
MONITORAMENTO LONGITUDINAL DOS METABÓLITOS FECAIS DE PROGESTERONA DURANTE A GESTAÇÃO EM FÊMEAS SUÍNAS

CLAUDIO, Jonatas M.¹
FERREIRA, Mayara F.²
NUNES, Barbara L M.³
AMARAL, Rodrigo S.⁴

Recebido em: 2022.01.23

Aprovado em: 2022.10.21

ISSUE DOI: 10.3738/21751463.4002

RESUMO: Este estudo objetivou avaliar o perfil dos metabólitos fecais de progesterona durante a gestação em fêmeas suínas. Assim, foram coletadas amostras de fezes de cinco fêmeas suínas adultas prenhes desde antes da cobertura até 15 dias após o parto. Os metabólitos fecais de progesterona apresentaram níveis médios de 13.546,57±12.808,08 (308,11-78.067,82) ng/g de fezes secas durante a gestação, com perfil crescente, atingindo níveis máximos próximos ao parto. Os dados corroboram o perfil hormonal sérico já descrito na literatura e a dinâmica hormonal observada também expressa o atraso no metabolismo da progesterona na espécie. Os resultados demonstram que a análise dos metabólitos fecais de progesterona é uma ferramenta simples e não invasiva para o monitoramento hormonal longitudinal da gestação em suínos, reduzindo os riscos e estresse inerentes da contenção e manipulação dos animais.

Palavras-chave: Suínos. Prenhez. Hormônios. Fezes. Reprodução.

LONGITUDINAL MONITORING OF FECAL PROGESTERONE METABOLITES DURING PREGNANCY IN SOWS

SUMMARY: This study aimed to evaluate the profile of fecal progesterone metabolites throughout pregnancy in sows. Thus, we collected fecal samples from five pregnant female pigs from before mating to 15 days after parturition. Fecal progesterone metabolites showed average levels of 13,546.57±12,808.08 (308.11-78,067.82) ng/g of dry feces during pregnancy, and an increasing profile, reaching maximum levels close to parturition. The data corroborate the serum hormonal profile already described in the literature. The hormonal dynamics also expresses the delay in progesterone metabolism in the species. The results demonstrate that the analysis of fecal progesterone metabolites is a simple and non-invasive tool for longitudinal hormonal monitoring of pregnancy in swine, reducing the inherent risks and stress in restraining and handling the animals.

Keywords: Swine. Pregnancy. Hormones. Feces. Reproduction.

INTRODUÇÃO

Com base nos mecanismos de metabolismo e excreção dos hormônios (PALME *et al.*, 1996; NORRIS, 1997; GRAHAM, 2004), a aplicabilidade do uso de diferentes matrizes

¹ ORCID-ID - <https://orcid.org/0000-0002-7168-2753> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - IFAM

² ORCID-ID - <https://orcid.org/0000-0001-7240-7895> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - IFAM

³ ORCID-ID - <https://orcid.org/0000-0002-8387-5333>

⁴ ORCID-ID - <https://orcid.org/0000-0002-0455-2481> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - IFAM

biológicas, como fezes, como alternativa à utilização de amostra sanguíneas no monitoramento endócrino em animais para a dosagem hormonal tem sido demonstrada por diversos estudos, tanto em animais selvagens (SCHWARZENBERGER *et al.*, 1996; GRAHAM, 2004) quanto em animais domésticos com interesse zootécnico, como bovinos, ovinos, caprinos, equinos e suínos (SCHWARZENBERGER *et al.*, 1996). Esta metodologia possui duas grandes vantagens, sendo a coleta mais fácil que a venopunção, e o animal não é submetido ao estresse, possibilitando o seu acompanhamento fisiológico longitudinal.

Em suínos, a utilização dos metabólitos fecais de esteroides pode ser uma ferramenta útil, principalmente em estudos científicos como demonstrado em outras espécies, na definição de eventos fisiológicos reprodutivos, como maturidade sexual, fase do ciclo estral e diagnóstico e monitoramento da gestação, e monitoramento do bem-estar dos indivíduos. Além disso, os suínos podem ser modelos experimentais para futuros estudos com suídeos selvagens, e também para a medicina humana, indicando a necessidade do desenvolvimento de técnicas menos invasivas nessa espécie em busca do bem-estar e da ética na experimentação animal (MACCHI *et al.*, 2010; MAYOR *et al.*, 2019; LUNNEY *et al.*, 2021)

Segundo Palme *et al.* (1996), os suínos excretam menos de 50% dos metabólitos de progesterona pelas fezes, sendo a principal via de excreção a urinária. Porém, apesar dessa menor excreção pela via fecal, alguns trabalhos já demonstraram a possibilidade do uso de progestinas fecais no monitoramento reprodutivo da espécie (SANDERS *et al.*, 1994; HULTÉN *et al.*, 1995; MORIYOSHI *et al.*, 1997; SNOJ *et al.*, 1998; NUNES *et al.*, 2019). Entretanto, estes autores somente avaliaram os animais durante o ciclo estral e início de gestação, sendo o uso dos metabólitos fecais durante todo o período gestacional ainda não realizado.

Deste modo, considerando a importância do papel da progesterona na manutenção da gestação, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil dos metabólitos fecais de progesterona durante a gestação em fêmeas suínas.

MATERIAL E MÉTODO

Para este trabalho, foram utilizadas cinco fêmeas mestiças (Landrace/Large White) saudáveis e vazias. As fêmeas foram mantidas em baias individuais com água *ad libitum* em bebedouro tipo chupeta e com fornecimento diário de ração comercial, no setor de Suinocultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - IFAM. 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 foram coletadas de cada fêmea 2x por semana logo após a defecação durante o monitoramento do ciclo estral e sinais de estro. As fêmeas foram cobertas por monta natural controlada. Após a confirmação da gestação por ultrassonografia (20 - 25 dias pós cobertura) as amostras de fezes passaram a ser coletadas 1x por semana. 10 dias antes da previsão de parto, as fêmeas foram transferidas para baias maternidade. Os partos foram assistidos e as coletas de fezes se mantiveram até 15 dias após o parto. Todas as amostras fecais foram mantidas congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise.

As amostras fecais foram liofilizadas e posteriormente submetidas ao processo de extração hormonal 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 h e posteriormente centrifugado (500 g, 15 min), sendo o sobrenadante (extrato fecal) separado, evaporado e ressuspendido em solução tampão ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$: $5,421\text{ g L}^{-1}$; Na_2HPO_4 : $8,662\text{ g L}^{-1}$; NaCl : $8,7\text{ g L}^{-1}$; BSA: $1,0\text{ g L}^{-1}$; pH 7,0).

Os metabólitos fecais de progesterona foram analisados por enzimmunoensaio utilizando um protocolo já descrito para várias outras espécies de animais incluindo suínos (GRAHAM *et al.*, 2001; NUNES *et al.*, 2019), utilizando o anticorpo CL425 e o respectivo hormônio conjugado com peroxidase (HRP) fornecidos pela Universidade da Califórnia, Davis, CA, EUA. Em resumo, microplacas de poliestireno de 96 poços (MaxiSorp, Nunc, Rochester, NY, EUA) foram marcadas com o anticorpo diluído em solução de marcação (Na_2CO_3 : $1,59\text{ g L}^{-1}$; NaHCO_3 : $2,93\text{ g L}^{-1}$; pH 9,6) e incubadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 h. Após a incubação, as microplacas foram lavadas com solução de lavagem (NaCl : $87,66\text{ g L}^{-1}$; Tween-20: 0,5%) e preenchidas com amostra (diluída em solução tampão), padrão da curva, ou controle, todos em duplicata, juntamente com o hormônio conjugado diluído em solução tampão. Após duas horas de incubação em temperatura ambiente, as microplacas foram lavadas sendo posteriormente adicionado solução de substrato (250 μL de TMB: $0,016\text{ mol L}^{-1}$ em DMSO; 50 μL de H_2O_2 : 0,6%; 11 mL de tampão substrato ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Na}$: $1,36\text{ g L}^{-1}$; pH 5.0)). A reação cromógena foi interrompida com solução ácida (H_2SO_4 : 10%) e a densidade óptica foi medida em uma leitora de microplacas utilizando um filtro de 450 nm.

A sensibilidade do ensaio foi $0,08\text{ ng mL}^{-1}$ e os coeficientes de variação intra e interensaio foram menores que 10,9%. A diluição seriada de um grupo de amostras apresentou paralelismo com a curva padrão do ensaio. Os resultados hormonais foram corrigidos e expressos em nanograma por grama de fezes secas (ng/g de fezes secas).

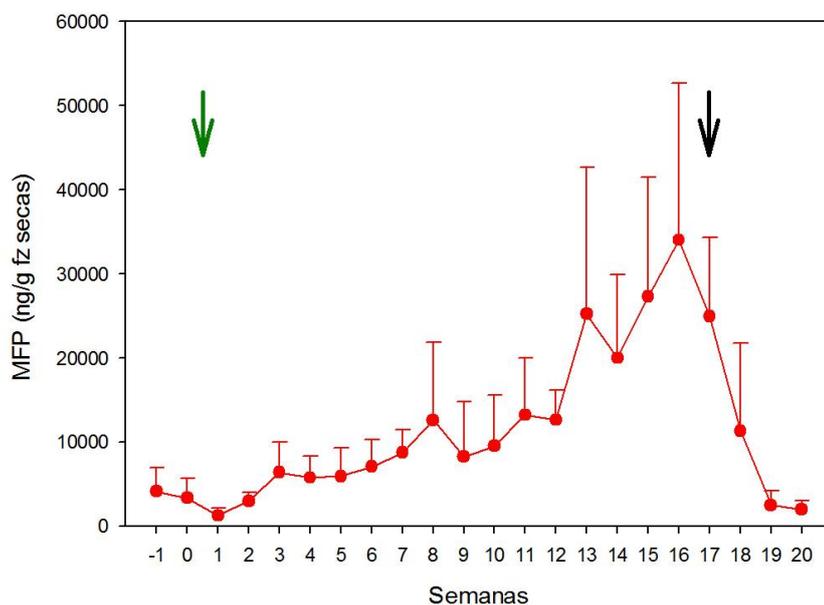
A média, desvio padrão e amplitude dos resultados foram calculados, bem como o perfil hormonal durante a gestação foi avaliado. Os níveis dos metabólitos fecais de progesterona entre

os três terços da gestação foram comparados (teste Kruskal-Wallis e teste Tukey como pós-teste). Também foram comparados os níveis hormonais do primeiro terço da gestação com os níveis hormonais da fase progesterônica do ciclo anterior à cobertura (teste Mann-Whitney). Foi considerado como nível de significância $P < 0,05$.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A gestação das fêmeas variou entre 114 a 117 dias (média $115,6 \pm 1,1$ dias), parindo de 6 a 12 filhotes, cada. O valor médio dos metabólitos fecais de progesterona durante a gestação foi de $13.546,57 \pm 12.808,08$ (308,11-78.067,82) ng/g de fezes secas. Os metabólitos fecais de progesterona apresentaram um perfil crescente durante a gestação, atingindo níveis máximos próximo ao 111º dia de gestação, e posterior queda até os níveis basais (Gráfico 1). Este perfil hormonal corrobora, como esperado, o relatado na literatura (EDGERTON *et al.*, 1971; VICENTE *et al.*, 1992).

Gráfico 1: Níveis médios dos metabólitos fecais de progesterona (MFP) durante a gestação em fêmeas suínas. Seta verde: momento da cobertura. Seta preta: momento do parto.



Fonte: Elaborado pelos Autores

De acordo com Palme *et al.* (1996), a principal via de excreção dos esteroides em suínos é pela urina, sendo somente 34% dos metabólitos de progesterona excretados pelas fezes. Entretanto, apesar da baixa excreção pelas fezes, os resultados deste trabalho demonstram que

esta matriz biológica é capaz de demonstrar as variações fisiológicas da progesterona durante a gestação nesta espécie.

Outro fator importante é a especificidade do anticorpo utilizado no ensaio hormonal. Segundo Palme *et al.* (1997), entre os metabólitos de progesterona excretados pelas fezes em suínos, aproximadamente 50% são 20-oxo-pregnanos, 40% são 20-hydroxi-pregnanos (α e β) e o restante não identificados. Desta forma, o uso de um anticorpo com alta reação cruzada com estes grupos de metabólitos, como o utilizado no presente estudo (GRAHAM *et al.*, 2001) possibilita um melhor monitoramento da dinâmica hormonal nesta espécie.

Os níveis hormonais entre os três terços da gestação diferiram significativamente ($P < 0,05$, Teste Tukey). Entretanto, os níveis hormonais do primeiro terço da gestação não diferiram dos níveis hormonais durante a fase progesterônica do ciclo estral ($4.697,82 \pm 3.165,76 \times 3.897,64 \pm 2.554,63$ ng/g fezes secas; $P = 0,3943$, teste Mann-Whitney), desta forma, os resultados indicam não ser viável utilizar a dosagem de metabólitos fecais de progesterona para discriminar fêmeas na fase progesterônica do ciclo estral e no primeiro terço da gestação.

Por outro lado, Moriyoshi *et al.* (1997) e Snoj *et al.* (1998) demonstraram que os níveis de metabólitos fecais de progesterona em fêmeas suínas entre os dias 20 a 25 pós-inseminação são significativamente maiores quando comparadas com fêmeas não-prenhes no mesmo período, apresentando uma alta acurácia no uso dessa dosagem como ferramenta para diagnóstico de gestação nesse período.

Foi observado um intervalo médio de 9 dias pós-cobertura para que houvesse uma elevação dos níveis dos metabólitos fecais de progesterona (> 2.000 ng/g de fezes secas). O mesmo intervalo também foi observado para que níveis hormonais reduzissem aos níveis basais após o parto (Gráfico 1). Hultén *et al.* (1995) e Snoj *et al.* (1998) observaram uma correlação positiva entre amostras séricas e fecais na dosagem de progesterona e seus metabólitos em fêmeas suínas, também apresentando um atraso na demonstração do evento fisiológico na matriz fecal, corroborando os achados do presente estudo.

Os suínos apresentam um atraso de aproximadamente 6 dias para a metabolização da progesterona circulante e excreção nas fezes (PALME *et al.*, 1996), sendo esse prazo, apesar de longo, inferior ao observado neste estudo. Entretanto, deve-se levar em consideração a baixa frequência de coletas adotada neste estudo (1-2x/semana), a qual certamente influenciou no aumento do tempo para a detecção do atraso na variação hormonal.

Com relação a suídeos selvagens, Mayor *et al.* (2019), demonstraram a eficácia do uso de amostras fecais no monitoramento reprodutivo de porco-do-mato (*Pecari tajacu*), com alta correlação entre os níveis de metabólitos fecais de progesterona e os níveis de progesterona

sérica. Estes autores também observaram níveis crescentes de metabólitos fecais de progesterona ao longo da gestação, corroborando os dados observados no presente estudo.

Desta forma, considerando os aspectos éticos da experimentação animal, a análise de metabólitos fecais de progesterona é uma ferramenta simples e não invasiva para ser aplicada no monitoramento dos eventos reprodutivos em suínos. A coleta de fezes pode ser realizada diretamente do chão sem a necessidade do contato direto com os animais, reduzindo os riscos e estresse inerentes da contenção e manipulação.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram a viabilidade do uso da matriz fecal no monitoramento da fisiologia reprodutiva em suínos, possibilitando o acompanhamento da dinâmica da progesterona durante a gestação, sendo esta, uma boa ferramenta a ser utilizada com o intuito de diminuir o estresse causado pela manipulação dos animais em estudos longitudinais.

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 PADGIT/PR-PPGI/IFAM.

REFERÊNCIAS

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, 2002. DOI: 10.5016/1806-8774.2004v6p91

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. DOI: 10.1002/zoo.1022

HULTÉN, F.; ZHANG, B. R.; FORSBERG, M.; DALIN, A. -M. Applying a progesterone assay to faecal samples collected from sows during the oestrous cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 30, n. 3, p. 101-105, 1995. DOI: 10.1111/j.1439-0531.1995.tb00613.x

LUNNEY, J. K.; VAN GOOR, A.; WALKER, K. E.; HAILSTOCK, T.; FRANKLIN, J.; DAI, C. Importance of the pigs as a human biomedical model. *Science Translational Medicine*, v. 13, p. eabd5758, 2021. DOI: 10.1126/scitranslmed.abd5758

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. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.12.002

MAYOR, P.; GUIMARÃES, D. A.; SILVA, J.; JORI, F.; LOPEZ-BEJAR, M. Reproductive monitoring of collared peccary females (*Pecari tajacu*) by analysis of fecal progesterone metabolites. **Theriogenology**, v. 134, p. 11-17, 2019. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.008

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. DOI: 10.1262/jrd.43.345

NORRIS, D. O. **Vertebrate endocrinology**. San Diego: Academic Press, 1997. 634 p.

NUNES, B. L. M.; CLAUDIO, J. M.; FERREIRA, M. F.; AMARAL, R. S. Monitoramento dos metabólitos fecais de progesterone e estradiol durante o ciclo estral em fêmeas suínas. **PUBVET**, v. 13, n. 2, p. a267, 2019. DOI: 10.31533/pubvet.v13n2a267.1-6

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. DOI: 10.1196/annals.1343.007

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. DOI: 10.1016/0378-4320(95)01458-6

PALME, R.; MÖSTL, E.; BREM, G.; SCHELLANDER, K.; BAMBERG, E. Faecal metabolites of infused ¹⁴C-progesterone in domestic livestock. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 32, n.4, p. 199-206, 1997. DOI: 10.1111/j.1439-0531.1997.tb01282.x

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.; 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. DOI: 10.1016/0378-4320(96)01561-8

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

VICENTE, W. R. R.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, C. A.; MALHEIROS, E. B.; PUGLIESE, A. C. Avaliação dos níveis séricos de progesterona em porcas durante a gestação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 139-145. 1992. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.1992.51963>