

Validación biológica de la técnica de extracción a campo de estradiol fecal en el gato doméstico: reporte preliminar

RISSE A.¹; IGLESIAS M.²; GARCÍA ROMERO G.¹; VALIENTE C.¹; DIAZ J.¹; CORRADA Y.¹; GOBELLO C.¹

Resumen

El objetivo de este trabajo fue validar biológicamente la técnica “a campo” de extracción de estradiol fecal en felinos domésticos mediante un estudio comparativo de muestras tomadas en distintos momentos del ciclo estral. Se utilizaron un total de 40 muestras de materia fecal procedentes de 7 hembras felinas pospúberes. Las muestras fecales fueron recolectadas en la etapa de estro (n=22) e interestro (n=18) definidos por comportamiento y citología vaginal. durante 12 meses. Se realizó el método de extracción “a campo” y el 17 β estradiol fue determinado por radioinmunoensayo. La concentración de estradiol varió de 926 a 33.320 pg/g de materia fecal húmeda. La media \pm SEM de las concentraciones de esta hormona en gatas en estro e interestro fueron de 11.814 \pm 2.171 pg/g y 3.238 \pm 474 pg/g (p < 0.01), respectivamente. La observación longitudinal de los valores de estradiol obtenidos en los animales indicó, claramente, que los picos eran coincidentes con el comportamiento y citología vaginal de estro.

Palabras clave: (extracción fecal), (esteroide), (felino)

¹Laboratorio de Fisiología Reproductiva, Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. 60 y 118 (1900) La Plata, Bs. As. e-mail: cgobello@fcv.unlp.edu.ar. ²Profesional independiente.

Recibido: 04-06-2010 - Aceptado: 29/09/2010

Summary

The objective of this article was to biologically validate the "field method" for estradiol fecal extraction in domestic felids by a comparative study of samples obtained in different stages of the estrous cycle. A total of 40 fecal samples from 7 postpubertal female cats were included. The samples were collected in the estrous (n=22) and interestrous (n=18) stages (defined by behavior and vaginal cytology) during 12 months. The "field extraction method" was carried out and then 17β estradiol was measured by radiimmunoassay. Fecal estradiol concentration ranged from 926 to 33320 pg/g wet weight. Mean \pm SEM in estrous and interestrous samples were 11814 ± 2171 pg/g and 3238 ± 474 pg/g ($p < 0.01$), respectively. Longitudinal observation of estradiol values clearly indicated that peaks coincided with cytological and behavioral estrus.

Key words: (fecal extraction), (steroid), (felid).

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 de ovulación generalmente inducida. Las gatas ovulan en respuesta al coito, sin embargo pueden también ovular espontáneamente⁵. Además de su importancia como mascota, el gato doméstico es un excelente modelo experimental para el estudio de enfermedades humanas^{6,9} y de nuevas biotecnologías reproductivas en felinos silvestres en peligro de extinción.

Es necesario el seguimiento hormonal del ciclo estral durante distintos tratamientos, la evaluación del potencial reproductivo y el desarrollo de distintas técnicas de reproducción asistida en el gato. Por esta razón, resulta esencial el desarrollo de métodos prácticos para el monitoreo de la actividad endocrina en esta especie.

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 una medición en tiempo real de la hormona nativa y 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. Sin embargo, 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 desde la 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.

Para muchas especies, la decisión de medir hormonas en materia fecal u 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^{2,12}. Además muchas especies felinas, incluida la doméstica, eliminan la orina en forma de spray o gotitas por lo que la recolección resulta imposible. Estudios del metabolismo del estrógeno en el gato doméstico han demostrado que más 95% de este esteroide se excreta en las heces^{3,8}.

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 esta especie la técnica “a campo” utilizada en nuestro Laboratorio de extracción de estradiol mediante un estudio comparativo en distintos momentos del ciclo estral. Concretamente en este trabajo inicial, se hipotetiza que con esta técnica las concentraciones de estradiol en materia fecal son significativamente mayores en hembras en estro que en interestro.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron un total de 40 muestras de materia fecal procedentes de 7 hembras felinas pospúberes, fértiles, de 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 estaban alojadas en gateras individuales, de acuerdo a las normas internacionales del cuidado de animales de laboratorio⁴, expuestas a fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad y alimentadas c-on balanceado comercial con un contenido proteico del 30 % y agua *ad libitum*.

Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP (CICUAL; Resolución del Consejo Directivo N° 129/09).

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 (lordosis, pataleo, elevación del periné, maullidos) y citológicos típicos (> 80% de células superficiales)^{7,11}. La citología vaginal, como indicador indirecto de las concentraciones estrogénicas, mediante hisopos óticos embebidos en solución fisiológica, se tiñeron con Tinción 15 (Biopur®, Sta Fe, Argentina) y se analizaron e interpretaron de acuerdo a Mills y Valli (1979)⁷.

Muestreo fecal

Las muestras fecales fueron recolectadas entre las 9 y las 17 horas, durante 12 meses en la etapa de estro (n=22) e interestro (n=18) del ciclo estral el mismo día de la citología vaginal. Las etapas del ciclo se clasificaron de acuerdo a los hallazgos típicos de comportamiento y citología vaginal⁷. 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.

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, 2008¹. Brevemente, la totalidad de las muestras de heces se pesaron y homogeneizaron. Luego se tomó una alícuota de 250 mg, reservando el resto de la muestra para eventuales mediciones futuras. A la alícuota se le agregaron 5 ml de alcohol etílico absoluto, se agitó primero a mano y luego por vórtex durante 1 minuto. Se centrifugó a 3000 RPM durante 5 minutos y se separó el sobrenadante, del cual se extrajeron 200 µl que se colocaron en un tubo de ensayo para dejarlo evaporar durante 24 a 48 hs hasta su sequedad. Se resuspendió el residuo seco en 200 µl de buffer de esteroides para la medición de 17β estradiol. El resto del sobrenadante

se conservó a -20°C para eventuales futuras mediciones.

Determinación de estradiol

El 17β estradiol fue determinado por radioinmunoensayo de fase sólida (Coat -A-Count Estradiol, DPC®, Los Angeles, USA). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron menores al 10%. La sensibilidad del kit, según el fabricante, es de 8 pg/ml. Los resultados obtenidos en el ensayo en pg/ml se transformaron y expresaron en pg/g de materia fecal húmeda.

Análisis estadístico

Se realizó la estadística descriptiva de los valores de estradiol en las distintas etapas del ciclo estral los que se expresaron como la media \pm error estándar (SEM). Las diferencias entre las concentraciones de estradiol en las muestras de estro e interestro se compararon mediante el test de Student. El nivel de significancia se estableció como $p < 0.05$ (Sigma Stat SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Resultados

La concentración de 17β estradiol varió de 926 a 33.320 pg/g de materia fecal húmeda. La media \pm SEM de las concentraciones de esta hormona en gatas en estro e interestro fueron de 11.814 ± 2.171 pg/g y 3.238 ± 474 pg/g ($p < 0.01$), respectivamente. Además, la observación longitudinal de los valores de estradiol en los animales estudiados indicó, claramente, que los aumentos (picos) en las concentraciones fecales eran coincidentes con el comportamiento y citología vaginal de estro (Figura 1).

Discusión

Hasta donde conocemos, éste es el primer reporte de la validación biológica de la técnica "a campo" de extracción de 17β estradiol en el gato doméstico. De acuerdo a los resultados aquí obtenidos, la técnica de extracción usada resultó, además de sencilla, útil para diferenciar los periodos del ciclo estral caracterizados por estrogenemia alta (estro) y baja. Si bien los valores absolutos de 17β estradiol aquí

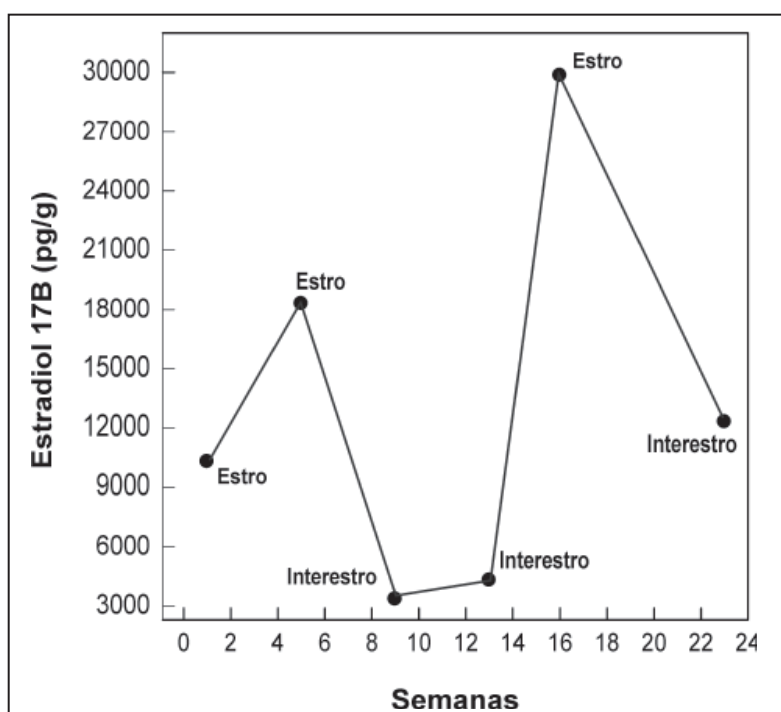


Figura 1: concentraciones de estradiol en materia fecal de una sección del muestreo longitudinal en distintos momentos del ciclo estral de una hembra felina seleccionada.

obtenidos resultaron menores a los reportados en la bibliografía¹⁰, en el presente reporte los valores de estro resultaron tres veces superiores a los del interestro. Así, el aumento relativo de esta hormona durante el estro coincidió con lo descrito para la especie¹⁰.

Por otro lado, al momento de establecer comparaciones de los valores absolutos entre las publicaciones, es importante considerar que las diferencias pueden deberse al método de extracción y a la muestra fecal (húmeda vs. seca) 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 algo inferiores que los reportados previamente¹⁰. En este aspecto, fue previamente reportado para el estradiol, correlación entre muestras pareadas húmedas y secas².

Además, es de esperar que las diferencias aquí halladas sean aun mayores cuando el estro se compare con el anestro profundo estacional en futuros estudios.

La validación del método de extracción mediante eventos fisiológicos, como las manifestaciones de celo, y la citología vaginal, que fielmente reflejan hiperestrogenemia garantizan claramente la utilidad de la técnica para diferenciar los distintos estadios del ciclo estral felino. Además, esta técnica se podría eventualmente extrapolar a los felinos silvestres.

Conclusión

Esta sencilla técnica de extracción de esteroides resulta de utilidad en el gato doméstico, ya que permitió diferenciar en forma no invasiva los periodos de hiperestrogenismo de los de estrogenemia basal.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa Vital can Argentina por la provisión del alimento de los animales de la colonia, a la Dra Zulema Farinati (CEMIC) y al Dr Nei Moreira por la lectura crítica del manuscrito.

Bibliografía

- 1-Brown JL, Wakter S, Steinman K. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non domestic species. Conservation and Research Center, Smithsonian 's National Zoological Park VA. USA 2008; Pp 62.
- 2-Brown J.L.; 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.
- 3-Brown JL, Wildt DE, Graham LH, Byers AP, Barrett S, Howard JG. Comparison of natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroids. *Biol Reprod* 1995; 53: 93–102.
- 4-Cardozo de Martínez CS, Afife Mrad de Osorio CM, Rodríguez Yunta E, Lolas Stepke F. *El animal como sujeto experimental. Aspectos técnicos y éticos*. Centro Interdisciplinario de estudios en bioética (CIEB), Universidad de Chile. 2007; 13-227.
- 5-Concannon P, Hodgson B, Lein D. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biol Reprod* 1980; 23: 111–7.
- 6-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.
- 7-Mills JN, Valli VE, Lumsden JH. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can Vet J* 1979; 20: 95–101.
- 8-Moreland RB, Brown JL, Wildt DE, Howard JG. Basic reproductive biology of the fishing cat. (*Prionailurus viverrinus*). *Biol Reprod* 2002; 66(Suppl. 1):328 [abstract].
- 9-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, R.J., Patterson, D.F. (Eds.), *Animal Models of Inherited Metabolic Diseases*, *Prog. Clin. Biol Res* 1982; 94: 67–90.
- 10-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.
- 11-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.

12-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.