáveis, mas ainda sem demonstrar um ritmo circanual na secreção deste hormônio. Com relação aos diferentes momentos de colheita, ao longo das 24 horas, assim como entre os meses, não foi estatisticamente possível a definição de um ritmo circadiano de secreção de cortisol.

PALAVRAS-CHAVE: Hormônio adrenal, metabólitos bioquímicos, ovinos, ritmo circadiano.

ABSTRACT

TOTAL CHOLESTEROL, HIGH DENSITY LIPOPROTEINS (HDL) AND CORTISOL PLASMA LEVELS, AND THEIR BIORHYTHMICITY, IN 24 HOURS, THROUGHOUT YEAR, IN IDEAL-POLWARTH RAMS

To evaluate the mean plasma concentrations of total cholesterol (TC), high density lipoproteins (HDL) and cortisol, blood samples were collected of five Ideal-Polwarth rams, maintained at 22°53'S latitude, in semi-confinement, every two months throughout the year, by 24h period, with 2-hour intervals between collects. The TC, changed 40.70±1,11mg/dL (April) and 61.48±1,11mg/dL (December), between months, while HDL changed 22.16±0.23mg/dL

(December) as 33.40±0.23mg/dL (February), but not make evident a circannual rhythm in this levels. The TC presented the lowest value at 16:30h (50.40±1.57mg/dL) and the highest value at 8:30h collect (54.67±1.57mg/dL); the HDL lowest level was at 10:30h (27.04±0.33mg/dL) and the highest level also at 8:30h collect (28.49±0.33mg/dL), however without permit circadian rhythm determination in your plasma concentrations. Similarly, the cortisol plasma concentrations,

between collect months, presents variable, however without demonstrate circadian rhythm in this hormone secretion. In relation to different collection's moments, throughout

months, it wasn't possible to define, by statistical analysis, a circadian rhythm of cortisol secretion.

KEY WORDS: Ovine, adrenal hormone, biochemistry metabolites, circadian rhythm.

INTRODUÇÃO

Modificações no fotoperíodo, temperatura, chuvas e disponibilidade de alimentos são fatores ambientais que ocorrem em ciclos distintos, ou estações. Estes fatores, às vezes, parecem sincronizar efeitos fisiológicos tais como a reprodução, o crescimento tecidual e o metabolismo às condições ambientais em que os animais vivem. Oscilações no fornecimento de alimentos ou na sua utilização (metabolismo, crescimento) geram modelos estacionais na produção de componentes corporais (BALL et al., 1996). A produtividade biológica de um animal depende não somente do fluxo de energia, nutrientes e água dentro de seus sistemas orgânicos, mas, também, de sua adaptabilidade ao ambiente em que vive (NAZKI & RATTAN, 1991; STARLING et al., 2005).

A maior parte do colesterol da dieta ou daquele sintetizado pelo fígado é convertida, como produto final hepático, em ácidos biliares, os quais ajudam na digestão de gotículas de lipídeos, emulsionando-as e tornando-as mais acessíveis à ação enzimática (CAMPBELL, 2001). Todos os hormônios esteróides, a despeito da espécie ou tecido produtor, utilizam o colesterol como substrato para a sua formação (McDONALD & PINEDA, 1989; ZAMIRI & KHODAEI, 2005). A fonte de colesterol para a biossíntese de hormônios esteróides pode variar de espécie para espécie e, mesmo, de órgão para órgão, mas vem de uma destas três principais fontes: (1) da síntese de acetato intracelular, (2) da hidrólise dos ésteres de colesterol, estocados na célula, geralmente em gotículas lipídicas, e (3) do fornecimento alimentar de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou lipoproteínas de alta densidade (HDL) e utilização do colesterol presente nas lipoproteínas circulantes (McDONALD & PINEDA, 1989; STOCCO, 1999).

Em carneiros Merino sexualmente maduros, BLACHE et al. (2000) afirmam que a nutrição é o fator mais forte sociosexual, e que as respostas podem ser divididas, principalmente, sobre o sistema neuroendócrino, controlando a atividade testicular, e em efeitos de longo prazo, que atuam sobre o crescimento testicular e a produção espermática. As moléculas de colesterol são necessárias para os processos de biossíntese de hormônios esteróides, assim como a presença das lipoproteínas de alta densidade (HDL), para transportar as primeiras no plasma sanguíneo. Existem várias vias de síntese de HDL. Sua principal função é captar o colesterol livre de membranas, esterificá-lo e transportá-lo de volta ao fígado (CAMPBELL, 2001). Estudando essa inter-relação em carneiros ao longo do ano, NAZKI & RATTAN (1991) observaram variação significativa nas concentrações plasmáticas de cortisol nos diferentes ambientes estacionais, significativamente mais elevadas no inverno e período de chuvas que durante o verão e primavera, enquanto o colesterol demonstrava uma tendência para comportamento inverso. A evidência de que o colesterol é um dos precursores para a biossíntese esteróide foi também evocada no trabalho de ZAMIRI & KHODAEI (2005), no qual concentrações mais elevadas de colesterol foram verificadas no sangue de carneiros, nos meses de julho e agosto, dois meses após a estação reprodutiva, inversamente correlacionadas aos níveis de testosterona.

Estudando ovinos machos e fêmeas, nas diferentes estações do ano, STARLING et al. (2005) encontraram efeito significativo destas fases distintas do ano sobre os níveis de cortisol, evidenciando a influência da ação conjunta das variáveis meteorológicas na fisiologia endócrina dos animais, representada por valores mais elevados deste hormônio na primavera e verão em relação aos observados no outono e inverno.

A possibilidade de existência de um ritmo circadiano na secreção cortisol foi investigada por SNOJ et al. (1994), os quais verificaram variações diurnas e noturnas, com aumentos ao nascer do sol, próximo à noite, no começo da tarde e durante a noite. O estresse ambiental, demonstrado pelas concentrações sanguíneas de cortisol, exerce efeitos pronunciados sobre várias características sanguíneas, hormonais e bioquímicas, os quais são necessários para o ajuste fisiológico de distintas funções orgânicas (NAZKI & RATTAN, 1991).

O objetivo deste trabalho foi determinar possíveis modificações plasmáticas nos níveis de cortisol, colesterol total e lipoproteínas de alta densidade, em períodos de 24 horas e durante um ano de estudo, no plasma de carneiros Ideal-Polwarth utilizados como doadores de sêmen, mantidos na latitude 22°53'S.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinco carneiros da raça Ideal-Polwarth, com idades entre quatro e cinco anos, permaneceram alocados na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, sendo previamente submetidos aos exames clínicos geral e especial, e comprovadamente aptos sanitária e reprodutivamente. Os animais foram mantidos em regime de semiconfinamento, sob luminosidade natural, em uma latitude de 22°53'S e longitude 46°29'W, com manejo alimentar em pastagem natural complementada pela administração de 0,5 kg/cabeça/dia de ração concentrada (14% de proteína bruta), e disponibilidade *ad libitum* de mistura mineral e água. A alimentação manteve-se constante ao longo de todo o período experimental, tanto em volumoso quanto em concentrado. O manejo sanitário e a avaliação clínica dos animais foram constantemente monitorados. O experimento realizou-se desde junho de um ano até abril do ano seguinte, em condições naturais de temperatura, precipitação pluviométrica, umidade relativa e radiação solar.

Na expectativa de estabelecer os possíveis ritmos hormonais (cortisol) e de substâncias metabólicas (colesterol total e HDL) endógenas destes animais, mantidos em condições naturais de fotoperíodo

e temperatura, ao longo de doze meses de experimento (determinação de um possível ritmo circanual), realizaram-se colheitas de sangue seriadas a cada dois meses (correspondendo aos meses de junho, agosto, outubro, dezembro, fevereiro e abril), durante 24 horas (determinação de um possível ritmo circadiano), com intervalos de duas horas entre elas, visando à avaliação hormonal e bioquímica dos níveis plasmáticos de cortisol, de colesterol total e de HDL. As colheitas de sangue foram procedidas por venopunção jugular em tubos de ensaio heparinizados,³ em intervalos de duas horas, durante o período de 24 horas (das 8h30min de um dia até às 6h30min do dia seguinte). O sangue foi centrifugado⁴ a 2.100 g durante quinze minutos, e o plasma obtido, alíquotado e armazenado a -20°C até o momento das dosagens hormonais, as quais se realizaram no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, SP, pelo método de radioimunoensaio (RIA), utilizando-se *kits* comerciais para cortisol.⁵ Os níveis plasmáticos de colesterol total⁶ e HDL⁷ foram determinados pelo método enzimático colorimétrico, com o auxílio de *kits* comerciais.

Para a análise estatística dos dados, utilizou-se a metodologia dos quadrados mínimos, de acordo com as colheitas bimestrais (junho de um ano a abril de outro ano) e também agrupados em duas épocas do ano, compreendendo seis meses cada uma (Época I – de março a agosto, envolvendo outono e inverno; Época II – de setembro a fevereiro, com primavera e verão). Estas duas épocas do ano são representativas das estações existentes no clima da região de Botucatu, SP. Para a análise da variância dos resultados hormonais e metabólicos, estes foram ajustados para animais, momentos (24 horas) e meses e/ou épocas de colheita de sangue. As diferenças entre médias submetram-se ao teste de Tukey a 1% ou 5% de probabilidade. As somas de quadrados médios para a causa de mês e de momentos sobre as dosagens plasmáticas foram decompostas em polinômios ortogonais, com o objetivo de avaliar o efeito de seus graus e, assim, traçar os ritmos circadiano e/ou circanual ou o comportamento das variáveis estudadas ao longo do tempo (HARVEY, 1990; SAS, 1996).

RESULTADOS

Os níveis médios (\pm DP) de colesterol total (CT) e de HDL foram, respectivamente, $52,36 \pm 12,94$ mg/dL e $27,63 \pm 6,53$ mg/dL. Ao avaliar-se as concentrações plasmáticas destes metabólitos ao longo dos meses do ano (Figura 1) e dos momentos do dia (Figura 2), a análise da variância revelou efeitos significativos ($p < 0,01$) para animais, meses de colheita e interação entre estas duas variáveis, tanto para o CT quanto para HDL. Não se constatou efeito dos momentos, para as duas características, com os níveis comportando-se sem que as tendências linear, quadrática ou outra fossem significativas. Ficou demonstrada uma correlação positiva ($r = 0,46$) entre estas duas características, indicando a interdependência entre elas.

O CT, entre os meses, oscilou entre $40,70 \pm 1,11$ mg/dL (abril/1996) e $61,48 \pm 1,11$ mg/dL (dezembro/1995), enquanto a HDL variou de $22,16 \pm 0,23$ mg/dL (dezembro/1995) a $33,40 \pm 0,23$ mg/dL (fevereiro/1996), revelando um comportamento irregular destas duas características, mas não evidenciando um ritmo circanual em seus níveis. O CT apresentou seu valor mínimo na colheita das 16h30min ($50,40 \pm 1,57$ mg/dL) e o máximo às 8h30min ($54,67 \pm 1,57$ mg/dL); e a HDL teve o seu valor mais baixo às 10h30min ($27,04 \pm 0,33$ mg/dL) e o mais alto também às 8h30min ($28,49 \pm 0,33$ mg/dL), mas ainda sem permitir a determinação de um ritmo circadiano em suas concentrações plasmáticas, apesar da irregularidade de suas secreções ao longo do dia.

As concentrações de cortisol plasmático apresentaram uma média geral (\pm DP) de $1,29 \pm 1,96$ ng/mL. Ao avaliar-se os meses de colheita separadamente, as médias (\pm EP) foram $0,79 \pm 0,25$; $0,98 \pm 0,25$; $1,61 \pm 0,25$; $1,12 \pm 0,25$; $1,60 \pm 0,25$ e $1,66 \pm 0,25$ ng/mL, respectivamente, para os meses de junho, agosto, outubro, dezembro/1995, fevereiro e abril/1996. A análise da variância revelou uma diferença significativa entre os meses ($p < 0,05$), demonstrando um crescimento linear (Figura 3), através do uso da equação $Y = 1,29275 + 0,163(X -$

3,5) para explicá-lo; porém, como o teste de Tukey não revelou diferenças significativas entre as médias, não se pode definir uma manifestação de ritmo circanual na secreção deste hormônio.

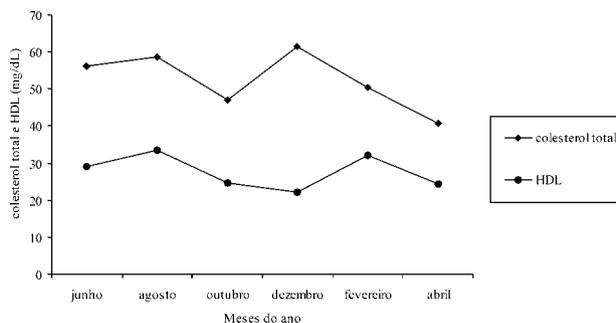


FIGURA 1. Representação gráfica das concentrações plasmáticas médias (mg/dL) de colesterol total (\pm EP = 1,11) e HDL (\pm EP = 0,23) em cinco carneiros da raça Ideal-Polwarth, ao longo do ano, mantidos em Botucatu, SP.

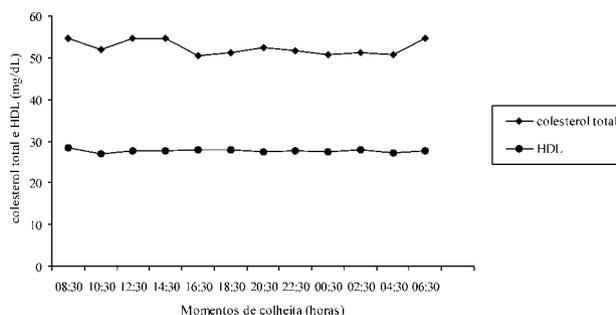


FIGURA 2. Representação gráfica das concentrações plasmáticas médias (mg/dL) de colesterol total (\pm EP = 1,57) e HDL (\pm EP = 0,33) em cinco carneiros da raça Ideal-Polwarth, em doze momentos durante 24 horas, mantidos em Botucatu, SP.

Com relação aos diferentes momentos de colheita, ao longo das 24 horas (Figura 4), a análise da variância e o teste de Tukey não permitiram o estabelecimento de um ritmo circadiano de secreção de cortisol, apenas uma diminuição significativa de seus níveis nos momentos posteriores ao início das colheitas, voltando a estabilizar-se até a manhã do dia seguinte.

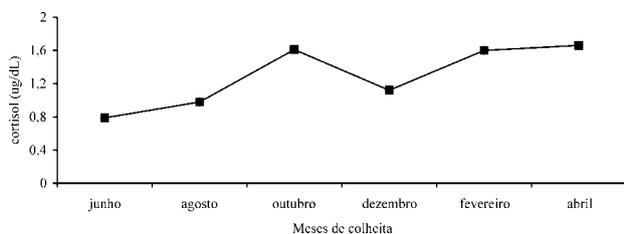


FIGURA 3. Representação gráfica das concentrações plasmáticas médias ($\pm EP = 0,25$) de cortisol (mg/dL), em cinco carneiros da raça Ideal-Polwarth, ao longo de um ano, com colheitas a cada dois meses ($p < 0,05$), mantidos em Botucatu, SP.

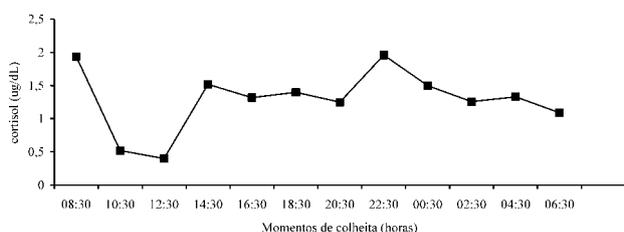


FIGURA 4. Representação gráfica das concentrações plasmáticas médias ($\pm EP = 0,35$) de cortisol (mg/dL), em cinco carneiros da raça Ideal-Polwarth, em doze momentos durante 24 horas, mantidos em Botucatu, SP.

DISCUSSÃO

A correlação positiva evidenciada para colesterol total e HDL, indicativa de interdependência entre elas, pode ser fisiologicamente explicada pelo transporte plasmático das moléculas hidrofóbicas de colesterol, pelas lipoproteínas de alta densidade, no plasma sanguíneo (McDONALD & PINEDA, 1989; STOCCO, 1999). Além disso, como citado por BLACHE et al. (2000), as respostas aos fatores nutricionais podem ser divididas, principalmente, naquelas que atuam sobre o sistema neuroendócrino, controlando a atividade testicular, e naqueles efeitos de longo prazo, os quais atuam sobre o crescimento testicular e a produção espermática, sendo extremamente importantes em animais reprodutores. Da mesma forma, podem ser afetados todos os tecidos endócrinos produtores de hormônios esteróides, cujo precursor é o colesterol, como as adrenais (STARLING et al., 2005). Ao avaliar os níveis de CT em todas as estações do

ano, NAZKI & RATTAN (1991) não observaram diferenças estatísticas entre elas, apenas uma tendência de elevação de seus níveis no verão, o que atribuíram ao decréscimo na utilização do colesterol para a síntese de cortisol, em virtude da redução plasmática deste hormônio. Por outro lado, uma relação inversa também foi observada por estes autores no inverno, quando as concentrações plasmáticas de colesterol tenderam a apresentar uma queda, acompanhando, inversamente, o incremento dos níveis de cortisol. Ao analisar-se as Figuras 1 e 3, pode-se perceber, claramente, uma relação inversa entre os níveis de CT e HDL e os de cortisol plasmático, corroborando com a afirmação anterior, assim como com os resultados do trabalho de ZAMIRI & KHODAEI (2005), de uma relação inversa entre períodos elevados de colesterol e de testosterona no sangue.

O cortisol também não apresentou um ritmo circadiano em suas concentrações, ao contrário daquilo que ficou definido nos animais estudados por SNOJ et al. (1994). Porém, mesmo sem evidenciar um ritmo circadiano, este hormônio apresentou concentrações mais elevadas no início da manhã (08h30min – $1,94 \pm 0,35$ mg/dL), logo ao começarem as colheitas, provavelmente em resposta à situação estressante de manipulação dos animais, e à noite (22h30min – $1,96 \pm 0,35$ mg/dL) e mais baixas ao longo da manhã (10h30min – $0,52 \pm 0,35$ mg/dL e 12h30min – $0,40 \pm 0,35$ mg/dL), mantendo-se constantes nos outros momentos de colheita. O trabalho de NAZKI & RATTAN (1991) indicou concentrações plasmáticas de cortisol mais elevadas no inverno em relação às outras estações do ano, justificada pelo fato da estação de inverno, com sua temperatura mais fria, atuar como um fator estressor inespecífico, levando à liberação hipofisária de ACTH, com conseqüente aumento da atividade adrenal e da secreção de cortisol, permitindo a adaptação dos animais ao ambiente adverso, pelas ações metabólicas deste hormônio, com relação à mobilização de reservas de energia e incremento da atividade celular. Contrariamente, STARLING et al. (2005), mantendo os animais em câmara bioclimática, observaram níveis de cortisol mais elevados na primavera e verão, atribuindo-os ao estresse da elevação da temperatura ambiente e do vapor de umidade, gerado-

res de desconforto térmico e estresse, neste ambiente controlado.

CONCLUSÕES

O estudo com cinco carneiros da raça Ideal-Polwarth não permitiu a determinação de ritmos circadiano e/ou circanual nos valores plasmáticos de cortisol, CT e HDL, mantendo-se dentro de limites fisiológicos e estatisticamente constantes ao longo do ano e nas 24 horas de colheita, com uma interdependência entre as duas últimas variáveis.

NOTAS

1. Vacutainer Systems, Becton Dickinson Vacutainer Systems Europe, BP 37-38241 MEYLAN Cedex, France.
2. Fanem – Centrífuga Excelsa Baby, mod.206-R.
3. Coat-A-Count Cortisol, Diagnostic Products Corporation (DPC), 5700 West 96th Street, Los Angeles, CA 90045-5597.
4. Colesterol e Enzimático, Celm, Al. Amazonas, 764, São Paulo, SP, CEP 06454-070.
5. HDL Colesterol, Celm, Al. Amazonas, 764, São Paulo, SP, CEP 06454-070.

REFERÊNCIAS

- BALL, A. J.; THOMPSON, J. M.; PLEASANTS, A.B. Seasonal changes in body composition of growing Merino sheep. **Livestock Production Science**, Lennoxville, v.46, p.173-180, 1996.
- BLACHE, D.; CHAGAS, L. M.; BLACKBERRY, M.A.; VERCOE, P. E.; MARTIN, G.B. Review: metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. **Journal Reproduction Fertility**, Cambridge, v.120, p.1-11, 2000.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 546-581.
- HARVEY, W. R. **User's Guided for LSMLMW PC-1 version**: mixed model least squares and maximum likelihood computer program. Ohio: State University, 1990. 91 p.
- MCDONALD, L.E.; PINEDA, M. H. **Veterinary endocrinology and reproduction**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p.202-230.
- NAZKI, A. R.; RATTAN, P. J. S. Some hormonal and biochemical characteristics of blood in sheep as related to different seasonal environments. **Indian Veterinary Journal**, v. 68, p.28-32, 1991.
- SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT. User's Guide, release 6.11 Edition**. Cary: SAS Institute, 1996.
- SNOJ, T.; CEBULIJ-KADUNC, N.; CESTNIK, V.; PARDUBSKY, T.; TRENTI, F. Biorhythmicity of cortisol and thyroid hormones in the Jezersko-Solchava breed of sheep. In: **WORLD BUIATRICS CONGRESS**, 18., Bologna, 1994. **Proceedings...** Bologna, 1994. v. 2, p.1573-1576.
- STARLING, J. M. C.; SILVA, R.G.; NEGRÃO, J.A.; MAIA, A.S.C.; BUENO, A.R. Variação estacional dos hormônios tireoideanos e do cortisol em ovinos em ambiente tropical. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, p. 2064-2073, 2005.
- STOCCO, D. M. Testosterone biosynthesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **Encyclopedia of reproduction**. v. 4, San Diego: Academic Press, p.784-789, 1999.
- ZAMIRI, M.J.; KHODAEI, H.R. Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat-tailed rams. **Animal Reproduction Science**, v. 88, p.245-255, 2005.

Protocolado em: 17 fev. 2006. Aceito em: 3 set. 2006.