

Validação fisiológica da dosagem de metabólitos fecais de testosterona em suínos machos

Physiological validation of fecal testosterone metabolites measurement in male swine

FERREIRA, Mayara Fonseca¹, NUNES, Bárbara Migueis²,

CLAUDIO, Jonatas Maciel¹, AMARAL, Rodrigo de Souza^{1,*}

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

² Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

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

RESUMO

O objetivo deste estudo foi realizar a validação fisiológica da dosagem dos metabólitos fecais de testosterona em suínos machos por meio de um desafio hormonal. Os três machos não castrados apresentaram um pico de metabólitos fecais de testosterona com valores hormonais aproximadamente 2x maiores que os níveis basais. Os picos hormonais ocorreram 2-3 dias após a estimulação hormonal, corroborando com o tempo de metabolismo e excreção da testosterona nessa espécie. O animal castrado apresentou níveis baixos de metabólitos fecais de testosterona durante todo o período experimental, não sendo responsivo ao desafio hormonal. O ensaio hormonal utilizado neste estudo foi capaz de refletir variações fisiológicas nos níveis de metabólitos fecais relacionados com as variações nos níveis de testosterona no sangue, tornando-se uma importante ferramenta para o monitoramento endócrino não-invasivo em suínos machos.

Palavras-chave: andrógenos, cachaço, desafio hormonal, enzima imunoensaio, reprodução.

ABSTRACT

The aim of this study was to carry out the physiological validation of the fecal testosterone metabolites measurement in male swine by a hormonal challenge. The three non-castrated animals showed a fecal testosterone metabolites peak with hormone values approximately 2x higher than basal levels. The hormone peaks occurred 2-3 days after hormone stimulation, corroborating with the time of metabolism and excretion of testosterone in this species. The castrated animal showed low fecal testosterone metabolites levels during all experimental period, not responding to hormonal challenge. The hormonal assay used in this study was able to reflect physiologic variations on fecal testosterone metabolites levels related to changes of testosterone levels in blood, becoming a powerful tool for noninvasive endocrine monitoring on male swine.

Keywords: androgens, boar, enzyme immunoassay, hormone challenge, reproduction.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um aumento no uso de matrizes alternativas, como fezes e urina, para o monitoramento de hormônios esteroides durante os eventos reprodutivos e de estresse em animais domésticos e selvagens (SCHWARZENBERGER et al. 1996; GRAHAM, 2004; SCHWARZENBERGER, 2007; AMARAL, 2010; KERSEY & DEHNHARD, 2014). Seu uso se baseia nas rotas de metabolismo e excreção dos esteroides, os quais podem ser excretados pelas fezes e urina (PALME et al., 1996; GRAHAM, 2004).

Em suínos, a principal rota de excreção dos metabólitos de esteroides é a urinária, onde somente 4 a 34% dos metabólitos de esteroides são excretados nas fezes, variando de acordo com o hormônio metabolizado (PALME et al., 1996). Apesar disso, estudos têm demonstrado a possibilidade de uso dos metabólitos fecais de esteroides no monitoramento reprodutivo nesta espécie (CHOI et al., 1987; SANDERS et al., 1994; SNOJ & CESTNIK, 1994; VOS, 1996; MORIYOSHI et al., 1997; SNOJ et al., 1998; OHTAKI et al., 1999; CESTNIK et al., 2001; AMARAL et al., 2016).

Porém, relatos de monitoramento de metabólitos fecais de testosterona em suínos, os relatos são escassos (SNOJ & CESTNIK, 1994; CESTNIK et al., 2001; AMARAL et al., 2016). Além do que, nenhum desses estudos validou a metodologia utilizada, demonstrando

que os níveis hormonais observados representavam as variações hormonais séricas.

Segundo Palme (2005), antes do uso da técnica, é necessário demonstrar que a técnica laboratorial utilizada é capaz de detectar mudanças nos níveis de metabólitos fecais de esteroides relacionadas às mudanças nos níveis sanguíneos desses esteroides. Para isso, uma das metodologias é a validação fisiológica realizando um teste de desafio hormonal.

Para a validação fisiológica da dosagem de metabólitos de testosterona, um desafio hormonal com GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) pode ser utilizado, onde a aplicação exógena de GnRH estimulará a hipófise a liberar LH (hormônio luteinizante), e este hormônio irá atuar nos testículos estimulando a produção de testosterona (DLONIAK et al., 2004; AMARAL et al., 2009; CHELINI et al., 2011).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar um desafio hormonal para validar fisiologicamente a dosagem de metabólitos fecais de testosterona em suínos machos utilizando um protocolo de enzima-imunoensaio.

MATERIAL E MÉTODOS

No total, foram utilizados quatro machos adultos meio sangue (Large White x Pietrain), sendo três inteiros (não castrados) e um castrado. Todos os animais foram mantidos em baias individuais com bebedouros tipo chupeta e alimentados com ração comercial, no

Setor de Suinocultura da instituição. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da instituição.

Os animais foram submetidos a um protocolo experimental de 11 dias (D-4 a D6). Nos quatro dias iniciais, amostras de fezes foram coletadas diariamente de cada animal imediatamente após a defecação. No dia D0, 3mL (25µg/mL) de um análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Lecirelina, Gestran Plus, Tecnopec Laboratórios, São Paulo, SP) foi administrado por via intramuscular para produzir um pico endógeno de testosterona. No dia da aplicação hormonal e durante os seis dias posteriores, as amostras de fezes continuaram a ser coletadas. Todas as amostras foram identificadas e armazenadas a -20°C até a análise.

As amostras fecais foram liofilizadas e os hormônios foram extraídos utilizando o protocolo descrito por Palme (2005). Uma quantidade de 0,5g de fezes secas foram colocadas em um tubo de vidro contendo 5mL de metanol 80%. Os tubos foram tampados e agitados lentamente durante 16 horas. As amostras foram centrifugadas (500g, 15 minutos) e o sobrenadante (extrato fecal) foi armazenado a -20 °C até a análise hormonal.

Os metabólitos fecais de testosterona foram mensurados por enzimaímmunoensaio (MUNRO & STABENFELDT, 1984; GRAHAM et al., 2001) utilizando o anticorpo R156-7 (1:7.500) e o respectivo hormônio conjugado com peroxidase (HRP) (1:300.000)

fornecidos pela Universidade da Califórnia, Davis, CA, EUA. Os extratos fecais foram diluídos (1:25) em tampão do ensaio (0,0392 M NaH₂PO₄.H₂O, 0,0610 M Na₂HPO₄, 0,1488 M NaCl, BSA: 1,0g/L; pH 7,0) antes da análise.

Em resumo, microplacas (Maxisorp, Nunc, Rochester, NY, EUA) foram marcadas com 50µl de anticorpo por poço, dissolvido em tampão de marcação (0,0150 M Na₂CO₃, 0,0348 M NaHCO₃; pH 9,6), e incubadas durante aproximadamente 16 horas a 4°C. As placas foram lavadas com solução de lavagem (0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20), e 25µL de tampão do ensaio foi adicionado, seguido por 50µL de cada amostra, padrão ou controle, em duplicata. Imediatamente após, 50µL de hormônio conjugado dissolvido em tampão do ensaio foi adicionado em cada poço. Após 2 horas de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas e 100µL de solução substrato (250µL de 0,016 M tetrametilbenzidina em dimetilsulfóxido e 50µL de 0,1752 M H₂O₂ diluído em 11mL de tampão substrato [0,01 M C₂H₃Na; pH 5,0]) foi adicionado em cada poço. A reação enzimática foi parada com 4 M de ácido sulfúrico, e a densidade óptica foi medida a 450nm.

A sensibilidade dos ensaios foi 0,08ng/mL, os coeficientes de variação intra e interensaio foram menores que 10,8%, e a diluição seriada de um conjunto de amostras apresentou paralelismo com a curva padrão do ensaio. Os níveis de metabólitos fecais de

testosterona foram expressos em ng/g de fezes secas.

Os resultados hormonais das amostras anteriores à aplicação hormonal foram utilizados como referência para a determinação dos níveis hormonais basais de cada animal. Os valores de média e desvio padrão dos níveis basais foram calculados. Após isso, o pico hormonal foi classificado como qualquer valor após o desafio hormonal que excedesse dois desvios padrões acima dos níveis hormonais médios para cada animal. O intervalo entre o desafio hormonal e o pico hormonal para cada animal foi determinado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis basais de metabólitos fecais de testosterona dos animais inteiros apresentaram valores aproximadamente 10 vezes maiores que os observados no animal castrado (Tabela 1), demonstrando, como de conhecimento, os testículos como principal órgão endócrino na síntese de testosterona.

Considerando a relação entre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e a produção de testosterona (SENGER, 2005), como esperado, todos os machos inteiros responderam positivamente ao desafio hormonal, com o aumento dos níveis de metabólitos fecais de testosterona após a estimulação com GnRH. Do mesmo modo, o animal castrado apresentou níveis baixos de metabólitos fecais de testosterona durante todo o período experimental, sem apresentar pico

hormonal após o desafio hormonal (Tabela 1, Figura 1).

A dosagem de metabólitos fecais de testosterona em suínos já foi realizada por outros autores (SNOJ & CESTNIK, 1994; CESTNIK et al., 2001; AMARAL et al., 2016), entretanto, este é o primeiro trabalho demonstrando que a matriz fecal é capaz de refletir consistentemente as variações fisiológicas da testosterona em suínos machos.

Os níveis de metabólitos fecais de testosterona observados no presente estudo corroboraram com os valores relatados em trabalhos prévios (SNOJ & CESTNIK, 1994; CESTNIK et al., 2001; AMARAL et al., 2016). Macchi et al. (2010) observaram valores mais baixos em javalis (*Sus scrofa*), entretanto, estes autores adotaram uma metodologia diferente e mais laboriosa para realizar a extração hormonal. De acordo com Palme (2005), o protocolo de extração hormonal pode influenciar nos resultados hormonais e devem ser mantidos o mais simples possível. O protocolo adotado no presente estudo (utilizando metanol 80%) normalmente apresenta uma alta recuperação dos metabólitos hormonais presente nas fezes (Palme, 2005). Deste modo, é possível que os valores observados por esses autores estejam subestimados.

A principal rota de excreção (fezes ou urina) e o tempo entre a síntese dos esteroides e a excreção de seus metabólitos nas fezes ou urina variam consideravelmente entre as

Tabela 1. Padrão de resposta dos metabólitos fecais de testosterona ao desafio com GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) em suínos machos.

Animal	Níveis basais (média ± DP) (ng/g de fezes secas)	Pico ^a (ng/g de fezes secas)	Aumento (%)	Dias para o pico ^b
A-1 (inteiro)	241,7 ± 102,3	576,3	138	3
A-2 (inteiro)	237,9 ± 111,9	839,5	252	2
A-3 (inteiro)	311,9 ± 79,7	554,9	78	2
A-4 (castrado)	33,1 ± 6,4	Não detectado	-	-

^a Pico = valor acima da média + 2 DP;

^b Dias entre a administração do GnRH exógeno e a observação do pico hormonal.

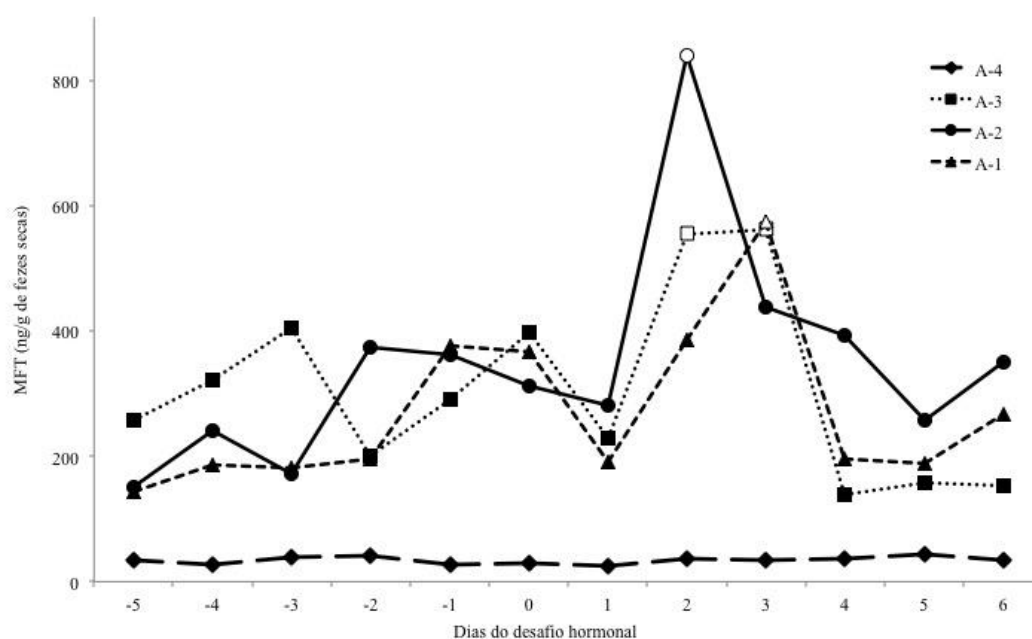


Figura 1. Variações na excreção dos metabólitos fecais de testosterona (MFT) em resposta ao desafio hormonal com GnRH em três suínos machos inteiros (A-1, A-2 e A-3) e um castrado (A-4). O GnRH foi administrado no dia 0. Símbolos abertos indicam picos hormonais.

espécies (GRAHAM, 2004; PALME et al., 1996). Palme et al. (1996), avaliando as rotas de excreção de testosterona radiomarcada em suínos, demonstraram que a urina é a principal rota de excreção dos metabólitos de testosterona, onde somente 14% dos metabólitos de testosterona são excretados pelas fezes. Entretanto, apesar da baixa excreção dos metabólitos de testosterona nas fezes, os resultados do presente estudo

demonstram a viabilidade do uso de amostras fecais no monitoramento de testosterona em suínos. Adicionalmente, a coleta de fezes em suínos é mais fácil e prática que a coleta de urina, podendo ser realizada coletando o material diretamente do chão, sem contato direto com o animal, indicando, assim, ser uma matriz melhor para o monitoramento reprodutivo não-invasivo nessa espécie.

Palme et al. (1006) também demonstrou o intervalo de 24 a 49 horas para o metabolismo da testosterona sérica e posterior excreção nas fezes em suínos. Esta informação corrobora com o intervalo observado no presente estudo para o surgimento do pico hormonal após a aplicação do GnRH exógeno (2-3 dias). Para a excreção fecal, os metabólitos dos esteroides são excretados junto com a bile no duodeno e são transportados com a digesta, assim, normalmente o tempo de excreção dos esteroides fecais estão relacionados com a taxa de passagem de alimento pelo trato gastrointestinal (PALME et al., 1996; SCHWARZENBERGER et al., 1996). Desta forma, o intervalo de tempo entre a variação sérica da testosterona e a observação deste evento nas amostras fecais devem ser consideradas durante a análise de dados em futuros estudos utilizando a matriz fecal para dosagem hormonal em suínos.

A técnica de dosagem de metabólitos fecais de testosterona em suínos, aqui validada neste estudo, pode ser aplicada em futuros estudos para o monitoramento fisiológico em suínos machos, bem como no diagnóstico e monitoramento de patologias endócrinas que envolvam a testosterona. Além do que, a técnica pode ser aplicada em outros suídeos silvestres, possibilitando o monitoramento endócrino longitudinal não-invasivo destas espécies.

CONCLUSÃO

Utilizando os protocolos laboratoriais aplicados neste estudo, amostras fecais de suínos machos são capazes de refletir variações fisiológicas nos níveis de testosterona, se tornando uma ferramenta útil para o monitoramento endócrino não-invasivo nesta espécie.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, R.S. Use of alternative matrices to monitor steroid hormones in aquatic mammals: a review. **Aquatic Mammals**, v. 36, n. 2, p. 162-171, 2010.
- AMARAL, R.S.; NUNES, B.L.M.; FERREIRA, M.F.; CLAUDIO, J.M. Avaliação dos níveis de metabólitos fecais de testosterona e estradiol em suínos. **Igapó**, v. 10, n. 1, p. 46-56, 2016.
- AMARAL, R.S.; ROSAS, F.C.W.; VIAU, P.; D'AFFONSECA NETO, J.A.; DA SILVA, V.M.F.; OLIVEIRA, C.A. Noninvasive monitoring of androgens in male Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*): biologic validation. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 3, p. 458-465, 2009.
- CESTNIK, V.; CEBULJ-KADUNC, N.; SNOJ, T. Faecal testosterone metabolites in males of domestic animals. **Veterinarski Novice**, v. 27, n. 1, p. 441-443, 2001.

CHELINI, M.-O.M.; OLIVEIRA, C.A.; OTTA, E. Validation of a radioimmunoassay for the quantification of fecal testosterone metabolites in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 459-463, 2011.

DLONIAK, S.M.; FRENCH, J.A.; PLACE, N.J.; WELDELE, M.L.; GLICKMAN, S.E.; HOLEKAMP, K.E. Non-invasive monitoring of fecal androgens in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 135, n. 1, p. 51-61, 2004.

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.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

KERSEY, D.C.; DEHNHARD, M. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 203, n. 1, p. 296-306, 2014.

MACCHI, E.; CUCUZZA, A.S.; BADINO, P.; ODORE, R.; RE, F.; BEVILACQUA, L.;

MALFATTI, A. 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.; NOZOKI, K.; OHTAKI, T.; NAKADA, K.; NAKAO, T. 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.; STABENFELDT, G. Development of a microlitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. **The Journal of Endocrinology**, v. 101, n. 1, p. 41-49, 1984.

OHTAKI, T.; MORIYOSHI, M.; NAKADA, K.; NAKAO, T. Fecal estrone sulfate profile in sows during gestation. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 6, p. 661-665, 1999.

PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M.N. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 1, p. 43-63, 1996.

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.

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

SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, v. 41, n. 1, p. 52-74, 2007.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R.; BAMBERG, E. 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^a Edição. Pullman: Current Conceptions, 2005. 373p.

SNOJ, T.; CEBUJI-KADUNC, N.; PARDUBSKY, T.; CESTNIK, V. Determination of faecal gestagens in sows by commercial progesterone EIA kit. **Acta Veterinaria Brno**, v. 67, n. 1, p. 21-25, 1998.

SNOJ, T.; CESTNIK, V. Testosterone concentration in boars feces. **Veterinarski Novice**, v. 20, n. 1, p. 333-336, 1994.

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.