

CONCENTRAÇÃO DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA NO FLUIDO FOLICULAR SUÍNO OBTIDO A PARTIR DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE DIFERENTES DIÂMETROS

**Guilherme OBERLENDER¹; Aryenne K. OLIVEIRA²; Luis D. S. MURGAS²; Márcio G.
ZANGERONIMO²**

RESUMO

Os hormônios esteróides, principalmente o estrógeno (E) e progesterona (P), estão presentes no fluido folicular (FF) e seus níveis variam com a fase de desenvolvimento do folículo. Objetivando determinar a relação entre a concentração de E e P livre no FF de folículos de vários tamanhos, ovários de 500 fêmeas suínas foram coletados imediatamente após o abate. Os folículos localizados na superfície de cada ovário foram classificados em pequenos (FPs) e grandes (FGs) e o FF obtido. Do *pool* de FF foi determinada a concentração de E, P e a relação E:P. A concentração de E e P foi maior ($P < 0,05$) nos FGs ($13,19 \pm 5,43$ e $350,18 \pm 246,37$ ng/mL) que nos FPs ($1,37 \pm 0,81$ e $130,96 \pm 43,21$ ng/mL). A relação E:P foi de 1,17 nos FPs e 4,95 nos FGs. Durante o desenvolvimento folicular há um aumento de E e P que correspondem ao início da maturação e crescimento dos folículos.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento dos folículos ovarianos durante o ciclo estral em mamíferos envolve um coordenado processo de replicação e diferenciação celular. Esse processo aumenta o número de células da granulosa que rodeiam o ovócito, ocorre a formação e expansão do antro folicular e a formação do FF. Ademais, o

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Muzambinho. Muzambinho/MG - E-mail: guilherme.oberlender@muz.ifsuldeminas.edu.br

² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Lavras/MG. E-mail: lsmurgas@dmv.ufla.br

crescimento folicular é muito importante, pois apenas folículos grandes (maiores que 6,0 mm de diâmetro) podem ovular (KNOX, 2005).

Nesse contexto, o conhecimento das concentrações dos hormônios reprodutivos é importante no entendimento da dinâmica de síntese e secreção pela glândula endócrina e outros tecidos. Ademais, auxilia na determinação das mudanças hormonais que ocorrem no ciclo estral da fêmea (KNOX et al., 2003).

O FF suíno é composto por um transudato plasmático e secreções dos folículos ovarianos, que refletem a elevada atividade das células foliculares (GUTHRIE; COOPER, 1996). Os hormônios esteróides, principalmente o E e a P estão presentes no FF e seus níveis variam com a fase de desenvolvimento do folículo.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a concentração fisiológica e a relação entre E e P presentes no FF de ovários de fêmeas suínas pré-púberes, coletado a partir de folículos antrais de diferentes tamanhos. Ademais, objetivou-se também determinar o tamanho dos ovários e o número total de folículos de duas diferentes classes de diâmetros na superfície dos mesmos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido após aprovação institucional, sendo todos os protocolos experimentais realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição, sob o protocolo número 009/10.

Para a realização do estudo, foram utilizados 1.000 ovários de fêmeas pré-púberes (cinco a seis meses de idade e peso médio de 100 kg) Landrace × Large White (linhagem híbrida comercial – Genética AGROCERES), abatidas em matadouro/frigorífico comercial. Os ovários isolados foram coletados imediatamente após o abate. Em seguida, os mesmos foram transportados até o laboratório, em solução de NaCl 0,9% (w/v) contendo 0,1% de sulfato de kanamicina à temperatura de 38°C. Posteriormente, foram lavados três vezes em solução de cetrimida 0,04% (v:v), seguido de mais três vezes em solução salina, ambas a 38°C (COY et al., 2008; OBERLENDER et al., 2013). Após, realizou-se o processo de obtenção do FF.

Os folículos ovarianos localizados na superfície de cada ovário foram classificados em folículos pequenos (FPs), sendo aqueles com 2,0 a 5,0 mm de diâmetro e folículos grandes (FGs), os que possuíam de 6,0 a 10,0 mm de diâmetro

(KNOX 2005; ITO et al., 2008; OBERLENDER et al., 2013). Com auxílio de seringa e agulha o FF foi obtido a partir da aspiração dos folículos ovarianos. Uma vez aspirado, o *pool* de FF obtido em cada uma das categorias foi centrifugado, filtrado e o sobrenadante obtido e armazenado a – 20°C até a realização das análises.

Para a determinação da concentração de E e P, as amostras de FF foram primeiramente diluídas (1:1.000) em Tampão Fosfato Salino (PBS) e em seguida determinada a concentração dos hormônios por teste imunoenzimático – ELISA, de acordo com protocolo do fabricante. A sensibilidade mínima foi de 0,0066 ng/mL e o coeficiente de variação (CV) intra e inter-ensaio foi <10% e <12%, respectivamente.

Na avaliação da morfometria ovariana foi mensurado o diâmetro maior e menor de cada ovário utilizando um paquímetro graduado em mm. A contagem dos FPs e FGs presentes na superfície ovariana (aproximadamente 25% da população de folículos ovarianos) foi realizada de acordo com Rhind e Schanbacher (1991).

Para a aquisição das 500 fêmeas (n = 1.000 ovários) 10 repetições foram realizadas (dias de coleta), e em cada uma, ovários de 50 fêmeas foram obtidos. Para avaliar a concentração de E e P livres no FF, um delineamento em blocos casualizados com dois tratamentos (FF de FPs e FGs) foi utilizado. Os blocos consistiram nos dias de coleta. Um total de 10 repetições foi realizado e cada unidade experimental foi representada por 50 fêmeas. Para a avaliação da morfometria ovariana (diâmetro/comprimento maior e menor) e o número de folículos na superfície de cada ovário, um total de 100 ovários foram utilizados de 50 fêmeas. Foram obtidos ovários de cinco fêmeas em cada um dos 10 dias de coleta.

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (DP). Foi realizado teste de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*) e os dados de concentrações hormonais foram comparados pelo teste t de *Student*. Para a avaliação do número de FPs e FGs, foi utilizado o teste não-paramétrico *Mann-Whitney*, pois os dados não apresentaram distribuição normal. Um nível de significância de 5% foi considerado para indicar diferença estatística. Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS for Windows versão 17.0 (SPSS, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da morfometria ovariana, a média do diâmetro/comprimento maior e menor dos ovários foi $26,00 \pm 3,00$ e $19,00 \pm 2,00$ mm, respectivamente.

Observou-se que o número de FPs foi maior ($P < 0.01$) comparado com FGs (Tabela 1).

Tabela 1. Número (média $\pm$ DP) de FPs e FGs encontrados na superfície dos ovários de fêmeas suínas pré-púberes ($n = 100$ ovários).

Tratamento*	Número de folículos	Valor mínimo	Valor máximo
Folículos pequenos (FPs)	70.86 ± 25.76 a	13	154
Folículos grandes (FGs)	6.54 ± 5.26 b	0	26
Média geral	38.70 ± 37.19		
$P < 0,01$			

a, b Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem entre si pelo teste *Mann-Whitney* ($P < 0,01$).

A morfologia dos ovários demonstraram características de animais pré-púberes, ou seja, ovários sem a presença de corpos albicans, copos lúteos ou sinais de ovulação (BAGG et al., 2004, KNOX, 2005). Esse achado foi confirmado pelo grande número de FPs na superfície dos ovários.

Os resultados de morfometria ovariana foram similares aos obtidos por Bagg et al. (2004), que encontraram uma média de 24,1 mm de comprimento maior e 15,9 mm de comprimento menor em fêmeas pré-púberes da mesma linhagem utilizada no presente estudo. Em relação ao número de folículos, um maior número de FPs comparado com FGs é justificado, pois em fêmeas pré-púberes, FPs estão abundantemente presentes, em detrimento a FGs e estruturas luteais (KNOX, 2005).

A média do número de FPs obtidos mostraram similares aos demonstrados por Knox (2005), que observaram média de 80 FPs em ovários de fêmeas suínas. A média geral de folículos (folículos entre 2,0 e 10,0 mm) estão de acordo com os resultados descritos por Bagg et al. (2004), que também avaliaram esse dado.

A concentração de E e P foi maior ($P < 0,05$) nos FGs ($13,19 \pm 5,43$ ng/mL e $350,18 \pm 246,37$ ng/mL) que nos FPs ($1,37 \pm 0,81$ ng/mL e $130,96 \pm 43,21$ ng/mL) (Figura 1). A relação E:P foi de 1,17 nos FPs e 4,95 nos FGs.

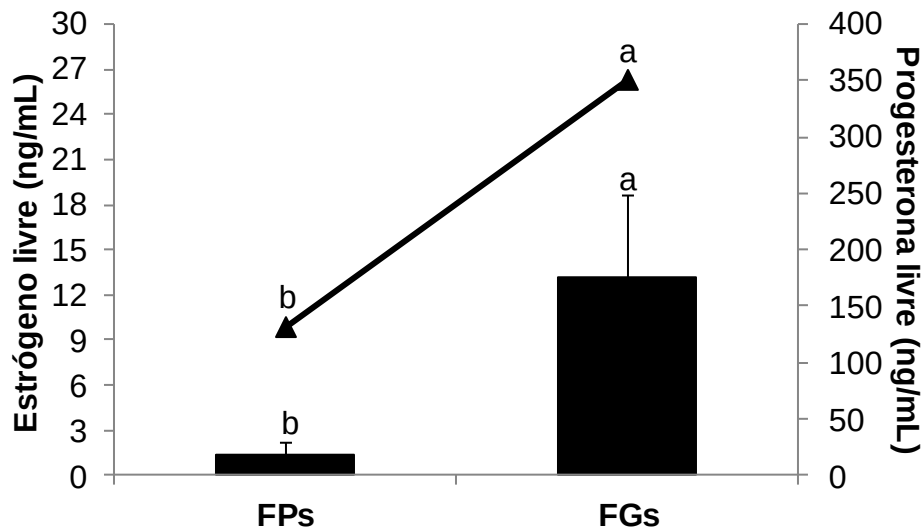


Figura 1. Concentração de estrógeno e progesterona livre no fluido folicular de folículos ovarianos pequenos (FPs, 2 a 5 mm de diâmetro) e folículos grandes (FGs, 6 a 10 mm de diâmetro) em fêmeas suínas pré-púberes (n = 500).

a, b Médias sem o sobrescrito comum diferem pelo teste t de *Student* ($P < 0,05$).

As concentrações de E e P e a relação E:P obtidas no presente estudo foram semelhantes aos resultados obtidos por Spicer et al. (2005), avaliando as concentrações dos mesmos hormônios esteróides no FF de ovários de éguas em diferentes fases de desenvolvimento.

CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento folicular há um aumento nos níveis de E e P que correspondem ao início da maturação e crescimento dos folículos ovulatórios. As concentração desses hormônios são maiores em FGs quando comparado aos FPs, sendo esses hormônios responsáveis pelos eventos do estro, ovulação e formação do corpo lúteo.

REFERÊNCIAS

BAGG, M. A. et al. Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. **Theriogenology**, Los Altos, v. 62, n. 6, p. 1003-1011, Sep. 2004.

COY, P. et al. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. **Reproduction**, Cambridge, UK, v. 135, n. 1, p. 19-27, Jan. 2008.

GUTHRIE, H. D.; COOPER, B. S. Follicular atresia, follicular fluid hormones, and circulating hormones during the midluteal phase of the estrous cycle in pigs. **Biology of Reproduction**, New York, v. 55, n. 3, p. 543-547, Sep. 1996.

ITO, M. et al. Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 106, n. 3/4, p. 421-430, Jul. 2008.

KNOX, R. V. et al. Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrus cycle in high compared to low ovulation rate gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 249-260, Jan. 2003.

KNOX, R. V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 29, n. 2, p. 385-397, Aug. 2005.

OBERLENDER, G. et al. Porcine follicular fluid concentration of free insulin-like growth factor-I collected from different diameter ovarian follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 10, p. 1269-1274, Oct. 2013.

RHIND, S. M.; SCHANBACHER, B. D. Ovarian follicle populations and ovulation rates of Finnish Landrace cross ewes in different nutritional states and associated profiles of gonadotrophins, inhibin, growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 8, p. 281-291, 1991.

SPICER, L. J. et al. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 29, n. 4, p. 573-581, Nov. 2005.

SPSS Statistics 17.0, Rel. 17.0.1. 2008, SPSS Inc., Chicago, IL.