

A INJEÇÃO INTRAFOLICULAR DE PGE OU PGE+PGF É CAPAZ DE REVERTER O BLOQUEIO OVULATÓRIO INDUZIDO POR ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL?

VINICIUS POUZADA LEAL¹; ISADORA RODRIGUES OLIVEIRA², JESSICA LAZZARI³, SERGIO VARGAS⁴; BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁵; RAFAEL GIANELLA MONDADORI⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – vinileal.18@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – isadora-rod@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – jelazzari@hotmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas - sergiofvjunior@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – rgmondadori@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O desempenho econômico da pecuária está relacionado com o desempenho reprodutivo (ROYAL; MANN; FLINT, 2000). O emprego de biotécnicas reprodutivas associadas a manipulação do ciclo estral e, por conseguinte, o momento da ovulação, permitem a obtenção de proles com maior potencial produtivo, o planejamento e concentração dos partos em períodos favoráveis e a retomada da ciclicidade (SÁ FILHO et al., 2013). Tendo em vista potencializar os índices produtivos, o aprimoramento da sincronia entre o momento da ovulação e a inseminação artificial é um gargalo a ser estudado.

Sabe-se que a ovulação é um processo inflamatório que envolve a síntese de prostaglandinas E (PGE) e PGF2α pré-ovulação, sendo a PGE2 considerada o principal mediador (BERISHA et al., 2019). Um aumento expressivo dessas prostaglandinas é observado no fluido folicular, 18h após a aplicação do GnRH, sendo que o pico ocorre 24h pós GnRH, com 484.21 ng/mL de PGE e 101.01 ng/mL de PGF (BERISHA et al., 2019). A biossíntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico pode ser inibida pela ação de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que atuam bloqueando a ação das cicloxygenases (COX) (SIMMONS et al., 2004). Os AINES são amplamente utilizados em medicina veterinária, na clínica médica e na aplicação de biotécnicas reprodutivas, devido sua ação anti-inflamatória e analgésica (MORAES et al. 2020).

A flunixinameglumina (FM) é um AINE inibidor não seletivo da COX-1 e COX-2 e induz a diminuição nos níveis de PGE no folículo (FONSECA et al., 2017; VERNUNFT et al., 2022). Em vacas, a ovulação somente é bloqueada pelo FM quando realizada a injeção intrafolicular (IIF) 16h após a aplicação do GnRH, previamente ao aumento da expressão das enzimas COX (VERNUNFT et al., 2022). Dessa forma, sabendo da fundamentalidade das prostaglandinas para a ovulação, o estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar se a IIF de PGE ou PGE+PGF é capaz de reverter o bloqueio ovulatório provocado pelo FM.

2. METODOLOGIA

Os procedimentos foram autorizados pela CEUA UFPel (006185/2023-19). Dezesseis fêmeas cíclicas, não gestantes e não lactantes tiveram uma nova onda folicular induzida por protocolo hormonal de sincronização de estro, com uso de

dispositivo intravaginal de 1g progesterona (DIV-P4) durante nove dias, administração de 2mg de benzoato de estradiol e 0,52mg de cloprosteno sódico no D0 e outra administração sete dias depois. Por fim, o análogo de GnRH (25 µg de lecirelina) foi aplicado 20h após a retirada do DIV-P4 e neste momento, foram eleitas apenas as fêmeas que apresentavam folículo pré-ovulatório maior do que 10mm. Dezenas horas após (Vernunft et al., 2022) foi realizada a IIF do tratamento estabelecido de acordo ao grupo: Grupo FM (n=5), que recebeu a IIF de 50000ng/mL de FM; grupo FM+PGE (n=7), que recebeu IIF 50000ng/mL de FM e 500ng/mL de PGE e; grupo FM+PGE+PGF (n=4), que recebeu IIF de 50000ng/mL de FM, 500ng/mL de PGE e 100ng/mL de PGF.

Apesar de Vernunft et al. (2022) terem obtido 100% de bloqueio da ovulação com a IIF de 338µM de FM, o mesmo resultado não foi obtido quando testado em outro estudo do nosso grupo (66,6% das ovulações bloqueadas). Assim, preparou-se uma solução de FM cinco vezes mais concentrada ($1690\mu M = 0,5\text{mg/mL}$; 0,121mL de Banamine®, 50mg/mL, MSD, em 20mL de solução fisiológica), cuja aplicação foi de acordo com volume folicular, de forma que o menor folículo (10mm) recebeu a mesma quantidade de FM que a média dos folículos injetados por Vernunft et al. (2022;17mm).

Para isso, imediatamente antes da injeção, fez-se anestesia epidural através da injeção de 5mL de lidocaína à 2% e limpeza da região perianal e vulvar, para então realizar a medição do diâmetro do folículo pré-ovulatório através de ultrassonografia, para determinação do volume folicular conforme FERREIRA et al. (2007). Os folículos foram injetados através do sistema de aspiração folicular guiado por ultrassonografia transvaginal e o volume injetado no folículo correspondeu a 10% do seu volume total. Assim, para que fossem obtidas as concentrações alvo, preparou-se soluções 10 vezes mais concentradas (MORAES et al., 2021).

O momento da ovulação foi acompanhado por ultrassonografia transretal com intervalos de 12 horas, até o D14. A taxa de ovulação foi analisada por regressão logística e o contraste foi usado para comparações entre os grupos, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avalia o efeito da administração concomitante de FM e prostaglandinas na ovulação de bovinos. Não houve diferença entre os grupos quanto à taxa de ovulação (FM: 40%, FM+PGE: 57%, FM+PGE+PGF: 25%; $p=0,56$), ou seja, a IIF de PGE ou PGE+PGF não foi capaz de reverter o efeito inibitório do FM, refutando nossa hipótese. No grupo FM+PGE, dois animais ovularam em até 34h, um em até 42h e o último em até 82h, momento da última avaliação. A única ovulação do grupo FM+PGE+PGF ocorreu 42h após a IIF, demonstrando grande variabilidade do momento da ovulação entre os animais que receberam as prostaglandinas.

No grupo FM, as ovulações (2/5) ocorreram até 34h após a administração de GnRH, conforme observado previamente em outro estudo do nosso grupo. Apesar do aumento de cinco vezes da concentração de FM, não ocorreu 100% do bloqueio da ovulação, conforme observado por Vernunft et al., (2022). Mesmo nessa condição, se as prostaglandinas fossem capazes de reverter o bloqueio da ovulação, todos os animais dos grupos FM+PGE e FM+PGE+PGF teriam ovulado.

A falha da reversão do efeito inibitório pode ser atribuída à forma pela qual o experimento foi conduzido. Tendo em vista a impossibilidade de realizar múltiplas perfurações do folículo pré-ovulatório, optou-se pela injeção dos componentes juntos. Contudo, a antecipação da aplicação das prostaglandinas, uma vez que o pico ocorre 24h pós GnRH (BERISHA et al., 2019), não foi eficaz. Em outro estudo do nosso grupo, quando foi avaliada a IIF de PGE isolada ou associada à PGF 12h após a remoção do DIV-P4, nenhum efeito foi observado sobre a ovulação (LAZZARI, et al., 2023).

Naturalmente, para que ocorra a ovulação, é necessário que ocorra o pico de GnRH seguido pelo pico do hormônio luteinizante (LH). O LH aumenta a expressão de COX e por conseguinte, a produção de PGs (BRIDGES, et al. 2005). Apesar da IIF mimetizar esse aumento de PGs, a falha na ovulação/reversão do efeito inibitório pode ser atribuída: (1) ao envolvimento de outros fatores no processo ou (2) de que apenas o pico (tempo e concentração) não seja suficiente para desencadear o processo, uma vez que a produção de PGs cresce de forma sustentada (BERISHA et al., 2019).

Com relação a outras espécies, em equinos, a simples injeção de FM intramuscular é capaz de bloquear a ovulação (CUERVO-ARANGO, et al. 2011). Ainda, a IIF de PGE+PGF foi capaz de reverter o bloqueio ovulatório (MARTÍNEZ-BOVI, et al. 2016). Porém, os autores utilizaram análogos sintéticos de prostaglandinas (PGE: dinoprostone e PGF: dinoprost), cujo efeito é potencializado, se comparado com nosso estudo, em que foram utilizadas prostaglandinas semelhantes às naturais quanto à meia vida. Além disso, em éguas foi demonstrado que a IIF de análogos sintéticos de PGE+PGF anteciparam a ovulação (AGUILAR et al., 2018).

4. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, a prostaglandina não foi efetiva em provocar a ovulação após o tratamento com FM, já que houveram animais que não ovularam nos grupos FM+PGE e FM+PGE+PGF. Novos estudos serão conduzidos com alterações nos momentos das aplicações e utilizando análogos das PGs.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, J. et al. Intrafollicular Injection of Prostaglandins in the Preovulatory Follicle of the Mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 183, 2018.
- BERISHA, B. et al. Prostaglandins In Superovulation Induced Bovine Follicles During The Preovulatory Period And Early Corpus Luteum. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 467, 2019.
- 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_{2α} in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4713-4722, 2006.
- CUERVO-ARANGO, J. and Domingo-Ortiz, R. (2011) Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinization of follicles. **Theriogenology** 75, 707-714.

FERREIRA, R. et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v. 134, n. 5, p. 713–719, nov. 2007.

MARTÍNEZ- BOVÍ, R.; CUERVO- ARANGO, J. Intrafollicular treatment with prostaglandins PGE2 and PGF2 α inhibits the formation of luteinised unruptured follicles and restores normal ovulation in mares treated with flunixin- meglumine. **Equine veterinary journal**, v. 48, n. 2, p. 211-217, 2016.

MORAES, F. P. **Estrógeno e prostaglandina f2 alfa no controle de funções reprodutivas em fêmeas bovinas**. 2020. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

MORAES, F. P. Regulação e função da prostaglandina F2 $\ddot{\gamma}$ durante a ovulação e luteinização em vacas. **Teriogenologia** 2021; 171: 30–37.

SÁ FILHO, M. F.; PENTEADO, L.; REIS, E. L.; REIS, T. A. N. P. S.; GALVÃO, K. N.; BARUSELLI, P. S. Timed artificial insemination early in the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. **Theriogenology**, v.79, n.4, p.625-32, 2013.

VERNUNFT, A. et al. Effects of different cyclooxygenase inhibitors on prostaglandin E₂ production, steroidogenesis and ovulation of bovine preovulatory follicles. **Journal of Reproduction and Development**, v. 68, n. 4, p. 246–253, 1 jan. 2022.