

**Níveis séricos de cortisol e 17- β estradiol durante o ciclo estral em
marrãs (*Sus scrofa domestica* - Linnaeus 1758)**

*Cortisol and oestradiol-17 β serum levels during the oestrus cycle in gilts (*Sus scrofa domestica*-Linnaeus 1758)*

G.H. Toniollo¹, W.R.R. Vicente¹, C.A. Oliveira²,
E.B. Malheiros¹, L.F.O.S. Carvalho¹

1Depto. de Reprodução Animal - FCAV - UNESP
14870-000 - Jaboticabal, SP

2Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

RESUMO

Utilizaram-se 21 fêmeas suínas, virgens, sexualmente aptas, criadas e mantidas sob condições industriais, objetivando determinar os perfis hormonais séricos de cortisol e 17- β estradiol, durante o ciclo estral. As colheitas de sangue foram efetuadas sempre no mesmo intervalo, entre oito e dez horas. Cada animal foi submetido a 14 punções venosas, distribuídas nos dias zero, dois, quatro, seis, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 22 e 23 do ciclo estral, considerando-se o dia zero como o primeiro dia da fase estral, e o 23º dia como o primeiro do estro subsequente. Os ensaios para dosagens hormonais foram executados utilizando-se a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida e para isso foi empregado conjunto de reagentes comerciais (COAT-A-COUNT®). Para o hormônio cortisol foram observados valores que variaram entre 3,5 a 8,0 μ g/dl e para o 17- β estradiol foram detectados valores médios que variaram de 3,5 a 14,9pg/ml.

Palavras-chave: Cortisol, 17- β estradiol, nível sérico, suínos

ABSTRACT

In the present study 21 young swine females, sexually mature, reared and kept under an industrial management system were assessed for cortisol and oestradiol-17 β serum prolifes during the oestrus cycle. Blood sampling was performed always at the same interval, from 8:00 to 10:00 a.m. Each animal was submitted to 14 venal punctions at days 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 22 and 23 of the oestrous cycle. The first day of the oestrous phase was assumed to be day 0 and the 23rd as the first of the next cycle. Hormone determinations were performed using a solid phase radioimmunoassay (RIA). Regarding to cortisol concentrations, there was a variation from 3.5 to 8.0 μ g/dl and for oestradiol-17 β the mean values detected varied from 3.5 to 14.9pg/ml.

Keywords: Cortisol, 17 β oestradiol, serum level, swine

INTRODUÇÃO

A síntese de estradiol nos folículos pré-ovulatórios está baseada na teoria de dois tipos de células foliculares, as da teca, nas quais a progesterona é convertida para andrógenos na porca (Haney & Schomberg, 1981) e na rata (Hendin et al., 1987) e as células da granulosa, nas quais os andrógenos oriundos da teca são convertidos para estradiol, na rata (Haney & Schomberg, 1981). Nesta a enzima 17 α -hidroxilase (P 450 17 α) localiza-se exclusivamente nas células da teca e nos folículos pré-ovulatórios (Hendin et al., 1987), enquanto a atividade da aromatase está localizada exclusivamente nas células da granulosa (Bogovich & Richards, 1984; Hsueh et al., 1984). No entanto, Bogovich & Richards (1984) comentaram que a enzima 17-cetosteróide-redutase converte estrona para estradiol e se encontra presente nas células da teca e da granulosa.

O aumento da concentração plasmática de estrógeno coincide com a diminuição da progesterona (Guthrie et al., 1972). Estes autores demonstraram, ainda, que três dias antes do estro, quando a progesterona plasmática está menor do que 1 ng/ml, o estrógeno está em torno de 30pg/ml. O nível mais alto foi obtido dois dias antes do estro, e no dia zero (estro), cujos valores alcançaram 30,7pg/ml, sendo idênticos aos das porcas não cobertas. Guthrie et al. (1972) comparando os níveis estrogênicos em marrãs gestantes com aquelas não gestantes, demonstraram não existir diferenças nas concentrações de estrógenos nos primeiros 16 dias pós-estro, embora níveis elevados no dia 18 e entre 15 e 20 (McDonald & Pineda, 1989), indiquem retorno ao estro em marrãs não cobertas, enquanto os níveis permanecem estáveis nas marrãs gestantes.

Vicente et al. (1990a) obtiveram concentrações de 11,24pg/ml de estradiol no plasma sangüíneo de porcas, nos primeiros dias pós-estro. Esses valores não mudaram até o 57º dia de gestação. Almond & Dial (1990) encontraram valores que variaram entre 10 e 19pg/ml para o 17 β -estradiol, em porcas durante o anestro.

Flowers et al. (1991) demonstraram que concentrações séricas de 17- β estradiol, a partir do sangue colhido da veia útero-ovárica e jugular, são diferentes. Esclareceram que 17- β estradiol, durante o ciclo estral, exibe aumento das concentrações somente a partir do 14º dia do ciclo, quando o sangue é proveniente da jugular, chegando a 30pg/ml no dia 16º, enquanto que a partir do sangue da veia útero-ovárica inicia elevação de suas taxas a partir do 11º dia do ciclo estral, alcançando valores próximos de 125pg/ml no dia 16 do ciclo.

Com relação aos glucocorticóides, especificamente o cortisol, poder-se-ia dizer que as taxas foram bem estabelecidas em espécies como a ovina e a caprina, mas em animais politócicos é maior a dificuldade em se definir o papel individual dos fetos nesse processo (Thorbur & Challis, 1979). Estudos nesse sentido foram efetuados procurando observar que a hipofisectomia em todos os fetos, durante a gestação, resulta em prolongamento desta fase além dos 120 dias em porcas, levando diminuição dos níveis plasmáticos de cortisol fetal em relação aos conceitos normais (Stryker & Dziuk, 1975; Coggins et al., 1977). Também foi verificado que os corticóides fetais se elevaram no plasma fetal e materno do suíno por ocasião do parto (Ash & Heap, 1975), mas durante o ciclo estral em porcas o comportamento dos níveis séricos de cortisol não foram estabelecidos.

Vicente et al. (1990b) verificaram que o cortisol sérico, de porcas gestantes, medido a partir do 57º dia de gestação, exibe valores médios crescentes, com taxas iniciais de 1,50 μ g/dl até atingir 5,93 μ g/dl no dia do parto.

Informações acerca dos níveis plasmáticos de corticosteróides dão conta que o manuseio dos animais domésticos é um dos muitos fatores que podem afetar a concentração plasmática desse hormônio (Dantzer et al., 1983). Assim, alteração do cortisol sérico nos suínos é indicador significativo de estresse (Dantzer & Mormede, 1981; Stott, 1981). A introdução de cânula intravenosa para colheita de sangue (Bate & Hacker, 1985), contenção com cordas (Fraser & Fox, 1983; Becker et al., 1985) e a estabulação (Becker et al., 1985) são fortes precursores de estresse. No entanto, o rápido retorno do cortisol sérico para níveis basais, após retirada a causa, é indicativo de que a meia vida do cortisol é de 80 a 110 minutos (Goldfien, 1982).

O objetivo do presente trabalho foi o de verificar os níveis séricos hormonais de cortisol e 17- β estradiol durante o período de estro, diestro e ovulação em marrãs na espécie suína.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 21 fêmeas da espécie suína, mestiças (Landrace x Large White), escolhidas aleatoriamente dentre um grupo de 47 marrãs, pesando entre 110 e 120 Kg de peso corpóreo e idade entre seis e sete meses, pertencentes ao plantel da empresa suinícola Humus Agrícola S.A., em outubro e novembro de 1990, destinadas à observação dos perfis hormonais do cortisol e 17- β estradiol, durante o decorrer do ciclo estral.

As marrãs foram mantidas sob condições de manejo da propriedade, que constou de fornecimento de ração balanceada duas vezes ao dia, sal e pré-mistura vitamínica e mineral, e água à vontade. As marrãs consideradas clinicamente saudáveis, após exame hematimétrico de rotina foram escolhidas aleatoriamente e agrupadas em instalação coletiva, tendo manifestado sintomas de estro em pelo menos uma oportunidade. A partir da caracterização clínica do estro, com o auxílio do reprodutor especialmente treinado para tal finalidade através de rufiação duas vezes por dia, e utilização da colpocitologia esfoliativa, iniciou-se a fase de colheita de sangue propriamente dita. Durante dois períodos de estro consecutivos, nenhuma das marrãs foi inseminada natural ou artificialmente, perfazendo em média 23 dias de observação. As colheitas de sangue foram efetuadas sempre no mesmo intervalo, entre oito e dez horas. Cada animal foi submetido a 14 punções venosas, distribuídas nos dias zero, dois, quatro, seis, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 22 e 23 do ciclo estral. Considerando-se o dia zero como o primeiro dia da fase estral, e o 23º dia como o primeiro do estro subsequente.

As colheitas de sangue foram realizadas após venopunção da cava cranial, com os animais em posição quadrupedal, contidos mediante o emprego de aziar utilizando-se, para tanto, seringas de 20ml, munidas de agulhas hipodérmicas de 100 x 10mm. Colhiam-se aproximadamente de 20ml por amostra, imediatamente transferido para tubo de vidro esterilizado e devidamente identificado e mantido em estante adequada. O material foi transportado para o Laboratório de Patologia Clínica da FCAVJ-UNESP onde, após separação do coágulo sangüíneo, centrifugava-se o soro a 1.600 (g) por cinco minutos. Ato contínuo, o total do

sobrenadante foi transferido para quatro frascos de vidro esterilizados, devidamente identificados e com volume similar, estocados a -18°C e descongelados à temperatura ambiente, no momento de se efetuarem as análises.

Os ensaios para dosagens hormonais foram feitos no Laboratório do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, utilizando-se a técnica de radioimunoensaio (RIE), em fase sólida. Para isso, foram utilizados conjuntos de reagentes comerciais*, desenvolvidos para avaliação quantitativa dos hormônios cortisol e 17- β estradiol, sem qualquer tipo de extração química e processo de purificação, valendo-se do I^{125} como elemento radiativo traçador.

As amostras de soro foram descongeladas juntamente com o reagente específico para cada hormônio, até atingirem a temperatura ambiente, agitando-se os frascos com amostras de soro antes do uso. Os procedimentos empregados nas dosagens foram os especificados pelo fabricante dos conjuntos de reagentes comerciais.

As contagens de radioatividade foram obtidas pela utilização de contador gama automático, de poço, modelo "Packard", calibrado automaticamente para I^{125} .

Os resultados foram fornecidos pelo emprego do programa específico de computador com impressora.

As características de desempenho dos ensaios foram realizadas verificando-se: 1- porcentagem de ligação máxima (% B0); 2- porcentagem de ligações não específicas (% L.N.E.); 3- porcentagem dos coeficientes de variação intra-ensaios para valores baixos (% C.V.1) e para valores altos (% C.V.2); e 4- nível de sensibilidade do teste, que foi estimado a partir da média e do desvio padrão das contagens de dois pares de tubos do calibrador de máxima porcentagem de ligação, calibrador zero, sendo a sensibilidade definida como a menor concentração aparente do hormônio a dois desvios padrões da média.

Para estudar a heterogeneidade de variâncias de cada hormônio realizou-se o teste de Bartlett, (Steel & Torrie, 1960), tendo como repetição os animais, ao nível de 5% de probabilidade. Para estudar o comportamento dos hormônios ao longo do ciclo estral, utilizou-se análise de regressão polinomial com valores transformados em logaritmo de $x+1$.

* Coat-A-Count^R - Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA, USA.

Os testes estatísticos não paramétricos de Wilcoxon, em nível de 5% de probabilidade, foi realizado para analisar, comparativamente, os valores séricos médios obtidos de cada perfil hormonal para cada dia de observação.

RESULTADOS

As análises séricas do 17 - β estradiol, realizadas nas amostras sangüíneas de 21 fêmeas suínas ao longo do ciclo estral, são descritas em valores médios que variaram de 3,5 a 14,9pg/ml (Fig. 1). Os maiores valores foram verificados no primeiro e segundo dia, quando então declinaram rapidamente para 3,5pg/ml até o 18º dia e a partir daí aumentaram gradativamente até o 23º dia do ciclo estral.

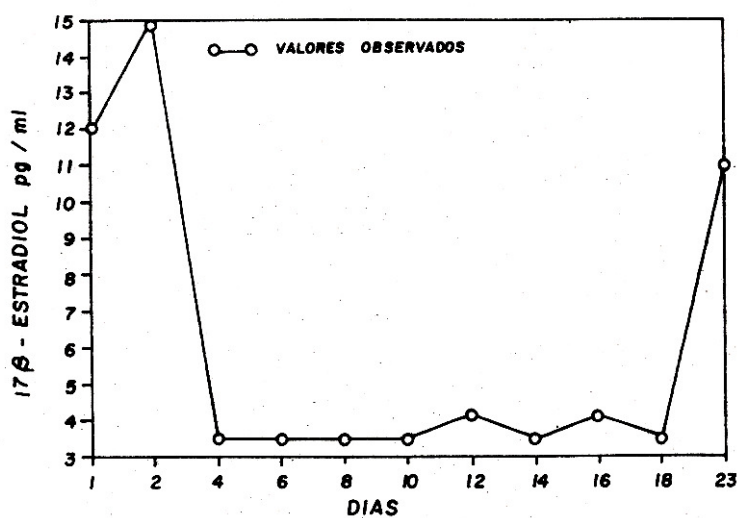


Figura 1. Valores médios observados da concentração de 17 - β estradiol no soro sangüíneo, durante o ciclo estral em 21 fêmeas suínas.

As análises séricas do cortisol, realizadas nas amostras colhidas de 21 marrãs, ao longo do ciclo estral, são descritos em valores médios que variaram de 3,5 a 8,0 $\mu\text{g/dl}$ (Fig. 2). No primeiro dia do estro os níveis de cortisol séricos estavam em 4,5 $\mu\text{g/dl}$, declinando rapidamente para 3,5 $\mu\text{g/dl}$ no segundo dia, com oscilações a partir daí entre 3,9 e 4,4 $\mu\text{g/dl}$ até o 18º dia, quando então aumentaram rapidamente para 8,0 $\mu\text{g/dl}$ no 23º dia do ciclo estral, coincidindo com o estro subsequente. Para efeito de comparação, na mesma figura encontram-se representados os valores estimados referentes à equação de regressão polinomial de $x+1$ (Teste de Bartlett).

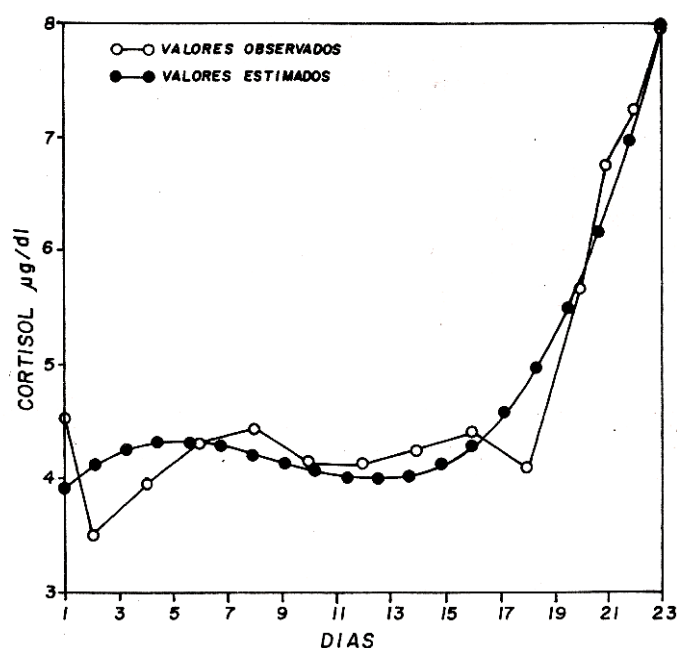


Figura 2. Valores médios observados e estimados (equação de regressão polinomial), referentes à concentração de cortisol no soro sanguíneo, durante o ciclo estral em 21 fêmeas suínas.

O teste de Bartlett revelou que há significância em nível de 5% de probabilidade, o que permitiu transformar esses dados em logaritmo de $x+1$ para fins de análise de regressão polinomial. Assim, as representações gráficas são apresentadas em valores estimados na Fig. 2, para o cortisol.

No decorrer dos períodos de observação, comparou-se dia a dia, após utilização do teste de Wilcoxon a nível de 5% de probabilidade, a variação das concentrações hormonais, evidenciando, desta forma, onde existiu ou não diferença significativa, dentro de cada perfil hormonal. Com o intuito de propiciar melhor interpretação, são apresentados, na sequência, estes resultados abrangendo o hormônio cortisol (Tab. 1).

Tabela 1. Níveis de significância entre dias, ao longo do ciclo estral, relativos aos valores séricos de cortisol em 21 fêmeas suínas, após aplicação do teste de Wilcoxon.

	Cortisol μ /dl												
d	1°	2°	4°	6°	8°	10°	12°	14°	16°	18°	20°	21°	22°
2°	*												
4°	*	NS											
6°	NS	NS	NS										
8°	NS	*	NS	NS									
10°	NS	NS	NS	NS	NS								
12°	*	NS	NS	NS	NS	NS							
14°	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS						
16°	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS					
18°	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS				
20°	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
21°	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
22°	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
23°	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

d = dias do ciclo estral

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

NS = não significativo ao nível de 5% de probabilidade

DISCUSSÃO

Os valores de 17β (Fig. 1) variaram de 3,5 a 14,9pg/ml. Os valores mínimos verificaram-se do quarto ao 18° dia, com pequenas oscilações no 12° e 16° dias do ciclo. Ele diverge do que foi descrito por Almond & Dial (1990), que obtiveram 9,8pg/ml e de 10 a 19pg/ml como valor mínimo. Os valores máximos obtidos coincidem com a fase folicular (primeiro, segundo e 23° dias). À semelhança do que foi mostrado pelos autores obteve-se 14,9pg/ml. Esses números estão aquém daqueles observados por Guthrie et al. (1972) e Flowers et al. (1991), que descreveram 30,7 e 30,0pg/ml, na mesma fase. Não obstante, Vicente et al. (1990a) informaram que as concentrações séricas de estradiol nos primeiros dias pós-estro estão em torno de 11,24pg/ml, não se alterando até o 57°

dia de gestação. Vale lembrar, que neste caso as porcas estavam gestantes e nessa fase os fetos são responsáveis por substancial síntese de estrógenos convertidos de andrógenos e progesterona, os quais são utilizados como substrato para produção de estrona e estradiol.

Ao se avaliar o comportamento do perfil hormonal, obtido pela análise da concentração plasmática do cortisol, pode-se observar, ao longo do ciclo estral, pequena variação no início. Todavia, ao redor do 18º dia, verifica-se aumento considerável, até o 23º dia (Fig. 2). Esses números foram significativos conforme se verifica na Tabela 1. Características relacionadas às taxas séricas de glucocorticóides, especificamente cortisol, foram bem estabelecidas, principalmente nas espécies ovina e caprina (Thorbur & Challis, 1979), porém quase sempre utilizando a gestação e fetos como referenciais. Os valores obtidos durante o ciclo estral em marrãs oscilaram entre 3,5 e 8,0µg/dl, no segundo e no 23º dia, respectivamente. Os resultados observados mostram que os níveis séricos de cortisol, durante o estro estão mais elevados do que os observados por Vicente et al. (1990b), que encontram 5,93µg/dl em porcas gestantes. Este fato talvez possa ser explicado pela presença de número variável de leitões que, como se sabe, participa no desencadeamento do parto, promovendo, via cortisol, estímulo do sistema enzimático placentário, responsável, em grande parte, pela inversão dos níveis plasmáticos progesterona/estrógenos. Isto mostra que os níveis de progesterona, do ciclo estral e do início da gestação, são diferentes, menores nos animais gestantes. O estro, pelas suas características peculiares, funciona como fator estressor significativo em relação a outras fases. Acrescente-se a este aspecto o manuseio, que como se acredita, é um dos muitos fatores que podem afetar a concentração plasmática desse hormônio (Dantzer et al., 1983). Vários autores admitem, ainda, que alterações no cortisol sérico de suínos é indicador significativo de estresse, cujos motivos podem ser distintos, como introdução de cânula intravenosa, contenção com cordas e estabulação (Dantzer & Mormede, 1981; Stott, 1981; Frazer & Fox, 1983; Bate & Hacker, 1985; Becker et al., 1985).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que: o perfil hormonal do cortisol, durante o ciclo estral, em marrãs, exibiu valores mais elevados durante a fase folicular, comparativamente à fase lútea do ciclo; o perfil hormonal do 17 β - estradiol durante o ciclo estral, em marrãs, evidenciou valores elevados no primeiro, segundo e 18º dia, coincidindo com a fase folicular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMOND, G.W., DIAL, G.D. Steroid hormone and luteinizing hormone concentrations in the anestrous sow. *Can. J. Vet. Res.*, v.64, p.209-214, 1990.
- ASH, R.W., HEAP, R.B. Oestrogen, progesterone and corticosteroid concentrations in peripheral plasma of sows during pregnancy, parturition, lactation and after weaning. *J. Endocrinol.*, v.64, p.141-154, 1975.
- BATE, L.A., HACKER, R.R. Effect of cannulation and environmental temperature on the concentrations of serum cortisol in pregnant sows. *Can. J. Anim. Sci.*, v.65, p.399-404, 1985.
- BECKER, B.A., FORD, J.J., CHRISTENSON, R.K., et al. Cortisol response of gilts in tether stalls. *J. Anim. Sci.*, v.60, p.264-270, 1985.
- BOGOVICH, K., RICHARDS, J.S. Androgen synthesis during follicular development: Evidence that rat granulosa cell 17-ketosteroid reductase is independent of hormonal regulation. *Biol. Reprod.*, v.31, p.122-131, 1984.
- COGGINS, E.G., VAN HORN, D., FIRST, N.L. Influence of prostaglandin F₂ α , dexamethasone, progesterone and induced corpora lutea on porcine parturition. *J. Anim. Sci.*, v.46, p.754-762, 1977.
- DANTZER, R., MORMÈDE, P. Can physiological criteria be used to assess welfare in pigs? In: SYBESMA, W. (Ed.) *The welfare of pigs*. Sybesma. London: Martinus Nijhoff, 1981. p. 53-73.
- DANTZER, R., MORMÈDE, P., BLUTHE, R.M., et al. The effect of different housing conditions on behavioural and adrenocortical reactions in veal calves. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.23, p.501-508, 1983.
- FLOWERS, B., CANTLEY, T.C., MARTIN, M.J., et al. Episodic secretion of gonadotrophins and ovarian steroids in jugular and utero-ovarian vein plasma during the follicular phase of the oestrous cycle in gilts. *J. Reprod. Fertil.*, v.91, p.101-112, 1991.
- FRAZER, A.F., FOX, M.W. The effects of ethostasis on farm animal behavior: A theoretical overview. *Int. J. Stud. Anim. Probl.*, v.4, p.59-70, 1983.
- GOLDFIEN, A. *Basic and clinical pharmacology*. Los Altos: L.M.P., 1982. 402p.
- GUTHRIE, H.D., HENRICKS, D.M., HANDLIN, D.L. Plasma estrogen, progesterone and luteinizing hormone prior to estrus and during early pregnancy in pigs. *Endocrinology*, v.91, p.675-679, 1972.
- HANEY, A.F., SCHOMBERG, D.W. Estrogen and progesterone production by developing porcine follicles in vitro: Evidence for estrogen formation by theca. *Endocrinology*, v.109, p.971-977, 1981.

- HENDIN, L., RODGERS, R.J., SIMPSON, E.R., et al. Changes in content of cytochrome P450 17 α , P450 Scc, and 3-Hidroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in developing rat ovarian follicles and corpora lutea: Correlation to theca cell steroidogenesis. *Biol. Reprod.*, v.37, p.211-223, 1987.
- HSUEH, A.J.W., ADASHI, E.Y., JONES, P.B.C., et al. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrinol. Rev.*, v.5, p.76-127, 1984.
- McDONALD, L.E., PINEDA, M.H. *Veterinary endocrinology and reproduction* 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. 571 p.
- STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. *Principles and procedures of statistics*. 1ed. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc., 1960. 481p.
- STOTT, G.H. What is animal stress and how is it measured? *J. Anim. Sci.*, v.52, p.150-153, 1981.
- STRYKER, J.L., DZIUK, P.J. Effects of fetal decapitation on fetal development, parturition and lactation in pigs. *J. Anim. Sci.*, v.40, p.282-287, 1975.
- THORBURN, G.D., CHALLIS, J.R.G. Endocrine control of parturition. *Physiol. Rev.*, v.59, p.863-918, 1979.
- VICENTE, W.R.R., TONIOLLO, G.H., OLIVEIRA, C.A., et al. Avaliação da concentração sérica de 17 β - estradiol em fêmeas suínas durante a gestação. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.14, p.201-214, 1990a.
- VICENTE, W.R.R., TONIOLLO, G.H., OLIVEIRA, C.A., et al. Avaliação da concentração sérica de cortisol em fêmeas suínas durante a segunda metade da gestação. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.14, p.235-242, 1990b.