

ESTRÓGENOS EM BEZERRAS DE ABATE¹

CARLOS ANTONIO MONDINO SILVA², EBERHARD GRUNERT³ e MARIANNE PÓZVÁRI⁴

SINOPSE.— A presença de substâncias com ação estrogênica nas fezes de 66 bezerras de abate com três a quatro meses de idade foi pesquisada através do teste de aumento de peso do útero em camundongos, de exames de cromatografia em camada fina e, paralelamente, inspeção dos respectivos ovários.

Pelo exame dos ovários constatou-se que apenas 13 bezerras apresentavam foliculos com diâmetro maior que 6 mm; as 53 restantes apresentavam diâmetro folicular menor que 6 mm, na maioria entre 2 e 3 mm.

A administração oral de extrato das fezes desses animais a camundongos fêmeas impúberes ofereceu os seguintes resultados: no grupo das 13 bezerras de maior diâmetro folicular, não houve diferença entre o peso médio dos úteros dos camundongos testes e o dos camundongos controles; no grupo das demais 53 bezerras, essa diferença foi altamente significativa ($P < 0,001$) em 47 casos, significativa ($P < 0,01$) em 3 casos, de pouca significância ($P < 0,05$) em 1, e sem significância, indicando ausência de atividade estrogênica nas fezes, em apenas 2 outros.

O exame cromatográfico de 41 das 47 amostras de fezes positivas para ação estrogênica revelou a presença de dietilstilbestrol em 24 amostras (60%), em concentrações que variaram de 17 a 666 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de fezes, de 17- α -estradiol em 8 amostras, variando de 2 a 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e de 17- β -estradiol, estriol e estroma, em pequeno número de amostras e com menores concentrações.

Com base nestes resultados, que inequivocamente demonstram a presença de hormônios sintéticos em bezerras com ovários aparentemente afunccionais, concluiu-se que a inspeção dos ovários poderia ser utilizada como meio de levantar suspeita do uso ilegal de estrógenos no engorde de bezerras para abate.

INTRODUÇÃO

O uso de hormônios com ação anabólico-estrogênica, tais como o dietilstilbestrol, ganhou muita popularidade nos últimos anos, especialmente no que se refere ao engorde de animais. O fato de que essas substâncias pertencem ao grupo dos denominados "compostos biológicos altamente ativos", além das suposições expressas na literatura de que essas substâncias possuem uma ação cocarcinogênica, levou vários países a proibirem o uso de preparados com ação estrogênica para outros fins que não o terapêutico.

A utilização de métodos de identificação químicos e biológicos torna-se bastante problemática por razões técnicas e econômicas. Por este motivo, o desenvolvimento de um teste simples que possibilitasse a identificação de animais tratados com estrógenos para fins de engorde seria de interesse muito especial.

Por tais razões, examinou-se a possibilidade da existência de alguma relação entre o quadro macroscópico ova-

riano e o uso de estrógenos com a finalidade de se estimular um engorde precoce em bezerras de abate.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovários de 66 bezerras abatidas com idade entre três e quatro meses no Frigorífico Estadual da Baixada Saxonía, em Hannover, Alemanha Federal, foram coletados e examinados quanto à presença de foliculos terciários. Através da medida do diâmetro dos foliculos identificados distribuíram-se as bezerras em dois grupos:

- grupo I: bezerras apresentando ovário aparentemente afunccionais, com foliculos terciários de diâmetro menor do que 6 mm;
- grupo II: bezerras com foliculos de diâmetro maior do que 6 mm em seus ovários.

Paralelamente coletava-se de cada bezerra uma amostra de fezes com peso em torno de 50 g, da qual, mais tarde, 10 g eram examinados através de um teste biológico, anteriormente descrito (Silva *et al.* 1973), quanto à presença de substâncias com ação estrogênica. Esse teste inclui os seguintes procedimentos: 10 g de fezes são bem misturados com 30 ml de álcool a 96%; essa mistura é centrifugada durante 15 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante, retirado e armazenado; o sedimento é novamente misturado com 30 ml de álcool a 96%, repetindo-se o procedimento anterior; os dois sobrenadantes são, então, reunidos e, logo após, misturados a 100 g de ração padrão para camundongos (Altromin 1324); a partir daí, formam-se "pellets" que são levados à estufa a 40°C para secagem durante 16 a 24 horas; esta ração é oferecida a camundongos fêmeas impúberes (NMRI/HAN), à razão de 2,5 g/camundongo/dia; no quinto dia os animais de laboratório são sacrifi-

¹ Aceito para publicação em 24 de maio de 1974.

Realizado durante o curso de Pós-Graduação do primeiro autor na Escola de Medicina Veterinária de Hannover.

² Médico Veterinário, doutor em Fisiopatologia da Reprodução da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

³ Médico Veterinário, Professor e Chefe do Departamento de Endocrinologia Clínica da Clínica de Obstetrícia e Ginecologia dos Bovinos da Escola de Veterinária de Hannover.

⁴ Médico Veterinário, Assistente Científico do Instituto de Exames Veterinários do Estado da Baixa Saxônia, Klinik f. Geburtshilfe u. Rindes der Tierärztlichen Hochschule Hannover, 3000 Hannover, Bischofsholer Damm 15, República Federal da Alemanha.

cados e seus úteros retirados e pesados; o tecido adiposo aderido aos úteros é cuidadosamente retirado e, quando da existência de conteúdo líquido nos úteros, o líquido é extraído através de leve pressão com papel filtro; o peso dos úteros é, então, relacionado a 100 g de peso corporal.

Para cada amostra de fezes usaram-se 10 camundongos nas condições indicadas. Para cada grupo de amostras de fezes a ser examinado utilizaram-se 10 camundongos nas mesmas condições dos anteriores, que recebiam apenas ração padrão e serviam como controle.

Dentro do possível, as amostras de fezes positivas no teste biológico foram examinadas através de cromatografia em camada fina (Schuller 1967) com a finalidade de se identificar a substância com atividade estrogênica presente. Para este exame eram utilizados 30 g de fezes.

Como prova adicional, examinaram-se histologicamente as glândulas de Bartholin de seis bezerras positivas no teste de aumento de peso em útero de camundongo, através do método descrito por Ruitenber e Kroes (1970).

A análise estatística dos resultados obtidos no teste biológico foi realizada através do teste "t".

RESULTADOS

Das 66 bezerras examinadas, 13 apresentavam, pelo menos em um dos ovários, folículos terciários maiores do que 6 mm de diâmetro. As restantes 53 bezerras não apresentavam qualquer folículo cujo diâmetro chegasse a 6 mm. A maioria desses folículos media de 2 a 3 mm de diâmetro.

Os extratos de 10 g de fezes de cada uma das 66 bezerras que foram examinados através do teste de aumento de peso em útero de camundongo apresentaram os resultados descritos no Quadro 1.

Como demonstram os resultados descritos no Quadro 1, não se determinou qualquer substância com atividade estrogênica no extrato das fezes de bezerras com folículos ovarianos maiores do que 6 mm de diâmetro. A diferença entre os pesos dos úteros dos camundongos teste e os controle não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Já no caso das bezerras com folículos menores do que 6 mm (ovários aparentemente afunccionais), os resultados obtidos foram diametralmente opostos. A diferença entre os pesos dos úteros dos animais teste e controle foi de alta significância estatística ($P < 0,001$). Das 53 bezerras examinadas, em apenas dois casos não se identificou a presença de substâncias com ação estrogênica.

Em uma bezerra o resultado foi de pouca significância ($P < 0,05$), e em outros três animais, significante ($P < 0,01$). As restantes 47 bezerras apresentaram atividade estrogênica nas fezes altamente significante ($P < 0,001$).

O exame de cromatografia em camada fina de 41 amostras de fezes com resultado positivo no teste biológico possibilitou a identificação das substâncias com atividade estrogênica, conforme demonstra o Quadro 2.

Por meio do exame cromatográfico pôde-se constatar que entre as substâncias identificadas no teste biológico como de alta atividade estrogênica destacava-se, sobremaneira, o dietilstilbestrol, que ocorreu em 24 (cerca de 60%) dos 41 extratos de fezes examinados. A concentração desta substância nas fezes variava muito: nos 24 extratos positivos os valores oscilaram entre 17 e 666 µg de dietilstilbestrol/kg de fezes. Em outras oito amostras identificou-se 17-α-estradiol, que é biologicamente uma substância muito menos ativa que o dietilstilbestrol. Em terceiro plano aparece o 17-β-estradiol, identificado em três extratos de fezes. Estrona e estriol foram encontrados, cada um, em um extrato de fezes, em concentrações relativamente baixas.

Embora nove amostras de fezes não evidenciassem a presença de qualquer substância estrogênica ao exame cromatográfico, no teste biológico mostraram-se altamente positivas (variação do peso dos úteros entre 176 e 394 mg%; peso dos úteros dos animais controle = 69 mg%). Acreditamos, por isso, que as baixas concentrações destas substâncias nas amostras em questão não permitiram sua identificação devido a perdas durante o processo de extração. Uma prova disto está em que, através do exame histológico das glândulas de Bartholin de seis bezerras positivas no teste biológico (três positivas e três negativas no exame cromatográfico), se verificou, em todas elas, hipertrofia acompanhada de hiperplasia.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Baseados em nossos resultados, chegamos à constatação de que, nos testes biológicos com os extratos de fezes das bezerras de abate, não foram as amostras de fezes dos animais que possuíam folículos maiores do que 6 mm que evidenciaram atividade estrogênica, senão daqueles com folículos menores que 6 mm de diâmetro (maioria dos folículos entre 2 e 3 mm Ø). Isso nos leva a concluir que a atividade estrogênica não deve ser definida como resultante de uma secreção endógena, mas sim de origem exógena.

QUADRO 1. Resultado da aplicação oral do extrato das fezes de bezerras de abate a camundongos fêmeas impúberes

Procedência do extrato de fezes	N.º de bezerras	Peso médio dos úteros (mg/100 g)		Teste "t"
		Camundongos teste	Camundongos controle	
Bezerras com folículos <6 mm φ	53	295 ± 57	69 ± 11	*** (P<0,001)
Bezerras com folículos >6 mm φ	13	67 ± 11	69 ± 8	N.S. (P>0,05)

*** = diferença altamente significativa, N.S. = diferença não significativa.

QUADRO 2. Exame cromatográfico em camada fina de 41 amostras de fezes com resultado positivo no teste biológico

N.º de bezerras	Substância identificada	Concentração calculada ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de fezes)
9	nenhuma	—
24	dietilstilbestrol	17 — 666
3	17- α -estradiol	2 — 4
3	17- α -estradiol e 17- β -estradiol	4 — 17
1	17- α -estradiol e estrona	4
1	17- α -estradiol e estriol	4

De fato, através do exame cromatográfico puderam ser identificadas as substâncias com atividade estrogênica cuja presença fora detectada através do teste biológico. Neste caso predominava o dietilstilbestrol.

Em nenhuma das bezerras que se identificou um conteúdo estrogênico nas fezes foi possível verificar a presença de folículos terciários grandes ($\varnothing > 6$ mm), o que vem reforçar a hipótese da origem exógena dos estrógenos encontrados através do teste biológico. Parece, portanto, que em bezerras, ao contrário das vacas (Dawson 1957, Roberts 1971, Schaez 1971 & Grunert 1973), não ocorrem cistos ovarianos após uma administração de estrógenos. Ocorre muito mais uma tendência a subfunção ou afunção dos ovários, como já foi observado em vacas, em algumas ocasiões. Por Kaltenbach *et al.* (1964) e Niswender *et al.* (1965) após uma aplicação de estrógenos.

De acordo com Döcke (1969), uma alta dose de estrógenos leva à diminuição da secreção de FSH pela hipófise. Um tratamento com estrógenos durante longo tempo pode ter como resultado uma grave atrofia dos ovários, assim como se pode observar após uma hipofisectomia.

As nossas observações em bezerras de abate até quatro meses de idade, assim como as de Silva (1973), corroboram esses dados. Karg *et al.* (1972), ao examinarem o líquido folicular de duas bezerras de abate através de um método radioimunológico, verificaram que o animal tratado produzia três vezes menos estrógenos que o controle; isso levou estes autores a levantar a hipótese de que um tratamento com estrógenos levaria a uma hipofunção ovariana em bezerras.

Baseados em nossos exames somos levados a acreditar que a presença de ovários aparentemente sub ou afuncionais em bezerras de abate nos permite suspeitar que, neste caso, sob certas circunstâncias, foi realizada uma aplicação de estrógenos com a finalidade de se alcançar um ganho de peso precoce.

São necessárias mais investigações neste sentido, procurando esclarecer a praticabilidade deste método de pré-seleção. Caso se confirmem as observações feitas por nós, teremos encontrado um método que permitirá a triagem de bezerras, que possivelmente tenham re-

cebido estrógenos, através do aparte daquelas que apresentarem os ovários sem folículos terciários grandes.

Tanto o teste de aumento de peso em útero de camundongo como a cromatografia em camada fina não podem ser utilizados como exames de rotina para um grande número de provas diárias. Para combater sistematicamente a aplicação ilegal de estrógenos em bezerras de abate é necessário, na nossa opinião, desenvolver-se um método mais simples e seguro de triagem ("Screening test") do que os testes morfológicos até agora disponíveis, como por exemplo, a observação do crescimento da papila mamária e sinais de feminilidade nos machos. Dever-se-ia, entretanto, assegurar que, através de tal método de seleção, dentro do possível, fossem reconhecidos todos os animais suspeitos de um tratamento por estrógenos. Desta maneira evitar-se-ia a larga utilização de métodos trabalhosos e antieconômicos como o teste de aumento de peso em útero de camundongo e a cromatografia em camada fina que, no entanto, deveriam ser usados em última instância como prova corroboratória.

REFERÊNCIAS

- Dawson, F.L.M. 1957. Bovine cystic ovarian disease — A review of recent progress. *Brit. vet. J.* 113:112-113.
- Döcke, F. 1969. Physiologische Grundlagen einer gezielten Beeinflussung der Reproduktion bei Haustieren. *Fortpfl. Haust.* 5: 276-295.
- Grunert, E. 1973. Gesundheitsschäden und Zystenbildung bei Kühen nach Östrogenüberdosierung (Gutachten). *Tierärztl. Umsch.* 28:331-333.
- Kaltenbach, C.C., Niswender, G.D., Zimmerman, D.R. & Wiltbank, J.N. 1964. Alteration of ovarian activity in cycling, pregnant and hysterectomized heifers with exogenous estrogens. *J. Anim. Sci.* 23:995-1001.
- Karg, H., Hoffmann, B., Vogt, K. & Behr, H. 1972. Radioimmunologische versus fluorimetrische Bestimmung exogener und endogener Steroidöstrogene bei Mastkälbern. *Tierärztl. Umsch.* 27:385-389.
- Niswender, G.D., Kaltenbach, C.C., Shumway, R.P., Wiltbank, J.N. & Zimmerman, D.R. 1965. Alteration of ovarian activity in cycling beef heifers with small daily injections of estradiol. *J. Anim. Sci.* 24:986-989.
- Roberts, S.J. 1971. Infertility in the cow: Hormonal disturbances resulting in infertility, p. 421-435. In Roberts, S.J. (Ed.). *Veterinary obstetrics and genital diseases.* Publicado pelo autor, Ithaca, New York.
- Ruitenbergh, E.J. & Kroes, R. 1970. Histological changes in the genital tract of the female calf after administration of diethylstilbestrol and hexoestrol. *Zbl. VetMed. A* 17:440-452.
- Schaez, F. 1971. Gestörte Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind, anormale Zustände, Krankheiten und Fehlfunktionen der Eierstöcke. Nymphomanie, p. 119-123. In Küst, D. & F. Schaez (Ed.). *Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren.* VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Schuller, P.L. 1967. The detection of diethylstilboestrol (DES) in urine by thin-layer chromatography. *Chromat.* 31:237-240.
- Silva, C.A.M. 1973. Nachweis von östrogenwirksamen Substanzen im Kot von Kälbern unter besonderer Berücksichtigung der Ovarfunktion. Tese de Doutorado, Esc. Med. Vet. Hannover.
- Silva, C.A.M., Grunert, E. & Satrapa, R. 1973. Estrógenos nas fezes de bezerros recém-nascidos. *Pesq. agropec. bras., Sér. Vet.*, 8:81-83.

ABSTRACT.- Silva, C.A.M.; Grunert, E.; Pózvári, M. [*Estrogens occurring in slaughtered female calves*]. Estrógenos em bezerras de abate. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1975) 10, 31-34 [Pt, en] Fac. Med. Vet. UFRG, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, Brazil.

The mice-uterus test, t.l.c. and concomitant macroscopic examination of respective ovaries were used to examine the faeces of 66 slaughtered female calves for the presence of substances having oestrogenic action. Follicles with a diameter of more than 6 mm were only observed in 13 cows, whilst those found in the ovaries of the remainder (53) had follicles between 2 and 3 mm in diameter.

An extract of calves faeces administered orally to adolescent female mice resulted in:

a) Extracts from those 13 cows with ovaries having follicles with diameters more than 6 mm, no significant difference in uterine weight between test and control mice;

b) Extracts from the remaining cows; highly significant ($P < 0.001$) differences between uterine weight of test and control mice in 47 cases; significant ($P < 0.01$) differences in 3 instances, minimal significance ($P < 0.05$) in one case; and no significant difference in the remaining two cases.

An investigation by t.l.c. of 41 samples from the 47 faeces with highly significant oestrogenic activity revealed diethylbestrol (Eng.: diethylstilbesterol) with concentration ranging from 17 to 666 g/kg in 24 samples; also 17 α -estradiol with concentration from 2 to 17 g/kg in 8 samples, and 17 β -estradiol, estriol and estron in lower concentration in a few samples.

The results obtained clearly show the presence of synthetic hormones in female calves with "sleeping ovaries". The examination of ovaries may therefore be used to indicate whether or not oestrogen is being used illegally to fatten female beef calves.