

## EFEITO DO ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE PGF E PGFM NO FLUÍDO FOLICULAR DE VACAS

FABIANE PEREIRA DE MORAES<sup>1</sup>; CAMILA AMARAL D'ÁVILA<sup>2</sup>; CAMILA RIBEIRO CARVALHO DE BRITO<sup>3</sup>; THOMAZ LUCIA JR.<sup>4</sup>; PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES<sup>5</sup>; BERNARDO GARZIERA GASPERIN<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, FaVet, ReproPEL – fabypmoraes@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas, FaVet, ReproPEL – camila.amaral.davila@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas, FaVet, ReproPEL - camilarcb@gmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas, FaVet, ReproPEL - tluciajr@gmail.com

<sup>5</sup>Unipampa Campus Uruguaiana – pbayardg@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas, FaVet, ReproPEL – bggasperin@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Protocolos hormonais que visem controlar o ciclo estral e sincronizar a ovulação estão sendo cada vez mais utilizados com o objetivo de melhorar a eficiência reprodutiva e otimizar os manejos nas propriedades. Os protocolos disponíveis para indução da ovulação são baseados no uso do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou em estrógenos (E2), como revisado por BÓ et al. (2016). O uso do estrógeno é mais vantajoso economicamente, entretanto é restrito em alguns países (LANE et al., 2008). Desta forma, é necessário buscar por novas alternativas de indutores de ovulação.

Sabe-se que as prostaglandinas desempenham diversas ações envolvidas na reprodução, dentre elas a atuação no processo ovulatório. Estudos já comprovaram o efeito da prostaglandina F2α (PGF) na indução da ovulação de maneira sincronizada em fêmeas bovinas (LEONARDI et al., 2012; PFEIFER et al., 2014; CASTRO et al., 2018; PFEIFER et al., 2018), porém seu mecanismo de atuação ainda é desconhecido. Com base nesses estudos, o uso da PGF seria uma alternativa aplicável do ponto de vista econômico, assim como em relação a sua disponibilidade no mercado mundial.

A síntese de prostaglandinas pode ser inibida através da administração de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), sendo que os mesmos podem inibir a ovulação em diversas espécies (MURDOCH E DUNN, 1983; DE SILVA E REEVES, 1985; FONSECA et al., 2017). Portanto, formulou-se a hipótese de que a administração de AINEs imediatamente antes da ovulação associada ao tratamento com PGF poderia representar um modelo para se estudar a ação das prostaglandinas no processo ovulatório. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do AINE sobre as concentrações de PGFM e PGF no fluido folicular, e verificar se a aplicação por via parenteral de um análogo de PGF seria capaz de reverter o efeito do anti-inflamatório.

### 2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA-UFPel). Foram utilizadas 18 fêmeas bovinas da raça Jersey, cíclicas, não gestantes e não lactantes e com escore de condição corporal ≥3 (escala de 1-5). Os animais foram submetidos a um protocolo hormonal de sincronização de estro, no qual no D0 foi realizada a aplicação de benzoato de estradiol (BE- Gonadiol®, Zoetis, Brasil; 2 mg i.m.), juntamente com a inserção de um dispositivo intravaginal (DIV, Sincrogest®, Ourofino, Brasil) contendo progesterona (P4), para induzir a regressão folicular e

o surgimento de uma nova onda de crescimento e ainda a aplicação de 241 µg de cloprostenol sódico (Estron®, Agener União, Brasil), i.m., para indução da luteólise. Os folículos com diâmetro superior a 8 mm no D0, foram aspirados. No D8, foi realizada aplicação i.m. de 241 µg de PGF (Estron®, Agener União, Brasil), visando remover possíveis fontes de P4 endógena. O diâmetro folicular foi acompanhado diariamente através de ultrassonografia transretal utilizando transdutor linear de 7,5 MHz (SonoScape A5V) do D7 ao D11, para identificação dos folículos dominantes em crescimento. O DIV permaneceu por nove dias, até que os folículos em crescimento atingissem um diâmetro de 12 mm. Foi realizada a aplicação de 100 µg de GnRH (acetato de gonadorelina; Gestran Plus® - TecnoPec), i.m., 20 h após a remoção do DIV (hora 0). Após a aplicação de GnRH, as vacas foram divididas em três grupos: controle, que receberam solução salina 0,9% i.m. (n = 6); AINE, que foram submetidas a aplicação de 2,2 mg/kg de flunixin meglumine (Flumedin®, Jofadel, Brasil) i.m., 17 h após a aplicação de GnRH (n=6); e AINE+PGF, que receberam 2,2 mg/kg de flunixin meglumine (Flumedin®, Jofadel, Brasil) i.m., 17 h após a aplicação de GnRH, seguidos de 25 mg de PGF (Lutalyse®, Pfizer, Brasil), i.m., 23 h após a aplicação de GnRH (n=6). O diâmetro dos folículos pré-ovulatórios foi equilibrado entre os grupos. Para a coleta das amostras de fluido folicular, as fêmeas bovinas foram submetidas à higienização da região perineal e anestesia epidural com 80 mg de lidocaína (Anestex Fagra®, Vétoquinol, Brasil). A aspiração folicular foi realizada através do acompanhamento por ultrassonografia transvaginal com sonda micro convexa de 6MHz (PieMedical esaote AguilaVet), utilizando um sistema estéril de mangueiras e cateteres 16 G (Jelco®). O conteúdo aspirado foi imediatamente centrifugado a 3500 rpm por 7 min para separação das células do fluido folicular, que foi armazenado em nitrogênio líquido a -196°C.

As dosagens do metabólito da prostaglandina (PGFM) e da PGF no fluido folicular foram realizadas através da técnica de ELISA utilizando os kits comerciais *13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F2α* e *Prostaglandin F2α* (Cayman Chemical®).

Em relação à análise estatística, as concentrações de PGFM e PGF no fluido folicular foram testadas quanto à normalidade e normalizadas quando necessário. As comparações entre os grupos foram realizadas através de análise de variância (ANOVA) seguida do teste t de Student, utilizando um nível de significância de 5%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada maior concentração de PGFM no fluido folicular dos animais do grupo AINE+PGF ( $P<0,0001$ ;  $3450,4 \pm 269,6$  pg/ml) em relação aos animais do grupo controle e grupo AINE ( $1228,2 \pm 45,7$  e  $204,1 \pm 568,5$  pg/ml, respectivamente). Os níveis de PGFM do grupo controle e grupo AINE não diferiram estatisticamente. A concentração de PGF no fluido folicular foi maior ( $P=0,0032$ ) no grupo controle ( $49563,2 \pm 7727,7$  pg/ml) em comparação com os grupos AINE ( $5664,3 \pm 3473,1$  pg/ml) e AINE+PGF ( $3198,4 \pm 770,5$  pg/ml). Os grupos AINE e AINE+PGF não diferiram estatisticamente.

Já está bem estabelecido que a biossíntese de prostaglandinas ovariana é indispensável para a ovulação em fêmeas bovinas e que o aumento nas concentrações da PGE2 e PGF<sub>2α</sub> precede o momento da ovulação (BRIDGES et al., 2006; BRIDGES E FORTUNE, 2007). A concentração de PGF<sub>2α</sub> no fluido folicular do grupo controle foi semelhante a encontrada por BRIDGES et al. (2006)

de folículos às 24 h após a aplicação de GnRH. Porém, foi superior às concentrações séricas encontradas por ROVANI et al. (2012), o que era esperado, uma vez que a síntese de PGF aumenta drasticamente no interior do folículo antes da ovulação (BRIDGES E FORTUNE, 2007). As concentrações de PGFM no fluido folicular foram inferiores às concentrações de PGFM sérica, quando comparadas ao mesmo estudo, o que pode ser explicado pelo fato de que a PGF é metabolizada nos pulmões (SUDO-HASHAI, 2010).

Nossos resultados demonstraram menores concentrações de PGF2α no fluido folicular dos animais que receberam AINE, em relação ao controle. A administração de análogo sintético de PGF por via parenteral não elevou os níveis de PGF intrafolícular. É possível que o tratamento não tenha sido capaz de alterar significativamente os níveis no interior do folículo, não sendo capaz de reverter o efeito do anti-inflamatório não esteroidal (AINE). Os anti-inflamatórios não esteroidais, atuam na cascata ovulatória inibindo a atividade da cicloxigenase (COX) e, consequentemente, a biossíntese das prostaglandinas. Devido ao seu mecanismo de ação, diversos estudos relataram efeitos inibitórios sobre a ovulação em diferentes espécies (MURDOCH E DUNN, 1983; DE SILVA E REEVES, 1985; FONSECA et al., 2017).

Outra possível explicação para os níveis reduzidos de PGF observados no fluido folicular das vacas tratadas sistematicamente é que o intervalo entre a aplicação intramuscular e a aspiração do fluido folicular foi de uma hora. Já no estudo conduzido por ROVANI et al. (2012) foi observado um pico de PGF sérica dez minutos após o tratamento. Portanto, é possível que maiores níveis seriam observados se o intervalo entre o tratamento e a aspiração folicular fosse menor.

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nos nossos achados, é possível afirmar que o AINE possui um efeito inibidor na síntese das prostaglandinas no interior do folículo. Portanto, o modelo parece adequado para estudar a função das prostaglandinas na ovulação, embora ainda seja necessário comprovar que a aplicação sistêmica é capaz de reverter a ação do AINE.

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Edital PRONEX-16/2551-0000494-3), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001) e pela bolsa de Mestrado de F.P. Moraes.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BO, G.A.; DE LA MATA, J.J.; BARUSELLI, P.S.; MENCHACA, A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, v.86, n.1, p.388-396, 2016.

BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J.E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.263, n.1, p.1-9, 2007.

BRIDGES, P.J.; KOMAR, C.M.; FORTUNE, J.E. Gonadotropin-Induced Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Cyclooxygenase-2 and Production

of Prostaglandins E and F<sub>2α</sub> in Bovine Preovulatory Follicles Are Regulated by the Progesterone Receptor. **Endocrinology**, v.147, n.10, p.4713-4722, 2006.

CASTRO, N.A.; NEVES, P.M.A.; CESTARO, J.P.; MELO, V.T.O.; SCHNEIDER, A.; PFEIFER, L.F.M. Use of prostaglandin F<sub>2α</sub> as ovulatory stimulus for synchronizing dairy cattle. **Research in Veterinary Science**, v.118, p.151-154, 2018.

DE SILVA, M.; REEVES, J. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Reproduction**, v.75, n.2, p.547-549, 1985.

FONSECA, J.F.; ALVIM, G.P.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; OLIVEIRA, M. E. F.; BRAIR, V.L.; BRANDÃO, F.Z.; FACÓ, O. 2017. Reproductive features and use of an anti-inflammatory drug in estrus-induced dairy goats artificially inseminated in a standing position with cervix immobilization. **Reproductive Biology**, v.17, n.3, p.268-273, 2017.

LANE, E.A.; AUSTIN, E.J.; CROWE, M.A. Oestrous synchronisation in cattle- Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. **Animal Reproduction Science**, v.109, n.1, p.1-16, 2008.

LEONARDI, C.E.P.; PFEIFER, L.F.M.; RUBIN, M.I.B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R.J.; PESSOA, G.A.; BAINY, A. M.; SILVA, C.A.M. Prostaglandin F<sub>2α</sub> promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v.78, n.7, p.1578-1582, 2012.

MURDOCH, W.J.; DUNN, T. G. Luteal function after ovulation blockade by intrafollicular injection of indomethacin in the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, Inglaterra, v.69, n.2, p.671-675, 1983.

PFEIFER, L.F.M.; LEONARDI, C.E.P.; CASTRO, N.A.; VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; CASTILHO, E.M.; SINGH, J.; KRUSSER, R.H.; RUBIN, M.I.B. The use of PGF<sub>2α</sub> as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v.81, n.5, p.689-695, 2014.

PFEIFER, L.F.M.; RODRIGUES, W.B.; CASANOVA DA SILVA, K.; ANACHE, N.A.; CASTRO, N.Á.; CASTILHO, E. M.; NOGUEIRA, E. Different protocols using PGF<sub>2α</sub> as ovulation inducer in Nelore cows subjected to estradiol-progesterone timed AI based protocols. **Theriogenology**, v.120, p.56-60, 2018.

ROVANI, M.T.; BARRETA, M.H.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B.G.; ANTONIAZZI, A.Q.; FESTUGATTO, R.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, P.B.D. Luteolysis after the intravulvosubmucosal injection of prostaglandin F<sub>2α</sub> in cattle: Systemic or local mechanism? **Livestock Science**, v.148, n.1, p.60-66, 2012.

SUDO-HASHAI, L.S., 2010. Prostaglandinas (Eicosanoides). In: DELUCIA, R.; PLANETA, C.S.; GALLACCI M. ; Avellar M.C.W.; FILHO, R.M.O. **Farmacologia Integrada**. Clube de Autores : São Paulo, 2014. Cap.37, p.474-485.