

SUBSTÂNCIAS ESTROGÊNICAS NOS OVARIOS DAS CROTALIDEAS

POR

JOSÉ R. VALLE & LUIZ A. R. VALLE

A descoberta e a ulterior aplicação da prova de Allen e Doisy permitiram verificar a ampla distribuição das substâncias estrogênicas na natureza, tanto no reino animal, como nos reinos vegetal e mineral. Nos trabalhos, entre outros de Martins (1), Doisy (2), Deulofeu (3) e Zondek (4), vêm referidos os dados mais importantes da literatura. Os estrógenos existem nos vertebrados e nos invertebrados, nos vegetais e até nos bitumes, mas os ovários são a sua fonte natural, quando se considera aquelas substâncias como as responsáveis pelo aparecimento e pela manutenção dos caracteres sexuais secundários femininos.

Corner (5) estudou o local de formação no organismo das substâncias estrogênicas; nas fêmeas não prenhes elas seriam elaboradas provavelmente pelas células da teca interna dos folículos de qualquer tamanho.

Fraenkel e Martins (6) foram os primeiros a verificar a atividade estrogênica do líquido folicular dos ovários de serpentes ovovivíparas, concluindo pela presença de 2 mil unidades camondongas por litro de material. Trabalhamos também com ovários de Crotalídeas (7) e encontramos, em experiências preliminares, 2900 unidades estrona por kg de folículos e óvulos de diferentes dimensões e previamente desembaraçados dos demais tecidos.

Neste trabalho procuramos determinar a concentração de substâncias estrogênicas no ovário total de cascaveis e jararacas depois da separação, segundo a técnica de Gallagher *et al.* (8), das substâncias androgênicas acaso presentes.

a) *Material*

Foram autopsiadas 245 cascaveis e jararacas (*Crotalus terrificus terrificus* e *Bothrops*, sp.), fêmeas, mortas no serpentário deste Instituto e os ovários, depois de triturados, colocados em álcool a 96%. Este total compreende 129 cascaveis, com peso corporal médio de 446 g, e 116 jararacas, com peso corporal médio de 279 gramas. O peso total dos ovários coletados foi de 331.3 g, donde o valor médio de 1.3 g por serpente.

b) *Extração*

Retirados os ovários, independentemente do desenvolvimento ovular, eles foram pesados, triturados e deixados à temperatura do laboratório em 4 vezes o seu peso de álcool a 96%. Após a coleta glandular o álcool foi filtrado e o resíduo reextraído em aparelho de refluxo com álcool quente durante 4 horas. O bagaço, pesando 34 g, foi desprezado e as porções alcoólicas, de cor amareló-esverdeada e de cheiro característico, foram reunidas, filtradas novamente e evaporadas. O resíduo xaroposo obtido foi tratado, em funil de separação, com 4 x 50 cm³ de éter isento de peróxidos e a fração insolúvel desprezada. A solução etérea evaporada forneceu 10 cm³ de óleo vermelho carregado, redissolvidos em 70 cm³ de éter e lavados com solução saturada de bicarbonato de sódio. Separada a fração etérea límpida e avermelhada, ela foi tratada com 5 x 40 cm³ de NaOH a 10%. A porção etérea foi depois acidificada com ácido sulfúrico a 10%, lavada com água destilada e evaporada. Obteve-se, assim cerca de 1 cm³ de resíduo oleoso. A porção alcalina separada foi por sua vez também acidificada e extraída com éter e este evaporado para a obtenção das substâncias estrogênicas, agora separadas dos andrógenos acaso existentes no extrato.

c) *Ensaio biológico*

O resíduo da fração alcali-insolúvel, devendo conter os andrógenos, foi diluído em óleo de amendoim até 3.3 cm³ e ensaiado num galo capão e em ratos castrados injetados com colchicina, conforme a técnica descrita quando estudamos as substâncias androgênicas nas gônadas das Crotalídeas (9). Os resultados foram negativos na dose total de 1 cm³, correspondente a 100 g de ovários frescos.

Para verificação do teor estrogênico na fração alcali-solúvel seguimos a técnica de Bülbring e Burn (10) de pesada dos cornos uterinos de ratas castradas infantis.

Empregamos 20 ratas de um mês de idade, castradas e divididas em 5 lotes de 4 animais. O tratamento foi iniciado 48 horas depois da castração, uma injeção diária subcutânea de 0.25 cm³ durante 4 dias, no total de 1 cm³ da solução oleosa a ensaiar. Dois lotes serviram de testemunhas, um não tratado e outro injetado com óleo puro; outro lote foi injetado com solução conhecida de estrona cristalizada. Nos lotes tratados com o extrato a ensaiar as soluções correspondiam a 5 e 10 gramas de ovários frescos por cm³. Os resultados vêm sumariados no Quadro I.

Si referirmos o peso uterino médio seco por 100 g de peso corporal, teremos 12.9 e 12.2 mg respectivamente para os lotes testemunhas sem tratamento e injetado com óleo puro; 15.1 e 22.5 mg para os lotes tratados com o extrato ensaiado contendo respectivamente 5 e 10 g de glândulas frescas por cm³ e,

finalmente, 16.0 mg para o lote que recebeu 1 γ de estrona cristalizada. Estes últimos valores permitem calcular a presença de substâncias estrogênicas nos ovários das Crotalídeas na concentração equivalente pelo menos a 160 γ de estrona por kg de material.

QUADRO I

Lotes	N.º de animais	Peso corporal médio em g	Tratamento	Peso uterino médio em mg		
				fresco	seco	fresco %
A	4	42.5	Nihil	19.8	5.5	12.9
B	4	47.2	4 \times 0.25 cm ³ de óleo puro	28.8	5.8	12.2
C	4	45.0	4 \times 0.25 cm ³ de Ext. = 5 g	25.8	6.8	15.1
D	4	43.5	4 \times 0.25 cm ³ de Ext. = 10 g	30.5	9.8	22.5
E	4	55.0	4 \times 0.25 cm ³ de Ext. = 1 γ	28.0	8.8	16.0

d) *Discussão*

São os seguintes os dados sobre a concentração de substâncias estrogênicas nos ovários das Crotalídeas: 2 mil unidades camondongas por litro de líquido folicular, segundo Fraenkel e Martins (6), 2900 unidades estrona por kg de foliculos e óvulos previamente dissecados, conforme as nossas experiencias preliminares (7) e 1600 unidades estrona por kg de ovario total de acordo com os dados que acabamos de relatar. Si compararmos estes valores com a concentração relativamente baixa de estrógenos nos ovários dos mamíferos, vemos que os ovários de ofídios constituem uma fonte apreciável daquelas substâncias. A concentração referida foi inferior à encontrada, por exemplo, no líquido folicular humano ou na urina de mulher grávida, mas superior à extraída por Marlow e Richert (11) dos ovários dos galináceos.

Quanto à presença de andrógenos nos ovários de cascaveis e jararacas, os ensaios foram negativos mesmo na dose da fração alcali-insolúvel correspondente a 100 g de glândulas frescas. A concentração de substâncias androgênicas nos testículos das Crotalídeas já foi referida em trabalhos anteriores (9, 12).

Complemento do presente trabalho seria, partindo de grande quantidade de material, a identificação química das substâncias responsáveis pelos efeitos assinalados.

RESUMO

De um extrato alcoólico de ovários de 245 serpentes ovovivíparas, dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, foram obtidas duas frações: uma ensaiada em ratas infantis castradas, para determinação do teor em substâncias estrogênicas, conforme a técnica de Bülbring e Burn, e a outra em galo e ratos castrados para a presença de substâncias androgênicas. Os ensaios foram negativos para estas

últimas, mas mostraram para as primeiras a concentração média equivalente a 160 microgramas de estrona por kg de glândulas frescas.

Este teor de estrógenos nos ovários dos ofídios é apreciável quando comparado com os valores baixos, referidos pelos autores, para os ovários dos mamíferos e das aves.

ABSTRACT

Two fractions were obtained from an alcoholic extract of the ovaries of 245 ovoviviparous snakes belonging to the genera *Crotalus* and *Bothrops*: one was assayed in castrate female rats for the estrogenic potency according to the Bülbring and Burn's method, and the other was injected on capon and castrate rats for androgenic response. Only the estrogenic effect was observed averaging 160 γ of estrone per kg of fresh material.

This amount of estrogens in the female gonads of snakes is higher than the known values for the mammalian and avian ovaries.

BIBLIOGRAFIA

1. *Martins, Th.* — Glândulas sexuais e hypophyse anterior, p. 98-106, S. Paulo, Cia. Editora Nacional, 1936.
2. *Doisy, E. A.* — Biochemistry of the estrogenic compounds, in *Sex and internal secretions*, cap. XIII, p. 846-877, Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1939.
3. *Deulofeu, V.* — Distribución de los estrógenos en la naturaleza — *Ciencia (México)* 2(8-9):289.1941.
4. *Zondek, B.* — Clinical and experimental investigations on the genital functions and their hormonal regulation, Cap. I — The occurrence of some estrogenic substances in nature, Baltimore, Williams and Wilkins Co., 1941.
5. *Corner, G. W.* — The sites of formation of estrogenic substances in the animal body — *Phys. Reviews* 18(2):154.1938.
6. *Fraenkel, L. & Martins, Th.* — Estudos sobre a fisiologia sexual das serpentes — *Mem. Inst. Butantan* 13:393.1939.
7. *Valle, J. R.* — Notas sobre a fisiologia endócrina dos ofídios — *Arq. Cir. Clin. Exper. (S. Paulo)* 6(5-6):1099.1942.
8. *Gallagher, T. F.; Peterson, D. H.; Dorfman, R. I.; Kenyon, A. T. & Koch, F. C.* — The daily urinary excretion of estrogenic and androgenic substances by normal men and women — *J. Clin. Invest.* 16(5):695.1937.
9. *Valle, J. R. & Valle, L. A. R.* — Substancias androgénicas nas gônadas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* — *Mem. do Inst. Butantan* 16:225.1942.
10. *Bülbring, E. & Burn, J. H.* — The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution — *J. Physiol.* 85:320.1935.
11. *Marlow, H. W. & Richert, D.* — Estrogens of the fowl — *Endocrinology* 26:531.1940.
12. *Valle, J. R. & Valle, L. A. R.* — Gonadal hormones in snakes — *Science* 97:400.1943.

(Trabalho da Secção de Endocrinologia do Instituto Butantan. Entregue para publicação em 31-8-1943 e dado à publicação em dezembro de 1943).