

VALIDACIÓN BIOLÓGICA DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN A CAMPO DE PROGESTERONA FECAL EN EL GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)

Risso A, de la Sota PE, García P, Díaz J, Corrada Y, Blanco PG, Gobello C.

Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva, Cátedra de Fisiología.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN : El objetivo de este trabajo fue validar biológicamente en los felinos domésticos la técnica "a campo" de extracción de progesterona (P_4) fecal mediante un estudio de correlación con los valores séricos de esta hormona. Secundariamente se compararon las concentraciones fecales de P_4 en distintas fases del ciclo estral. Se utilizaron un total de 16 muestras fecales procedentes de 13 hembras felinas pospúberes. Las muestras fecales fueron recolectadas en las etapas de estrus ($n=3$), fase lútea ($n=10$), y gestación ($n=3$) definidas por comportamiento, citología vaginal o ultrasonografía. En forma simultánea al muestreo fecal se tomaron muestras sanguíneas ($n=12$). Se realizó el método de extracción de esteroides "a campo" y la P_4 fue determinada por radioinmunoensayo en todos los casos. La concentración de P_4 varió de 20 a 463 ng/g de materia fecal húmeda. El coeficiente de correlación de Pearson entre los valores hallados en materia fecal y en suero fue de 0,77 ($p < 0,01$). Se encontraron diferencias entre los valores obtenidos en fase folicular vs. fase lútea ($106 \pm 22,5$ vs. $304 \pm 47,7$; $p < 0,03$), ciclos ovulatorios vs. no ovulatorios ($313,25 \pm 142,3$ vs. $118,3 \pm 86,4$; $p < 0,02$) pero no entre los ovulatorios vs. gestantes ($313,25 \pm 142,3$ vs. $292,6 \pm 130,7$; $p = 0,08$). Se concluye que en el gato doméstico, esta técnica de extracción fecal resulta válida por su alto grado de correlación con los valores séricos, además de permitir diferenciar los periodos de hiperprogesteronemia de los basales durante el ciclo estral.

Palabras clave: extracción fecal, esteroide, felino

BIOLOGICAL VALIDATION OF THE "IN FIELD" EXTRACTION METHOD FOR FECAL PROGESTERONE IN THE DOMESTIC CAT (*Felis catus*)

ABSTRACT: The objective of this article was to biologically validate in domestic felids the "field method" for progesterone (P_4) fecal extraction by a correlating fecal and serum values. Additionally, fecal P_4 concentrations in different stages of estrous cycle were compared. A total of 16 fecal samples from 13 postpubertal female cats were used. The samples were collected during estrus ($n=3$), luteal phase ($n=10$), and gestation ($n=3$) defined by behavior, vaginal cytology or ultrasonography. Simultaneously blood samples were drawn ($n=12$). The "field extraction method" was carried out in fecal samples and then P_4 was determined by radiomunoassay in all the cases. Fecal P_4 concentration ranged from 20 to 463 ng/g wet weight. Pearson correlation coefficient between fecal and serum samples was 0.77 ($p < 0.01$). Differences between follicular and luteal phase (106 ± 22.5 vs. 304 ± 47.7 ; $p < 0.03$), ovulatory vs. non ovulatory cycles (313.25 ± 142.3 vs. 118.3 ± 86.4 ; $p < 0.02$) were found, although ovulatory vs. gestational cycles could not be distinguished (313.25 ± 142.3 vs. 292.6 ± 130.7 ; $p = 0.08$). It is concluded that, in the domestic cat, this extraction method is useful to differentiate hyperprogesteronemia from basal P_4 , and that it provides P_4 fecal values highly correlated with serum ones.

Key words: fecal extraction, steroid, felid

Fecha de recepción: 07/06/10

Fecha de aprobación: 20/11/10

Dirección para correspondencia: A. Risso, Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva, Cátedra de Fisiología Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina. **E-mail:** arisso@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El aumento del número de gatos domésticos (*Felis catus*), como animal de compañía, ha provocado el crecimiento de la demanda del mejoramiento reproductivo en la especie. De acuerdo a su ciclo estral, la hembra felina se clasifica como poliéstrica estacional y de ovulación generalmente inducida (1). Además de su importancia como mascota, el gato doméstico es un excelente modelo experimental para el estudio de enfermedades humanas (2, 3) y de nuevas biotecnologías reproductivas para felinos silvestres en peligro de extinción (3).

El seguimiento hormonal del ciclo estral es necesario para la evaluación del potencial reproductivo, de distintos tratamientos técnicos o bien para el desarrollo de técnicas de reproducción asistida. Por esta razón, resulta esencial el desarrollo de métodos prácticos para el monitoreo de la actividad endocrina en la especie felina.

Los métodos convencionales para obtener datos de la endocrinología de los animales domésticos requieren análisis de muestras sanguíneas seriadas. La venopunción periférica es una maniobra invasiva que resulta impracticable en animales susceptibles al estrés como los felinos. Así, los gatos requieren normalmente anestesia general para este procedimiento. Sin embargo, el análisis de muestras sanguíneas permite la medición en tiempo real de la hormona nativa representando el "gold standard". Además, en suero o plasma es posible medir todas las hormonas, independiente de su naturaleza bioquímica. En contrapartida, métodos no invasivos como la medición de metabolitos hormonales excretados en orina o heces son alternativas atractivas ya que no requieren manipuleo de los animales y evidencian concentraciones hormonales promedio. No obstante, solo pueden medirse con estas técnicas esteroides o metabolitos gonadales y adrenales y no hormonas en estado nativo o proteicas. Tampoco resultan en tiempo real las mediciones. Así por ejemplo, el desfase temporal de una hormona en sangre hasta que es eliminada es de 4-12 horas para los metabolitos vertidos en la orina y de 12-24 horas para los eliminados por materia fecal.

La determinación de metabolitos hormonales en materia fecal requiere, como paso previo, el proceso de extracción. Mediante este método, los componentes de interés en las muestras son aislados, removidos o concentrados, evitando la interferencia de otras partículas.

El objetivo de este trabajo fue validar biológicamente en el gato doméstico la técnica "a campo" de extracción de P_4 en materia fecal, mediante un estudio de correlación con los valores séricos. Adicionalmente, como objetivo secundario se compararon las concentraciones fecales de P_4 en las distintas fases del ciclo estral. Concretamente,

se hipotetizó que existe una correlación positiva entre los valores de P_4 hallados en sangre y en materia fecal y que las concentraciones fecales de esta hormona permiten determinar el estadio del ciclo estral

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Para este estudio se utilizaron un total de 13 hembras felinas pospúberes, fértiles, entre 2 y 4 años de edad pertenecientes a la Colonia Experimental del Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Las gatas estuvieron alojadas en gateras individuales, de acuerdo a las normas internacionales del cuidado de animales de laboratorio, expuestas a fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad y alimentadas con balanceado comercial y agua *ad libitum*. Un gato macho entero, alojado en similares condiciones, se usó para los servicios y para la observación del comportamiento de las hembras

SEGUIMIENTO COMPORTAMENTAL Y CITOLÓGICO

Las hembras se examinaron físicamente en forma diaria (>1 hora 2 veces al día) para determinar la aparición de estro, el que se corroboró por los hallazgos de comportamiento y citológicos típicos (4, 5). La citología vaginal, como indicador indirecto de las concentraciones estrogénicas, se realizó mediante hisopos óticos embebidos en solución fisiológica, se tiñó con Tinción 15 (Biopur®, Sta Fe, Argentina) y se analizó e interpretó de acuerdo a Mills y col. (4). Conforme a los resultados obtenidos las muestras se clasificaron en fase folicular (estro) o interestro.

DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

En tres gatas a las que se les dio servicios con el macho, se confirmó la gestación por ultrasonografía (Toshiba Core Vision Pro, Japan, transductor lineal de 8-MHz) a los 21 días luego de los mismos (6).

MUESTREO FECAL

Se recogieron un total de 16 muestras fecales durante las etapas de estro (día 3; n=3), interestro (25-28 días del primer día del estro; n=10), y gestación (24-26 días del servicio; n=3). Se seleccionaron heces frescas y libres de elementos ajenos a la muestra. Las muestras fueron conservadas en frascos rotulados a -20 °C hasta su procesamiento.

MUESTREO SANGUÍNEO

Doce a 24 horas antes del muestreo fecal, en 12 de las hembras, se tomaron muestras de sangre únicas por venopunción periférica y bajo

anestesia general, en las etapas de interestro (n= 10), estro (n= 1) y gestación (n= 1). Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos, y el suero obtenido fue almacenado a -70°C hasta su procesamiento.

EXTRACCIÓN HÚMEDA DE METABOLITOS FECALES

El método de extracción de metabolitos de las hormonas esteroideas utilizado es el descrito como "método a campo" por Brown y col. (7). Este método ha sido previamente validado biológicamente para estradiol fecal felino (8).

DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA

La P₄ fue determinada en duplicado con un radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida (Coat-A-Count, DPC®, Los Angeles, USA). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron menores al 10 %. La sensibilidad de este ensayo al 95 % de unión, según el fabricante, es de 0,1 ng/ml. De acuerdo a los valores séricos de P₄ los periodos interestros se clasificaron en ovulatorios (> 2ng/ml) y no ovulatorios (< 2ng/ml). Los resultados obtenidos en el ensayo en ng/ml se transformaron y expresaron en ng/g de materia fecal húmeda.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó estadística descriptiva (media ± SEM) de los valores fecales de P₄ obtenidos. Además, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre los valores de P₄ en materia fecal y suero (n= 12). Las diferencias entre las concentraciones de P₄ en las muestras fecales tomadas en fase folicular (n=3) vs. en fase lútea (n=13; preñadas y vacías), ciclos ovulatorios (n= 4) vs. no ovulatorios (n= 6), y ovulatorios (n= 4) vs. gestantes (n=3) se compararon mediante tests de Student. El nivel de significancia se estableció como p< 0.05 (Sigma Stat SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

En la totalidad de las muestras la concentración de P₄ varió de 20 a 463 ng/g de materia fecal húmeda. El coeficiente de correlación de Pearson entre los valores hallados en materia fecal y en suero fue de 0,77 (p< 0,01). Las concentraciones fecales de P₄ durante las distintas

etapas del ciclo estral se muestran la Tabla 1. Se encontraron diferencias entre los valores obtenidos en fase folicular vs. fase lútea (p<0,03), ciclos ovulatorios vs. no ovulatorios (p<0,02) pero no entre los ovulatorios vs. gestantes (p = 0,08).

DISCUSIÓN

Para muchas especies, la decisión de medir hormonas en materia fecal o en orina lo determina el hecho de que el material sea fácil de recoger, procesar y analizar. Sin embargo, el modo de excreción también debe considerarse. En el caso de los felinos el análisis urinario de esteroides reproductivos no es una opción viable, ya que los esteroides se excretan casi exclusivamente en las heces (7, 9). Además muchas especies felinas, incluida la doméstica, eliminan la orina en forma de spray o gotitas por lo que la recolección resulta imposible.

Así como los estrógenos, en la especie felina, la mayor parte de progesterona (P₄) se excreta por heces más que por orina. Sin embargo a diferencia de los primeros, la P₄ no se excreta en su forma nativa (10). En otras especies se describió la presencia de metabolitos no conjugados de epimeros pregnenolona en extractos fecales (11). No obstante en el gato más del 70 % de esteroides son conjugados y pueden ser identificados con RIA de P₄ (12).

Se han descrito variadas técnicas de extracción de esteroides sexuales en las heces de mayor o menor complejidad y número de pasos en los felinos (12-14). Empero, la técnica "a campo" resulta muy sencilla y también fue útil para la determinación del estradiol fecal en el gato doméstico (7, 8).

Hasta donde conocemos, éste es el primer reporte de la validación biológica de esta técnica de extracción para P₄ en el gato doméstico. Si bien los valores absolutos de P₄ en materia fecal aquí obtenidos resultaron menores a los reportados en la bibliografía (>2,0± 0,3 µg/g de materia fecal seca(15); es importante considerar que las diferencias pueden deberse al método de extracción y a la muestra fecal usada por cada laboratorio. En este trabajo en particular, el uso de una técnica de extracción en materia fecal húmeda pudo haber contribuido al hallazgo de valores absolutos inferiores que los reportados previamente (15).

Tabla 1: Concentraciones (media ± SEM) fecales de progesterona (P₄; ng/g) durante las fases folicular y lútea de trece gatas domésticas.

| | Fase folicular | Fase lútea | | |
|-----------------------|----------------|---------------|----------------|-------------|
| | | No ovulatoria | Ovulatoria | Gestante |
| P ₄ (ng/g) | 106 ± 22,5 | 118 ± 86,4 | 313,25 ± 142,3 | 292 ± 130,7 |

De acuerdo a los resultados aquí obtenidos, la técnica de extracción usada resultó representativa de los valores séricos de esta hormona. Además, esta técnica permitió diferenciar los periodos de hiperprogesteronemia (ciclos ovulatorios y gestación) de los de P₄ basal (estro y ciclos no ovulatorios) del ciclo estral felino. Como era de esperar, y tal como ocurriría en suero alrededor del día 25, no se detectaron diferencias significativas en la P₄ fecal entre las gatas pseudopreñadas (ovuladas y vacías) y las preñadas.

La determinación de P₄ sérica y eventos fisiológicos que indirectamente indican progesteronemia basal (conducta de celo, estro colpocitológico) o elevada (gestación) garantizan claramente la validez de la técnica. Se concluye que en el gato doméstico, la técnica de extracción "a campo" para P₄ fecal, además de sencilla, resulta útil por su alto grado de correlación con los valores séricos y permite diferenciar los periodos de hiperprogesteronemia de los de P₄ basal del ciclo estral.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa Vital can, Argentina por la provisión del alimento de los animales de la colonia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Concannon P, Hodgson B, Lein, D. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biol Reprod* 1980; 23: 111-7.
2. Fox PR, Maron BJ, Basso C, Liu SK, Thiene G. Spontaneously occurring arrhythmogenic right ventriculopathy in the domestic cat: a new animal model similar to the human disease. *Circulation* 2000; 102: 1863-70.
3. O'Brien SJ, Nash WG, Winkler CA, Reeves RH. Genetic analysis in the domestic cat as an animal model for inborn errors, cancer and evolution, en: Migaki G, Desnick RJ, Patterson DF. (Eds.), *Animal Models of Inherited Metabolic Diseases*, *Prog. Clin. Biol Res* 1982; 94: 67-90.
4. Mills JN, Valli VE, Lumsden JH. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can Vet J* 1979; 20: 95-101.
5. Shille VM, Lundström KE, Stabenfeldt GH. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 β concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biol Reprod*, 1979; 21: 953-63.
6. Mattoon J, Nyland T. Ultrasonography of the Genital System. En: Nyland T, Mattoon J. (eds.) *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. WB Saunders, Philadelphia. 1995; 141-64
7. Brown JL, Wakter S, Steinman K. *Endocrine manual for eproductive assessment of domestic and non domestic species*. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park VA. USA 2008; Pp 62.

8. Risso A, Iglesias M, García Romero G, Valiente C, Diaz J, Corrada Y, Gobello C. Validación biológica de la técnica de extracción a campo de estradiol fecal en el gato domestico (*Felis catus*) *Invet*. 2010; 12(1): 53-58.
9. Shille VM, Wing AE, Lasley BL, Banks JA. Excretion of radiolabeled estradiol in the cat (*Felis catus*, L): a preliminary report. *Zoo Biol* 1984; 3: 2019.
10. Mostl E, Lehmann H, Wenzel U. Gestagens in faeces of minks and cats for monitoring corpus luteum activity. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 47: 540-41.
11. Wasser SK, Monfort SL, Southers J, Wildt DE. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 213-220.
12. Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasively in feces. *Biol Reprod* 1994; 51: 776-86.
13. Shile MV, Haggerty MA, Shackleton C, Lasley BL. Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 1990; 34: 779-94
14. Graham LH, Raeside JI, Goodrowe KL, Liptrap RM. Measurements of faecal oestradiol and progesterone in non-pregnant and pregnant domestic and exotic cats. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 47: 119-120.
15. Pelican K.M, Brown JL, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. *General and Comparative Endocrinology* 2005; 144: 110-21.