

# Concentrazioni fecali dei metaboliti del cortisolo in pecore parto

Emanuela Rossi<sup>(1)</sup>, Domenico Robbe<sup>(2)</sup>, Antonio Di Nardo<sup>(1)</sup>, Paolo Dalla Villa<sup>(1)</sup>, Angelo Giammarino<sup>(2)</sup> & Raffaele Luigi Sciorsci<sup>(3)</sup>

## Riassunto

Il presente studio sperimentale è stato realizzato per individuare il momento endocrinologico d'innescamento del parto e verificare eventuali correlazioni tra le concentrazioni dei metaboliti fecali del cortisolo nella madre e la vitalità del nascituro. A tale scopo è stato utilizzato il Kit ELISA 11-oxoetiocholanolone in grado di rilevare il metabolita:11,17-dioxoandrostanes. Durante l'ultima settimana di gestazione e a 12 ore dal parto sono stati confrontati i livelli dei metaboliti del cortisolo nelle feci di 10 ovini positivi per adenomatosi polmonare ovina (APO) e 10 ovini appartenenti al gruppo di controllo. Nei soggetti appartenenti al gruppo APO le concentrazioni medie del cortisolo fecale (500-600 ng/g) sono risultate molto più alte rispetto al gruppo di controllo (150-200 ng/g). In tutti i soggetti (APO e controllo), il livello medio del cortisolo ha subito una variazione significativa ( $p < 0.05$ ) durante gli ultimi due giorni di gestazione. Solo in tre soggetti (2 appartenenti al gruppo APO ed uno al gruppo dei controlli) non si è verificato l'innalzamento significativo ( $p > 0.05$ ) del cortisolo al parto e gli agnelli nati, dotati di scarsa vitalità, sono morti subito dopo. Da tale lavoro si evince che il livello medio del cortisolo della madre non influenza il normale andamento della gravidanza, e che per garantire il normale espletamento del parto e una buona vitalità del neonato è fondamentale

che si verifichi un innalzamento significativo del cortisolo indipendentemente dal suo valore basale.

## Parole chiave

Cortisolo, Metaboliti fecali, Neonato, Parto, Vitalità.

## Introduzione

Il parto segna la fine del periodo di gestazione, quindi il momento in cui il feto diventa indipendente dalla madre e capace di sopravvivere nell'ambiente esterno. Il *primum movens* che determina l'avvio del parto è l'invio di numerosi segnali biochimici del feto alla madre (4). Questi segnali vengono emessi solo quando il feto ha raggiunto una completa maturazione dei sistemi polmonare, circolatorio e ghiandolare preposto alla digestione; nonché la maturità neuro-ormonale nel suo complesso. In particolare, la maturità polmonare è caratterizzata da una modificazione del rapporto biochimico tra le lecitine e le sfingomieline. L'incremento delle lecitine impedisce il collasso degli alveoli polmonari, pertanto garantisce al neonato la possibilità di respirare autonomamente. Tale modificazione biochimica è sotto il controllo del cortisolo sierico, sia endogeno sia somministrato *ad hoc* alla madre in caso di necessità. L'azione del cortisolo fetale e l'integrità ipotalamo-ipofisurrenale risultano quindi fondamentali, per l'innescamento del meccanismo del parto (2, 5).

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia  
e.rossi@izs.it

(2) Department of Veterinary Clinical Sciences, University of Teramo, Viale Crispi 212, 64100 Teramo, Italia

(3) Department of Animal Production, University of Bari, Strada Provinciale per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano (BA), Italia

L'osservazione che anomalie a livello delle ghiandole surrenali e del cervello fetale prolungano la gestazione, è stata confermata da numerosi esperimenti in cui l'ipofisectomia o l'adrenalectomia fetale ritardano il parto (4), mentre la somministrazione di glucocorticoidi lo induce prematuramente (6). Durante le ultime fasi della gravidanza, si assiste ad un aumento dell'accrescimento della corteccia surrenale fetale e ad un aumento della sintesi di glucocorticoidi. In particolare, durante l'ultima settimana di gestazione, nel feto si assiste ad un notevole aumento del cortisolo plasmatico, tale da stimolare l'endometrio e la placenta a produrre PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (3). In generale, l'aumento dei corticosteroidi fetali, durante l'ultimo mese di gestazione sembra essere responsabile anche dell'attivazione di particolari sistemi enzimatici a livello dei cotiledoni che determinano un'elevata capacità della placenta di convertire steroidi (C<sub>21</sub>) in androgeni (C<sub>19</sub>) ed estrogeni, necessari per l'innescamento del meccanismo del parto. Il normale espletamento del parto è possibile solo quando si realizza un'armonica interazione tra feto, forze espulsive e preparazione del canale del parto, tutto questo avviene solo in presenza di corretti equilibri ormonali. Quando il normale susseguirsi di eventi endocrini, biochimici, recettoriali e funzionali subisce qualche modificazione, aumenta il rischio di un parto non perfettamente eutocico (1). Vista la capacità del cortisolo fetale di attraversare la barriera placentare (13) si è ritenuto opportuno misurare le variazioni di tale ormone nella madre partendo dalla matrice fecale (10). I glucocorticoidi presenti nel torrente ematico sono, infatti, metabolizzati a livello epatico mediante coniugazione con acido glucuronico e solfati, ed escreti, sotto forma di cataboliti, sia con le urine, sia con le feci, passando tramite i succhi biliari nel lume intestinale, dove subiscono un'ulteriore trasformazione ad opera della flora intestinale (7, 11). Attraverso studi eseguiti con l'ausilio di glucocorticoidi marcati con isotopi radioattivi è stato possibile rivelare i tempi e le modalità di escrezione di tali sostanze (7). In particolare nelle pecore, pur prevalendo la via urinaria, è possibile titolare anche nelle feci i metaboliti degli

ormoni steroidei intorno alla 12° ora dalla liberazione dell'ormone in circolo (9,11).

I principali metaboliti del cortisolo riscontrabili nelle feci, 21 in tutto, sono gli steroidi C<sub>21</sub>O<sub>4</sub> e C<sub>19</sub>O<sub>3</sub> con un peso molecolare che va da 350 a 302-308 Da maggiormente in forma non coniugata (7).

Gli obiettivi del presente lavoro sono stati i seguenti: identificare il momento dell'innescamento endocrinologico del parto attraverso il dosaggio dei metaboliti del cortisolo fecale (11,17-dioxoandrostanes) nella madre applicando la tecnica proposta da Palme *et al.* (9) ed indagare l'eventuale correlazione tra la loro concentrazione e la vitalità neonatale.

## Materiali e metodi

L'indagine è stata condotta su 20 ovini di razza meticcica custoditi presso l'allevamento di proprietà dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZS A&M) localizzato nella provincia di Teramo. Di questi, 10 ovini risultavano essere positivi per adenomatosi polmonare ovina (APO) (gruppo A), i restanti 10 ovini sani hanno costituito il gruppo di controllo (gruppo B). Gli ovini del gruppo A sono risultati positivi al virus JSRV, evidenziato con la metodica hemi-nested LTR PCR (hn-LTR-PCR) (8). Tutti gli animali sono stati stabulati in un ricovero dotato di paddock esterno, abbeveratoi automatici ed autocatturanti, utilizzate durante le operazioni di campionamento. Durante la sperimentazione tutti gli animali hanno ricevuto una razione alimentare composta da fieno di primo taglio e mangime concentrato (ovini-3 pecora da latte extra, Europa Mangimi). Le pecore sono state sincronizzate attraverso l'applicazione per 12 giorni di spugnette intravaginali di pregnenolone e la somministrazione di PMSG al momento della rimozione delle spugnette e 48 ore prima dell'immissione dei maschi.

Quotidianamente e da ogni singolo animale, la raccolta del materiale fecale è stata effettuata direttamente dall'ampolla rettale tra le otto e le dieci del mattino, per quindici giorni prima del parto; un ulteriore prelievo è stato eseguito

12 ore dopo il parto periodo che corrisponde al delay time tra la il picco ematico del cortisolo al momento del parto e l'escrezione dei suoi metaboliti attraverso le feci. Per l'individuazione del momento del parto, le pecore sono state osservate ogni 6 ore per tutto il periodo della sperimentazione. Tutti gli agnelli sono stati sottoposti alla prova di APGAR per la valutazione della vitalità e dell'efficienza delle principali funzioni dell'organismo. Tale prova è stata effettuata due volte ad 1 e 5 minuti dalla nascita, i parametri considerati frequenza cardiaca, respiratoria attività e tono muscolare, risposta del "grimace" e colorazione delle mucose sono stati misurati e a ciascuno di essi è stato assegnato un numero su una scala 0-2. L'indice di Apgar, che si ottiene dalla somma di questi 5 parametri vitali, può perciò variare da un massimo di 10 ad un minimo di 0. Un indice compreso tra 7 e 10 è stato considerato indicativo di animali in buone condizioni, uno tra 4 e 7 di animali moderatamente depressi e un valore inferiore a 4 di animali marcatamente depressi.

Gli animali sono stati custoditi nel rispetto delle norme previste dalla normativa vigente sulla sperimentazione animale (D. Lgs. 116/92) e con l'approvazione del Ministero della Salute.

I campioni di feci sono stati immediatamente messi in appositi contenitori, identificati con numero progressivo e quindi congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento della procedura di estrazione per prevenire possibili degradazioni ad opera della microflora batterica in essi presente. Al termine del periodo di raccolta si è proceduto con la preparazione dei campioni, scegliendo solo quelli appartenenti all'ultima settimana di gestazione e quelli relativi alle 12 ore dopo il parto. Dopo lo scongelamento, l'omogeneizzazione e le pesature, ad un'aliquota rappresentativa del campione e pari a 0,5 grammi sono stati addizionati 5 ml di una soluzione di metanolo all'80 % in acqua (4 ml metanolo, 1 ml acqua) per l'estrazione dei metaboliti fecali. Dopo agitazione con handvortex per 1-2 minuti e con multishaker (Universal table shaker 709) per 45 minuti a 250 rotazioni al minuto i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 2.500 giri al minuto come descritto

da Palme e Mostl (10). Successivamente da ogni campione è stato prelevato 1 ml di surnatante, poi trasferito in vials con tappo di gomma e ghiera di metallo. I campioni così preparati, sono stati inviati, in appositi contenitori di polistirolo utilizzati per il trasporto di materiale refrigerato, tramite corriere espresso al laboratorio di Biochimica "Ludwig Boltzmann" della facoltà di Medicina Veterinaria di Vienna. Verificata la stabilità dei campioni si è proceduto all'applicazione del test immunoenzimatico 11-oxoetiocholanolone (EIA) secondo la tecnica validata e riportata da Palme e Mostl (10).

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il test di Friedman. Le differenze sono state considerate significative per  $p \leq 0.05$ .

## Risultati

I valori medi  $\pm$  l'errore standard della media (SEM) dei metaboliti del cortisolo fecale riscontrati nei due gruppi sperimentali sono riportati nella Figura 1. I risultati ottenuti evidenziano che il livello medio dei metaboliti del cortisolo fecale del gruppo positivo per APO (500-600 ng/g) è significativamente ( $p < 0.01$ ) più elevato di quello riscontrato nei soggetti di controllo (150-200 ng/g). Nell'ambito di entrambi i gruppi non c'è significatività ( $p > 0.05$ ) tra le differenze delle concentrazioni dei metaboliti riscontrate nei giorni da -7 a -2 dal parto. Solo a partire dal giorno -2 in entrambi i gruppi si ha un incremento dei metaboliti del cortisolo con una differenza statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) rispetto ai valori osservati a 12 ore dopo il parto. Tale aumento risponde al "decorso fisiologico" della concentrazione dell'ormone esaminato il cui picco ematico si osserva al momento del parto. Questo aumento è più rapido nelle pecore appartenenti al gruppo positivo per APO (gruppo A) rispetto agli animali di controllo (gruppo B).

Come si può osservare dalla Figura 2, solo in tre soggetti, 2 appartenenti al gruppo APO (pecora 1 e 2) ed uno al gruppo di controllo (pecora 3), non si è verificato l'innalzamento del cortisolo al momento del parto. Gli agnelli

nati da questi tre animali dotati di scarsa vitalità, sono morti subito dopo e presentavano un indice di Apgar inferiore a 4.

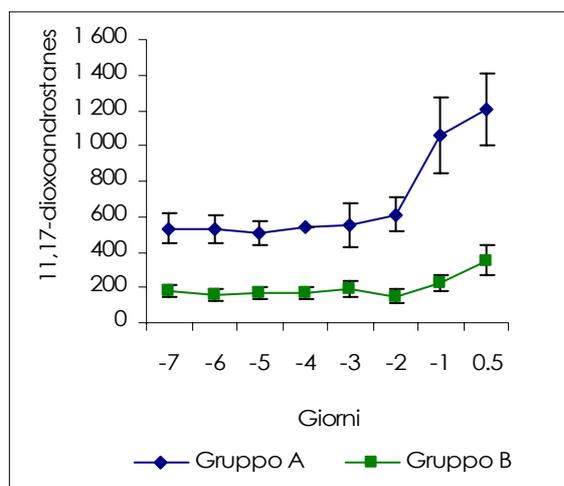


Figura 1  
Valori medi  $\pm$  SEM delle concentrazioni dei metaboliti (11,17-dioxoandrostanes) dei gruppi A e B

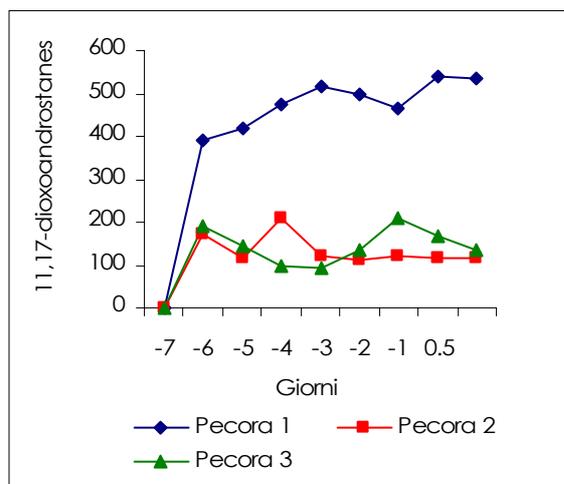


Figura 2  
Valori dei metaboliti fecali (11,17-dioxoandrostanes) del cortisolo nelle pecore 1 e 2 (gruppo A) e nella pecora 3 (gruppo B)

## Discussione

La tecnica del dosaggio dei metaboliti fecali del cortisolo proposta da Palme e Mostl (10) è risultata idonea alla presente prova sperimentale, infatti, i dati ottenuti rispecchiano gli eventi correlati all'innesco del parto.

L'uso delle feci offre numerosi vantaggi: le feci sono facili da raccogliere ed il campionamento ripetuto può essere fatto senza disturbare l'animale, quindi senza influenzarne lo stato endocrino (7, 10). Questo consente anche di monitorare sia i cambiamenti a breve termine, legati a particolari eventi, sia i profili a lungo termine durante studi longitudinali, come ad esempio le modificazioni ormonali durante la fase di preparazione al parto e di maturazione dell'asse ipofisi surrenale fetale. Il livello fecale dei metaboliti del cortisolo, infatti, rappresenta un valore integrato in un intervallo temporale e non un valore legato al solo momento del prelievo (12).

Dal presente studio si evince che il livello medio dei metaboliti del cortisolo fecale della madre non influenza il normale andamento della gravidanza e che, per garantire il normale espletamento del parto e la buona vitalità del neonato, è fondamentale che si verifichi l'innalzamento del cortisolo rispetto al valore basale. Visto che il picco del cortisolo fecale si ha 12 ore dopo il picco ematico e che l'incremento dei suoi metaboliti inizia a -2 giorni dal parto, si può affermare che nella pecora l'avvio della preparazione al parto inizia 60 ore prima (con un intervallo massimo di -6 ore pari al tempo trascorso tra l'ultima visita ed il parto). Pertanto il dosaggio dei metaboliti fecali del cortisolo potrebbe essere utilizzato come valore predittivo dell'innesco endocrinologico del parto al fine di garantire il benessere della madre e del nascituro.

Dai dati in nostro possesso si può ipotizzare che esiste una correlazione tra la concentrazione dei metaboliti fecali del cortisolo riscontrati nella madre e la vitalità del neonato; infatti, negli unici tre casi esaminati (due del gruppo A ed uno del gruppo B) in cui gli agnelli subito dopo la nascita sono morti non si è evidenziato l'innalzamento del cortisolo a partire dal giorno -2. L'esiguo numero degli agnelli deceduti non ci ha permesso di dimostrare dal punto di vista statistico tale correlazione, pertanto saranno necessari ulteriori studi su un numero maggiore di soggetti.

## Ringraziamenti

---

Gli autori ringraziano i sig.ri Gino e Vincenzo D'Innocenzo, Doriano Ferrari e Giampaolo Foschini per le amorevoli cure prestate agli animali, la Dott.ssa Melania Giammarco, del Dipartimento di Scienze degli Alimenti

dell'Università degli Studi di Teramo, per la collaborazione alla preparazione ed allo stoccaggio dei campioni fecali ed il Dott. Luca Candeloro per l'elaborazione statistica dei dati.

## Bibliografia

---

1. Aguggini G., Beghelli V., Clemente M.G., D'Angelo A., Debenedetti A., Facello C., Giulio L.F., Guglielmino R., Lucaroni A., Maffeo G., Marongiu A., Naitana S., Nuvoli P. & Piazza R. 2002. Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. 2nd Ed. UTET, Turin, 793-798.
2. Bassett S.M., Oxborrow T.J., Smith I.D. & Thorburn G.D. 1969. The concentration of progesterone in the peripheral plasma of the pregnant ewe. *J Endocr*, **45**, 449-457.
3. First N.I. & Lohse J. 1984. Mechanism initiating and controlling parturition. *In Proc. 10th International Congress on animal reproduction and artificial insemination*, 10-14 June, Urbana. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, v-31.
4. Liggins G.C. 1969. The foetal role in the initiation of parturition in the ewe. *In Foetal autonomy* (G.E.W. Wolstenholme & M. O'Connor, eds). Churchill, Ltd, London, 218-231.
5. Minoia P. 1977. Il probabile ruolo svolto dai glicocorticoidi nella determinazione del parto dei ruminanti. *Acta Med Vet*, **23**, 89- 92.
6. Minoia P. & Sciorsci R.L. 1985. Aspetti fisiopatologici della gravidanza e del parto nella pecora e nella capra. *Atti Sisvet*, **39**, 85-102.
7. Mostl E., Maggs J.L. Schrotter G., Besenfelder U. & Palme R. 2002. Measurement of cortisol metabolism in faeces of ruminants. *Vet Res Commun*, **26**, 127-139.
8. Palmarini M., Datta S., Omid R., Murgia C. & Fan H. 1996. The long terminal repeats of Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) are preferentially active in type II pneumocytes. *J Virol*, **74**, 5776-5787.
9. Palme R., Fischer P., Schildorfer H. & Ismail M.N. 1996. Excretion of infused <sup>14</sup>C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim Reprod Sci*, **43**, 43-63.
10. Palme R. & Mostl E. 1997. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Int J Mammal Biol*, **62** (Suppl. II), 192-197.
11. Palme R., Rettenbacher S., Touma C., El Bahr S.M. & Mostl E. 2005. Stress hormones in mammals and birds comparative aspects regarding metabolism, excretion and non invasive measurement in faecal samples. *Ann NY Acad Sci*, **1040**, 162-171.
12. Przkop F., Stupnicka E., Woliniska-Witort E., Mateusiak K., Sadowski B. & Domanski E. 1985. Changes in circadian rhythm and suppression of the plasma cortisol level after prolonged stress in the sheep. *Acta Endocrinol*, **110**, 540-545.
13. Ptak G., Clinton M., Tischner M., Barboni B. & Mattioli M. 2002. Improving delivery and offspring viability of *in vitro*-produced and cloned sheep embryos. *Biol Reprod*, **67**, 1719-1725.