

Perfil hormonal da progesterona em ovelhas (*Ovis aries*) no início da gestação, no pré-parto e início da lactação

(Evaluation of progesterone hormone profile on ewes at early pregnancy, preterm and early lactation)

P.A. Rodrigues¹, W.R.R. Vicente^{1*}, J. Cipolla Neto², C.A. Oliveira³

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista
Rodovia Carlos Tonanni, Km 5
14870-000 - Jaboticabal - SP
e-mail: isapenat@fcav.unesp.br

²Instituto de Ciências Biomédicas - USP - São Paulo, SP

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - São Paulo, SP

RESUMO

Foram utilizadas 15 ovelhas prenhes e em lactação com o objetivo de se determinarem os padrões fisiológicos da progesterona, e de se verificar a presença ou não de ritmo circadiano. Observou-se aumento crescente dos níveis de progesterona durante a gestação, com diminuição abrupta aos dois dias pré-parto. A análise de autocorrelação revelou que esse hormônio apresentou no período de pré-parto ritmo circadiano muito mais evidente que no início da gestação e lactação.

Palavras-Chave: Progesterona, ritmo circadiano, ovelha

ABSTRACT

The main objectives of this work were to determine the physiological patterns of progesterone on pregnancy and lactation in ewes, and to verify whether the hormone presents a 24h secretion rhythm. Serum levels of progesterone increased during gestation with an abrupt decrease by two days preterm. The autocorrelation analysis showed that this hormone, had a more evident circadian rhythm on preterm, than during early pregnancy and lactation.

Keywords: Progesterone, circadian rhythm, ewe

INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, e principalmente em ovelhas, os níveis dos hormônios relacionados à reprodução apresentam grande variação segundo o estado fisiológico, ou mesmo no período de 24 horas (Cauter & Aschoff, 1988).

Segundo Turek & Cauter (1988), a maioria dos ritmos hormonais, estudados sob condições ambientais constantes, apresentam ritmo circadiano, indicando que algum sistema temporal interno deve estar envolvido na sua geração. Assim, em condições ambientais

Recebido para publicação em 14 de fevereiro de 1997.

Suporte financeiro - FAPESP

*Autor para correspondência

normais, ritmos circadianos têm período igual ao comprimento do dia solar, mas alguns fatores do ambiente físico devem estar envolvidos para sincronizar o fenômeno de ritmicidade biológica. Para a grande maioria dos mamíferos, o ciclo claro-escuro parece ser o fator ambiental mais importante para sincronizar o "relógio" biológico endógeno, embora outros agentes externos também tenham sido identificados, como tipo de alimento ingerido, temperatura ambiente etc.

O núcleo supraquiasmático (NSQ), estrutura bilateral localizada no hipotálamo anterior contém o maior "relógio" circadiano que regula a maioria, se não todos, dos ritmos endógenos. Esta estrutura recebe sinal neural direto da retina por via do trato retino-hipotalâmico (TRH), que está envolvido na transmissão da informação claro-escuro ao NSQ.

Apostolakakis et al. (1993) demonstraram haver pouca evidência de um padrão rítmico, de 24 horas, nas concentrações plasmáticas de cortisol ou progesterona na circulação sanguínea e também na atividade contrátil uterina em ovelhas prenhes e fetos, durante o final da gestação. Entretanto, Challis et al. (1981), estudando flutuações das concentrações de progesterona e cortisol em ovelhas e fetos nos últimos dias de gestação, mostraram haver variação substancial em intervalos de 10 a 20 minutos.

O presente trabalho teve por objetivo determinar os padrões fisiológicos da progesterona em fêmeas ovinas em início de gestação, pré-parto e início de lactação, e verificar a ocorrência de ritmicidade circadiana para este hormônio.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas 15 fêmeas ovinas, adultas e em atividade sexual, da raça Ideal, pertencentes ao Setor de Ovinocultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Campus de Jaboticabal. As condições de manejo e alimentação foram mantidas durante todo o período experimental, com liberdade de pastejo de grama-seda e "coast cross" (*Cynodon dactylon*) entre 7 e 10h e 13 e 17h. Nos demais períodos os animais eram arraçoados, recebendo concentrado e volumoso. As ovelhas foram tosquiadas em outubro e colocadas com

reprodutores em novembro, com a finalidade de provocar estímulo reprodutivo pela presença do macho. As ovelhas, após o coito, foram identificadas pela marcação com graxa na região dorsal e a gestação confirmada pelo não aparecimento de sinais clínicos de estro.

Amostras de sangue foram obtidas durante período de 24 horas, em intervalos regulares, às 4, 8, 12, 16, 20 e 24h, no início da gestação (sétimo e 12º dias), pré-parto (sétimo e segundo dias antes do parto) e início de lactação (sétimo e 12º dias). As colheitas de sangue foram realizadas por punção da veia jugular externa, com os animais em posição quadrupedal, utilizando-se agulhas hipodérmicas descartáveis de 40 x 12mm. O sangue foi depositado em tubos de ensaio esterilizados devidamente identificados, num volume aproximado de 15ml por amostra. Após separação do coágulo sanguíneo, o soro foi centrifugado a 1600 (g) por cinco minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para dois frascos de vidro devidamente esterilizados com volume similar e estocados à temperatura de -18°C até o momento de se efetuarem as análises.

Os ensaios para dosagens hormonais foram feitos no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, utilizando-se conjuntos de reagentes comerciais¹ desenvolvidos para avaliação quantitativa da progesterona sem qualquer tipo de extração química e processo de purificação, valendo-se do ¹²⁵I como elemento radioativo traçador.

As amostras de soro e os reagentes específicos para o hormônio foram previamente descongelados até atingirem a temperatura ambiente, e devidamente agitados antes do uso. Os procedimentos utilizados nas dosagens hormonais foram os especificados pelo fabricante dos "kits".

As contagens de radioatividade foram obtidas pela utilização de contador gama automático de

¹ COAT-A-COAT - Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA, USA

poço, modelo "Cobs Gamma"¹, calibrado automaticamente para I¹²⁵. E os seus resultados foram fornecidos pelo uso de programa específico de computador.

Foi realizada análise de variância bifatorial, com medidas repetidas para cada fator (split-plot). Os fatores considerados foram períodos ao longo do ciclo gestacional/puerperal e horas do dia. Para comparação das médias foi aplicado o teste Student-Newman-Keuls, caracterizando o esquema fatorial 6 × 6 (períodos de colheitas × intervalos de colheitas) com 15 repetições.

Para determinar o fenômeno biológico da ritmicidade (ritmo circadiano) em período de tempo pré-determinado foi utilizado o método Cosinor (Silva, 1988).

Também foi realizada a análise de autocorrelação, onde o coeficiente de autocorrelação é determinado entre a série de dados originais e essa mesma série quando defasada de um número fixo de unidade de tempo. Os coeficientes de autocorrelação foram obtidos mediante programa de computador (GBSTAT, Dynamic Microsystems Inc. USA), e calculados para cada animal em cada fase do ciclo gestacional/puerperal. A seguir, foram realizadas as médias e erros padrão das autocorrelações de todos os animais, para determinado período, para que assim os resultados refletissem o comportamento geral da população em relação à variável estudada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas dosagens de progesterona pelo método de radioimunoensaio, obtiveram-se ótimas curvas padrão, fornecendo resultados bastante confiáveis e seguros, o que vem reforçar as descrições feitas por Vicente et al. (1991 e 1992).

A análise de variância apresentada na Tab. 1 indica que a variabilidade dos dados deveu-se tanto aos períodos quanto aos horários, e que o fator horas do dia variou de acordo com o período do ciclo gestacional/puerperal.

¹ Roche Diagnostic Co., USA.

Tabela 1. Análise de variância da dosagem de progesterona em ovelhas.

FV	Progesterona			
	GL	QM	F	P
Animais (A)	14	44,74	-	-
Períodos (P)	5	1869,82	64,15	<0,0001
Interação A × P	70	29,15	-	-
Horários (H)	5	9,34	5,11	0,0005
Interação A × P	70	1,83	-	-
Interação P × H	25	3,20	2,05	0,0025
Resíduo	350	1,56	-	-
Total	539	23,78	-	-

Na Fig. 1 observa-se que os níveis séricos de progesterona apresentam-se em elevação no início da gestação, sendo aos sete dias pré-parto o maior valor encontrado. Estes achados concordam com as observações, feitas por Tucker (1988), de que a secreção de progesterona, na maioria das espécies, é mantida em níveis altos durante a maior parte da gestação, fato que poderia explicar, pelo menos em parte, a supressão da lactogênese e também o bloqueio da contratilidade uterina neste período. E ainda, tal fato pode ser explicado levando-se em conta que, nessa espécie, a placenta passa a ser a principal fonte de progesterona a partir do 50º dia de gestação (Linzell & Heap, 1968). Dois dias antes do parto nota-se uma queda significativa nos níveis séricos de progesterona (Fig. 1), que é acompanhada pelo aumento do cortisol fetal (Flint et al., 1975). Esta queda abrupta da progesterona também foi observada por Boulfekhar & Brudieux (1979) nos últimos três dias antes do parto. Flint & Ricketts (1979) sugeriram que no pré-parto a glândula adrenal fetal, mediante secreção de cortisol, altera a produção de esteróides na placenta, estimulando a atividade enzimática placentária, convertendo progesterona em 17 α -hidroxiprogesterona, androstenediona e estrógeno, e como resultado a concentração de progesterona diminui e a de estrógeno aumenta por ocasião do parto. O decréscimo da progesterona antes do parto é responsável pelo aumento da secreção da PGF_{2 α} (Challis & Olson, 1988) e início do parto, e também induz prontamente a lactação, devido à conversão desse hormônio a um metabólito não antilactogênico (Kuhn, 1969). Em relação à lactação, os valores obtidos foram extremamente baixos, semelhantes aos encontrados por Boulfekhar & Brudieux (1979), o que faz lembrar dois aspectos: o primeiro, provavel-

mente, relacionado com a condição de aciclia fisiológica pós-parto e o segundo, com a reprodução estacional desses animais.

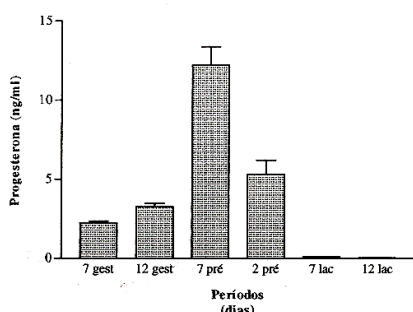


Figura 1. Valores médios e respectivos erros padrão, das concentrações de progesterona no soro sanguíneo de ovelhas: 7 dias de gestação (7 gest), 12 dias de gestação (12 gest), 7 dias pré-parto (7 pré), 2 dias pré-parto (2 pré), 7 dias de lactação (7 lac) e 12 dias de lactação (12 lac).

No início da gestação, tanto no sétimo como no 12º dia, as maiores concentrações de progesterona foram registradas às 16h, enquanto nas demais fases os valores maiores foram observados sempre no início da manhã (Fig. 2a, b, c, d, e e f), praticamente invertendo a condição anterior. Talvez esse fato deva-se, no período de pré-parto, à transformação metabólica dos esteróides, além das ondas de contração uterina que devem agir como fator estressor. No período de lactação, uma provável explicação para este fato pode ser a nova condição fisiológica, a exemplo da fase preparatória para o parto. Comparando esses resultados com os obtidos por Rodrigues (1996) para o cortisol, nota-se que as maiores concentrações de progesterona ocorreram, em todos os períodos, em intervalo de tempo que acredita-se ser após os picos registrados para o cortisol. Este fato reforça as observações feitas por Rebar & Yen (1979) e Honnebier et al. (1992), nas quais atentam para a importância da adrenal materna na manutenção ou sincronização dos ritmos de 24 horas dos hormônios associados à gestação.

Os valores de progesterona obtidos a partir do teste do Cosinor são apresentados na Tab. 2. Eles mostram que não houve ajuste significativo para

a progesterona em nenhum dos períodos estudados, os quais não permitem informar sobre a inexistência de ritmicidade biológica, já que a maior desvantagem desse teste e suas derivações é assumir que o perfil observado deve ser adequadamente descrito por uma simples curva sinusoidal. Esta suposição praticamente nunca é verdadeira para ritmos biológicos que são assimétricos por natureza, ainda que este teste seja largamente utilizado, segundo Turek & Cauter (1988).

Tabela 2. Valores de progesterona obtidos pela utilização do método Cosinor, testando-se o período de 24 horas.

Períodos	Progesterona
7 dias de gestação	0,979
12 dias de gestação	0,888
7 dias pré-parto	0,462
2 dias pré-parto	0,240
7 dias de lactação	0,169
12 dias de lactação	0,188

Alternativamente, a análise de autocorrelação (Fig. 3) mostra que o máximo de correlação positiva ocorreu a seis intervalos de 4 horas de deslocamento em todas as fases do ciclo gestacional/puerperal estudadas, sugerindo ritmo de 24 horas. No início de gestação (7 e 12 dias), além do ritmo de 24 horas evidenciado, nenhum outro se mostra claro. Aos sete e dois dias pré-parto (Fig. 3c e 3d, respectivamente) observa-se que o máximo de correlação negativa ocorreu a três intervalos de deslocamento, determinando curva sinusoidal indicando ritmo de 24 horas dominante e estável. Resultados semelhantes foram obtidos por Rodrigues (1996) para o cortisol e estradiol em ovelhas prenhes. Tal fato sugere que, neste período, fenômenos biológicos importantes devem ocorrer para sincronizar eventos como o momento do parto e outros. Já aos 7 e 12 dias de lactação (Fig. 3e e 3f, respectivamente) observam-se ritmos de 24 horas compostos com outros ritmos. Estes resultados contrapõem-se aos obtidos por Apostolakis et al. (1993) que não observaram ritmo de 24 horas para a progesterona em ovelhas em final de gestação. Outros estudos relataram significativo ritmo de 24 horas para a progesterona em macacas prenhes (Honnebier et al., 1992) e em cadelas (Steinetz et al., 1990).

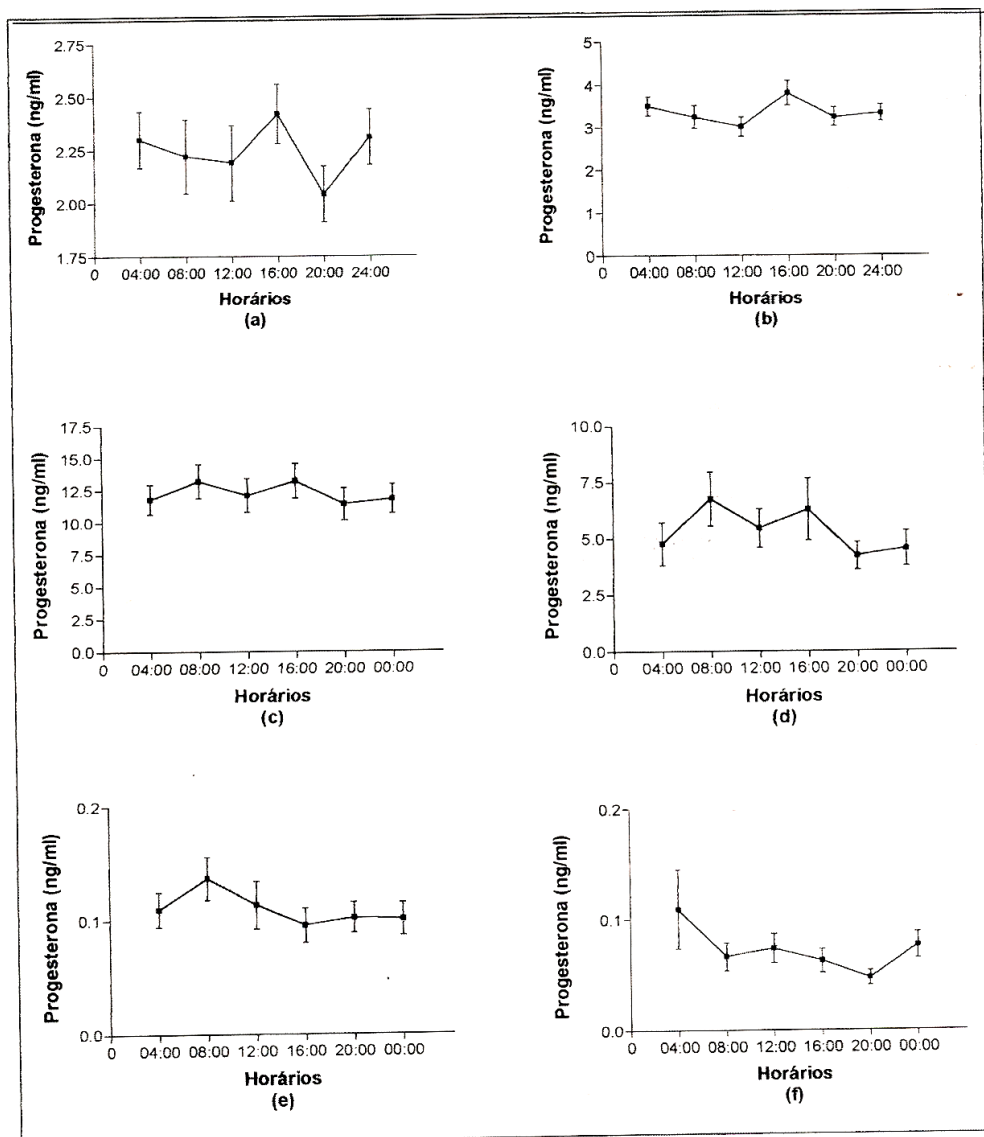


Figura 2. Valores médios e respectivos erros padrão, das concentrações de progesterona no soro sanguíneo de ovelhas no sétimo dia de gestação (a), 12^o dia de gestação (b), sete dias pré-parto (c), dois dias pré-parto (d), sétimo dia de lactação (e) e 12^o dia de lactação (f), obtidas durante período de 24 horas.

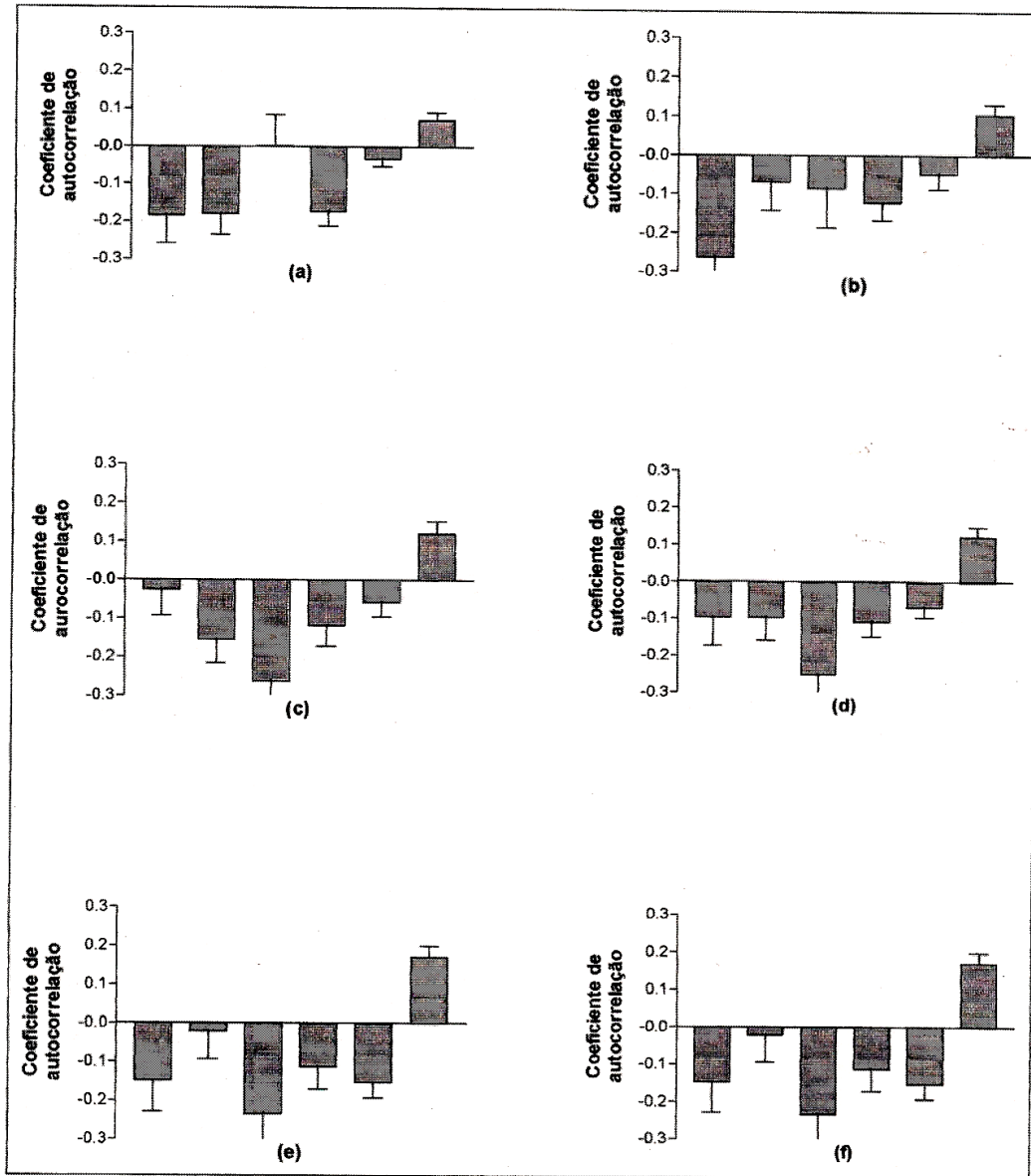


Figura 3. Representação gráfica das médias e erros padrão dos coeficientes de correlação obtidos pela autocorrelação de séries temporais individuais dos valores de progesterona no soro sanguíneo de ovelhas no sétimo dia de gestação (a), 12º dia de gestação (b), sete dias pré-parto (c), dois dias pré-parto (d), sétimo dia de lactação (e) e 12º dia de lactação (f), durante período de 24 horas.

CONCLUSÕES

A metodologia e o conjunto de reagentes utilizados na dosagem das concentrações de progesterona, no soro sanguíneo periférico de fêmeas ovinas, revelaram-se eficazes. O perfil hormonal observado pelas análises séricas de progesterona revelou valores crescentes no período inicial de gestação (7 e 12 dias), decrescentes no período final de gestação (sete e dois dias) e baixos no período inicial de lactação (7 e 12 dias). Utilizando-se o método Cosinor, as flutuações registradas ao longo de 24 horas nos diversos períodos estudados não determinaram curva do tipo sinusoidal, os quais não permitem informar sobre a inexistência de ritmicidade circadiana. No entanto, de acordo com as análises de autocorrelação, o hormônio progesterona apresentou no sétimo e segundo dia pré-parto ritmo circadiano muito mais evidente do que no início da gestação e da lactação. Fatores como o estado fisiológico dos animais têm grande influência sobre os ritmos de 24 horas e merecem ser mais bem estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APOSTOLAKIS, E.M. et al. Time of day of birth and absence of endocrine and uterine contractile activity rhythms in sheep. *Am. J. Physiol.*, v.264, p.E-534-540, 1993.
- BOULFEKHAR, L., BRUDIEUX, R. Peripheral concentrations of progesterone, cortisol, aldosterone, sodium and potassium in the plasma of the tadmrit ewe during pregnancy and parturition. *J. Endocrinol.*, v.84, p.25-33, 1979.
- CAUTER, E.V., ASCHOFF, J. Endocrine and other biological rhythms. In: GRUNE and STRATTON. *Endocrinology*, New York: L.J. De-Groot, 1988.
- CHALLIS, J.R.G., OLSON, D.M. Parturition. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. *The physiology of reproduction*, New York: Raven, 1988. p.2177-2216.
- CHALLIS, J.R.G. et al. Short-term fluctuations in the concentration of cortisol and progesterone in fetal plasma, maternal plasma, and amniotic and allantoic fluids from sheep during late pregnancy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.59, p.261-267, 1981.
- FLINT, A.P.F. et al. The mechanism by which foetal cortisol controls the onset of parturition in the sheep. *Biochem. Soc. Trans.*, v.3, p.1189, 1975.
- FLINT, A.P.F., RICKETTS, A.P. Control of placental endocrine function: role of enzyme activation in the onset of labour. *J. Steroid Biochem.*, v.11, p.493-500, 1979.
- HONNEBIER, M.B.O.M., JENKINS, S.L., NATHANIELSZ, P.W. Circadian timekeeping during pregnancy: endogenous phase relationships between maternal plasma hormones and the maternal body temperature rhythm in pregnant rhesus monkeys. *Endocrinology*, v.131, p.2051-2058, 1992.
- KUHN, N.J. Specificity of progesterone inhibition of lactogenesis. *J. Endocrinol.*, v.45, p.615-616, 1969.
- LINZELL, J.L., HEAP, R.B. A comparison of progesterone metabolism in the pregnant sheep and goat: sources of production and an estimation of uptake by some target organs. *J. Endocrinol.*, v.41, p.433, 1968.
- REBAR, R.W., YEN, S.S.C. Endocrine rhythms in gonadotropins and ovarian steroids with reference to reproductive processes. In: — *Endocrine rhythms*. New York: Raven, 1979. p.259-298.
- RODRIGUES, P.A. *Contribuição ao estudo do fenômeno de ritmicidade biológica (ritmo circadiano) do perfil hormonal do cortisol, estradiol e progesterona em ovelhas (Ovis aries Linnaeus, 1758) em início da gestação, pré-parto e lactação*. Jaboticabal: UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1996. 70p. (Dissertação, Mestrado).
- SILVA, A.A.B. Metodologia de análise matemática e estatística dos ritmos biológicos. In: CIPOLLANETO, J., MARQUES, N., MENNA-BARRETO, L.S. *Introdução ao estudo da cronobiologia*. São Paulo: Ícone, 1988, p.50-64.
- STEINETZ, B.G. et al. Diurnal variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin, or estradiol-17 β in the pregnant bitch. *Endocrinology*, v.127, p.1057-1063, 1990.
- TUCKER, H.A. Lactation and its hormonal control. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. *The physiology of reproduction*. New York: Raven, 1988. p.2235-2263.
- TUREK, F.W., CAUTER, E.V. Rhythms in reproduction. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. *The physiology of reproduction*. New York: Raven, 1988. p.1789-1830.
- VICENTE, W.R.R. TONIOLLO, G.H., OLIVEIRA, C.A. et al. Avaliação do ritmo circadiano da progesterona, androstenediona e cortisol em fêmeas suínas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.15, p.81-90, 1991.
- VICENTE, W.R.R. TONIOLLO, G.H., OLIVEIRA, C.A. et al. Avaliação dos níveis séricos de progesterona em porcas durante a gestação. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.29, p.139-145, 1992.