

Resposta esteroidogênica induzida por hCG em garanhões jovens Mangalarga: testosterona e sulfato de estrona plasmáticos

hCG induced steroidogenic response in Mangalarga young stallions: plasma testosterone and estrone sulphate

Samira Barbosa LIMA¹; Aurea WISCHRAL¹; Fernando FERREIRA¹;
Ieda Therezinha do Nascimento VERRESCHI²

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Ieda Therezinha do Nascimento
Verreschi
Disciplina de Endocrinologia
Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina
Rua Pedro de Toledo, 781 – 13º andar –
Vila Clementino
04039-032 – São Paulo – SP
e-mail: samirabl@usp.br

1-Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP – SP
2-Disciplina de Endocrinologia da Escola
Paulista de Medicina da UFSP – SP

RESUMO

Avaliou-se a resposta esteroidogênica aguda da célula de Leydig em sete garanhões jovens da raça Mangalarga (2,6 a 4,5 anos), através de estimulação com gonadotrofina coriônica humana (hCG). Os animais foram tratados com 5.000 UI (hCG) Vetecor®, i.v., *in bollus*, às 8 horas. Amostras de plasma foram obtidas por venopuntura às 7 horas (basal), 4, 24, 48, 72 horas pós-estímulo (28 a 31 de agosto). Testosterona (T) e sulfato de estrona (E_1SO_4) foram dosados por radioimunoensaio (RIE) c.v. $\leq 5\%$. Os dados foram analisados pelos testes *Friedman* e *Wilcoxon Matched-Pairs Signed Ranks* ($p \leq 0,05$). A magnitude da produção hormonal após o estímulo foi calculada pela Variação Percentual ($\Delta \%$). Às 48 horas do teste, 57,1% dos animais ($n = 4$) apresentaram pico de T com um aumento de 5,7 vezes com relação ao basal. Embora em 57,1% ($n = 4$) tenha ocorrido a resposta máxima de E_1SO_4 às 4 horas, o valor máximo foi de 1,6 vez às 24 horas. A hCG pode ser empregada para estimular a resposta esteroidogênica da célula de Leydig e a dose de 5.000 UI é suficiente para estimular a esteroidogênese testicular. Em condições basais, as concentrações plasmáticas de estrógenos são superiores às dos andrógenos. Este protocolo pode ser usado para identificar problemas de origem endócrina em cavalos desta raça.

UNITERMOS: Célula de Leydig; Equinos; hCG; Testosterona.

INTRODUÇÃO

Na gônada masculina dos mamíferos, o papel da célula de Leydig é a secreção de hormônios esteróides, que ajudam a regular a função do epitélio seminífero, do eixo hipotalâmico-hipofisário, e das glândulas sexuais acessórias. A gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem sido usada para avaliar os receptores para o hormônio luteinizante (LH), em células de Leydig de equinos com a vantagem de ser mais estável que o LH equino e ambas as gonadotrofinas estimulam a esteroidogênese^{9,10}. Paradoxalmente, os testículos dos garanhões produzem grande quantidade de estrógenos^{3,19} e baixa quantidade de testosterona¹⁶. Os estrógenos circulam na forma de sulfoconjugados¹³ protegidos da metabolização e permitindo uma reativação por hidrólise tecidual⁴. Os estrógenos podem servir como biomarcadores sensíveis para predizer modificações da fertilidade em garanhões^{8,14,15}. Alguns autores sugerem que a sua determinação no sangue, juntamente com a testosterona, pode auxiliar no diagnóstico da infertilidade¹¹. A estimulação da esteroidogênese pelas células de Leydig é um parâmetro amplamente utilizado no estudo das alterações

reprodutivas ligadas à esfera hormonal em várias espécies. No presente experimento, uma única dose estimuladora de hCG foi administrada em cavalos jovens da raça Mangalarga com o objetivo de avaliar a responsividade da célula de Leydig neste grupo de animais. A resposta esteroidogênica ao hCG foi avaliada através da medida das concentrações plasmáticas de testosterona e sulfato de estrona.

MATERIAL E MÉTODO

Foram avaliados 7 garanhões Mangalarga jovens nascidos e criados na Fazenda Rio das Pedras em Jundiá, com idades de 2,6 a 4,5 anos, mantidos a pasto de *coast cross* (*Cynodon dactylon*) durante o dia e levados para a baía à noite. O teste foi realizado em 4 dias (de 28 a 31 de agosto de 1997), antes da “estação de monta”. No dia 1 iniciou-se a colheita do sangue periférico por venopuntura da jugular externa às 7 horas. Aplicou-se uma única dose de 5.000 UI de hCG-Vetecor® por via intravenosa *in bollus* às 8 horas e a seguir foram feitas colheitas sequenciais do sangue periférico às 4, 24, 48 e 72 horas pós-estímulo. Após centrifugação, o plasma foi alíquotado, identificado e congelado a -20°C até as

dosagens hormonais.

A testosterona (T) foi dosada por radioimunoensaio (RIE) convencional segundo a técnica descrita por Lox *et al.*¹² utilizando anticorpo produzido no Laboratório de Hormônios da Disciplina de Endocrinologia da UNIFESP/EPM¹⁷. O limite de detecção foi de 5 ng/dl, e o coeficiente de variação intra-ensaio (para valores baixos e elevados) foi menor que 5%, com recuperação entre 80% e 98% (média de 90%). O sulfato de estrona (E_1SO_4), dosado através de kit comercial (DSL-5400. *Diagnostic Systems Laboratories, Inc.*®), apresentou limite de detecção de 0,10 ng/ml e o coeficiente de variação intra-ensaio para os valores elevados e baixos foram menores que 5%. Os ensaios hormonais foram feitos em duplicatas e os valores foram expressos em ng/ml e convertidos para nmol/l¹⁸.

Sendo o objetivo deste trabalho a caracterização da produção hormonal pelas células de Leydig em resposta ao tratamento agudo com hCG, tomaram-se os valores hormonais basais (imediatamente antes da injeção) como controle das concentrações plasmáticas atingidas após a estimulação. Para todas as comparações feitas, o $p < 0,05$ foi considerado como indicador de diferenças significativas. O teste de *Friedman* ANOVA de duas vias foi utilizado para comparar os cinco tempos do teste (0, 4, 24, 48 e 72 horas) para os dois hormônios estudados, e as diferenças entre dois tempos foram analisadas através do teste para amostras dependentes, *Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks*. Este mesmo teste foi aplicado para verificar diferenças entre os valores basais e as respectivas respostas máximas (picos). Calculou-se a Variação Percentual ($\Delta\%$) ou incremento relativo entre os valores basais e os respectivos picos para evidenciar a magnitude da produção hormonal após o estímulo com hCG.

RESULTADOS

As concentrações de T variaram durante os tempos do teste e foram identificadas pelo teste de *Friedman*, para o grau de liberdade 4. Já para E_1SO_4 não houve diferença significativa (Tab. 1 e Fig. 1). Em 4 (57,1%) animais o pico de testosterona ocorreu às 48 horas do teste e correspondeu a um aumento de 5,7 vezes com relação ao valor basal e incremento relativo ($\Delta\%$) de 318,6%. Nos demais, a resposta máxima ocorreu às 24 horas em 2 (28,6%) e às 72 horas em 1 (14,3%) (Fig. 2).

Em 4 (57,1%) animais houve elevação significativa da produção de E_1SO_4 às 4 horas, porém o valor mediano máximo foi verificado às 24 horas do teste (Tab. 1), correspondendo a um aumento de 1,6 vez com relação ao valor basal, e um incremento relativo ($\Delta\%$) de 70,8%. Nos demais, a resposta máxima ocorreu às 24 horas em 1 (14,3%), às 72 horas em 2 (28,6%) (Fig. 2). Não foi possível verificar diferença significativa entre os tempos, mas os valores basal e de pico foram significativos (*Wilcoxon Matched-Pairs*) representados na Tab.1.

Tabela 1

Valores medianos das concentrações plasmáticas de testosterona e sulfato de estrona durante o teste de estímulo com hCG em garanhões jovens da raça mangalarga, São Paulo, 1997.



T = testosterona; E_1SO_4 = sulfato de estrona;

* pico; 0 = basal;

a, b, c = $p \leq 0,05$ - *Wilcoxon Matched-Pairs*.

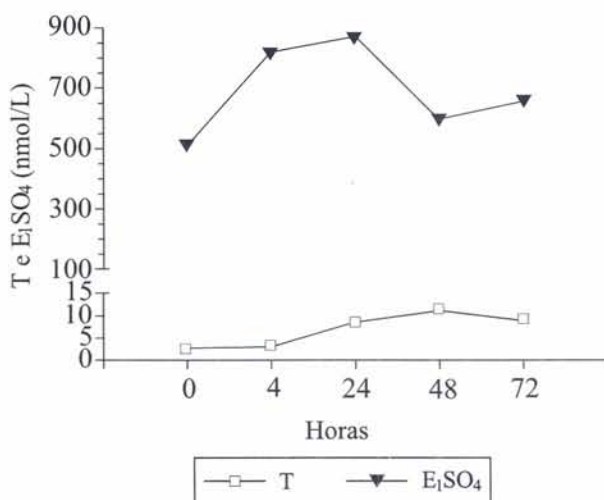


Figura 1

Concentrações plasmáticas de testosterona e sulfato de estrona durante os dias de realização do teste de estímulo com hCG em garanhões jovens Mangalarga.

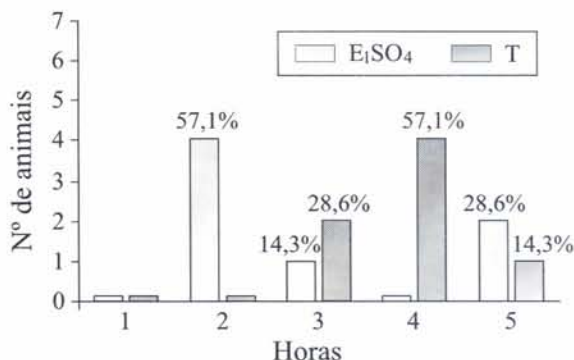


Figura 2

Distribuição percentual da ocorrência dos picos de produção de testosterona e sulfato de estrona durante o teste de estímulo com hCG em garanhões jovens Mangalarga.

DISCUSSÃO

Em potros pré-púberes, a principal modificação das células de Leydig é histofuncional passando do tipo fetal para o tipo pré-púbere, caracterizado bioquimicamente pela presença de receptores específicos para LH/hCG. A repercussão endócrina desta evolução funcional é a produção diferenciada dos esteróides sexuais. Nestas condições, ambos, andrógenos e estrógenos, são produzidos pelas células de Leydig, desempenhando funções específicas no desenvolvimento reprodutivo de garanhões. Empregou-se o teste de estímulo com hCG para caracterizar a resposta esteroidogênica da célula de Leydig de garanhões jovens e pôde-se verificar a predominância do estrógeno sulfato de estrona com relação ao andrógeno, testosterona. Fato semelhante também foi observado em animais adultos empregando o mesmo teste com o dobro da dose, ou seja, 10.000 UI de hCG^{6,14}.

O aumento relativo do andrógeno, que foi mais que três vezes superior ao do estrógeno, possivelmente refletiu a importância da produção da testosterona para a demanda reprodutiva, sendo concentrada em grande parte pelos túbulos seminíferos no próprio testículo^{1,2}. Este fato repercute na produção diária de 0,3 µg de T por minuto por um testículo, enquanto a produção do E₁SO₄ é de 5,6 µg por minuto por testículo¹⁶. Assim como observado por Zondek¹⁹; Bedrak; Samuels³ e Cox *et al.*⁷, machos da espécie equina produzem normalmente mais estrógenos do que andrógenos, os garanhões jovens estimulados com a hCG apresentaram estas mesmas características.

Os momentos de produção hormonal máxima durante a estimulação com hCG diferiram para andrógeno e estrógeno. Enquanto este último predominou nas primeiras 24 horas do teste, o andrógeno predominou após este tempo. O aspecto bifásico de produção desses hormônios já havia sido assinalado em garanhões férteis¹⁴ que também considerou as concentrações estimuladas da T

como indicadores de função da célula de Leydig. Os estrógenos têm sido relacionados à estimulação e manutenção da espermatogênese, e Claus *et al.*⁵ sugerem que o conteúdo estrogênico do ejaculado aumente a frequência da contração uterina em suínos, associado ao aumento da concentração de prostaglandina F2α na veia eferente. A concentração de estrógenos na circulação periférica em suínos poderia facilitar o transporte dos espermatozoides e influenciar o momento da onda pré-ovulatória de LH e a ovulação. Por apresentarem receptores para LH/hCG, somente as células de Leydig são capazes de responder às gonadotrofinas luteinizantes e coriônica com a produção tanto de andrógenos como de estrógenos; portanto, as concentrações plasmáticas de andrógenos e estrógenos observadas após a estimulação com hCG nestes garanhões jovens refletem a responsividade esteroidogênica desta célula.

CONCLUSÃO

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) pode ser empregada para estimular a resposta esteroidogênica da célula de Leydig e a dose de 5.000 UI é suficiente para estimular a esteroidogênese testicular. Em condições basais, as concentrações plasmáticas circulantes de estrógenos são superiores às dos andrógenos, podendo a observação da concentração destes hormônios após o teste de estímulo com hCG fornecer subsídios para o diagnóstico de infertilidade e subfertilidade de origem endócrina em equinos machos da raça Mangalarga.

AGRADECIMENTOS

Dr. Renato Campanarut Barnabe - Departamento de Reprodução Animal - VRA-FMVZ-USP. Ivonne Fianti Bianco - Laboratório de Hormônios - Disciplina de Endocrinologia / UNIFESP-EPM. Apoio: CNPq.

SUMMARY

Leydig cell acute steroidogenic response, in seven young Mangalarga stallions (2.6 – 4.5 ys), was evaluated through human Corionic Gonadotrophin (hCG) stimulation. The animals were treated with 5,000 UI (hCG) Vetecor®, i.v., *in bolus*, at 8 a.m. Plasma samples were collected by venopuncture at 7 a.m. (basal), 4, 24, 48, and 72 hours after stimulation (from 28 to August 31). Testosterone (T) and estrone sulphate (E₁SO₄) was measured by radioimmunoassay (RIA), intra-assay variation £ 5%. Data were analysed by Friedman and Wilcoxon Matched-Pairs tests (p £ 0.05). The magnitude of hormonal production after stimulation was analysed by Percentual Variation (D%). At 48 hours, 57.1% of the animals (n = 4) had maximal response (T) with values 5.7 greater than basal. And although 57.1% of them (n = 4) had maximal response (E₁SO₄) at 4 hours, the maximal value was 1.6 greater than basal at 24 hours. The hCG may be employed to stimulate the Leydig cell steroidogenic response and 5,000 UI is enough to stimulate testicular steroidogenesis. The estrogen basal concentrations are higher than testosterone basal concentrations. This protocol could be applied to identify fertility problems of endocrine origin in horses of this breed.

UNITERMS: Leydig cell; Equine; hCG; Testosterone.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AMANN, R.P.; GANJAM, V.K. Effects of hemicastration or hCG-treatment on steroids in testicular vein and jugular vein blood of stallions. **Journal of Andrology**, v.2, n.1, p.132-9, 1981.
- 2- AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v.57, p.380-403, 1983. Supplement 2.
- 3- BEDRAK, E.; SAMUELS, L.T. Steroid biosynthesis by the equine testis. **Endocrinology**, v.87, n.6, p.1186-95, 1969.
- 4- BOUHAMIDI, R.; GAILLARD, J.L.; SILBERZAHN, P.; MARTIN, B. Binding of estrogens-3-sulfates to stallion plasma and equine serum albumin. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.42, n.3/4, p.345-9, 1992.
- 5- CLAUS, R.; HONG-VU, C.; ELLENDORF, F.; MEYER, H.D.; SCHOPPER, D.; WEILER, U. Seminal oestrogens in the boar: origin and functions in the sow. **Journal of Steroids and Biochemistry**, v.27, n.1-3, p.331-5, 1987.
- 6- COX, J.E.; REDHEAD, P.H. Prolonged effect of a single injection of human chorionic gonadotropin on plasma testosterone and oestrone sulphate concentrations in mature stallions. **Equine Veterinary Journal**, v.22, n.1, p.36-8, 1990.
- 7- COX, J.E.; REDHEAD, P.H.; DAWSON, F.E. Comparison of the measurement of plasma testosterone and plasma oestrogens for the diagnosis of cryptorchidism in the horse. **Equine Veterinary Journals**, v.18, n.3, p.179-82, 1986.
- 8- DOUGLAS, R.H.; UMPHENOUR, N. Endocrine abnormalities and hormonal therapy. Stallions management. **Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v.8, n.1, p.237-51, 1992.
- 9- EVANS, J.W.; ROSER, J.F.; MIKUCKIS, G.M. Comparison of the interaction of equine LH and human chorionic gonadotropin to equine testicular receptors. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.113-21, 1982. Supplement 32.
- 10- HALL, P.F. Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In: KNOBIL E.; NEIL J.D. **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York : Raven Press, 1994. p.1335-62.
- 11- INOUE, J.; CERBITO, W.A.; OGURI, N.; MATSUZAWA, T.; SATO, K. Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions. **International Journal of Andrology**, v.16, n.2, p.155-8, 1993.
- 12- LOX, C.D.; CHRISTIAN, C.D.; HEINE, M.W. A simple radioimmunoassay for testosterone. **American of Obstetrics and Gynecology**, v.118, n.1, p.114-8, 1974.
- 13- MUYAN, M.; ROSER, J.F.; DYBDAL, N.; BALWIN, D.M. Modulation of gonadotropin-releasing hormone -stimulated luteinizing hormone release in culture male equine anterior pituitary cells by gonadal steroids. **Biology of Reproduction**, v.29, n.2, p.340-5, 1993.
- 14- ROSER, J.F. Endocrine profiles in fertile, subfertile, and infertile stallions: testicular response to human chorionic gonadotropin in infertile stallions. In: SHARP, D.C.; BAZER, F.W. (ed.) **Equine reproduction VI**. Madison : Society for the Study of Reproduction, 1995. p.661-9. (Biology of Reproduction, Monograph series 1).
- 15- ROSER, J.F.; HUGHES, J.P. Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations, and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions. **Journal of Andrology**, v.13, n.3, p.214-23, 1992.
- 16- SETCHELL, B.P.; COX, J.E. Secretion of conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.123-7, 1982. Supplement 32.
- 17- VIEIRA, J.G.H.; RUSSO, E.M.K.; VERRESCHI, I.T.N.; MACIEL, R.M.R.; LIMA, M.C. Caracterização de antisoro antitesterona para uso em radioimunoensaio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 12., Salvador, 1976. **Resumos**. p.186.
- 18- YOUNG, D.S. Système international (SI) units for plasma, serum, or blood concentrations. **Annals of Internal Medicine**, v.106, n.1, p.114-29, 1987.
- 19- ZONDEK, B. Max excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion. **Nature**, v.133, p.209-10, 1934.

Recebido para publicação: 21/05/1998
Aprovado para publicação: 03/09/1999