

INIBIÇÃO DA OVULAÇÃO DE BOVINOS COM USO DE ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEREOIDAL POR VIA INTRAOVARIANA

VÍTOR DUTRA ANTUNES DA CUNHA¹; JÉSSICA LAZZARI²; FABIANE PEREIRA DE MORAES³; SERGIO FARIAS VARGAS JUNIOR⁴; BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – vitorcunha2004@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – jelazzari@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fabypmoraes@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – sergiofvjunior@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Em 2023, o Brasil abateu 34,06 milhões de cabeças de bovinos, com alta de 13,7% frente ao ano anterior (IBGE, 2023). Para continuar atendendo essa demanda, é necessário melhorar o desempenho reprodutivo, através do emprego de biotécnicas reprodutivas (FIGUEIREDO et al., 2021). Nesse sentido, a manipulação hormonal do ciclo, embora eficiente, deve ser constantemente aprimorada para aumentar a sincronia entre o momento da ovulação e da inseminação artificial (FIGUEIREDO et al., 2021).

Os protocolos de sincronização do estro utilizam indutores de ovulação a base de estradiol, análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e gonadotrofina coriônica humana, diferindo em custos e no intervalo da aplicação até a ovulação (D'AVILA et al., 2019). Além destes, as prostaglandinas (PG) F2 α (PGF) e, principalmente, a E2 (PGE) possuem papel fundamental na ovulação, embora os mecanismos não tenham sido completamente esclarecidos (BRIDGES et al., 2006). Portanto, visto que há a possibilidade do desenvolvimento de novos indutores de ovulação baseado no uso das PG, torna-se necessário desenvolvimento de um modelo de estudo adequado.

Nesse cenário, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) inibem as enzimas precursoras das PG, as ciclooxigenases I e II (COX I e II) que, por conseguinte, bloqueiam a ovulação (VERNUNFT et al., 2022). O flunixin meglumine (FM), o é um AINE não seletivo da COX I e II e amplamente utilizado na clínica médica de grandes animais. Até o momento, o FM foi capaz de inibir 100% da ovulação somente quando aplicado por injeção intrafolicular (IIF) 16h após a aplicação do GnRH (338 μ M de FM, VERNUNFT et al., 2022). Nesse momento, foi capaz de atuar antes do início do aumento e do pico de produção das COX e PGs, que ocorrem às 18h e às 24h após aplicação de GnRH, respectivamente (BRIDGES et al., 2006). Porém, esse modelo de bloqueio de ovulação apresenta algumas limitações, principalmente nos casos de múltiplas injeções e/ou aspirações foliculares, pois as chances de rompimento do folículo pré-ovulatório aumentam. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de FM intraovariana na ovulação de fêmeas bovinas.

2. METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais foram autorizados pela CEUA UFPel (006185/2023-19). O estudo foi conduzido no Centro Agropecuário da Palma da Universidade Federal de Pelotas (Capão do Leão/RS), onde iniciou-se o protocolo

de sincronização do estro em vacas das raças Jersey, Holandês e Angus, cíclicas, não lactantes e com escore de condição corporal entre 3,0 e 3,5 (escala de 1 a 5). Todos os animais foram sincronizados no dia 0 (D0) em fase aleatória do ciclo estral, com a colocação de um dispositivo intravaginal (DIV) de 1 g de progesterona (P4) e a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol im. No D8, foram administradas 0,52 mg de cloprostenol im para promover a luteólise. Deste dia até o D10, os ovários foram monitorados usando ultrassonografia transretal (US) (SonoScape A5V; 7.5 MHz) para acompanhamento da dinâmica folicular e identificação do folículo dominante.

No D9, o DIV foi retirado e os animais foram marcados na região sacro-caudal com tinta específica para detecção de estro. Vinte horas após a retirada do DIV (D10), foi administrado 25 µg de lecirelina (análogo de GnRH) im em todos os animais que possuíam folículos maiores de 10 mm (SARTORI et al., 2001). Além disso, o diâmetro folicular foi equalizado entre os três grupos (6 animais/grupo): grupo controle negativo, em que 0,2mL de solução salina foram administrados via IIF; grupo F-FM (grupo controle positivo), que recebeu 338 µM de FM IIF e o grupo O-FM, que recebeu 10 mg de FM (0,2mL de FM não diluído) em injeção intraovariana (IO).

As injeções foram realizadas 16h após a aplicação do GnRH (D11) (VERNUNFT et al., 2022) onde, previamente, os animais foram submetidos à limpeza perivulvar e anestesia epidural, utilizando 3 a 5mL de formulação comercial de lidocaína a 2%. Os procedimentos seguiram o método descrito por FERREIRA et al. (2007), com auxílio de uma guia de aspiração com US acoplado (sonda microconvexa de 5 MHz).

A IO foi realizada no córtex ovariano, em região desprovida de folículos antrais e tecido luteal, o mais próximo possível do folículo (MALARD et al., 2020). Para a IIF de FM, preparou-se uma solução de FM (Banamine®, 50mg/mL, MSD) na diluição 1:1000 (VERNUNFT et al., 2022). Monitorou-se o momento da ovulação na tarde do D11, na manhã e tarde do D12 e na manhã do D14, com US. A taxa de ovulação foi analisada por regressão logística e o contraste foi usado para comparações entre os grupos, sendo significativo quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito de uma nova via de administração do FM para bloqueio da ovulação de bovinos. Todos os animais do grupo O-FM ovularam até 34h após a aplicação do GnRH, refutando nossa hipótese. O mesmo ocorreu com o grupo controle negativo, onde 5/6 animais ovularam até 34h, conforme o esperado (FRAGA, 2001) e o animal restante ovulou entre 34 e 42h após a aplicação de GnRH. Dos animais do grupo F-FM, 83% (5/6) apresentaram folículo anovulatório, com no mínimo 25mm de diâmetro, estrutura resultante da inibição da ovulação, sendo observado até 72h após aplicação do GnRH, momento da última avaliação.

Outros modelos experimentais com o uso de AINE na ovulação já foram estudados em diferentes espécies. Anteriormente, nosso grupo avaliou a administração de uma ou duas doses de FM im em bovinos, no qual não surtiu efeito bloqueador de ovulação (MORAES, 2020; MAUBRIGADES, 2023). Enquanto, para equinos, uma única aplicação é suficiente para induzir a formação de folículos anovulatórios (CUERVO-ARANGO et al., 2011). Por esta via, apenas PUGLIESI et al., (2012) foram capazes de inibir a ovulação após múltiplas aplicações de FM. Todavia, o uso prolongado de AINEs predispõem a ocorrência

de efeitos colaterais negativos, como as úlceras pépticas (DORNELAS et al., 2023), e por isso, este modelo foi descartado de nossos estudos.

A via intrafolicular é vantajosa pois a injeção é realizada no local alvo do estudo, em baixa dose e possibilita visualizar a solução colidindo com as células da granulosa, gerando turbilhonamento no interior do folículo, o que confirma a execução correta (FERREIRA et al., 2007). Recentemente, Venunft et al. (2022) avaliaram o efeito de diferentes AINE (seletivos e não seletivos) e concentrações na ovulação de bovinos. Apenas 338 μ M de FM e 70 μ M de indometacina, ambos inibidores não seletivos de COX, foram capazes de bloquear completamente a ovulação. Contudo, para estudos de múltiplas aplicações/aspirações foliculares este método aumenta as chances de rompimento.

Nesse sentido, partiu-se para a via IO. A IIO é vantajosa pois, assim como na IIF, a aplicação do fármaco é próxima ao folículo dominante, porém sem perfurá-lo, evitando os riscos de rompimento (PETERS et al., 2004). Como pontos negativos, apresenta grande variação na distância entre o local da aplicação e a parede folicular. Nosso modelo de estudo falhou em bloquear a ovulação. Esperava-se que o AINE se difundisse através das membranas celulares para o interior do folículo. Contudo, como não foi mensurada a concentração do FM no fluido folicular, não é possível afirmar se ele atingiu o local alvo. Além disso, levantou-se a hipótese de que o momento da aplicação não tenha sido o mais adequado para permitir a difusão do fármaco no interior do folículo. Apenas, SILVA; REEVES (1985) obtiveram 100% de bloqueio da ovulação com a aplicação de indometacina IO, por laparotomia. O sucesso foi justificado pela facilidade de manipulação, uma vez que com a completa visualização do ovário, foi possível garantir a aplicação do fármaco o mais próximo possível do folículo. Todavia, é um método extremamente invasivo, não justificando a utilização dessa abordagem.

4. CONCLUSÕES

O modelo de estudo com a aplicação de anti-inflamatório não esteroide, flunixin meglumine, por via intraovariana, não foi bem-sucedido em bloquear a ovulação de fêmeas bovinas quando injetado 16 horas após o análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 $_{2\alpha}$ in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4713-4722, 2006.

CUERVO-ARANGO, J.; DOMINGO-ORTIZ, R. Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, p. 707-714, 2011.

D'Avila, C. A., Moraes, F. P. D., Junior, T. L., & Gasperin, B. G. Hormônios utilizados na indução da ovulação em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, p. 797-802, 2019.

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

Dornelas, A. J. S., Dantas, A. L., Distler, A. C., Scarin, G. P., Colomietz, I. F., Paraguassu, I., ... & Juliani, A. (2023). A incidência de úlcera péptica em usuários crônicos de anti-inflamatórios não esteroides. **Revista Eletrônica Acervo Médico**, v. 23, n. 3, p. e12007-e12007, 2023.

Ferreira, R., Oliveira, J. F., Fernandes, R., Moraes, J. F., & Gonçalves, P. B. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, Cambridge, Inglaterra, v.134, n.5, p. 713-719, 2007.

FRAGA, D. B. M. **Avaliação de dois protocolos para sincronização de ovulação em rebanhos leiteiros**. 2001. Dissertação (Magister Scientiae) - Programa de PósGraduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; GASPERIN, B.G. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal e à Humana**. Rio de Janeiro: Roca, 2021.

IBGE. **Em 2023, abate de bovinos cresce e o de suínos e frango atingem recordes**. Estatísticas Econômicas, Brasil, 14 de mar. 2024. Acessado em 14 ags. 2024. Online. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/39452-em-2023-abate-de-bovinos-cresce-e-o-de-suinos-e-frangos-atingem-recordes#:~:text=Em%202023%2C%20foram%20abatidas%2034,de%20crescimento%20verificada%20em%202022>.

Malard, P. F., Peixer, M. A., Grazia, J. G., Brunel, H. D. S. S., Feres, L. F., Villarroel, C. L., ... & Carvalho, J. L. Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss. **Scientific Reports**, publicado online, v.10, n.1, 2020.

MAUBRIGADES, L. M. Avaliação da administração parenteral de flunexina meglumina sobre a ovulação por GnRH em bovinos. In: **9º SEMANA INTEGRADA UFPEL**, 5. Pelotas, 2023.

MORAES, F. P. **Estrógeno e prostaglandina F2 alfa no controle de funções reprodutivas em fêmeas bovinas**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

PETERS, M. W.; PURSLEY, J. R.; SMITH, G. W. Inhibition of intrafollicular PGE2 synthesis and ovulation following ultrasound-mediated intrafollicular injection of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 in cattle. **Journal of animal science**, v. 82, n. 6, p. 1656-1662, 2004.

Pugliesi, G., Khan, F. A., Hannan, M. A., Beg, M. A., Carvalho, G. R., & Ginther, O. J. Inhibition of prostaglandin biosynthesis during postluteolysis and effects on CL regression, prolactin, and ovulation in heifers. **Theriogenology**, v. 78, n.2, p. 443-454, 2012.

SARTORI R.; FRICKE P. M.; FERREIR J. C.; GINTHER O. J.; WILTBANK M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biol Reprod**, v.65, p.1403-1409, 2001.

VERNUNFT, A.; LAPP, R.; VIERGUTZ T.; WEITZEL J. M. Effects of different cyclooxygenase inhibitors on prostaglandin E2 production, steroidogenesis and ovulation of bovine preovulatory follicles. **Journal of Reproduction and Development**, Dummerstorf, Germany, v.68, n.4, 2022.