

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE METABÓLITOS FECALIS DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL EM SUÍNOS

Rodrigo de Souza Amaral¹, Bárbara Luiza Migueis Nunes², Mayara Fonseca Ferreira³, Jonas Maciel Claudio⁴

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – *Campus* Manaus Zona Leste

(rodrigo.amaral@ifam.edu.br)

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – *Campus* Manaus Zona Leste

(barbara@desperta.org.br)

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – *Campus* Manaus Zona Leste

(mayarafonseca@gmail.com)

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – *Campus* Manaus Zona Leste

(jclaudiovet-ifam@outlook.com)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de metabólitos fecais de testosterona (MFT) e 17 β -estradiol (MFE) em suínos adultos. Amostras de fezes de quatro fêmeas foram coletadas 1-2X/semana durante sete semanas, e de quatro machos diariamente durante seis dias consecutivos. As amostras fecais foram analisadas para testosterona e 17 β -estradiol por enzimaímmunoensaio. Os machos apresentaram níveis estatisticamente maiores que as fêmeas tanto para MFT quanto MFE. Esses resultados corroboraram com a fisiologia da espécie, uma vez que os altos níveis de estrógenos nos varrões são importantes para a atuação das glândulas sexuais acessórias e para o comportamento sexual. E constatado a viabilidade do uso de amostras fecais no monitoramento da testosterona e estradiol em suínos, possibilitando seu uso como ferramenta para o manejo reprodutivo desta espécie.

¹ Doutor em Reprodução Animal. Docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, *Campus* Manaus Zona Leste

² Discente do curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, *Campus* Manaus Zona Leste

³ Discente do curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, *Campus* Manaus Zona Leste

⁴ Discente do curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, *Campus* Manaus Zona Leste

Palavras-chave: Esteroides fecais, suínos, reprodução.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the testosterone (TFM) and estradiol-17 β (EFM) fecal metabolites in adult swine. Fecal samples from four females were collected 1-2x/week during seven weeks, and from four males daily during six consecutive days. All samples were assayed for testosterone and estradiol-17 β by enzyme immunoassay. Males showed statistically higher levels of TFM and EFM than females. Those results corroborate with the swine physiology, because high estrogens levels in boars are important to the activity of accessory sex glands and sexual behavior. It is demonstrated the viability of testosterone and estradiol monitoring by fecal samples, enabling its use as a tool for the reproductive management of that species.

Keywords: Fecal steroids, swine, reproduction.

INTRODUÇÃO

O manejo reprodutivo é um dos fatores determinantes da produção suinícola, assim como em outras criações animais, em que a sua correta execução propicia um aproveitamento maior das matrizes, uma maior taxa de nascimentos e maior taxa de sobrevivência dos leitões (CORTEZ; TONIOLLI, 2012; BORTOLOZO et al., 2015).

Uma das ferramentas para o manejo reprodutivo de animais de produção é o monitoramento hormonal do rebanho, o qual pode auxiliar na determinação de maturidade sexual, na identificação de maneira mais precisa do estro, no monitoramento da gestação e no assessoramento para a aplicação de biotecnologias da reprodução (HENRICKS et al., 1972; SANDERS et al., 1994; SNOJ et al., 1998; GERES et al., 2000).

Para o monitoramento endócrino-reprodutivo, as dosagens hormonais são normalmente realizadas em amostras de soro ou plasma sanguíneo. Porém, a obtenção da amostra sanguínea é um procedimento invasivo e altamente estressante para o animal. Em suínos, as coletas sanguíneas são realizadas por venopunção das veias craniais ou auricular caudal com a contenção do animal utilizando o estrangulamento do focinho. Este procedimento apresenta um grau elevado de risco de acidentes e exige um grande esforço do manipulador, além de ser muito estressante para o animal (MORIYOSHI et al., 1997). Desta forma, a utilização de metodologias alternativas são de suma importância, levando em consideração a preocupação

com o bem-estar dos animais.

Após sintetizados, os hormônios esteroides (como a testosterona, progesterona e o estradiol) são liberados na corrente sanguínea para atingirem as células alvo. Após a sua atuação no organismo, estes hormônios são metabolizados principalmente no fígado e excretado nas fezes e/ou na urina (PALME et al., 1996; NORRIS, 1997; GRAHAM, 2004). A principal via de excreção, fezes ou urina, pode variar de espécie para espécie, bem como entre os hormônios esteroides em uma mesma espécie (PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER, et al., 1996).

Com base nos mecanismos de metabolismo e excreção dos hormônios, diversos trabalhos têm demonstrado a aplicabilidade de matrizes alternativas, tais como: fezes, na dosagem hormonal, como alternativa à atualização de amostra sanguíneas no monitoramento endócrino. Esta metodologia possui duas grandes vantagens, sendo uma a coleta mais fácil que a venopunção, e a outra em que o animal não é submetido ao estresse, possibilitando o acompanhamento fisiológico longitudinal do animal. O uso de fezes para dosagem hormonal é muito aplicado no monitoramento endócrino de animais selvagens (SCHWARZENBERGER et al., 1996; GRAHAM, 2004). Seu uso também já foi aplicado em diversas espécies de animais domésticos com interesse zootécnico, como bovinos, ovinos, caprinos, equinos e suínos (SCHWARZENBERGER et al., 1996).

A principal via de excreção dos metabólitos de esteroides em suínos é pela urina, entretanto, alguns pesquisadores já utilizaram a dosagem de metabólitos fecais de progesterona e estrona em algumas fases do ciclo reprodutivo de fêmeas suínas, principalmente durante a gestação (SANDERS et al., 1994; MORIYOSHI et al., 1997; SNOJ et al., 1998; OHTAKI et al., 1999). Por outro lado, relatos utilizando a avaliação dos metabólitos fecais de estradiol e testosterona são escassos (SNOJ e CESTNIK, 1994; VOS, 1996; CESTNIK e SNOJ, 2001). Adicionalmente, estudos comparando os níveis destes esteroides entre os sexos em suínos são desconhecidos.

Considerando as observações, objetiva neste estudo avaliar os níveis de metabólitos fecais de testosterona (MFT) e 17β -estradiol (MFE) presentes em suínos adultos machos e fêmeas, bem como comparar os níveis destes metabólitos entre os dois sexos.

MÉTODO OU FORMALISMO

Com o intuito de atingir o objetivo proposto neste estudo, foram utilizados quatro suínos machos adultos não-castrados (varrões) e quatro suínas fêmeas adul-

tas vazias e cíclicas, todos alojados no Setor de Suinocultura do Campus Manaus Zona Leste do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - IFAM. Todos os animais foram mantidos em baias individuais, com fornecimento diário de ração e água *ad libitum*.

As amostras de fezes de cada macho foram coletadas diariamente logo após a defecação durante seis dias consecutivos. Das fêmeas, as amostras de fezes foram coletadas uma a duas vezes por semana durante sete semanas logo após a defecação, no intuito de amostrar momentos diferentes do ciclo estral. Todas as amostras foram armazenadas em sacos plásticos identificados e mantidas congeladas a -20oC até a análise.

As amostras fecais foram liofilizadas e posteriormente submetidas ao processo de extração hormonal seguindo o protocolo descrito por Palme (2005). A quantidade de aproximadamente 0,5g de fezes secas foi pesada e transferida para um tubo de vidro contendo 5ml de metanol a 80%. O tubo foi agitado durante 16h e posteriormente centrifugado, sendo o sobrenadante (extrato fecal) transferido para um tubo plástico e mantido a -20oC.

O extrato fecal foi analisado por enzimaímunoensaio utilizando um protocolo descrito para várias outras espécies (MUNRO et al., 1991; GRAHAM et al., 2001). Foram utilizados anticorpos R156-7 para testosterona e R0008 para 17 β -estradiol, todos fornecidos pela Universidade da Califórnia, Davis - UC Davis, nos Estados Unidos, para a determinação dos níveis de MFT e MFE de cada amostra. O anticorpo para testosterona apresenta as seguintes reações cruzadas: testosterona, 100%; 5 α -dihidrotestosterona; androstenediona, 0,27%; e < 0,10% com outros esteroides. Já o anticorpo para 17 β -estradiol apresenta as seguintes reações cruzadas: 17 β -estradiol, 100%; estrona, 0,73%; sulfato de estrona, progesterona, testosterona, cortisol, corticosterona, androstenediona, < 0,01% (UC, Davis).

Microplacas de poliestireno de 96 poços de alta adsorção (MaxiSorp, Nunc, Rochester, NY, EUA) foram marcadas (50 μ l/poço) com o anticorpo diluído em solução de marcação (Na₂CO₃: 1,59 g/L; NaHCO₃: 2,93 g/L; pH 9,6), seladas com adesivo de acetato e incubadas a 4oC por 16 hs. Após a incubação, as microplacas foram submetidas a um ciclo de três lavagens com solução de lavagem (NaCl: 87,66 g/L; Tween-20: 0,5%).

Foi adicionado 25 μ L de solução tampão (NaH₂PO₄.H₂O: 5,421 g/L; Na₂HPO₄: 8,662 g/L; NaCl: 8,7 g/L; BSA: 1,0 g/L; pH 7,0) em cada poço e, posteriormente, 50 μ L de cada amostra (diluída em solução tampão), padrão da curva, ou controle. Ime-

diatamente após, foi adicionado 50 µL de solução de hormônio conjugado com enzima (HRP: horseradishperoxidase; C. Munro, UC Davis, CA, EUA) diluída em solução tampão. As microplacas foram seladas e incubadas por 2 hs em temperatura ambiente.

Após a incubação, as microplacas foram lavadas sendo posteriormente adicionado 100 µL/poço de solução de substrato (250 µL de TMB: 0,016 mol/L em DMSO; 50 µL de H₂O₂: 0,6%; 11 mL de tampão substrato (C₂H₃Na: 1,36 g/L; pH 5.0)). A reação cromógena foi interrompida com 50 µL de solução ácida (H₂SO₄: 10%). A densidade óptica de cada poço foi medida em uma leitora de microplacas utilizando um filtro de 450 nm.

Todas as amostras, controles e padrões foram analisados em duplicata. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram < 10,94% para todos os hormônios. A sensibilidade dos ensaios foi de 0,08 ng/mL para testosterona e 0,17 ng/mL para estradiol. Diluições seriadas dos extratos fecais apresentaram curvas de padrão similar à curva padrão de cada ensaio hormonal.

Os dados hormonais obtidos foram corrigidos de acordo com o protocolo de extração e a quantidade de amostra de fezes utilizada, e apresentados em ng/g de fezes secas. A média e o desvio padrão, bem como a amplitude, de cada hormônio analisado para cada sexo foram determinados. Os níveis hormonais entre os sexos foram comparados pelo teste Mann-Whitney, utilizando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os níveis de MFT e MFE em machos e fêmeas estão expressos na Tabela 1 e nas Figuras 1 e 2.

Tabela 1 – níveis de médios \pm desvio padrão de metabólitos fecais de testosterona (MFT) e estradiol (MFE) em suínos machos e fêmeas. Letras maiúsculas diferentes - diferença significativa dentro de cada coluna ($P < 0,0001$; Teste Mann-Whitney).

	MFT ng/g de fezes secas	MFE ng/g de fezes secas
Machos	374,2 \pm 160,3 ^A (147,1 – 626,7)	349,3 \pm 150,1 ^A (160,9 – 647,3)
Fêmeas	171,6 \pm 97,2 ^B (87,5 – 447,1)	161,8 \pm 112,6 ^B (35,9 – 697,3)

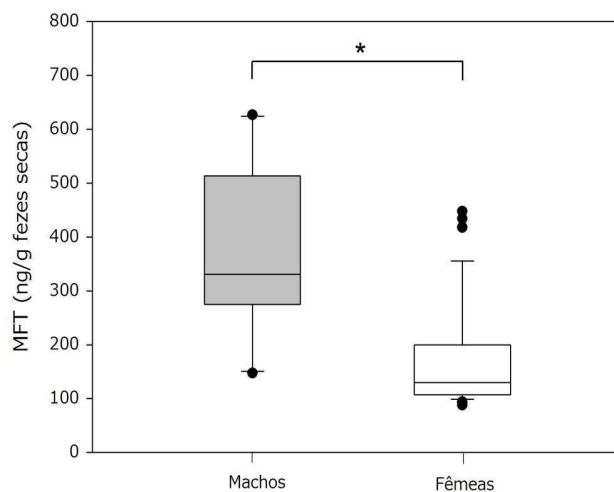


Figura 1 – Níveis de metabólitos fecais de testosterona (MFT) em suínos machos e fêmeas. Boxplot representando mediana, 10%, 25%, 75% e 90% percentis dos dados. * - Diferença significativa entre os grupos ($P < 0,0001$, teste Mann-Whitney)

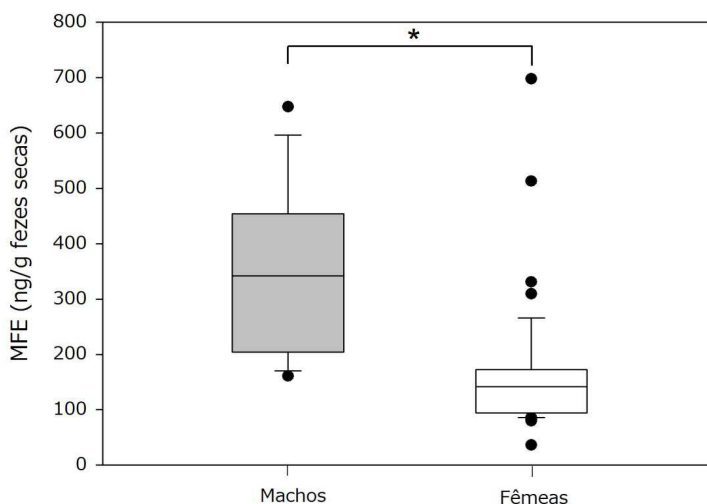


Figura 2 – Níveis de metabólitos fecais de 17β -estradiol (MFE) em suínos machos e fêmeas. Boxplot representando mediana, 10%, 25%, 75% e 90% percentis dos dados. * - Diferença significativa entre os grupos ($P < 0,0001$, teste Mann-Whitney)

SNOJ e CESTNIK (1994) observaram níveis médios de MFT entre 80 e 1.600 ng/g de fezes secas (0,28 e 5,56 nmol/g de fezes secas) em suínos machos adultos,

com uma média geral de 600 ng/g de fezes secas, sendo valores próximos ao observado neste estudo. Por outro lado, os níveis de MFT observados no presente estudo foram consideravelmente superiores aos relatados para javalis (*Sus scrofa*) (média 49.5 ± 42.2 ng/g de fezes; MACCHI et al., 2010). A rota de excreção dos esteroides pode variar consideravelmente entre as espécies (PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER, 1996), desta forma, é possível que essa diferença possa ser uma variação espécie-específica. Entretanto, diferenças metodológicas no processo de extração, também, podem ter influenciado nas diferenças observadas.

Como esperado, os machos apresentaram níveis de MFT significativamente maiores que as fêmeas ($P < 0,0001$) (Tabela 1 e Figura 1). Os níveis significativamente baixos de MFT em fêmeas corroboram com o esperado, de acordo com a fisiologia da espécie. Nas fêmeas, a testosterona é sintetizada nas células da teca interna, e grande parte se difunde para as células da granulosa onde é convertida a estradiol, sendo essa importante no processo de foliculogênese e da libido na fêmea (SENGER, 2005).

Considerando que o ciclo estral em suínos dura em média 21 dias (ANDERSON, 2000), a frequência adotada de coletas das amostras fecais das fêmeas proporcionou a amostragem de diferentes pontos de dois ciclos consecutivos de cada animal. Sabe-se que o estradiol apresenta níveis séricos crescentes durante o desenvolvimento folicular, com seu pico relacionado com o aparecimento dos sinais de estro, sendo que após a ovulação, os níveis de estradiol se reduzem a valores basais até o início do próximo ciclo (ANDERSON, 2000; SENGER, 2005). Fato este, que justifica a grande amplitude observada neste estudo para os MFE nas fêmeas.

Os valores de MFE nas fêmeas obtidos neste estudo foram expressivamente maiores que os relatados por Vos (1996) (valores médios de 0,00 a 1,57 ng/g de fezes). No trabalho de Vos (1996), foram utilizadas amostras fecais coletadas durante um ciclo estral de quatro fêmeas, porém, a extração hormonal foi realizada com fezes úmidas e em duas etapas (com solução salina e posteriormente com éter dietílico). De acordo com Palme (2005), a liofilização das amostras fecais antes do processo de extração hormonal possibilita a remoção de materiais não digeridos e de água da amostra, concentrando os hormônios e reduzindo as variáveis entre amostras. Do mesmo modo, Palme (2005) relata que a utilização de metanol a 80% em um protocolo de extração com etapa única, como adotado no presente estudo, possibilita as maiores taxas de recuperação hormonal. Desta forma, as diferenças observadas entre o presente estudo e os resultados obtidos por Vos (1996) possivelmente estão relacionadas a fatores metodológicos.

Como observado para MFT nos machos, os níveis de MFE nas fêmeas foram superiores aos relatados para javalis (média 212.6 ± 216.2 pg/g de fezes; MACCHI et al., 2010). Como sugerido para MFT, variações espécie específicas e/ou metodológicas podem ser a causa dessas diferenças.

Os níveis de MFE dos machos também foram estatisticamente superiores aos das fêmeas ($P < 0,0001$) (Tabela 1 e Figura 2). Os varrões apresentam altos níveis de estrógenos séricos, sendo esses valores superiores aos das fêmeas cíclicas (HENRICKS et al., 1972; CLAUS e HOFFMANN, 1980). Do mesmo modo, altos valores de metabólitos urinários de estrógenos também foram identificados na urina de varrões (VELLE, 1966). Assim, a diferença de MFE encontrada neste estudo corrobora com as diferenças hormonais existente entre suínos machos e fêmeas.

Os estrógenos nos varrões são principalmente sintetizados pelos testículos (VELLE, 1966; RAESIDE e RENAUD, 1983). Em varrões, os altos níveis de estrógenos são importantes para a atividade das glândulas sexuais acessórias e para o comportamento sexual. Joshi e Raeside (1973) observaram a influência dos estrógenos juntamente com a testosterona na atividade das glândulas acessórias, para a produção do plasma seminal, e na libido.

O método para verificar as rotas de excreção dos metabólitos de esteroides é a realização de aplicação de hormônio radiomarcado, possibilitando monitoramento da porcentagem de excreção pela urina e pelas fezes. Deste modo, Palme et al. (1996) observou que a principal via de excreção dos esteroides em suínos é pela urina, onde somente 14% dos metabólitos de testosterona e 4% dos metabólitos de estrona são excretados pelas fezes. Brown et al. (1970) verificou que 89% dos metabólitos de estradiol são excretados pela urina, desta forma, observa-se que as fezes, também, não são a principal via de excreção deste esteroide.

Entretanto, apesar da baixa excreção dos esteroides pelas fezes em suínos, os resultados deste estudo demonstram a viabilidade do uso desta matriz no monitoramento destes esteroides reprodutivos em suínos. Palme et al. (1996) relata a existência de variações entre o tempo de metabolização dos esteroides reprodutivos presentes na corrente sanguínea e posterior excreção nas fezes em suínos. A testosterona apresenta um intervalo de 1 a 2 dias para ser metabolizada e excretada nas fezes, enquanto a estrona apresenta um intervalo de 2 a 3 dias. Desta forma, dependendo dos objetivos do estudo, esse fator deve ser considerado ao avaliar os resultados hormonais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou a viabilidade do uso de amostras fecais no monitoramento da testosterona e estradiol em suínos, possibilitando seu uso como ferramenta para o manejo reprodutivo dessa espécie. Entretanto, a diferença no tempo de excreção destes hormônios deve ser levada em consideração ao se utilizar esta ferramenta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio dos funcionários do Setor de Suinocultura do IFAM/CMZL e a Coordenação Geral de Produção – CGP/IFAM-CMZL pela ajuda no manejo dos animais. Os autores também agradecem a PR-PPGI/IFAM e a FAPEAM pelas bolsas concedidas (RSA: Produtividade/IFAM; BLMN e MFF: PIBIC-IFAM; JMC: PAIC/FAPEAM). Este projeto foi financiado com recursos do edital Nº 008/2014 PAD-CIT/PR-PPGI/IFAM.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, L.L. Pigs. In: HAFEZ, B.; HAFEZ E.S.E. (Eds). **Reproduction in farm animals**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.182-191.

BORTOLOZZO, F.P et al. Desafios e potencialidades para o manejo reprodutivo da fêmea suína. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 97-103, 2015.

BROWN, B.I. et al. Excretion of ¹⁴C in urine of the domestic sow after injection of radioactive estradiol-17beta, esterone, corticosterone and cortisol. **Journal of Animal Science**, v. 31, n. 6, p. 1186-1190, 1970.

CESTNIK, V.; CEBULJ-KADUNC, N.; SNOJ, T. Faecal testosterone metabolites in males of domestic animals. **Veterinarske Novice (Slovenia)**, v. 27, n. 11, p. 441-443, 2001.

CLAUS, R.; HOFFMANN, B. Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in blood plasma of boars. **Acta Endocrinologica**, v. 94, n. 3, p. 404-11, 1980.

CORTEZ, A.A.; TONIOLLI, R. Aspectos fisiológicos e hormonais da foliculogênese e ovulação em suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 163-173, 2012.

GERES, D. et al. Changes of progesterone concentrations in blood plasma of sows during periparturient period. **Veterinarski Arhiv**, v. 70, n. 1, p. 47-57, 2000.

GRAHAM, L.H. Non-invasive monitoring of reproduction in zoo and wildlife species. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 91-98, 2004.

GRAHAM, L.H. et al. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progesterones in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

HENRICKS, D.M.; GUTHRIE, H.D.; HANDLIN, D.L. Plasma estrogen, progesterone and luteinizing hormone levels during the estrous cycle in pigs. **Biology of Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 210-218, 1972.

JOSHI, H.; RAESIDE, J. Synergistic effects of testosterone and oestrogens on accessory sex glands and sexual behaviour of the boar. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 33, n. 3, p. 411-423, 1973.

MACCHI, E. et al. Seasonality of reproduction in wild boar (*Sus scrofa*) assessed by fecal and plasmatic steroids. **Theriogenology**, v. 73, n. 9, p. 1230-1237, 2010.

MORIYOSHI, M. et al. Early pregnancy diagnosis in the sow by fecal gestagen measurement using a bovine milk progesterone qualitative test EIA kit. **Journal of Reproduction and Development**, v. 43, n. 4, p. 345-350, 1997.

MUNRO, C.J. et al. 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**, v. 37, n. 6, p. 838-844, 1991.

NORRIS, D.O. **Vertebrate endocrinology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1997.

OHTAKI, T. et al. Fecal estrone sulfate profile in sows during gestation. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 61, n. 6, p. 661-665, 1999.

PALME, R. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 75-80, 2005.

PALME, R. et al. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 1, p. 43-63, 1996.

RAESIDE, J.; RENAUD, R. Estrogen and androgen production by purified Leydig cells of mature boars. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 3, p. 727-733, 1983.

SANDERS, H.; RAJAMAHENDRAN, R.; BURTON, B. The development of a simple fecal immunoreactive progesterin assay to monitor reproductive function in swine. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, n. 6, p. 355-358, 1994.

SCHWARZENBERGER, F. et al. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 515-526, 1996.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. Pullman: Current Conceptions, 2005.

SNOJ, T. et al. Determination of fecal gestagens in sows by commercial progesterone kit. **Acta Veterinaria Brno**, v. 67, n. 1, p. 21-25, 1998.

SNOJ, T.; CESTNIK, V. Testosterone concentration in boars feces. **Veterinarske Novice (Slovenia)**, v. 20, n. 11, p. 333-336, 1994.

VELLE, W. Urinary oestrogens in the male. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 12, n. 1, p. 65-73, 1966.

VOS, E.A. Direct ELISA for estrone measurement in the feces of sows: prospects for rapid, sow-side pregnancy diagnosis. **Theriogenology**, v. 46, n. 2, p. 211-231, 1996.