

Detección de cortisol en pelo como biomarcador de estrés crónico en perros de trabajo de las FAS

Sanmartín Sánchez L^{1a}., Lozano Benito D.^{1b}, Rico Sevilla M.^{1c}, Vega-Pla JL^{2a}.

Sanidad mil. 2016; 72 (4): 255-259, ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Justificación: La medición de cortisol en pelo, es una técnica no invasiva que proporciona una imagen retrospectiva de su acumulación durante un periodo de tiempo prolongado. **Objetivo:** Determinar los niveles de cortisol en pelo en perros de trabajo como biomarcador del estrés crónico, así como el efecto de factores como la estacionalidad y el despliegue en operaciones internacionales. **Diseño:** El estudio se realizó en el Laboratorio de Investigación Aplicada, con un total de 24 perros del ET sometidos a distintas condiciones ambientales. **Metodología:** Las muestras de pelo se analizaron mediante un ensayo tipo ELISA (Enzyme-LinkedImmuno-SorbentAssay) para medir la concentración de cortisol, previa extracción alcohólica. **Resultados:** La concentración media de cortisol fue significativamente superior en primavera respecto al verano y no se encontraron efectos significativos debidos al despliegue. **Conclusión:** El presente trabajo desvela una concentración diferencial en los niveles de cortisol en pelo de perros de trabajo debido a la estación del año.

PALABRAS CLAVE: Perros de trabajo, Cortisol en pelo, Estrés, Despliegue, ELISA.

Hair cortisol detection as biomarker of chronic stress in military working dogs

SUMMARY: Justification: The measurement of hair cortisol, is a noninvasive technique that provides a retrospective of its accumulation over a period of time. **Objective:** To investigate the levels of cortisol in dogs as a biomarker of chronic stress, and the effect of factors such as season and deployment. **Design:** The study was conducted in the LIA, with a total of 24 dogs subjected to differential environmental conditions. **Methods:** Hair samples were analyzed by ELISA for measuring cortisol concentration after alcoholic extraction. **Results:** The mean concentration of cortisol in dogs was significantly higher in spring than summer, and no significant effects of deployment were found. **Conclusion:** This study reveals different levels of cortisol concentration in hair dog's between seasons.

KEYWORDS: Dog, Hair Cortisol, Stress, Season, Deployment, ELISA.

INTRODUCCIÓN

El cortisol es un glucocorticoide que juega un papel clave en la respuesta fisiológica al estrés y en la alostasis, el proceso activo de mantenimiento y restablecimiento de la homeostasis, lo que ayuda a un animal a adaptarse a una nueva situación o reto ambiental¹.

Existen muchos factores que pueden hacer que la parametrización de la respuesta de estrés, como la medición del cortisol en sangre sea difícil (por ejemplo, la restricción durante la punción venosa, la capacidad para probar la respuesta por sólo un breve momento en el tiempo), por lo que es complejo estudiar el efecto de los factores medioambientales prolongados en la producción de cortisol en sangre. De hecho, los estudios sobre la secreción de cortisol plasmático estacional en algunas especies como equi-

nos, no siempre están de acuerdo². Las muestras de pelo se han propuesto para evitar procedimientos de muestreo invasivos y en periodos más largos. La medición de cortisol en muestras de pelo, se ha utilizado en varias especies^{3,4}, proporcionando una "imagen retrospectiva" de la acumulación y la incorporación de la hormona partir del plasma durante un periodo de tiempo. Esto permite estudiar el incremento de hormonas o xenobióticos durante el proceso de crecimiento o el control del estrés crónico asociado con diversas manipulaciones experimentales de los animales o el mantenimiento en cautividad⁵. Debido a que se trata de una técnica no cruenta, las mediciones de concentración de cortisol en pelo representan una alternativa interesante para los estudios de estrés, aportando una estimación más exacta de los niveles basales mantenidos en el tiempo que una sola medición⁶.

Numerosos trabajos en la especie humana han ensayado la medición de cortisol en pelo modificando un inmunoensayo originalmente desarrollado para saliva^{7,8}. La metodología para la extracción del cortisol en pelo de animales fue validada en trabajos pioneros en animales salvajes^{3,4}, donde se ensayaron la idoneidad de disolventes adecuados para la extracción de la molécula dadas las características diferenciales del pelo respecto a la especie humana (higiene de lavado, secreción sebácea etc.). Asimismo, en los citados trabajos se utilizaron ensayos tipo ELISA desarrollados para saliva y demostraron que las experiencias estresantes prolongadas producen un aumento significativo de la concentración de cortisol en el pelo.

¹ Cap. Veterinario.

² Tcol. Veterinario.

^a Laboratorio de Investigación Aplicada. SGAP-SEGENTE Ministerio de Defensa. Córdoba. Apartado de Correos 2087, C.P: 14080. Córdoba.

^b Unidad de Servicios de la Base Jaime I. C.P: 46117, Bétera (Valencia). Correo: dlozben@et.mde.es

^c Unidad de Servicios de la Base "General Alemán Ramírez". C/ Coronel Rocha S/N. C.P: 35009. Las Palmas de Gran Canaria. Correo: mricsev@et.mde.es

Dirección para correspondencia: Lourdes Sanmartín Sánchez. Laboratorio de Investigación Aplicada, Apartado de Correos 2087, 14080-Córdoba. Telf.: 957325312 Fax.: 957322493. Correo: msans32@oc.mde.es

Recibido: 6 de julio de 2017

Aceptado: 14 de octubre de 2016

Se conocen varios estudios de determinación de los niveles de cortisol en pelo de perros⁹⁻¹². En unos se encontraron diferencias en los niveles de cortisol achacables a la vida en ambientes solitarios o la convivencia en perreras, así como a atributos como el color del pelo⁹; en otros se observó un paralelismo entre las reacciones de comportamiento y los niveles de cortisol producidos por estímulos acústicos reiterados¹¹.

Los perros de trabajo de las FAS se encuentran sometidos a unas condiciones peculiares, donde el transporte, los distintos ambientes, personas y olores a los que se enfrentan, etc., pueden provocarles un aumento de estrés especialmente en situaciones de despliegue en Operaciones. A pesar de que la presencia de cortisol en el pelo revela el acúmulo de cortisol a largo plazo y puede ser un indicador del estrés crónico, también hay que tener en cuenta posibles variaciones estacionales. Por ello, se buscan herramientas para poder cuantificar el estrés objetivamente, y así intentar minimizarlo al máximo.

El objetivo principal de este estudio es aportar una estimación de los niveles de cortisol del pelo de perros de trabajo de las Fuerzas Armadas en dos periodos estacionales (primavera y verano), como biomarcador del estrés crónico. Como objetivos secundarios se plantean:

1. Determinar si existen diferencias entre grupos de animales (intersujetos) sometidos a distintas condiciones ambientales: despliegue en Afganistán y Territorio Nacional.
2. Investigar los posibles efectos de la estación del año y del despliegue en Operaciones sobre las concentraciones de cortisol en pelo de perros adultos de trabajo (intrasujetos).
3. Verificar si la determinación de los niveles de cortisol en pelo mediante la técnica ELISA tiene sensibilidad suficiente para comparar con los niveles de referencia en esta especie y detectar diferencias entre casos y controles poblacionales.

METODOLOGÍA

Población de estudio

Se seleccionaron aleatoriamente un total de 24 perros de trabajo de distintas razas y edades, donde la proporción de sexos fue de 20 machos y 4 hembras. Los animales se dividieron en dos grupos (casos y controles) atendiendo a si desplegaban en Zona Operaciones (casos) en la estación de verano (Afganistán, casos: 8 individuos,) o por el contrario, se mantenían en Territorio Nacional (controles: 16 individuos).

El discreto tamaño de la población de estudio, se debió por una parte a que se desplegaron pocos animales, y también a motivos de manejo para la obtención de las muestras. Los animales seleccionados no alteraron su actividad programada recibiendo el entrenamiento previsto previo al despliegue y su trabajo durante el mismo, así como también las condiciones ambientales para los individuos mantenidos en Territorio Nacional se mantuvieron homogéneas (individuos sanos, actividad normal).

Muestras

Se rasuró una zona de pelo del abdomen de un área de 5 x 5 cm en cada individuo (casos y controles), obteniéndose dos

muestras pareadas, una en primavera (marzo) previa al despliegue y otra en verano (julio) durante el repliegue. Todas las muestras de los individuos casos y controles fueron obtenidas en condiciones similares (hora y día) y almacenadas a temperatura de refrigeración en bolsas individuales identificadas.

El número total de muestras finalmente analizadas (41) fue inferior al número de muestras obtenidas (48), debido a que algunas no fueron aptas para su análisis. Las muestras aptas se clasificaron atendiendo a la estación del año (22 muestras de primavera y 19 muestras de verano) y al número de casos y controles (15 muestras obtenidas de los individuos casos y 26 de los controles). Asimismo, se subdividieron las muestras en 4 grupos: casos primavera (8), controles primavera (14), casos verano (7), y controles verano (12).

Extracción y detección de cortisol en pelo

Las muestras recogidas durante el año 2015 fueron remitidas al LIA (Laboratorio de Investigación Aplicada) donde a su recepción se almacenaron en congelación (-18°C) hasta el momento de su análisis. Se seleccionaron 250 mg de pelo por animal, que se introdujeron en tubos cónicos de 15 ml. Cada muestra se lavó usando 2,5 ml de Isopropanol (2-propanol 99,5% Sharlab) en agitación (1800 rpm durante 2,5 minutos) para eliminar la suciedad y los posibles esteroides externos sin afectar a los esteroides internos⁴. Las muestras se dejaron secar durante 36 horas a temperatura ambiente. A continuación, el pelo se cortó en fragmentos <2 mm de longitud con una tijera, se pesaron entre 120-150 mg por individuo y fueron introducidos en un microtubo de 2 ml. Se añadieron 1,5 ml de metanol por cada muestra, para a continuación incubarlos durante 18 horas a 30°C a la vez que se agitaban (100 r.p.m) (Mixer block[®]). El contenido de cada vial se centrifugó a 7000 g durante 2 minutos, se recuperaron 0,750 ml de la fase líquida y se incubaron en nuevos microtubos sobre una bandeja a 38°C hasta la desecación completa y la obtención de un residuo¹³. Cada muestra se reconstituyó en 0,2 ml de PBS (phosphate-buffer saline) 0,05 M, pH= 7-7,5 y se agitó. Las muestras se analizaron mediante un kit de ensayo ELISA para la detección de cortisol en saliva (Demeditec[®]). La sensibilidad del kit de ensayo fue de 0,024 ng/ml, con un rango de detección de 0-30 ng/ml. A partir de la curva estándar se calculó la concentración de la hormona (picogramos cortisol/ miligramo de pelo) en cada una de las muestras³.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el paquete estadístico SPSS 14.0 para Windows, y para la creación de figuras se empleó la aplicación Statgraphics plus professional 16.0.03. Se llevaron a cabo diferentes análisis en relación a los objetivos e hipótesis propuestos en este estudio.

En primer lugar, se procedió a realizar un análisis descriptivo de diversas variables. Para ello se calcularon frecuencias, porcentajes, estadísticos de tendencia central y dispersión dependiendo de la naturaleza de cada una de las variables incluidas.

A continuación, se llevaron a cabo diferentes pruebas estadísticas con un nivel de significación menor o igual a 0,05 para la comparación de las variables. Se contrastó la normalidad y

la homocedastidad de los valores obtenidos de la variable dependiente o de respuesta "cortisol en pelo", mediante el test de Shapiro y test de Levene, respectivamente.

Con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas intersujetos entre los grupos de casos y controles se utilizó un modelo general lineal (GLM) para valorar la influencia de otras variables como la estación del año (primavera vs verano) sobre la concentración de cortisol en pelo, y la influencia de factores como el despliegue sobre la concentración de cortisol medida en picogramos por miligramo de pelo (pg/mg) entre los individuos objeto de estudio.

Finalmente, no se analizó el tamaño del efecto (eta cuadrado parcial o d de cohen) para ver cuánto de grandes podrían ser las diferencias en la condición estacionalidad.

RESULTADOS

Los valores de cortisol en pelo variaron entre 13,36 y 41,22 pg/mg pelo, donde la concentración media de cortisol en la población de estudio fue de 21,92 pg/mg de pelo (d.t.= ±5,98).

En la Tabla 1 se recoge el tamaño muestral de la población de estudio y la descripción estadística de las muestras de pelo analizadas, incluyendo los valores de concentración media de cortisol y su desviación típica atendiendo a los dos grupos objeto de estudio (casos y controles) y a las dos estaciones (primavera y verano). La concentración media de cortisol en los casos fue de 23,17 pg/mg (d.t. =±7,60) y en los controles de 22,22 pg/mg (d.t.=±5,12). La concentración media en la estación de primavera fue de 24,14 pg/mg (d.t.= ±6,43); mientras que en la estación de verano fue inferior con una concentración media de 20,75 pg/mg (d.t.=±5,20).

Tabla 1. Descripción estadística de la muestra (tamaño, media y desviación típica).

MUESTRAS	CASOS (15)	CONTROLES (26)	TOTAL (41)
primavera (22)	24,60 ±8,73)	22,00 ±5,00	24,14 ±6,43
verano (19)	21,54 ±6,32	20,30 ±4,65	20,75 ±5,20
Total (41)	23,17±7,60	22,22±5,12	21,92 ±5,98

La distribución de la concentración de cortisol en el pelo globalmente en la población de estudio incluyendo ambos grupos (casos y controles) se muestra en la Figura 1. La concentración

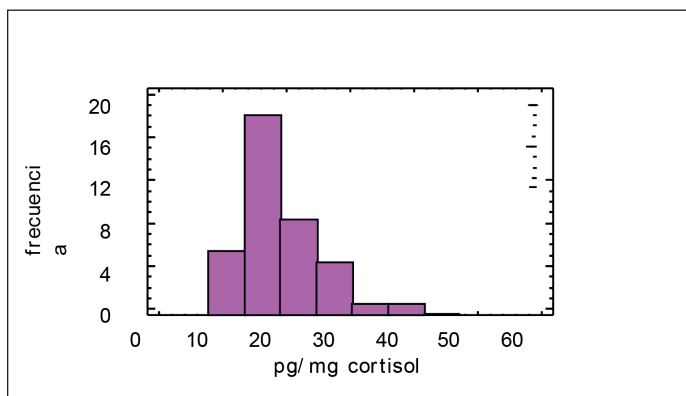


Figura 1. Histograma de las frecuencias observadas de concentración de cortisol.

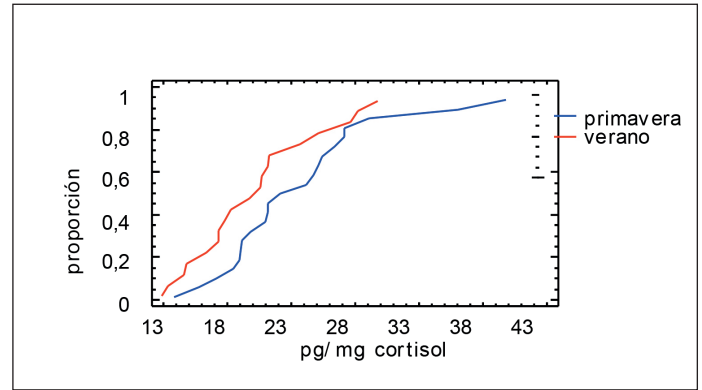


Figura 2. Concentración de cortisol estacional.

de cortisol estacional se representa en la Figura 2, donde en primavera los valores variaron entre 14,35 y 41,22 pg/mg y en verano fueron inferiores y oscilaron entre 13,36 y 30,81 pg/mg.

Los valores de la concentración de cortisol no se ajustaron a una distribución normal mediante el Test de Shapiro (W=0,940, P=0,0448). Los resultados del Modelo General Lineal (GLM) se muestran en las Tablas 2 y 3. Las pruebas de contraste intrasujetos para la medida del efecto de la estación del año revelaron diferencias significativas en los niveles de cortisol entre estaciones (F=5,456; p=0,033), siendo la concentración de cortisol significativamente superior en primavera (marzo) respecto al verano (julio) tanto en los individuos que desplegaron como en los que no lo hicieron como se observa en la Figura 3.

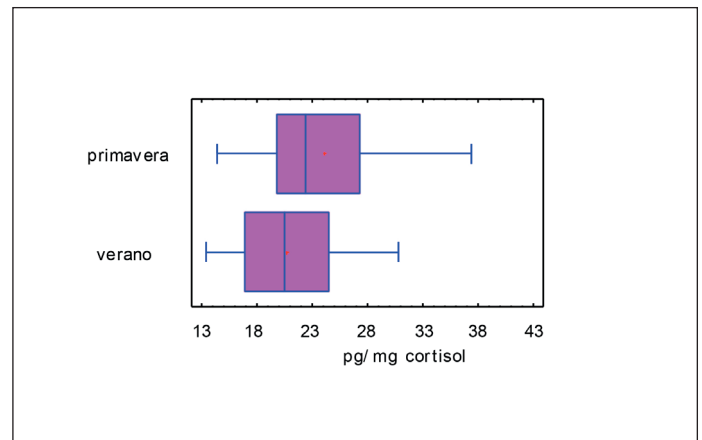


Figura 3. Gráfico de cajas y bigotes para la concentración de cortisol entre estaciones

Tabla 2. Pruebas de contraste GLM intrasujetos para el efecto de la época del año.

Fuente	Factor	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Estación del año	Lineal	77,030	1	77,030	5,456	0,033
Factor despliegue	Lineal	4,658	1	4,658	0,330	0,574
Error (factor)	Lineal	225,873	16	14,117		

gl: grados de libertad

Tabla 3. Pruebas de contraste GLM intersujetos y su interacción con el despliegue.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	16793,194	1	16793,194	263,754	0,000
Despliegue	9,201	1	9,201	0,145	0,709
Error	1018,717	16	63,670		

gl: grados de libertad

No se encontraron efectos significativos sobre la concentración de cortisol entre casos y controles atribuibles al factor de estudio “despliegue” en las pruebas de contraste inter-sujetos (Tabla 3). Se observaron concentraciones homogéneas y similares de cortisol en pelo entre casos y controles (Figura 4), y de forma paralela en cada una de las muestras de las subpoblaciones objeto de estudio (casos primavera, casos verano, controles primavera y controles verano), que indicó no estar influido por desplegar o no en Zona de Operaciones (Figura 5).

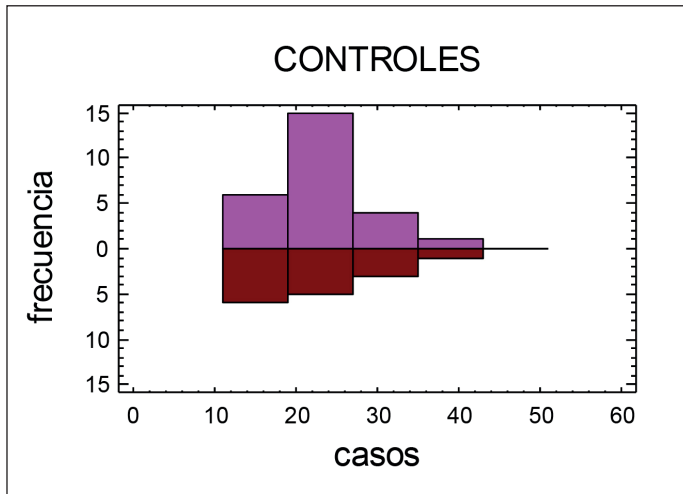


Figura 4. Gráfico concentración de cortisol entre casos y controles.

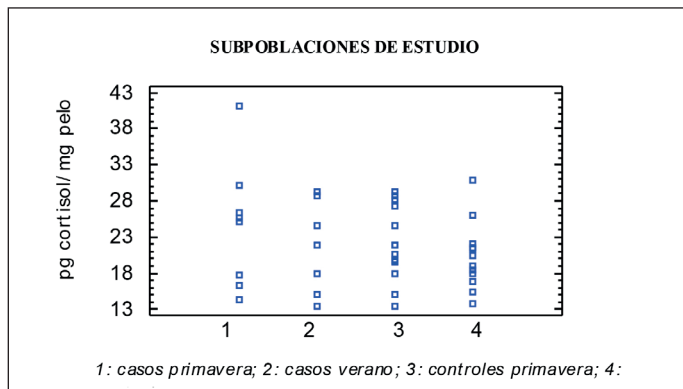


Figura 5. Concentraciones observadas en las subpoblaciones de estudio

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realiza la medición de cortisol en pelo utilizando una metodología que ha sido validada en la especie canina^{9,10}, a través de estudios de correlación positiva comparando la concentración de cortisol en el plasma, heces y pelo,

utilizando un ensayo inmunoenzimático para saliva que avalan los resultados obtenidos. Las concentraciones obtenidas de cortisol en pelo se encuentran en el rango de valores descritos en la especie canina que oscilan entre (4,56 y 27,09 pg/mg)^{9,10}.

Por otra parte, en este estudio se comparan factores ambientales como la estacionalidad y las condiciones de trabajo, que pueden resultar en una fuente de estrés para los animales y tener su reflejo en la respuesta orgánica del individuo (parametrización biológica), como son las condiciones excepcionales del despliegue y/o la evolución del estrés a lo largo de dos estaciones del año consecutivas. Algunos trabajos en otras especies animales midieron los efectos ambientales (temperatura, precipitaciones, iluminación) sobre la concentración de cortisol al nacimiento y a los 30 días de vida, sin encontrar influencia de estos factores pero si un descenso en el cortisol que representa la progresiva adaptación al entorno^{14,15}. Estos hallazgos están en la línea de los resultados obtenidos ya que las condiciones medioambientales fueron homogéneas con una tendencia similar en ambos grupos achacable al entorno estacional, sin encontrar diferencias ni aumento en los niveles de estrés justificables por el trabajo desarrollado por estos perros en el Teatro de Operaciones.

Además, los resultados de nuestro estudio mostraron que el cortisol en el pelo varía con la temporada del año, donde los niveles fueron más altos en primavera respecto al verano y presentaron un paralelismo con los encontrados en un estudio reciente¹², donde se midió la respuesta de estrés a largo plazo analizando muestras de pelo de perros pastores alemanes. En el citado trabajo se concluyó que el cortisol extraído del pelo refleja los niveles de actividad y estrés a largo plazo durante semanas o incluso meses, existiendo una marcada estacionalidad y también una respuesta en función de la funcionalidad del animal, ya que los perros de competición presentaron niveles más altos en comparación con los de compañía y los de trabajo profesionales.

Por tanto, este modelo de estudio es una herramienta interesante y un método prometedor para revelar estados de estrés crónico en un período de tiempo más o menos largo, y cómo la interacción humana y la estacionalidad pueden influir en el nivel de cortisol en los perros.

CONCLUSIONES

El presente trabajo aporta un protocolo sustentado en una técnica previamente validada, que permite el cálculo de los niveles de cortisol en el pelo como biomarcador del estrés crónico en perros de trabajo. Se ha observado una concentración diferencial en los niveles de cortisol en dos estaciones del año. Pero el resultado más interesante es la capacidad de adaptación de los perros de trabajo adiestrados ya que no se detecta variación significativa en los niveles de estrés entre perros sometidos o no a unas condiciones de trabajo y ambientales tan características como es un despliegue en una Zona de Operaciones como Afganistán.

AGRADECIMIENTOS

Al Batallón de Policía Militar, y en especial a los guías caninos de su Sección Cinológica, por la dedicación y profesionalidad en el trabajo diario con sus compañeros caninos.

Esta investigación ha sido parcialmente financiada por la Diputación de Córdoba a través de un Convenio de Colaboración suscrito entre ambas instituciones.

BIBLIOGRAFIA

1. McEwen BS. Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1998;840(1):33-44.
2. Place NJ., McGowan CM., Lamb SV., Schanbacher BJ., McGowan T., Walsh DM. Seasonal Variation in Serum Concentrations of Selected Metabolic Hormones in Horses: Seasonal Variation in ACTH. *J. Vet. Intern. Med.* 2010;24(3):650-654.
3. Koren L., Mokady O., Karaskov T., Klein J., Koren G., Geffen E. A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Anim. Behav.* 2002;63(2):403-406.
4. Davenport MD., Tiefenbacher S., Lutz CK., Novak MA., Meyer JS. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006;147(3):255-261.
5. Carlitz EHD., Kirschbaum C., Stalder T., van Schaik CP. Hair as a long-term retrospective cortisol calendar in orang-utans (*Pongo spp.*): New perspectives for stress monitoring in captive management and conservation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014;195:151-156.
6. Gow R., Thomson S., Rieder M., Van Uum S., Koren G. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci. Int., Forensic Sci Int.* 2010 20;196(1-3):32-7.
7. Sauvé B., Koren G., Walsh G., Tokmakejian S., Van Uum SH. Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clin Invest Med.* 2007;30(5):E183-91.
8. Yamada J., Stevens B., de Silva N., Gibbins S., Beyene J., Taddio A., Newman C., Koren G. Hair Cortisol as a Potential Biologic Marker of Chronic Stress in Hospitalized Neonates. *Neonatology* 2007;92(1):42-49.
9. Bennett A., Hayssen V. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domest Anim Endocrinol.* 2010 Oct;39(3):171-80.
10. Accorsi PA., Carloni E, Valsecchi P, Viggiani R, Gamberoni M, Tamanini C, Seren E. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen Comp Endocrinol.* 2008 Jan 15;155(2):398-402.
11. Siniscalchi M., McFarlane JR., Kauter KG., Quaranta A., Rogers LJ. Cortisol levels in hair reflect behavioural reactivity of dogs to acoustic stimuli. *Res Vet Sci.* 2013 Feb;94(1):49-54.
12. Roth LS., Faresjö Å., Theodorsson E., Jensen P. Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. *Sci Rep.* 2016 Jan 21;6:19631.
13. Tallo-Parra O., Manteca X., Sabes-Alsina M., Carbajal A., Lopez-Bejar M. Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. *Animal.* 2015 Jun;9(6):1059-64.
14. Montillo M., Comin A., Corazzin M., Peric T., Faustini M., Veronesi MC., Valentini S., Bustaffa M., Prandi A. The Effect of Temperature, Rainfall, and Light Conditions on Hair Cortisol Concentrations in Newborn Foals. *J. Equine Vet. Sci.*, Jun. 2014;34(6):774-778.
15. Comin A., Veronesi MC., Montillo M., Faustini M., Valentini S., Cairoli F., Prandi A. Hair cortisol level as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in horse foals. *Vet J.* 2012 Oct;194(1):131-2.