

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n2a267.1-6>

Monitoramento dos metabólitos fecais de progesterona e estradiol durante o ciclo estral em fêmeas suínas

Bárbara Luiza Migueis Nunes¹, Jonatas Maciel Claudio¹, Mayara Fonseca Ferreira¹, Rodrigo de Souza Amaral^{2*}

¹Aluno do curso de Medicina Veterinária, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – Campus Manaus Zona Leste – IFAM/CMZL, Manaus – AM, Brasil.

²Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – Campus Manaus Zona Leste – IFAM/CMZL, Manaus – AM, Brasil.

* Autor para correspondência. E-mail: rodrigo.amaral@ifam.edu.br

Resumo. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de metabólitos fecais de progesterona e estradiol ao longo do ciclo estral em fêmeas suínas. Assim, amostras de fezes foram coletadas de quatro fêmeas adultas saudáveis e vazias duas vezes por semana por 75 a 200 dias, dependendo do indivíduo. Os metabólitos fecais de progesterona e estradiol foram dosados por enzimaímunensaio. A duração do ciclo estral estimada (~21 dias), bem como a duração das fases progesterônica (~12 dias) e não progesterônica (~8 dias) corroboraram com as relatadas na literatura, com diferenças entre as fases para os metabólitos fecais de progesterona. Houve uma ausência de sincronia entre os metabólitos fecais de progesterona e estradiol, relacionada com as diferenças na metabolização e excreção destes hormônios. Este estudo demonstrou a viabilidade no uso de amostras fecais para o monitoramento longitudinal do ciclo estral em suínos. Entretanto, é necessário considerar as diferenças na metabolização dos hormônios ao avaliar a interação hormonal durante o ciclo estral.

Palavras chave: ciclo estral, fezes, hormônios, reprodução, suínos

Monitoring of progesterone and estradiol fecal metabolites during estrous cycle in sows

Abstract. The aim of this study was to evaluate the progesterone and estradiol fecal metabolites levels during the estrous cycle in sows. Therefore, fecal samples were collected from four adult healthy females 2 x/week during 75 to 200 days. Progesterone and estradiol fecal metabolites were measured by enzyme immunoassay. The estimated estrous cycle length (~21 days) and the progesteronic (~12 days) and no-progesteronic (~8 days) phases corroborated with the literature, showing statistical difference between phases for progesterone fecal metabolites. We observed an absence of synchrony between the progesterone and estradiol metabolites during estrous cycle, associated to differences in steroid metabolism in this species. This study demonstrated the viability in use of fecal samples for the longitudinal monitoring of estrous cycle in swine; however, it is necessary take in count the differences in hormone metabolism on the interpretation of the fecal hormone profile during the estrous cycle.

Keywords: estrous cycle, feces, hormones, reproduction, swine

Monitorio de los metabolitos fecales de progesterona y estradiol durante el ciclo estral en cerdas

Resumen. El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles de metabolitos fecales de progesterona y estradiol durante el ciclo estral en cerdas. Así, muestras de heces fueron recolectadas de cuatro hembras adultas sanas 2 veces por semana por 75 a 200 días. Los metabolitos fecales de progesterona y estradiol fueron dosificados por enzaimunoensayo. La duración estimada del ciclo estral (~21 días), así como la duración de las fases progesterónica (~12 días) y no progesterónica (~8 días) corroboraron con la literatura, con diferencias entre las fases para los metabolitos fecales de progesterona. Observamos una ausencia de sincronía entre los metabolitos fecales de progesterona y estradiol, relacionados con las diferencias en la metabolización y excreción de estas hormonas. Este estudio demostró la viabilidad en el uso de muestras fecales para el monitoreo longitudinal del ciclo estral en cerdos; sin embargo, es necesario considerar las diferencias en la metabolización de las hormonas al evaluar la interacción hormonal durante el ciclo estral.

Palabras clave: ciclo estral, heces, hormonas, reproducción, cerdos

Introdução

Nas últimas décadas houve um aumento crescente no uso de matrizes alternativas, como fezes e urina, para o monitoramento de hormônios esteroides durante os eventos reprodutivos em animais domésticos e selvagens (Amaral, 2010; Graham, 2004; Kersey & Dehnhard, 2014; Schwarzenberger, 2007; Schwarzenberger et al., 1996), possibilitando um monitoramento não invasivo e reduzindo o estresse da manipulação dos animais. Em animais domésticos, o uso de matrizes alternativas tem sido aplicado no monitoramento e diagnóstico dos eventos e de patologias reprodutivas, como ciclo estral, gestação, puberdade, aborto, criptorquidismo, entre outros. Além do que, os animais domésticos podem ser utilizados como modelos experimentais no desenvolvimento de técnicas laboratoriais a serem aplicadas em espécies selvagens (Schwarzenberger et al., 1996).

De acordo com Palme et al. (1996), a principal rota de excreção dos metabólitos de esteroides em suínos é a urinária, e somente 4 a 34% dos metabólitos de esteroides são excretados nas fezes, variando de acordo com o hormônio metabolizado. Entretanto, considerando a grande facilidade de coleta de amostras fecais, alguns estudos têm demonstrado a possibilidade de uso dos metabólitos fecais de esteroides no monitoramento reprodutivo nesta espécie (Amaral et al., 2016; Cestnik et al., 2001; Choi et al., 1987; Moriyoshi et al., 1997; Ohtaki et al., 1999; Sanders et al., 1994; Snoj et al., 1998; Snoj & Cestnik, 1994; Vos, 1996).

Em porcas, os estudos publicados focaram principalmente na dosagem de metabólitos fecais de progesterona e de estrona como ferramenta para o diagnóstico de gestação. Sanders et al. (1994) relataram a aplicabilidade do uso de amostras fecais no monitoramento do ciclo estral, porém, somente avaliando os metabólitos fecais de progesterona. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de metabólitos fecais de progesterona e estradiol ao longo do ciclo estral em fêmeas suínas.

Material e métodos

Foram utilizadas quatro fêmeas adultas saudáveis e vazias mestiças Landrace vs. Large White. Todos os animais foram mantidos em baias individuais com bebedouros tipo chupeta e alimentados com ração comercial, no Setor de Suinocultura, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – Campus Manaus Zona Leste – IFAM/CMZL. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da instituição (protocolo CEUA. 008.02.1928.2206/2017).

Amostras de fezes de cada fêmea foram coletadas duas vezes por semana, logo após a defecação, durante 75 a 200 dias, dependendo do indivíduo. Para cada fêmea, a coleta foi finalizada no momento

em que o animal era direcionado para reprodução, seguindo o manejo adotado pela instituição. Todas as amostras coletadas foram identificadas e mantidas a -20°C até o processamento laboratorial.

As amostras fecais foram liofilizadas e a extração hormonal foi feita utilizando o protocolo descrito por Palme (2005). Uma quantidade de 0,5 g de fezes secas foi misturada em 5 mL de metanol 80%. O material foi agitado lentamente durante 16 horas e posteriormente centrifugado (500 g, 15 minutos), sendo o sobrenadante (extrato fecal) armazenado a -20°C até a análise hormonal.

Os metabólitos fecais de progesterona e estradiol foram mensurados por ensaio imunoenzimático previamente utilizado em amostras fecais de suínos (Graham et al., 2001; Munro et al., 1991), utilizando os anticorpos CL425 para progesterona e R0008 para estradiol e os respectivos hormônios conjugados com peroxidase (HRP) fornecidos pela Universidade da Califórnia, Davis, CA, EUA. Em resumo, microplacas de poliestireno de 96 poços de alta adsorção (MaxiSorp, Nunc, Rochester, NY, EUA) foram marcadas (50 μL /poço) com o anticorpo diluído em solução de marcação (Na_2CO_3 : 1,59 g/L; NaHCO_3 : 2,93 g/L; pH 9,6) e incubadas a 4°C por 16 h. Após a incubação, as microplacas foram lavadas com solução de lavagem (NaCl : 87,66 g/L; Tween-20: 0,5%) e preenchidas com 25 μL de solução tampão ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$: 5,421 g/L; Na_2HPO_4 : 8,662 g/L; NaCl : 8,7 g/L; BSA: 1,0 g/L; pH 7,0) em cada poço, seguido de 50 μL de cada amostra (diluída em solução tampão), padrão da curva, ou controle, todos em duplicata. Imediatamente após, foi adicionado 50 μL de hormônio conjugado diluído em solução tampão. Após duas horas de incubação em temperatura ambiente, as microplacas foram lavadas sendo posteriormente adicionados 100 μL /poço de solução de substrato (250 μL de TMB: 0,016 mol/L em DMSO; 50 μL de H_2O_2 : 0,6%; 11 mL de tampão substrato ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Na}$: 1,36 g/L; pH 5,0)). A reação cromógena foi interrompida com 50 μL de solução ácida (H_2SO_4 : 10%). A densidade óptica de cada poço foi medida em uma leitora de microplacas utilizando um filtro de 450 nm.

A sensibilidade dos ensaios foi 0,08 ng/mL para progesterona e 0,17 ng/mL para estradiol. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram menores que 10,9% para todos os hormônios. A diluição seriada de um grupo de amostras apresentou paralelismo com a curva padrão dos ensaios. Os resultados hormonais foram corrigidos e expressos em ng/g de fezes secas.

Os valores basais e picos de metabólitos fecais de progesterona das amostras de cada animal foram determinados por um método iterativo de exclusão dos valores maiores que a média + 1,5 desvios padrões. Inicialmente a média e o DP eram calculados, e os valores que superasse média + 1,5 desvios padrões eram excluídos, seguindo da repetição do cálculo até que não houvesse valores maiores que o padrão estabelecido, sendo esses dados restantes considerados valores basais e todos acima do padrão considerados picos hormonais.

A duração e os níveis hormonais nas fases progesterônica (valores de pico) e não progesterônica (valores basais) foram calculados e comparados estatisticamente (teste Mann-Whitney). A duração do ciclo estral (intervalo entre o início de uma fase progesterônica e o início da fase progesterônica seguinte) também foi determinada. Os picos de metabólitos fecais de estradiol também foram determinados por método iterativo, e o perfil hormonal foi comparado com o perfil dos metabólitos fecais de progesterona.

Resultados e discussão

Foi observado um padrão cíclico dos metabólitos fecais de progesterona, possibilitando a identificação de um total de 17 ciclos estrais, com duração média de $20,8 \pm 2,4$ dias (17 – 24 dias), corroborando com a duração descrita na literatura para a espécie (~21 dias; Anderson, 2000). Os valores de duração do ciclo estral corroboraram com os obtidos por Hultén et al. (1995) ao monitorar o ciclo estral em suínos por metabólitos fecais de progesterona.

As fases progesterônica e não progesterônica duraram em média 12,2 e 7,6 dias, respectivamente (Tabela 1, Figura 1), corroborando com as previamente descritas por Henricks et al. (1972) e com as observadas por Sanders et al. (1994) ao avaliar os metabólitos fecais de progesterona. A fase progesterônica, como esperado, apresentou valores de metabólitos fecais de progesterona significativamente maiores que a fase não progesterônica ($P < 0,0001$, teste Mann-Whitney; Tabela 1).

Tabela 1. Duração e níveis de metabólitos fecais de progesterona (MFP) durante o ciclo estral e suas fases em fêmeas suínas

	Duração, dias	MFP, ng/g de fezes secas
Ciclo estral	20,8 ± 2,4	3.152,3 ± 2.404,5
Fase progesterônica	12,2 ± 3,2	4.386,2 ± 2.322,6 ^A
Fase não progesterônica	7,6 ± 3,2	1.220,0 ± 517,8 ^B

Letras maiúsculas diferentes: diferenças estatísticas ($P < 0,05$)

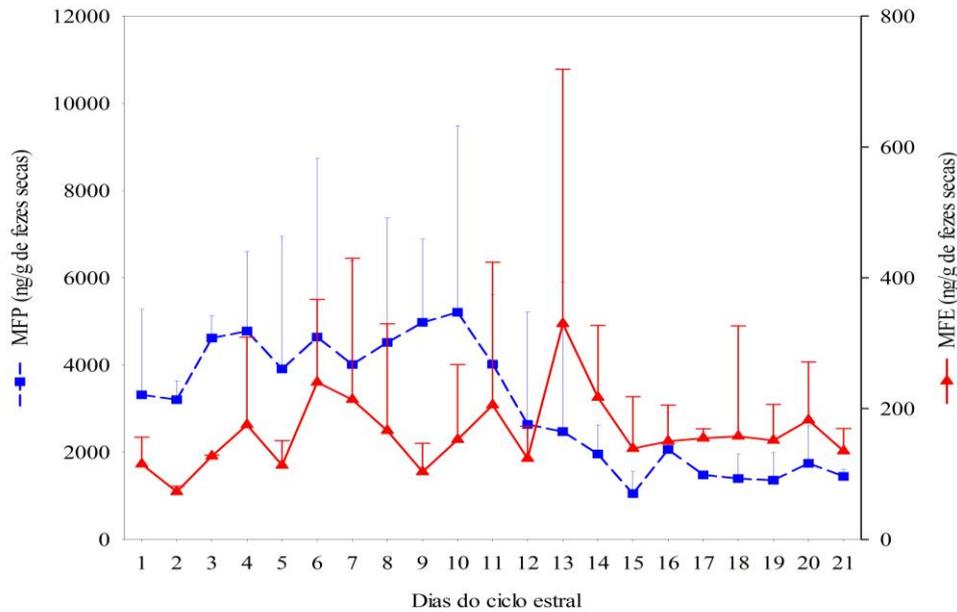


Figura 1. Níveis médios de metabólitos fecais de progesterona (MFP) e de estrógenos (MFE) durante o ciclo estral em fêmeas suínas. O Dia 1 do ciclo estral representa o primeiro dia da fase progesterônica.

Os níveis médios de metabólitos fecais de estrógenos foram de $153,5 \pm 131,0$ ng/g de fezes secas ($35,9 - 1.007,5$ ng/g de fezes secas), apresentando picos concomitantes com a queda dos metabólitos fecais de progesterona (Figura 1). Sabe-se que a elevação dos estrógenos está relacionada com o desenvolvimento folicular, culminando com a ovulação e posterior elevação da progesterona (Senger, 2005; Toniollo et al., 1998), não sendo este, o padrão observado neste estudo. O metabolismo dos esteroides ocorre principalmente no fígado, sendo os metabólitos posteriormente excretados no duodeno pelo sistema biliar e transportados com a digesta (Graham, 2004; Palme et al., 1996; Schwarzenberger et al., 1996). O tempo de metabolização e excreção normalmente está relacionado com o tempo de passagem do alimento pelo trato intestinal, porém, este pode variar de 30 minutos a mais de um dia, dependendo da espécie, podendo também haver variações entre os hormônios em uma determinada espécie (Palme, 2005). Em suínos, Palme et al. (1996) observaram uma grande variação entre o tempo de metabolização dos esteroides reprodutivos presentes na corrente sanguínea e posterior excreção nas fezes. De acordo com estes autores, a progesterona circulante na corrente sanguínea apresenta um tempo médio de seis dias para ser metabolizada e excretada nas fezes, enquanto os estrógenos apresentam um tempo médio de dois dias. Assim, pode-se afirmar que a ausência de sincronia entre os picos de metabólitos fecais de estrógenos e progesterona está relacionada com a variação no tempo de metabolização e excreção destes hormônios. Desta forma, deve-se ter muita cautela ao analisar a relação entre os níveis de metabólitos fecais de progesterona e estrógenos em suínos, bem como ao correlacionar os níveis hormonais com os aspectos comportamentais.

Em suínos, a maioria dos estudos endócrino-reprodutivos utilizando matrizes alternativas opta por usar a matriz urinária, uma vez que esta espécie apresenta a via urinária como principal rota de excreção dos metabólitos de esteroides reprodutivos (Palme et al., 1996). Entretanto, considerando os resultados do presente estudo, e que amostras fecais podem ser coletadas diretamente do chão diariamente, sem contato direto com o animal, fica demonstrado a viabilidade de uso de amostras fecais para o monitoramento reprodutivo nesta espécie de maneira não invasiva.

Os suínos domésticos também podem ser utilizados como modelos experimentais para suídeos e tayassuídeos silvestres, devido às proximidades filogenéticas. Alguns estudos já foram realizados utilizando a matriz fecal em espécies silvestres (Ahuja-Aguirre et al., 2017; Berger et al., 2006; Macchi et al., 2010). Entretanto, somente Berger et al. (2006) monitoraram longitudinalmente o ciclo estral. Estes autores avaliaram os metabólitos fecais de progesterona e estradiol, porém, os mesmos não encontraram relação fisiológica dos metabólitos fecais de estradiol com o padrão cíclico observado nos metabólitos fecais de progesterona. Berger et al. (2006) especularam sobre a influência de alguns fatores fisiológicos para este achado, porém não citam a possibilidade de existência de diferenças no tempo de metabolização dos esteroides avaliados como um fator relevante nos resultados encontrados. Desta forma, futuros estudos sobre o monitoramento longitudinal do ciclo estral em suídeos e tayassuídeos silvestres utilizando amostras fecais devem considerar a possibilidade de diferenças na taxa de metabolização dos esteroides reprodutivos, como observado em porcas no presente estudo.

Conclusão

Este estudo demonstrou a viabilidade no uso de amostras fecais para o monitoramento longitudinal de metabólitos fecais de progesterona e estradiol em suínos durante o ciclo estral. Com base nos resultados obtidos, é necessário atenção ao avaliar conjuntamente o perfil hormonal dos hormônios analisados, considerando a diferença nas taxas de metabolismo e excreção dos esteroides reprodutivos.

Referências bibliográficas

- Ahuja-Aguirre, C., López-deBuen, L., Rojas-Maya, S. & Hernández-Cruz, B. C. (2017). Progesterone and estradiol profiles in different reproductive stages of captive collared peccary (*Pecari tajacu*) females assessed by fecal metabolites. *Animal Reproduction Science*, 180(1):121-126.
- Amaral, R. S. (2010). Use of alternative matrices to monitor steroid hormones in aquatic mammals: a review. *Aquatic Mammals*, 36(2):162-171. doi: 10.1578/AM.36.2.2010.162
- Amaral, R. S., Nunes, B. L. M., Ferreira, M. F. & Claudio, J. M. (2016). Avaliação dos níveis de metabólitos fecais de testosterona e estradiol em suínos. *Igapó*, 10(1):46-56.
- Anderson, L. L. (2000). Pigs. In B. Hafez & E. S. E. Hafez (Eds.), *Reproduction in farm animals* (7 ed., pp. 182-191). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Berger, E. M., Leus, K., Vercammen, P. & Schwarzenberger, F. (2006). Faecal steroid metabolites for non-invasive assessment of reproduction in common warthogs (*Phacochoerus africanus*), red river hogs (*Potamochoerus porcus*) and babirusa (*Babyrusa babyrussa*). *Animal Reproduction Science*, 91(1-2):155-171.
- Cestnik, V., Cebulj-Kadunc, N. & Snoj, T. (2001). Faecal testosterone metabolites in males of domestic animals. *Veterinarski Novice*, 27(1):441-443.
- Choi, H. S., Kiesenhofer, E., Gantner, H., Hois, J. & Bamberg, E. (1987). Pregnancy diagnosis in sows by estimation of oestrogens in blood, urine or faeces. *Animal Reproduction Science*, 15(3-4):209-216.
- Graham, L. H. (2004). Non-invasive monitoring of reproduction in zoo and wildlife species. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 6(1):91-98.
- Graham, L. H., Schwarzenberger, F., Möstl, E., Galama, W. & Savage, A. (2001). A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. *Zoo Biology*, 20(3):227-236. doi: 10.1002/zoo.1022
- Henricks, D. M., Guthrie, H. D. & Handlin, D. L. (1972). Plasma, estrogen, progesterone and luteinizing hormone levels during the estrous cycle in pigs. *Biology of Reproduction*, 6(2):210-218.
- Hultén, F., Zhang, B. R., Forsberg, M. & Dalin, A.-M. (1995). Applying a progesterone assay to faecal samples collected from sows during the oestrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals*, 30(3):101-105.
- Kersey, D. C. & Dehnhard, M. (2014). The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. *Gen Comp Endocrinol*, 203(1):296-306. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.04.022

- Macchi, E., Cucuzza, A. S., Badino, P., Odore, R., Re, F., Bevilacqua, L. & Malfatti, A. (2010). Seasonality of reproduction in wild boar (*Sus scrofa*) assessed by fecal and plasmatic steroids. *Theriogenology*, 73(9):1230-1237.
- Moriyoshi, M., Nozoki, K., Ohtaki, T., Nakada, K. & Nakao, T. (1997). Early pregnancy diagnosis in the sow by fecal gestagen measurement using a bovine milk progesterone qualitative test EIA kit. *Journal of Reproduction and Development*, 43(4):345-350.
- Munro, C. J., Stabenfeldt, G. H., Cragun, J. R., Addiego, L. A., Overstreet, J. W. & Lasley, B. L. (1991). Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. *Clinical Chemistry*, 37(6):838-844.
- Ohtaki, T., Moriyoshi, M., Nakada, K. & Nakao, T. (1999). Fecal estrone sulfate profile in sows during gestation. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(6):661-665.
- Palme, R. (2005). Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1):75-80.
- Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H. & Ismail, M. N. (1996). Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science*, 43(1):43-63. doi: 10.1016/0378-4320(95)01458-6
- Sanders, H., Rajamanhendran, R. & Burton, B. (1994). The development of a simple fecal immunoreactive progesterin assay to monitor reproductive function in swine. *The Canadian Veterinary Journal*, 35(6):355-358.
- Schwarzenberger, F. (2007). The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook*, 41(1):52-74.
- Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme, R. & Bamberg, E. (1996). Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4):515-526. doi: 10.1016/0378-4320(96)01561-8
- Senger, P. L. (2005). *Pathways to pregnancy and parturition* (2 ed.). Pullman: Current Conceptions.
- Snoj, T., Cebulj-Kadunc, N., Pardubsky, T. & Cestnik, V. (1998). Determination of faecal gestagens in sows by commercial progesterone EIA kit. *Acta Veterinaria Brno*, 67(1):21-25.
- Snoj, T. & Cestnik, V. (1994). Testosterone concentration in boars feces. *Veterinarski Novice*, 20(1):333-336.
- Toniollo, G. H., Vicente, W. R. R., Oliveira, C. A., Malheiros, E. B. & Pugliese, A. C. (1998). Avaliação dos níveis séricos de 17-alfa-OH progesterona e androstenediona durante o ciclo estral em marrãs (*Sus scrofa domestica* - Linnaeus, 1758). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 35(5):205-209.
- Vos, E. A. (1996). Direct ELISA for estrone measurement in the feces of sows: prospects for rapid, sow-side pregnancy diagnosis. *Theriogenology*, 46(2):211-231.

Recebido: 8 de janeiro, 2019.

Aprovado: 1 fevereiro, 2019.

Publicado: 21 fevereiro, 2019.

Licenciamento: Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.