

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Estrógeno e prostaglandina F2 alfa no controle de funções reprodutivas em
fêmeas bovinas**

Fabiane Pereira de Moraes

Pelotas, 2020

Fabiane Pereira de Moraes

**Estrógeno e prostaglandina F2 alfa no controle de funções reprodutivas em
fêmeas bovinas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Bernardo Garziera Gasperin

Coorientador: Arnaldo Diniz Vieira

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M827e Moraes, Fabiane Pereira de

Estrógeno e prostaglandina F2 alfa no controle de funções reprodutivas em fêmeas bovinas / Fabiane Pereira de Moraes ; Bernardo Garziera Gasperin, orientador ; Arnaldo Diniz Vieira, coorientador. — Pelotas, 2020.

63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Estrógenos. 2. Enfermidades uterinas. 3. Prostaglandinas. 4. Processo ovulatório. 5. AINE. I. Gasperin, Bernardo Garziera, orient. II. Vieira, Arnaldo Diniz, coorient. III. Título.

CDD : 636.208982

Fabiane Pereira de Moraes

**Estrógeno e prostaglandina F2 alfa no controle de funções reprodutivas em
fêmeas bovinas**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/02/2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Monique Tomazele Rovani
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Rafael da Rosa Ulguim
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Todo dia é dia de agradecer e quando se termina um ciclo mais ainda...

Agradeço a Deus, por me fortalecer e me amparar em todos os momentos desta caminhada. Sei que sempre estás comigo! Obrigada por tanto!

A ti meu anjo de luz, Miguel, a quem dedico todo meu amor e todos os meus dias, a quem agradeço por em um curto período ter me ensinado tanto sobre força e vida! És minha motivação, minha luz! Te amo além desta vida!

Aos meus pais, José Miguel e Marilena, por sempre torcerem por mim, a torcida mais verdadeira que alguém pode ter! Meus exemplos de honestidade e luta! À minha irmã, Josiane, que sempre acreditou em mim e me incentivou!

Ao meu namorado, Mozer, por todo companheirismo, amor, carinho, cuidado e paciência, por escutar minhas intermináveis leituras em voz alta e estar sempre pronto a me ajudar!

Aos meus “amigos de fé” Cristina, Vanessa, Sol e Charles, que sempre estiveram comigo nas alegrias e tristezas, em especial a Cris que me incentivou e auxiliou na inscrição do mestrado. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Ao meu orientador, Bernardo, por toda parceria, orientação, por estar sempre disposto a de fato orientar, auxiliar, ensinar... Muito obrigada pela oportunidade, paciência e exemplo!

Aos professores Arnaldo, Rafael e Thomaz, que sempre estiveram presentes, ajudando e prontos para transmitir conhecimento. Em especial ao meu coorientador Prof. Arnaldo, por todos os ensinamentos, ajudas e por instigar pensamentos críticos. Muito obrigada!

Aos colaboradores do ReproPel, pelo convívio diário, ajuda, risadas e parceria. Em especial, aos que ajudaram no meu experimento: Arnaldo, Bernardo, Camila, Gustavo e Jéssica! E a “carioca” que me auxiliou nos *abstracts* deste documento! Obrigada por tudo!

À EMBRAPA, pela disponibilidade dos animais para realização dos experimentos que fazem parte deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; código de financiamento 001) pela bolsa de mestrado e aos órgãos de fomento CNPq e FAPERGS, sem os quais não seria possível fazer pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Veterinária (PPGV-UFPel), a Faculdade de Veterinária (FaVet-UFPel) e a Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de aprender um pouco mais!

E por fim, meu muito obrigada aos seres que despertaram em mim o amor pela Medicina Veterinária: aos animais, meu respeito, dedicação e afeto!

Muito obrigada!

Resumo

DE MORAES, Fabiane Pereira. **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.

A eficiência reprodutiva repercute sobre a produtividade e lucratividade da bovinocultura e pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles os transtornos uterinos e a eficiência na manipulação do ciclo estral e ovulação. No primeiro estudo, objetivou-se revisar e discutir aspectos relacionados à exposição ao estrógeno para prevenção ou terapia de transtornos reprodutivos, com foco no ambiente uterino. Com base nesta revisão, foi possível concluir que o estrógeno possui importante papel no ambiente uterino, porém, quando utilizado em doses isoladas, não se observou efeitos benéficos na terapia ou profilaxia de enfermidades uterinas. Entretanto, quando vacas repetidoras de serviço foram submetidas à exposição prolongada ao estrógeno, em protocolos de indução artificial a lactação, observou-se efeitos benéficos sobre o desempenho reprodutivo desses animais, tornando importante investigar de maneira controlada o efeito do estrógeno sobre a fertilidade. Posteriormente, sabendo que a manipulação do ciclo estral e indução da ovulação é indispensável para o uso de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), já foi demonstrado que a prostaglandina F2 α (PGF) é importante no processo ovulatório, porém seu mecanismo de ação ainda não foi elucidado, tornando justificável a validação de um modelo *in vivo* para o estudo da função das prostaglandinas na ovulação. Neste sentido, no segundo estudo buscou-se avaliar o efeito do anti-inflamatório não esteroidal (AINE) flunixinina meglumina (FM; 2,2 mg/Kg), inibidor de cicloxigenases, sobre as concentrações de PGF e seu metabólito (13,14-di-hidro-15-ceto-PGF, PGFM) no fluido folicular (FF); verificar se a aplicação por via parenteral de um análogo de PGF (dinoprost trometamina; 25 mg) seria capaz de alterar as concentrações intrafoliculares de PGF e PGFM; e avaliar o efeito do AINE FM sobre a ovulação e função luteal subsequente. Para isso, vacas Jersey cíclicas (n=18) foram submetidas a um protocolo de sincronização de estro, e, após a aplicação de GnRH, foram alocadas em três grupos, de acordo com o diâmetro folicular (>11 mm) CONTROLE (n=6), não tratado; AINE FM (n=6), que recebeu uma aplicação de FM 17 h após o GnRH; e AINE FM + PGF (n=6), no qual foi administrado FM 17 h após o GnRH e PGF 23 h após GnRH. O FF foi coletado 24 h após o GnRH, sendo demonstrado maior concentração de PGFM no grupo AINE FM + PGF e maior concentração de PGF no grupo CONTROLE (P< 0,01). Para avaliar a ovulação e função luteal, vacas Jersey cíclicas (n=19) foram sincronizadas e, após a aplicação de GnRH, distribuídas em dois grupos, de acordo com o diâmetro folicular (>11 mm): CONTROLE (n=10), não tratado; e AINE FM (n=9), submetido a uma dose de FM 17 h após o GnRH. Os folículos foram acompanhados até 42 h após o GnRH e a coleta de sangue para dosagem de

progesterona foi realizada cinco dias após o GnRH, todos os animais do controle e seis animais do AINE FM ovularam até 42 h após GnRH e as concentrações de progesterona sérica não diferiram entre os grupos ($P>0,05$). Com base nos nossos achados, é possível concluir que a FM foi capaz de inibir a síntese de PGF no interior do folículo e que a aplicação parenteral de PGF não alterou as concentrações intrafoliculares de PGF. A administração de uma dose de FM na fase final do processo ovulatório não afetou a ovulação e a síntese de progesterona pelo corpo lúteo subsequente. Por outro lado, é necessário testar outros AINEs para estabelecer um modelo de inibição da ovulação por via sistêmica para o estudo da função das prostaglandinas neste processo na espécie bovina.

Palavras-chave: estrógenos, enfermidades uterinas, prostaglandinas, processo ovulatório, AINE.

Abstract

DE MORAES, Fabiane Pereira. **Estrogen and prostaglandin f2 alpha in the control of reproductive functions in bovine females**. 2020. 63f. Dissertation (Master's degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

The reproductive efficiency has repercussion on productivity and profitability of cattle industry and can be influenced by several factors, as uterine disorders and the efficiency of estrous cycle manipulation and ovulation. In the first study, we reviewed and discussed the aspects regarding the estrogen exposure to prevent or treat reproductive disorders, focusing on the uterine environment. Based on this review, we concluded that the estrogen has an important role in the uterine environment; nevertheless, it did not exhibit beneficial effects to treat or prevent uterine disorders when used in isolated doses. However, when repeat breeding cows were submitted to estrogen of long exposure in protocols of artificial induction of lactation, we observed beneficial effects on reproductive performance in these animals, being important to investigate, in a controlled manner, the effect of estrogen on fertility. Subsequently, given that the manipulation of estrous cycle and ovulation induction are essential to the Fixed-Time Artificial Insemination protocols (FTAI), it was demonstrated that the prostaglandin F₂ α (PGF) is important in the ovulation process, though the precise mechanism of action has not been elucidated, making the validation of an in vivo model for studying the function of prostaglandins in ovulation considerable. In this respect, in the second study we aimed to: assess the effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) Flunixin Meglumine (FM; 2,2 mg/Kg), a cyclooxygenase inhibitor, on the concentrations of PGF and its metabolite (13,14-di-hydro-15-ceto-PGF, PGFM) in the follicular fluid; to confirm whether the parenteral administration of PGF analogous (dinoprost tromethamine; 25 mg) would be able to alter the intra-follicular concentrations of PGF and PGFM; and to assess the effect of the NSAID FM on ovulation and subsequent luteal function. For that, cyclical Jersey cows (n = 18) were submitted to an estrus synchronization protocol, and, after the application of GnRH, were allocated in three groups, according to the follicular diameter (>11 mm): CONTROL (n = 6), untreated; NSAID FM (n = 6), who received an FM application 17 h after GnRH; and NSAID FM + PGF (n = 6), in which FM was administered 17 h after GnRH and PGF 23 h after GnRH. The FF was collected 24 h after GnRH, with a higher concentration of PGFM in the NSAID FM + PGF group and a higher concentration of PGF in the CONTROL group (P <0.01). To assess ovulation and luteal function, cyclical Jersey cows (n = 19) were synchronized and, after the application of GnRH, distributed into two groups, according to the follicular diameter (>11 mm): CONTROL (n = 10), untreated; and NSAID FM (n = 9), submitted to a dose of FM 17 h after GnRH. Follicles were followed up to 42 h after GnRH and blood collection for progesterone measurement was performed five days

after GnRH, all control animals and six animals of the NSAID FM ovulated up to 42 h after GnRH and serum progesterone concentrations did not differ between groups ($P > 0.05$). Based on our findings, it is possible to conclude that the FM inhibited PGF synthesis within the follicle and the parenteral administration of PGF did not alter the intra-follicular concentrations of PGF. The administration of a single dose of FM in the final phase of the ovulatory process did not affect the ovulation and the subsequent synthesis of progesterone by the corpus luteum. On the other hand, it is necessary to test other NSAIDs to establish a systemic model of ovulation inhibition in order to investigate the function of prostaglandins in this process.

Key-words: estrogens, uterine disorders, prostaglandins, ovulatory process, NSAID.

Lista de Figuras

- Figura 1 Concentração do metabólito da $PGF2\alpha$ (13,14-di-hidro-15-ceto- $PGF2\alpha$ -PGFM) (A) e $PGF2\alpha$ (PGF) (B) no fluído folicular de vacas do grupo controle (CONT) (n=6), grupo tratado com 2,2 mg/Kg de anti-inflamatório não esteroideal flunixinina meglumina 17 h após o GnRH (AINE FM) (n=6) e grupo tratado com 2,2 mg/Kg de anti-inflamatório não esteroideal flunixinina meglumina 17 h após o GnRH e 25 mg de PGF (dinoprost trometamina), por via intramuscular, 23 h após o GnRH (AINE FM + PGF) (n=6)..... 54
- Figura 2 Associação entre as concentrações de P4 e PGF no fluído folicular..... 55

Lista de Tabelas

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Momento da ovulação em vacas tratadas ou não com 2,2 mg/Kg de anti-inflamatório não esteroideal flunixinina meglumina (AINE FM) 17 h após indução da ovulação com GnRH..... | 53 |
|----------|---|----|

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|------|--|
| ACTH | Hormônio adrenocorticotrófico |
| AINE | Anti-inflamatório não esteroidal |
| BE | Benzoato de estradiol |
| BMP7 | Proteína morfogenética óssea 7 |
| CL | Corpo lúteo |
| COX | Ciclooxigenases |
| CTGF | Fator de crescimento de tecido conjuntivo |
| DIV | Dispositivo intravaginal |
| DVP | Descarga vaginal purulenta |
| E2 | Estrógeno |
| ECP | Cipionato de estradiol |
| EGF | Fator de crescimento epidermal |
| FM | Flunixinina meglumina |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofinas |
| hCG | Gonadotrofina coriônica equina |
| I.M. | Intramuscular |
| IA | Inseminação artificial |
| IAL | Indução artificial de lactação |
| IATF | Inseminação artificial em tempo fixo |
| IGF2 | Fator de crescimento semelhante a insulina 2 |
| IL16 | Interleucina 16 |
| IL33 | Interleucina 33 |
| Kg | Quilogramas |
| mg | Miligramas |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |

| | |
|-------|---|
| µg | Microgramas |
| ng | Nanogramas |
| P4 | Progesterona |
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| PGF | Prostaglandina F2 α |
| PGFM | Metabólito da prostaglandina F2 α (13,14-di-hidro-15-ceto-PGF) |
| SFRP2 | <i>Secreted frizzled related protein 2</i> |
| WIF1 | <i>Wnt inhibitory factor 1</i> |

Lista de Símbolos

| | |
|--------|----------------|
| \geq | Maior ou igual |
| © | Copyright |
| % | Porcentagem |
| °C | Grau Celsius |

Sumário

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 1 Introdução..... | 17 |
| 2 Objetivos..... | 19 |
| 2.1 Objetivo geral | 19 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 19 |
| 3 Artigos..... | 20 |
| 3.1 Artigo 1..... | 20 |
| 3.2 Artigo 2..... | 35 |
| 4 Considerações Finais..... | 56 |
| Referências..... | 57 |
| Anexos..... | 64 |

1 Introdução

A produção pecuária é de grande importância para a economia brasileira, o que enfatiza a notoriedade dessa atividade e seu elevado potencial de expansão. O Brasil possui o maior rebanho comercial, é o maior exportador de carne bovina do mundo e ocupa a terceira posição no *ranking* mundial de produção de leite, porém ainda com baixa produtividade por animal (Abiec, 2019; Embrapa, 2019). Desta forma, visando aumentar a eficiência da bovinocultura é essencial a utilização de programas reprodutivos, que visem melhorar o desempenho reprodutivo e conseqüentemente a lucratividade dos sistemas de produção. Nesse sentido encontram-se os protocolos hormonais, que visam controlar o ciclo estral das fêmeas e difundir o uso de biotécnicas da reprodução.

À medida que se intensifica a bovinocultura, ocorre o aparecimento de problemas reprodutivos relacionados a fertilidade. Dentre eles, destacam-se os transtornos uterinos, que ocasionam muitos prejuízos dentro dos rebanhos e possuem terapias bastante controversas. O estrógeno possui ações no ambiente uterino que refletem na sua estrutura, imunidade e funcionalidade, e devido ao seu importante papel no mecanismo de defesa hormonal do órgão, diversos estudos testaram o uso do estrógeno, em doses isoladas, na terapia e ou profilaxia de transtornos uterinos, porém não observaram efeitos benéficos (Sheldon e Noakes, 1998; Wagner et al., 2001; Overton et al., 2003; Sheldon et al., 2004). Entretanto, quando utilizadas repetidas doses de estrógeno em protocolos de indução artificial da lactação, foram observados efeitos positivos sobre o desempenho reprodutivo de vacas repetidoras de serviço (Collier et al., 1975; Mellado et al., 2007; Freitas et al., 2010). Esses achados corroboram com a hipótese de que o estrógeno, quando utilizado em doses repetidas, auxilia na terapia de transtornos reprodutivos, porém não existem estudos que evidenciem os mecanismos pelos quais vacas submetidas a exposição prolongada retomam a fertilidade e torna-se necessário aprofundar os conhecimentos nesse sentido.

Com o intuito de se expandir o uso de biotécnicas reprodutivas, como a IATF, e melhorar os índices reprodutivos, é indispensável o uso de hormônios indutores da ovulação. Como revisado por Bó et al. (2016), atualmente encontram-se disponíveis o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e os estrógenos (E2), sendo que os últimos apresentam melhor relação custo-benefício; entretanto, existe uma preocupação com os possíveis efeitos dos seus resíduos na saúde do consumidor, o que restringe seu uso em muitos países (Lane et al., 2008). Com base nisso, torna-se relevante a busca por novas alternativas de indutores de ovulação. Alguns estudos já testaram o uso de prostaglandina F_{2α} (PGF) e observaram que ela foi capaz de induzir a ovulação de forma sincronizada em fêmeas bovinas (Leonardi et al., 2012; Pfeifer et al., 2014; Castro et al., 2018; Pfeifer et al., 2018), porém seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. Assim, é essencial o estabelecimento de um modelo *in vivo* para investigar a ação das prostaglandinas no processo ovulatório na espécie bovina.

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 cicloxigenases (Simmons et al., 2004). Os AINES são amplamente utilizados em medicina veterinária, na clínica médica e também na aplicação de biotécnicas reprodutivas, devido sua ação anti-inflamatória e analgésica. Na medicina humana, são utilizados AINES para o tratamento de inflamações crônicas, como a endometriose, e também em casos de dismenorreia (revisado por Ferrero et al., 2018). Vários estudos já comprovaram seus efeitos sobre a inibição da ovulação (Murdoch e Dunn, 1983; De Silva e Reeves, 1985; Cuervo-Arango e Domingo-Ortiz, 2011) e até mesmo a redução de índices reprodutivos após tratamento com AINE antes da ovulação (Fonseca et al., 2017) em diferentes espécies animais. Com base neste conhecimento, se torna necessário estudar sua ação sobre a síntese de prostaglandinas no processo ovulatório e, desta maneira, esclarecer a atuação das prostaglandinas na ovulação. O entendimento dos mecanismos associados com a indução e inibição da ovulação é fundamental para que possamos avançar nas biotécnicas da reprodução e contracepção.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Revisar o uso de terapias a base de estrógeno para o tratamento de enfermidades uterinas e estudar a importância das prostaglandinas no processo ovulatório.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Estudar aspectos relacionados a exposição ao estrógeno para prevenção ou terapia de transtornos reprodutivos, com foco no ambiente uterino;
- 2) Validar um modelo *in vivo* para o estudo das prostaglandinas no processo ovulatório;
- 3) Avaliar o efeito do anti-inflamatório não esteroideal (AINE) flunixinina meglumina (FM) sobre as concentrações de PGF e do metabólito da PGF (13,14-di-hidro-15-ceto-PGF, PGFM) no fluído folicular;
- 4) Verificar se a aplicação por via parenteral de um análogo de PGF (dinoprost trometamina) é capaz de alterar as concentrações intrafoliculares de PGF e PGFM;
- 5) Avaliar o efeito do AINE FM sobre a ovulação e síntese de progesterona luteal.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Efeito do estrógeno no ambiente uterino de fêmeas bovinas: Revisão

Fabiane Pereira de Moraes, Arnaldo Diniz Vieira, Bernardo Garziera Gasperin

Publicado na Revista Brasileira de Reprodução Animal

Efeito do estrógeno no ambiente uterino de fêmeas bovinas: revisão

Effect of estrogen on the uterine environment of bovine females: review

F.P. Moraes¹, A.D. Vieira¹, B.G. Gasperin^{1*}

¹Universidade Federal de Pelotas, Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal (ReproPEL), Capão do Leão, RS, Brasil.

*Correspondência: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Campus Universitário S/Nº, 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil. (53) 3275 7189. E-mail:

bggasperin@gmail.com

Resumo

A eficiência reprodutiva na bovinocultura é essencial para a produtividade e lucratividade do sistema. O ambiente uterino tem importância fundamental para o estabelecimento e manutenção da gestação em diferentes espécies e pode ser influenciado pela ação de diversos hormônios. Sabe-se que as concentrações fisiológicas de estrógeno possuem efeito sobre a imunidade, estrutura e funcionalidade uterina. Alguns autores utilizaram administrações de estrógeno, em doses isoladas, como profilaxia ou terapia em casos de infertilidade, entretanto, não foram observados efeitos benéficos ou até mesmo houve um aumento da contaminação bacteriana. Porém, outros estudos que utilizaram repetidas doses de estrógeno demonstraram efeitos positivos no desempenho reprodutivo em vacas repetidoras. Ainda, protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com suplementação de estrógeno ou com período prolongado de proestro têm possibilitado maiores taxas de prenhez e menos perdas gestacionais. Com base nisso, se faz necessário a realização de pesquisas que abordem o efeito do estrógeno sobre a fertilidade em condições controladas. O objetivo desta revisão é discutir aspectos relacionados a exposição ao estrógeno para prevenção ou terapia de transtornos reprodutivos com foco no ambiente uterino.

Palavras-chave: eficiência reprodutiva, útero, estradiol, terapia hormonal

Abstract

Reproductive efficiency in cattle is essential for the productivity and profitability of the system. The uterine environment has a fundamental importance for pregnancy establishment and maintenance in different species and can be influenced by the action of several hormones. It is well established that physiological concentrations of estrogen have effect on the uterine immunity, structure and functionality. Some authors evaluated estrogen administration, in single doses, for prophylaxis or therapy of infertility; however, no beneficial effects were observed, and, in some cases, there was an increase in bacterial contamination. Conversely, other studies using repeated doses of estrogen demonstrated positive effects on reproductive performance in repeat breeder cows. Furthermore, timed-artificial insemination (TAI) protocols using estrogen or with prolonged proestrus are associated with increased pregnancy rates and seem to prevent pregnancy losses. Based on this, it is necessary to perform studies evaluating the effect of estrogen on fertility under controlled conditions. The objective of this review is to discuss aspects related to the exposure to estrogens to prevent or overcome reproductive disorders focusing on the uterine environment.

Keywords: *reproductive efficiency, uterus, estradiol, hormone therapy*

Introdução

O bom desempenho reprodutivo em bovinos de corte e leite é essencial para garantir uma produção eficiente e lucratividade satisfatória (Baruselli et al., 2012; Remnant et al., 2018). Neste sentido, um ambiente uterino apropriado é fundamental para viabilizar a fertilização, o estabelecimento e a manutenção da gestação em todas as espécies de mamíferos (Atkins et al., 2013). No caso de rebanhos leiteiros, os problemas reprodutivos estão entre os motivos mais relevantes para determinar o descarte precoce dos animais (Silva et al., 2005).

O útero é influenciado pela ação de diferentes hormônios de acordo com a fase do ciclo estral, sendo que os estrógenos possuem um papel importante no mecanismo de defesa hormonal deste órgão. Segundo Dhaliwal et al. (2001), durante a fase estrogênica do ciclo estral ocorre um aumento do fluxo sanguíneo e da atividade dos polimorfonucleares no trato reprodutivo, contrações miométrais e produção de muco cervical. Ainda, as concentrações séricas de estradiol antes do momento da ovulação promovem uma regulação no ambiente uterino em diferentes espécies (Groothuis et al., 2007), possuindo importante papel na fertilidade. Todas estas alterações são necessárias para proteger o ambiente uterino, uma vez que, durante a cópula, diversos contaminantes são introduzidos no trato reprodutivo da fêmea. Conforme revisado por Hawk et al. (1983) as concentrações pré-ovulatórias de estrógeno influenciam no transporte, motilidade e longevidade espermática, assim como na sobrevivência embrionária. Além da relevância do estrógeno em diversos eventos reprodutivos, alguns estudos investigaram um potencial efeito terapêutico em casos de infertilidade. Entretanto, não há um consenso sobre a indicação, mecanismo de ação e eficácia destes tratamentos. Portanto, o objetivo da presente revisão é discutir aspectos relacionados ao uso de estrógenos para o tratamento de transtornos reprodutivos com foco no ambiente uterino.

Estrógenos na terapia da infertilidade: ambiente uterino

As enfermidades uterinas associadas a infecção após a cópula ou ocasionadas após o parto são semelhantes em mamíferos. Infecções sexualmente transmissíveis são comuns em humanos e são causas de infertilidade ou, quando desenvolvidas durante a gravidez, podem ocasionar partos prematuros e abortos. A alta incidência de doença uterina em bovinos e a maior disponibilidade desses animais para pesquisas, torna a espécie um bom modelo para estudar os efeitos das infecções por microrganismos na função uterina e na resposta imune (Herath et al., 2006), possibilitando o desenvolvimento de novas terapias para humanos e

animais.

Devido às profundas modificações causadas pelo estrógeno no ambiente uterino, sendo muitas delas relacionadas à mecanismos de defesa e “limpeza”, alguns estudos avaliaram o efeito da suplementação de estrógeno exógeno na profilaxia e tratamento de distúrbios uterinos. Carson et al. (1988) avaliaram vacas ovariectomizadas tratadas com progesterona, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) ou estradiol frente a infecção uterina experimental com *Corynebacterium pyogenes* e observaram maior capacidade de resistência e recuperação do ambiente uterino quando este estava sob efeito do estradiol, sendo que nenhum dos animais tratados com estrógeno desenvolveu doença uterina. Estes dados confirmam a hipótese de que o estrógeno tem um papel essencial na proteção do útero frente à contaminantes exógenos, uma vez que estimula a produção de muco cervical e promove a contração das fibras musculares do miométrio. Um estudo conduzido por Heidari et al. (2016), indicou que maiores concentrações de estradiol em relação a progesterona no fluido folicular de vacas com cisto reduziram significativamente o número e a diversidade de bactérias uterinas, demonstrando uma relação entre o estado hormonal do fluido folicular e o número de espécies bacterianas no útero. Da mesma forma, o ambiente uterino também pode influenciar o ambiente ovariano, uma vez que Green et al. (2011) demonstraram que a endometrite subclínica em bovinos leiteiros no pós-parto altera as concentrações foliculares de estradiol a longo prazo, quando comparadas às concentrações em animais saudáveis com tamanhos de folículos idênticos.

Silper et al. (2016) analisaram a concentração plasmática de estradiol no momento da realização de exames para o diagnóstico de distúrbios uterinos. Foram avaliadas a presença de descarga vaginal purulenta (DVP), citologia uterina e a ultrassonografia para avaliação da estrutura anatômica do órgão, assim como a presença/ausência de conteúdo uterino. Vacas com concentrações plasmáticas superiores a 2 pg/mL de estradiol tiveram maior prevalência

de DVP e maior probabilidade de serem diagnosticadas como portadoras de alguma patologia uterina.

Quanto à terapia dos distúrbios puerperais, Overton et al. (2003) avaliaram o efeito da profilaxia com cipionato de estradiol (ECP) em vacas leiteiras com alto risco de metrite e concluíram que a administração de 4 mg de ECP (2 mL; dose única) no período de 24 a 36 h após o parto não diminuiu a ocorrência e a severidade de metrite nos primeiros 10 dias pós-parto. Estes achados corroboram com os de Sheldon e Noakes (1998) que compararam a injeção intramuscular (IM) de 3 mg de benzoato de estradiol (BE; dose única), cloprostenol (500 µg; parenteral) e infusão intrauterina de oxitetraciclina hidrocloreídrica (1500 mg) como formas de tratamento para endometrite bovina, porém não observaram diferença entre os tratamentos quanto à resolução clínica dos casos. Em outro estudo, Wagner et al. (2001) avaliaram os efeitos da administração de 4 mg de ECP, em dose única, 24 h após o parto sobre parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras (intervalo até a primeira IA, percentual de vacas não gestantes após primeira IA e intervalo parto-concepção), porém, não houve efeito positivo do uso do ECP em relação ao controle.

Sheldon et al. (2004) testaram, em vacas leiteiras, a administração intrauterina de estradiol (10 mg de BE), no corno uterino anteriormente gravídico, nos dias 7 e 10 pós-parto e observaram um aumento da contaminação bacteriana, especificamente por bactérias anaeróbicas. Risco e Hernandez (2003) compararam a administração de cloridrato de ceftiofur ou ECP (4 mg, IM, dose única) em vacas leiteiras com retenção de placenta quanto ao efeito sobre a prevenção de metrite e desempenho reprodutivo. Os resultados demonstraram maior percentual de metrite no grupo tratado com estradiol, não sendo observado efeito benéfico sobre o desempenho reprodutivo dos animais. Cabe ressaltar que, nos referidos estudos, apenas uma aplicação de estrógeno foi realizada e, embora o ECP possua uma longa meia-vida, é possível que aplicações repetidas possam induzir diferentes efeitos.

Conforme revisado por Pestano et al. (2015), alguns estudos, embora menos controlados, demonstraram que uma proporção significativa de vacas repetidoras de serviço, quando submetidas a protocolos de indução artificial de lactação (IAL), voltam a conceber, sugerindo um possível efeito da exposição prolongada ao estrógeno na fertilidade. Em um dos estudos, vacas não gestantes após várias inseminações foram submetidas a protocolos de IAL (0,075 mg/Kg de ECP durante sete dias ou 0,071 mg/Kg de BE durante 14 dias), resultando na presença de cistos ovarianos. Estes animais foram então tratados e, após o retorno da atividade ovariana fisiológica, foram inseminados, sendo obtida uma taxa de prenhez de 41,4% (Freitas et al., 2010). Collier et al. (1975) também utilizaram protocolo de indução de lactação (BE, 0,1 mg/Kg, durante sete dias) em vacas com problemas reprodutivos e obtiveram 56% de prenhez, sem o emprego de nenhum outro procedimento para melhorar o desempenho reprodutivo. Embora estes dados sejam muito positivos, não é possível afirmar que são exclusivamente decorrentes da exposição ao estrógeno, uma vez que uma série de outros hormônios são utilizados nos protocolos de indução de lactação, e pelo fato de que as vacas submetidas aos protocolos normalmente sofrem drásticas mudanças metabólicas, nutricionais e imunológicas.

Em um estudo conduzido por Curcio et al. (2017) em éguas, foram comparados tratamentos para placentite experimentalmente induzida. As terapias foram baseadas em um protocolo usual recomendado para o tratamento de placentite a base de antibiótico e anti-inflamatório associados ou não, à progesterona de longa ação, ECP ou ambos. O grupo que recebeu terapia associada a três administrações de ECP (10 mg/animal), com intervalo de três dias entre os tratamentos, a partir de 48 h após a infecção experimental, obteve melhores resultados. Nas éguas tratadas com estrógeno foi observada maior duração da gestação e potros mais saudáveis, não sendo obtido nenhum potro de alto risco. Esses achados corroboram com a hipótese de que o estrógeno, quando utilizado em doses repetidas, auxilia

na terapia de transtornos reprodutivos. Portanto, o efeito da exposição ao estrógeno sobre a fertilidade necessita ser investigado em condições controladas.

Efeitos celulares e moleculares do estrógeno

Além da influência do estrógeno no mecanismo de proteção uterina, relacionado ao tratamento e/ou profilaxia de enfermidades, dados encontrados na literatura demonstram efeitos celulares e moleculares deste hormônio esteroide. Sabe-se que as concentrações de estrógeno no tecido endometrial são muito superiores às plasmáticas. Porém, o endométrio não é capaz de sintetizar estrógeno devido à ausência da enzima aromatase e, portanto, acredita-se que as elevadas concentrações sejam decorrente da retenção do estradiol da circulação sanguínea (Mann et al., 2007). O padrão de expressão de receptores α para estrógeno é influenciado pelas fases do ciclo estral e, conseqüentemente, pelas concentrações de estrógeno, demonstrando maior expressão durante o período de estro e fase luteal média (Robinson et al., 2001).

Após ligação aos seus receptores, o estrógeno atua regulando a expressão de uma série de proteínas e genes no ambiente uterino. Ulbrich et al. (2009) demonstraram que a SERPINA14, que possui ação na preparação do útero antes da fertilização, tem a sua expressão regulada positivamente pelo estrógeno nas glândulas endometriais durante o estro. O estradiol também induz a expressão de genes potencialmente envolvidos no desenvolvimento embrionário, tais como o gene da proteína morfogenética óssea 7 (*BMP7*), de quimiocinas (*CCL14*, *CCL21*, *CCL26*, *CXCL12*), do fator de crescimento de tecido conjuntivo (*CTGF*), do fator de crescimento semelhante a insulina 2 (*IGF2*), de interleucinas (*IL16*, *IL33*), *secreted frizzled related protein 2* (*SFRP2*), e do *Wnt inhibitory factor 1* (*WIF1*), um inibidor de WNT, importante molécula de sinalização (Tríbulo et al., 2018). Cabe ressaltar que os referidos estudos apenas associaram a expressão gênica do endométrio ao perfil endócrino durante o estro, ou seja, não é possível atribuir a regulação dos genes citados

apenas às concentrações de estrógeno. Ao nosso conhecimento, não há nenhum estudo avaliando o efeito do tratamento com estrógeno sobre a expressão gênica endometrial em bovinos.

Em um estudo realizado com ovelhas ovariectomizadas, Reynolds et al. (1998) demonstraram que as fêmeas submetidas ao tratamento com dois implantes subcutâneos de liberação controlada de estradiol (50 mg de estradiol) apresentaram maior crescimento uterino, ocasionado pelo aumento do número e tamanho das células, e também aumento no volume microvascular endometrial total. Sugiura et al. (2018) compararam a espessura endometrial em vacas leiteiras pós-parto com estro natural ou induzido (protocolo baseado em progesterona e prostaglandina), e observaram que animais com estro induzido tiveram maior espessura do endométrio antes do momento da ovulação. O aumento da espessura, em ambos os grupos, foi observado quando as concentrações de progesterona diminuíram e em seguida houve um aumento das concentrações de estradiol, sugerindo um efeito do estradiol sobre a regulação da espessura endometrial. Outro estudo recente demonstrou que vacas leiteiras submetidas a uma administração de 10 mg de BE intramuscular no pós-parto, avaliadas com ultrassom Doppler colorido, apresentaram aumento do volume e da velocidade do fluxo sanguíneo e também no diâmetro das artérias uterinas (Rawy et al., 2018). Portanto, além das ações relacionadas à defesa local, o estrógeno atua na estrutura e funcionalidade do útero.

Em roedores e humanos o aumento das concentrações de estrógeno e da biodisponibilidade de seus receptores no ambiente uterino também resultam em crescimento endometrial (Groothuis et al., 2007). Altas concentrações de estrógeno folicular em vacas cíclicas e prenhes ou em animais ovariectomizados que foram tratados com estradiol exógeno refletiram em maiores níveis de receptores de estradiol e progesterona no endométrio (Kimmins e Maclaren, 2001).

Um dos possíveis mecanismos de atuação do estrógeno sobre o crescimento e

diferenciação celular é a regulação do fator de crescimento epidermal (EGF) do endométrio. Os níveis desse fator sofrem alterações durante o ciclo estral. Vacas férteis apresentaram dois picos de concentração de EGF, o que não foi observado em 70% das vacas repetidoras. O tratamento com estrógeno restaurou a fertilidade e o padrão de elevação do EGF, de forma similar a observada nas vacas férteis (Katagiri e Takahashi, 2006; Katagiri et al., 2013; Katagiri et al., 2016), sugerindo que a ativação do EGF é um dos mediadores dos efeitos do estrógeno.

Relação entre níveis de estrógeno e biotécnicas da reprodução

Com base nos efeitos já relatados sobre o ambiente uterino, estudos demonstram o efeito estrogênico positivo na eficiência de biotécnicas utilizadas na reprodução. Em um deles se observou que a modulação das concentrações de estradiol a partir da aplicação de ECP em protocolos de sincronização de estro altera a expressão gênica no útero de vacas de corte. A alteração na expressão de alguns genes associados à regulação da proliferação celular uterina suporta um efeito do ECP na proliferação celular e na morfologia dos tecidos. Além disso o ECP ainda é responsável pelo aumento da ocorrência de estro e melhores taxas de prenhez após IA (Sá Filho et al., 2017).

Existem evidências de que o pH uterino regula a motilidade e longevidade espermática e que o pH inadequado no momento da inseminação poderia afetar as taxas de prenhez. Vacas que receberam ECP e tiveram elevadas concentrações de estradiol pré-ovulatórias apresentaram diminuição do pH uterino, de forma semelhante a vacas que apresentaram estro naturalmente (Perry e Perry, 2008).

Motavalli et al. (2017) compararam três protocolos curtos de IATF em vacas leiteiras múltiparas, onde o primeiro grupo recebeu cloprostenol e hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o segundo grupo, cloprostenol, GnRH e progesterona e o terceiro recebeu cloprostenol, GnRH, progesterona e 2,5 mg de BE. Os resultados de taxa de prenhez

foram maiores nos grupos dois e três, porém, o grupo que recebeu estradiol obteve aproximadamente quatro vezes menos perdas gestacionais que os demais, enfatizando os efeitos do estrógeno sobre a fertilidade.

Considerações finais

Com base nos estudos citados, é bem estabelecido que o estrógeno modula o ambiente uterino. Entretanto, seu efeito profilático e/ou terapêutico sobre a infertilidade não foi observado quando foram administradas doses isoladas. A exposição a doses repetidas de estrógeno melhorou a eficiência reprodutiva de vacas repetidoras submetidas à protocolo de indução artificial da lactação, mas não é possível afirmar que esse efeito é atribuído exclusivamente a exposição ao estrógeno.

Devido a relevância da bovinocultura e a representatividade dos problemas reprodutivos, é necessária a realização de novas pesquisas, em condições controladas, que avaliem o efeito da exposição ao estrógeno sobre a fertilidade, para que então seja possível inferir sobre seus efeitos. Neste sentido, protocolos de IATF que possibilitam um maior período de proestro natural estão sendo desenvolvidos e apresentam resultados promissores.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de produtividade de B.G. Gasperin (309138/2017-5), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – Edital PRONEX 12/2014 -FAPERGS/CNPq, 16/2551-0000494-3), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001) e pela bolsa de Mestrado de F.P. Moraes.

Referências

- Atkins JA, Smith MF, Macneil MD, Jinks EM, Abreu FM, Alexander LJ, Geary TW.** Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *J Anim Sci*, v.91, n.2, p.722–733, 2013.
- Baruselli PS, Sales JNS, Sala RV, Vieira LM, Sá Filho MF.** History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim Reprod Sci*, v.9, n.3, p.139–152, 2012.
- Carson RL, Kemppainen RJ, Scanlan CM.** The effects of ovarian hormones and acth on uterine defense to *Corynebacterium pyogenes* in cows. *Theriogenology*, v.30, n.1, p.91–97, 1988.
- Collier RJ, Bauman DE, Hays RL.** Milk Production and Reproductive Performance of Cows Hormonally Induced into Lactation. *J Dairy Sci*, v.58, n.10, p.1524–1527, 1975.
- Curcio BR, Canisso IF, Pazinato FM, Borba LA, Feijo LS, Muller V, Finger IS, Toribio RE, Nogueira CEW.** Estradiol cypionate aided treatment for experimentally induced ascending placentitis in mares. *Theriogenology*, v.102, p.98-107,2017.
- Dhaliwal GS, Murray RD, Woldehiwet Z.** Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim Reprod Sci*, v.67, p.135–152, 2001.
- Freitas PRC, Coelho SG, Rabelo E, Lana AMQ, Artunduaga MAT, Saturnino HM.** Artificial induction of lactation in cattle. *R Bras Zootec*, v.39, p.2268–2272, 2010.
- Green MP, Ledgard AM, Beaumont SE, Berg MC, McNatty KP, Peterson AJ, Back PJ.** Long-term alteration of follicular steroid concentrations in relation to subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *J Anim Sci*, v.89, p.3551–3560, 2011.
- Groothuis PG, Dassen HHNM, Romano A, Punyadeera C.** Estrogen and the endometrium: Lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update*, v.13, n.4, p.405–417, 2007.
- Hawk HW.** Sperm Survival and Transport in the Female Reproductive Tract. *J Dairy Sci*,

v.66, n.12, p.2645–2660, 1983.

Heidari M, Kafi M, Khodakaram-Tafti A, Derakhshandeh A, Mirzaei A. Relationships between follicular fluid steroid concentrations and uterine infections in ovarian cystic cows. *Comp Clin Path*, v.25, n.4, p.865–870, 2016.

Herath S, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *Am J Reprod Immunol*, v.69, p.13–22, 2006.

Katagiri S, Moriyoshi M, Takahashi Y. Low Incidence of an Altered Endometrial Epidermal Growth Factor (EGF) Profile in Repeat Breeder Holstein Heifers and Differential Effect of Parity on the EGF Profile Between Fertile Holstein (Dairy) and Japanese Black (Beef) Cattle. *J Reprod Develop*, v.59, n.6, p.575–579, 2013.

Katagiri S, Moriyoshi M, Yanagawa Y. Endometrial epidermal growth factor profile and its abnormalities in dairy cows. *J Reprod Develop*, v.62, n.5, p.465–470, 2016.

Katagiri S, Takahashi Y. Potential relationship between normalization of endometrial epidermal growth factor profile and restoration of fertility in repeat breeder cows. *Anim Reprod Sci*, v.95, n.1–2, p.54–66, 2006.

Kimmins S, Maclaren LA. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta*, v.22, n.8–9, p.742–748, 2001.

Mann GE, Scholey DV, Robinson RS. Identification of elevated concentrations of estradiol in bovine uterine endometrium. *Domest Anim Endocrinol*, v.33, p.437–441, 2007.

Motavalli T, Dirandeh E, Deldar H, Colazo MG. Evaluation of shortened timed-AI protocols for resynchronization of ovulation in multiparous Holstein dairy cows. *Theriogenology*, v. 95, p.187–192, 2017.

Overton MW, Sischo WM, Reynolds JP. Evaluation of effect of estradiol cypionate administered prophylactically to postparturient dairy cows at high risk for metritis. *J Am Vet*

Med Assoc, v.223, n.6, p.846–851, 2003.

Perry GA, Perry BL. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. *Domest Anim Endocrinol*, v.34, p.333–338, 2008.

Pestano HS, Haas CS, Santos MQ, Oliveira FC, Gasperin BG. Indução artificial de lactação em bovinos: histórico e evolução. *Rev Bras Reprod Anim*, v.39, n.3, p.2268–2272, 2015.

Rawy M, Mido S, Ali HE, Derar D, Megahed G, Kitahara G, Osawa T. Effect of exogenous estradiol Benzoate on uterine blood flow in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci*, v.192, p.136–145, 2018.

Remnant JG, Green MJ, Huxley JN, Hudson CD. Associations between dairy cow inter-service interval and probability of conception. *Theriogenology*, v.114, p.324–329, 2018.

Reynolds LP, Kirsch JD, Kraft KC, Redmer DA. Time-course of the uterine response to estradiol-17beta in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors. *Biol Reprod*, v.59, n.3, p.613–620, 1998.

Risco CA, Hernandez J. Comparison of ceftiofur hydrochloride and estradiol cypionate for metritis prevention and reproductive performance in dairy cows affected with retained fetal membranes. *Theriogenology*, v.60, n.1, p.47–58, 2003.

Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, v.122, p.965-979, 2001.

Sá Filho MF, Gonella-Diaza AM, Sponchiado M, Mendanha MF, Pugliesi G, Ramos RS, Andrade SCS, Gasparin G, Coutinho LL, Goissis MD, Mesquita FS, Baruselli PS, Binelli M. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrous beef cows. *J Anim Sci Biotechno*, v.8, n.1, p.1–14, 2017.

Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Dobson H. Effect of intrauterine administration of

oestradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.81, n.1–2, p.13–23, 2004.

Sheldon IM, Noakes DE. Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Vet Rec*, v.142, p.575–579, 1998.

Silper BF, Madureira AML, Burnett TA, Fernandes ACC, Abreu FM, Veira DM, Vasconcelos JLM, Cerri RLA. Diagnosis of uterine and vaginal disorders by different methodologies is affected by concentration of estradiol in plasma from lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*, v.99, n.6, p.4795–4807, 2016.

Silva LAF, Silva EB, Silva LM. Causas de descarte de fêmeas bovinas leiteiras adultas. *Rev Bra Saúde Prod Anim*, v.5, p.9–17, 2005.

Sugiura T, Akiyoshi S, Inoue F, Yanagawa Y, Moriyoshi M, Tajima M, Katagiri S. Relationship between bovine endometrial thickness and plasma progesterone and estradiol concentrations in natural and induced estrus. *J Reprod Develop*, v.64, p.135–143, 2018.

Tríbulo P, Siqueira LGB, Oliveira LJ, Scheffler T, Hansen PJ. Identification of potential embryokines in the bovine reproductive tract. *J Dairy Sci*, v.101, p.690–704, 2018.

Ulbrich SE, Frohlich T, Schulke K, Englberger E, Waldschmitt N, Arnold GJ, Reichenbach HD, Reichenbach M, Wolf E, Meyer HHD, Bauersachs S. Evidence for Estrogen-Dependent Uterine Serpin (SERPINA14) Expression During Estrus in the Bovine Endometrial Glandular Epithelium and Lumen. *Biol Reprod*, v.81, p.795–805, 2009.

Wagner DC, Bondurant RH, Sisco WM. Reproductive effects of estradiol cypionate in postparturient dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, v.219, n.2, p.220–223, 2001

3.2 Artigo 2

Dose única de flunixin meglumina inibe a síntese intrafolicular de $PGF_{2\alpha}$ mas não afeta a ovulação em fêmeas bovinas

Fabiane Pereira de Moraes, Bernardo Garziera Gasperin

Será submetido à revista Ciência Rural

Dose única de flunixin meglumina inibe a síntese intrafolicular de PGF2 α mas não afeta a ovulação em fêmeas bovinas

A single dose of flunixin meglumine inhibits intrafollicular synthesis of PGF2 α but does not affect ovulation in cows

Fabiane Pereira de Moraes¹, Bernardo Garziera Gasperin^{1*}

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), flunixin meglumine (FM) on the concentrations of prostaglandin F2 α (PGF) and its metabolite (PGFM) in the follicular fluid (FF), and on ovulation and luteal function and in this way establish an in vivo model to study the function of prostaglandins in ovulation. Jersey cows (n = 18) had their follicular waves synchronized and, after GnRH administration, were allocated into three groups: CONTROL: untreated; NSAID FM: FM (2.2 mg / kg) 17 h after GnRH; and NSAID FM + PGF: FM 17 h after GnRH and PGF (25 mg dinoprost tromethamine), 23 h after GnRH. The FF was collected 24 h after GnRH, being observed greater concentration of PGFM in the NSAID FM + PGF group and a greater concentration of PGF in the control (P <0.01). Subsequently, Jersey cows (n = 19) were synchronized and, after GnRH administration, were allocated into: CONTROL: no further treatment; and NSAID FM: FM (2.2 mg / kg) 17 h after GnRH. All control animals (n = 10) and six NSAID FM animals (n = 9), ovulated up to 42 h after GnRH. Progesterone concentrations 114 h after GnRH did not differ (P > 0.05). It is concluded that FM inhibits the synthesis of PGF inside the follicle, and the application of systemic PGF was not able to increase intra-follicular PGF concentrations. The single dose of FM did not affect ovulation and the subsequent function of the corpus luteum.

¹ ReproPel- Núcleo de Pesquisa e Ensino em Reprodução Animal, FaVet, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: bggasperin@gmail.com. * Autor para correspondência.

Key words: *prostaglandins, ovulatory process, NSAID, progesterone*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do anti-inflamatório não esteroideal (AINE), flunixinina meglumina (FM), sobre as concentrações de prostaglandina F_{2α} (PGF) e seu metabólito (PGFM) no fluído folicular (FF), sobre a ovulação e função luteal, e desta forma estabelecer um modelo in vivo para estudar a função das prostaglandinas na ovulação. Vacas Jersey (n=18) tiveram as ondas foliculares sincronizadas e, após a aplicação de GnRH, foram distribuídas em três grupos: CONTROLE: não tratado; AINE FM: FM (2,2 mg/kg) 17 h após GnRH; e AINE FM + PGF: FM 17 h após GnRH e PGF (25 mg dinoprost trometamina), 23 h após GnRH. O FF foi coletado 24 h após GnRH, sendo observada maior concentração de PGFM no grupo AINE FM +PGF e maior concentração de PGF no controle (P< 0,01). Para avaliar a ovulação e função luteal, vacas Jersey (n=19) foram sincronizadas e, após aplicação de GnRH, distribuídas em: CONTROLE: não tratado (n=10); e AINE FM (2,2 mg/kg) 17 h após GnRH (n=9). Todos os animais do controle e seis animais do AINE FM, ovularam até 42 h após GnRH. As concentrações de progesterona 114 h após GnRH não diferiram entre os grupos (P>0,05). Conclui-se que a FM inibe a síntese de PGF no interior do folículo e a aplicação de PGF sistêmica não elevou as concentrações de PGF intrafoliculares. A aplicação em dose única de FM na fase final do processo ovulatório não afetou a ovulação e a função do corpo lúteo subsequente.

Palavras-chave: *prostaglandinas, processo ovulatório, AINE, progesterona*

INTRODUÇÃO

A manipulação do ciclo estral e sincronização da ovulação são essenciais para a intensiva utilização de biotécnicas reprodutivas, tais como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Os protocolos atualmente disponíveis que proporcionam uma sincronia no

momento da ovulação são baseados no uso do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou estrógenos (E2), como revisado por BO et al. (2016). A utilização de estrógeno como indutor de ovulação é mais viável economicamente, porém possui como fator limitante seu uso restrito em alguns países (LANE et al., 2008). Desta forma, torna-se importante buscar novas alternativas de indutores de ovulação.

Sabe-se que as prostaglandinas desempenham diversas funções na reprodução, dentre elas a atuação no processo ovulatório. Estudos já comprovaram seu efeito 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 prostaglandina F2 α (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 por anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), amplamente utilizados em Medicina Veterinária, sendo que os mesmos podem inibir o processo ovulatório em diversas espécies (MURDOCH & DUNN, 1983; DE SILVA & REEVES, 1985; FONSECA et al., 2017). Portanto, formulou-se a hipótese de que a administração do AINE flunixinina meglumina (FM) antes da ovulação, associada ou não ao tratamento com PGF, poderia representar um modelo para se estudar a ação das prostaglandinas no processo ovulatório. Os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar o efeito do AINE FM (2,2 mg/kg) sobre as concentrações de PGF e do metabólito da PGF (13,14-dihidro-15-ceto-PGF, PGFM) no fluido folicular, e verificar se a aplicação por via parenteral de um análogo de PGF (dinoprost trometamina) seria capaz de alterar as concentrações intrafoliculares de PGF e PGFM; 2) avaliar o efeito do AINE FM sobre a ovulação e função luteal subsequente.

METODOLOGIA

Experimento 1

Foram utilizadas 18 vacas da raça Jersey, cíclicas, não gestantes e não lactantes, com escore de condição corporal ≥ 3 (escala de 1-5), sendo o escore 1 atribuído à animais extremamente magros e 5 para obesos. Os animais foram mantidos em campo nativo com livre acesso à água e sal mineral, e foram submetidos a um protocolo hormonal de sincronização de estro. No D0, foi realizada a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE- Gonadiol®, Zoetis), i.m., juntamente com a inserção de um dispositivo intravaginal (DIV, Sincrogest®, Ourofino) contendo 1 g de progesterona (P4), para induzir a regressão folicular e o surgimento de uma nova onda de crescimento e ainda a aplicação de 241 µg de PGF (Cloprostenol sódico, Estron®, Agener União), i.m., para indução da luteólise. Os folículos com diâmetro superior a 8 mm no D0, foram puncionados através do acompanhamento por ultrassonografia transvaginal com sonda micro convexa de 6MHz (PieMedical Esaote AquilaVet), utilizando um sistema de aspiração folicular (OPU) adaptado, com uma agulha 40x8 na extremidade. No D8, foi realizada aplicação i.m. de 241 µg de PGF (Cloprostenol sódico, Estron®, Agener União), 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 foi removido no D9 e após 20 h da sua retirada foi realizada a aplicação de 100 µg de GnRH (Acetato de gonadorelina; Gestran Plus® - TecnoPec), i.m., (hora 0). Após a aplicação de GnRH, as vacas foram distribuídas em três grupos de acordo com o diâmetro folicular, que foi equilibrado entre os grupos: controle (n = 6) não tratado; AINE FM (n=6), que foram submetidas a aplicação de 2,2 mg/kg de FM (Flumedin®, Jofadel) i.m., 17 h após a aplicação de GnRH; e AINE FM+PGF (n=6), que receberam 2,2 mg/kg de FM i.m., 17 h

após a aplicação de GnRH, seguidos de 25 mg de PGF (Dinoprost trometamina, Lutalyse®) i.m., 23 h após a aplicação de GnRH.

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). A aspiração folicular foi realizada através do acompanhamento por ultrassonografia transvaginal com sonda micro convexa de 6MHz (PieMedical Esaote AquilaVet), 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 de PGFM e da PGF no fluido folicular foram realizadas através da técnica de ELISA utilizando os kits comerciais 13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F2 α (Ref. 16670) e Prostaglandin F2 α (Ref. 16010; Cayman Chemical®). A dosagem de progesterona foi realizada através de quimioluminescência (ADVIA Centaur; Siemens; Ref. 01586287). Os coeficientes de variação (CV) dos ensaios foram inferiores a 10%.

Experimento 2

Para avaliar o efeito do AINE FM sobre a ovulação, foram utilizadas fêmeas bovinas da raça Jersey (n=19), cíclicas, não gestantes, não lactantes e com escore de condição corporal entre 2,5 e 4,0 (escala de 1-5). Os animais foram mantidos em campo nativo, com livre acesso a água. O protocolo hormonal utilizado para a sincronização do estro e indução de uma nova onda folicular baseou-se na introdução de um DIV contendo 1 g de P4 (Primer®, Tecnopec), que foi mantido durante nove dias, juntamente com a aplicação intramuscular de 2 mg de BE (RIC-BE®, Tecnopec). Decorridas 24 h da inserção do DIV, foi administrado 10,5 μ g de acetato de buserelina, i.m., (Gonaxal®, Biogénesis Bagó).

No D7, foi realizada a aplicação i.m. de 241 μ g de PGF (Cloprostenol sódico, Estron®, Agener União), com o objetivo de promover a luteólise, a partir deste dia os

folículos foram acompanhados diariamente por ultrassonografia transretal (SonoScape A5V, com sonda de 7,5 MHz), para identificação dos folículos dominantes em crescimento.

No D9, foram removidos os DIVs e aplicado por via i.m 241 µg de PGF (Estron®, Agener União). Após 20 h da remoção dos DIVs foi aplicado 10,5 µg acetato de buserelina por via i.m. (Sincroforte®, Ourofino) em todos os animais. A partir deste momento, os animais foram distribuídos, de acordo com o diâmetro folicular, que foi equilibrado entre dois grupos: Controle (n=10) e AINE FM (n=9). Após 17 h da aplicação do hormônio sintético análogo ao GnRH, o grupo AINE FM recebeu a aplicação de 2,2 mg/kg de FM (Flumedin®, Jofadel), esse momento foi estabelecido de acordo com o demonstrado por BRIDGES et al. (2006), onde foi observado elevação nas concentrações de prostaglandinas no interior do folículo após 18 h da aplicação do GnRH. Os folículos pré-ovulatórios continuaram sendo acompanhados diariamente até 42 h após a aplicação de GnRH.

Cinco dias após a aplicação de GnRH (D15), foi realizada uma nova avaliação dos animais por ultrassonografia transretal, com o objetivo de verificar a presença de um corpo lúteo (CL) no ovário onde estava presente o folículo pré-ovulatório. Os animais que ovularam até 42 h após o GnRH e apresentaram CL foram submetidos à coleta de sangue a partir da veia coccígea, por sistema a vácuo, em tubos sem anticoagulante. O sangue foi centrifugado e o soro armazenado para posterior encaminhamento a um laboratório comercial para dosagem de progesterona através de quimioluminescência (ADVIA Centaur; Siemens; Ref. 01586287).

Análise estatística

As concentrações de PGFM e PGF no fluido folicular (experimento 1) e as concentrações séricas de progesterona (experimento 2) 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 de Tukey, utilizando um nível de significância de 5%. Após transformação dos dados para logaritmo, o efeito da concentração

de PGF sobre a concentração de P4 foi estimada por regressão linear simples (Experimento 1).

RESULTADOS

Em relação ao experimento 1, foi observada maior concentração de PGF (Fig. 1B) no fluido folicular ($P=0,0032$) dos animais do grupo controle ($49,56 \pm 7,73$ ng/ml) em comparação com os grupos AINE FM ($5,66 \pm 3,47$ ng/ml) e AINE FM+PGF ($3,19 \pm 0,77$ ng/ml). Os grupos AINE FM e AINE FM+PGF não diferiram estatisticamente. As concentrações de PGFM no fluido folicular (Fig. 1A) foram superiores nos animais do grupo AINE FM+PGF ($P<0,0001$; $3,45 \pm 0,27$ ng/ml) em relação aos animais do grupo controle e grupo AINE FM ($1,23 \pm 0,05$ e $0,2 \pm 0,57$ ng/ml, respectivamente). Os níveis de PGFM do grupo controle e grupo AINE FM não diferiram estatisticamente. Observou-se uma correlação positiva entre as concentrações de P4 e PGF no fluido folicular das vacas, independentemente do grupo (Fig.2).

No experimento 2, em relação ao momento da ovulação (Tab.1), todos os animais do grupo controle ($n=10$) ovularam até 42 h após a administração do hormônio sintético análogo ao GnRH (100%); enquanto que, no grupo AINE FM ($n=9$), seis animais ovularam até 42 h após o GnRH (66,7%). Duas vacas do grupo AINE FM ovularam posteriormente (entre 42 e 114h após o GnRH), enquanto uma vaca desenvolveu uma estrutura cística. Em relação as concentrações séricas de progesterona 114 h após a aplicação de GnRH, não foi observada diferença entre os grupos ($1,9\pm 0,1$ e $1,9\pm 0,1$ ng/mL para controle e AINE FM, respectivamente), as concentrações de progesterona dos animais que ovularam após 42 h da aplicação do GnRH não foram avaliadas.

DISCUSSÃO

Os principais achados do nosso estudo foram: 1) o AINE FM foi capaz de inibir a síntese de PGF intrafolicular, quando aplicado 17 h após o indutor de ovulação; 2) a aplicação parenteral de PGF não elevou a concentração de PGF intrafolicular; 3) uma dose de AINE FM 17 h após o GnRH não inibiu a ovulação e não afetou a síntese de progesterona subsequente.

No experimento 1, foi avaliado o efeito do AINE FM sobre as concentrações de PGF e PGFM intrafoliculares, e se uma dose por via parenteral de PGF seria capaz de alterar essas concentrações. Nossos resultados demonstraram menores concentrações de PGF no fluido folicular dos animais que receberam AINE FM, em relação ao controle, e que a administração de um análogo de PGF por via parenteral não elevou os níveis de PGF intrafoliculares. É possível que o tratamento não tenha sido capaz de alterar significativamente os níveis no interior do folículo, entretanto, isso é pouco provável, pois já foi demonstrado que cinco minutos após a administração i.m de PGF já são detectadas alterações ovarianas (SHIRASUNA et al., 2012). Outra possível explicação para os níveis reduzidos de PGF observados no fluido folicular das vacas tratadas sistemicamente com PGF é que o intervalo entre a aplicação intramuscular e a aspiração do fluido folicular foi de uma hora. No estudo conduzido por ROVANI et al. (2012), foi observado um pico de PGF sérica dez minutos após o tratamento pela via submucosa, sendo observadas concentrações elevadas por, no mínimo 40 minutos, momento da última mensuração. Portanto, é possível que maiores níveis seriam observados se o intervalo entre o tratamento e a aspiração folicular fosse menor. Em um estudo coordenado por CUERVO-ARANGO (2012), na espécie equina, foi avaliado o efeito do tratamento sistêmico com PGF (Cloprostenol) em éguas tratadas com FM (1,7 mg/kg, duas vezes por dia, desde o momento da aplicação de gonadotrofina coriônica humana (hCG) até 36h após a hCG), sendo observado que a PGF não foi capaz de restabelecer a ovulação nos animais e, portanto, não reverteu o efeito inibitório do AINE. Entretanto, a injeção

intrafolicular de PGF (500 µg) e PGE (125 µg) foi capaz de superar o efeito inibitório da FM sobre a ovulação, em que todos os animais tratados ovularam e desenvolveram um CL (MARTÍNEZ-BOVÍ & CUERVO-ARANGO, 2016). Infelizmente, em nosso primeiro estudo não foi possível avaliar o momento da ovulação, pois os folículos foram aspirados.

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 PGF₂α precede o momento da ovulação (BRIDGES et al., 2006; BRIDGES & FORTUNE, 2007). A concentração de PGF no fluido folicular do grupo controle foi semelhante à encontrada por BRIDGES et al. (2006) em 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 & 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 rapidamente metabolizada nos pulmões, sendo transformada no metabólito inativo 13,14-dihidro-15-ceto-PGF₂α, considerado um indicador de liberação de PGF na circulação (SUDO-HASHAI, 2010).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo, foi observado que os animais tratados com AINE FM apresentaram menores concentrações de P₄ intrafolicular (D'AVILA, 2019), sugerindo que as prostaglandinas estão envolvidas na luteinização folicular. A correlação positiva observada no presente estudo entre as concentrações de P₄ e PGF intrafoliculares, corroboram com esta hipótese. Em um estudo recente conduzido por BERISHA et al. (2019), foi observado um aumento contínuo das concentrações de PGE₂ e PGF de 0 a 25 h após o GnRH, que foi acompanhado pela aumento nas concentrações de P₄ no mesmo período.

BRIDGES and FORTUNE (2007) observaram um aumento na concentração de progesterona secretada pelas células da teca interna (*in vitro*) isoladas de folículos 24 h após a

administração de GnRH e cultivadas com PGE2. Também foi demonstrado aumento nas concentrações de P4 em células da teca interna cultivadas *in vitro* com PGE2 ou PGF (FORTUNE et al., 2008). Coletivamente, os dados indicam que as prostaglandinas são necessárias para o adequado processo de luteinização.

No experimento 2, foi avaliado o efeito da FM, aplicada 17 h após a indução da ovulação com GnRH, sobre a ocorrência do processo ovulatório e a concentração de progesterona sérica pós-ovulatória (114 h após GnRH). A escolha do momento do tratamento foi baseada nos resultados do experimento 1, que demonstraram que vacas tratadas com a mesma dose de FM, no mesmo momento, apresentaram menores concentrações de PGF e PGFM 24 h após a administração de GnRH. Além disso, já foi demonstrado que a elevação nas concentrações de prostaglandinas ocorre mais de 18 h após o tratamento com GnRH (BRIDGES et al., 2006). Contrariando a nossa hipótese, o anti-inflamatório FM não teve ação de bloqueio da ovulação e não afetou as concentrações de progesterona sérica. De forma semelhante, DONNELLY et al. (2019) testaram o uso de FM (1.1 mg/kg i.v.) em éguas, uma vez ao dia, durante dois dias consecutivos e não observaram atraso ou bloqueio da ovulação, nem efeito sobre a função luteal pós-ovulatória. CUERVO-ARANGO (2011) observou que o FM (1,7 mg/kg) foi capaz de bloquear a ovulação em éguas quando administrado 0-24 h após a administração de hCG a cada 12 h até completar 36 h, sendo estes os grupos que apresentaram menores concentrações de progesterona. Porém, mesmo os animais com estruturas anovulatórias apresentaram luteinização e síntese de progesterona (≥ 2 ng/mL) a partir do quinto dia após a hCG. No mesmo estudo, os tratamentos com FM em dose única (24 ou 30 h após hCG), não afetaram a ovulação e síntese de progesterona subsequente, que foi igual à do grupo controle.

Os anti-inflamatórios não esteroidais, atuam na cascata ovulatória inibindo a atividade das cicloxigenases (COX) e, conseqüentemente, a biossíntese das prostaglandinas. Devido ao

seu mecanismo de ação, diversos estudos relataram efeitos inibitórios sobre a ovulação em diferentes espécies. MURDOCH and DUNN (1983) testaram a aplicação de indometacina no interior de folículos pré-ovulatórios de ovelhas e observaram que o AINE foi capaz de bloquear a ovulação, sem alterar as concentrações de progesterona em relação aos animais não tratados. Em outro estudo, o mesmo AINE foi administrado em vacas pelas vias intramuscular, intrauterina e intrafolicular, e foi observado o bloqueio da ovulação nos animais que receberam a indometacina no interior do folículo (DE SILVA & REEVES, 1985). A aplicação de FM no momento da inseminação, também demonstrou efeitos negativos sobre taxa de prenhez em cabras (FONSECA et al., 2017). CUERVO-ARANGO and DOMINGO-ORTIZ (2011) observaram que éguas tratadas com FM (2 mg/kg), duas vezes ao dia, desde que apresentaram um folículo pré-ovulatório ≥ 32 mm até o momento da ovulação, apresentaram bloqueio da ovulação em 83% dos casos (5/6) e desenvolvimento de folículos não rompidos luteinizados.

A partir dos resultados encontrados na literatura e de acordo com DONNELLY et al. (2019), possivelmente não foi observado efeito inibitório do AINE FM sobre a ovulação neste estudo devido à administração única, enquanto os trabalhos que observaram bloqueio ou falha ovulatória, utilizaram altas doses e maior frequência de aplicação ou ainda administraram o AINE por via intrafolicular. AIUMLAMAI et al. (1990) descreveram uma rápida redução na concentração de PGFM sérica após uma administração intravenosa de FM (2,2 mg/kg) que persistiu durante seis horas em vacas ovariectomizadas, sendo recomendado pelos autores quatro administrações diárias de FM para obtenção de um pleno efeito sobre a síntese de prostaglandinas. Portanto, supostamente, para se observar os efeitos inibitórios do AINE na ovulação, seriam necessárias mais aplicações ou alteração do momento da administração.

Com base nos nossos achados, é possível afirmar que o AINE FM 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 de PGF é capaz de elevar as concentrações de PGF intrafoliculares. Por outro lado, é indispensável testar outros AINEs para estabelecer um modelo de inibição da ovulação por via sistêmica para o estudo da função das prostaglandinas neste processo. Ainda, os dados sugerem que a administração do AINE FM em dose única, durante a fase final do processo ovulatório, não prejudica a ovulação e função luteal subsequente. No entanto, não se pode descartar possíveis efeitos deletérios sobre o desempenho reprodutivo, o que não foi avaliado no presente estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa de produtividade de B.G. Gasperin (309138/2017-5), à FAPERGS (Edital PRONEX 12/2014 -FAPERGS/CNPq, 16/2551-0000494-3) e à CAPES (Código de Financiamento 001), pela bolsa de Mestrado de F.P. Moraes e bolsa de Doutorado de C. A. D'Ávila.

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE BIOÉTICA E BIOSEGURANÇA

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFPel (0288-2015).

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Não temos nenhum conflito de interesse a declarar.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

REFERÊNCIAS

AIUMLAMAI, S., et al. Regulation of prostaglandin biosynthesis with flunixin meglumine in the bovine species. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A**, v.37, n.1, p.16-22. 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2110398>>. Acesso em. doi: 10.1111/j.1439-0442.1990.tb00871.x.

BERISHA, B., et al. Prostaglandins in Superovulation Induced Bovine Follicles During the Preovulatory Period and Early Corpus Luteum. **Frontiers in Endocrinology**, v.10, n.467. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00467>>. Acesso em. doi: 10.3389/fendo.2019.00467.

BO, G. A., et al. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v.86, n.1, p.388-96. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180326>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.053.

BRIDGES, P. J.; J. E. FORTUNE. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.263, n.1, p.1-9. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720706003844>>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.08.002>.

BRIDGES, P. J., et al. Gonadotropin-Induced Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Cyclooxygenase-2 and Production of Prostaglandins E and F₂ α in Bovine Preovulatory Follicles Are Regulated by the Progesterone Receptor. **Endocrinology**, v.147, n.10, p.4713-4722. 2006. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1210/en.2005-1575>>. Acesso em: 3/17/2019. doi: 10.1210/en.2005-1575.

CASTRO, N. A., et al. Use of prostaglandin F₂ α as ovulatory stimulus for synchronizing dairy cattle. **Research in Veterinary Science**, v.118, p.151-154. 2018. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528817305921>>. Acesso em. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.01.010>.

CUERVO-ARANGO, J. The effect of treatment with flunixin meglumine at different times relative to hCG administration on ovulation failure and luteal function in mares. **Animal Reproduction Science**, v.127, n.1-2, p.84-90. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21820823>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.07.008.

CUERVO-ARANGO, J. The effect of systemic administration of cloprostenol on ovulation in mares treated with a prostaglandin synthetase inhibitor. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v.47, n.1, p.32-38. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21507082>>. Acesso em. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01796.x.

CUERVO-ARANGO, J.; R. DOMINGO-ORTIZ. 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. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21111464>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.10.011.

D'AVILA, C. A. **Efeito da prostaglandina e anti-inflamatório não esteroideal no processo ovulatório em bovinos**. Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, p.67. 2019

DE SILVA, M.; J. J. REEVES. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **J Reprod Fertil**, v.75, n.2, p.547-549. 1985b. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4067932>>. Acesso em. doi: 10.1530/jrf.0.0750547.

DONNELLY, C. G., et al. Effects of flunixin meglumine on postponement of ovulation in mares. **American journal of veterinary research**, v.80, n.3, p.306-310. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30801209>>. Acesso em. doi: 10.2460/ajvr.80.3.306.

FONSECA, J. F., et al. 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. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1642431X17300852>>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.07.002>.

FORTUNE, J. E., et al. Prostaglandins Stimulate Progesterone Production in Vitro by Theca and Granulosa Cells from Ovulatory Follicles of Cattle. **Biology of Reproduction**, v.78, n.Suppl_1, p.180-181. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolreprod/78.s1.180c>>. Acesso em: 1/14/2020. doi: 10.1093/biolreprod/78.s1.180c.

LANE, E. A., et al. 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. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432008003539>>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.009>.

LEONARDI, C. E. P., et al. Prostaglandin F₂ α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v.78, n.7, p.1578-1582. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X12004001>>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.030>.

MARTÍNEZ-BOVÍ, R.; J. CUERVO-ARANGO. 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. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25438830>>. Acesso em. doi: 10.1111/evj.12396.

MURDOCH, W. J.; T. G. DUNN. Luteal function after ovulation blockade by intrafollicular injection of indomethacin in the ewe. **J Reprod Fertil**, v.69, n.2, p.671-5. 1983. Disponível em: em. doi.

PFEIFER, L. F. M., et al. The use of PGF₂ α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v.81, n.5, p.689-695. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X13004986>>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.11.016>.

PFEIFER, L. F. M., et al. Different protocols using PGF 2α as ovulation inducer in Nelore cows subjected to estradiol-progesterone timed AI based protocols. **Theriogenology**, v.120, p.56-60. 2018. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X18304278>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.030>.

ROVANI, M. T., et al. Luteolysis after the intravulvosubmucosal injection of prostaglandin F 2α in cattle: Systemic or local mechanism? **Livestock Science**, v.148, n.1, p.60-66. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141312001722>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.007>.

SHIRASUNA, K., et al. Rapid Accumulation of Polymorphonuclear Neutrophils in the Corpus luteum during Prostaglandin F 2α -Induced Luteolysis in the Cow. **PLOS ONE**, v.7, n.1, p.e29054. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029054>. Acesso em. doi: 10.1371/journal.pone.0029054.

SUDO-HASHAI, L. S. Capítulo 37 Prostaglandinas (Eicosanoides). **Roberto DeLucia (Org.)**, p.474. 2010.

Tabela 1- Momento da ovulação em vacas tratadas ou não com 2,2 mg/Kg de anti-inflamatório não esteroideal flunixinina meglumina (AINE FM) 17 h após indução da ovulação com GnRH.

| Grupo | n | Estro | Diâmetro folicular* (Média) mm | Ovulação até 42 h* (%) | Ovulação até 114 h* (%) |
|----------|----|-------|--------------------------------|------------------------|-------------------------|
| CONTROLE | 10 | 3 | 12,4 | 100 (10/10) | 100 (10/10) |
| AINE FM | 9 | 0 | 12,7 | 66,7 (6/9) | 88,9 (8/9) |

*Referente ao momento de aplicação de GnRH.

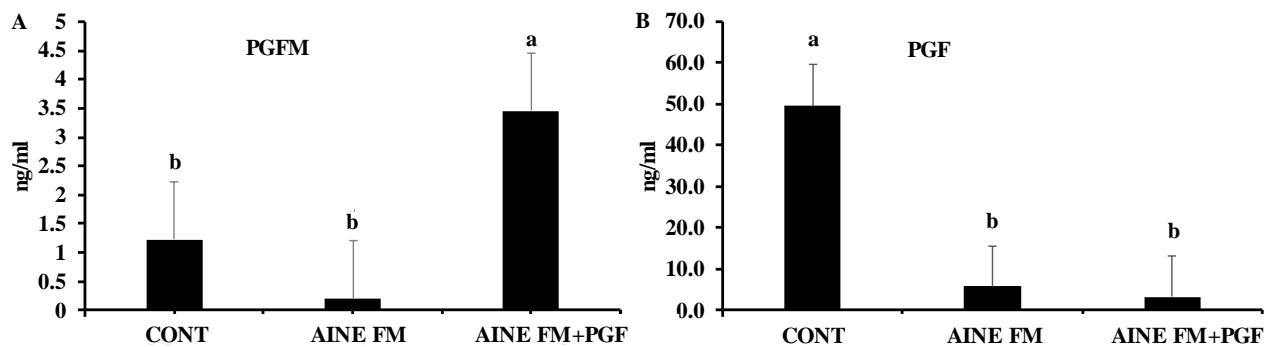


Figura 1- Concentração do metabólito da $PGF_{2\alpha}$ (13,14-di-hidro-15-ceto- $PGF_{2\alpha}$ -PGFM) (A) e $PGF_{2\alpha}$ (PGF) (B) no líquido folicular de vacas do grupo controle (CONT) (n=6), grupo tratado com 2,2 mg/Kg de anti-inflamatório não esteroidal flunixinina meglumina 17 h após o GnRH (AINE FM) (n=6) e grupo tratado com 2,2 mg/Kg de anti-inflamatório não esteroidal flunixinina meglumina 17 h após o GnRH e 25 mg de PGF (dinoprost trometamina), por via intramuscular, 23 h após o GnRH (AINE FM + PGF) (n=6). a,b Expoentes distintos diferem estatisticamente.

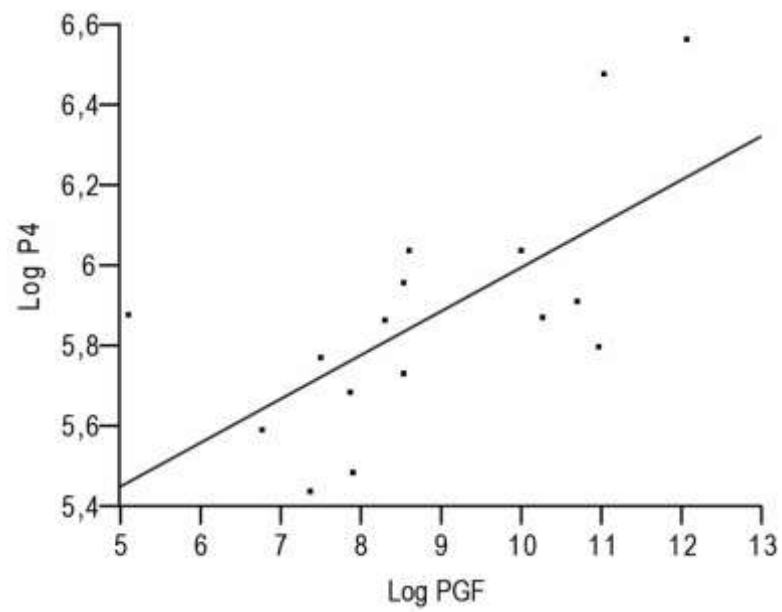


Figura 2: Associação entre as concentrações de P4 e PGF no fluido folicular ($P=0,006$; $\log P4$

$$= 4,907722 + 0,1084182 * \log PGF; r^2=0,43).$$

4 Considerações Finais

Com base no que foi apresentado no primeiro estudo, não foi observado efeito profilático e/ou terapêutico do estrógeno, quando utilizado em doses isoladas. Porém, em estudos que utilizaram repetidas doses de estrógeno em protocolos de indução artificial da lactação, foi demonstrado efeito positivo sobre o desempenho reprodutivo de vacas repetidoras de serviço. Uma vez que não se pode atribuir os efeitos benéficos exclusivamente ao estrógeno, torna-se necessária a realização de novas pesquisas que avaliem o efeito do estrógeno sobre a fertilidade e evidenciem os mecanismos pelos quais vacas submetidas a exposição prolongada retomam a fertilidade.

Em relação aos nossos achados do segundo estudo, é possível afirmar que a flunixinina meglumina, quando aplicada 17 h após o indutor de ovulação (dose única), foi capaz de inibir a síntese de PGF intrafolicular, sendo que a aplicação sistêmica de PGF não foi capaz de elevar essas concentrações. Além disso, a administração de FM na fase final do processo ovulatório não afetou a ocorrência da ovulação, assim como a função luteal pós-ovulatória. Por outro lado, para estabelecermos um modelo de inibição da ovulação por via sistêmica, seriam necessárias alterações no princípio ativo, na dosagem, na frequência e/ou nos momentos das administrações.

Referências

ABIEC, B.B.E.A. **Beef Report Brazilian Livestock Profile**. ABIEC. São Paulo: Brazilian Beef, 2019. 49p.

AIUMLAMAI, S.; ODENSVIK, K.; STABENFELDT, G.; KINDAHL, H. Regulation of prostaglandin biosynthesis with flunixin meglumine in the bovine species. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A**, v.37, n.1, p.16-22, 1990.

ATKINS J. A.; SMITH M. F.; MACNEIL M. D.; JINKS E. M.; ABREU F. M.; ALEXANDER L. J.; GEARY T. W. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. **Journal of Animal Science**, v.91, n.2, p.722-733, 2013.

BARUSELLI P. S.; SALES J. N. S.; SALA R. V.; VIEIRA L. M.; SÁ FILHO M. F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v.9, n.3, p.139-152, 2012.

BERISHA, B.; RODLER, D.; SCHAMS, D.; SINOWATZ, F.; PFAFFL, M. W. Prostaglandins in Superovulation Induced Bovine Follicles During the Preovulatory Period and Early Corpus Luteum. **Frontiers in Endocrinology**, v.10, n.467, 2019.

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 F₂α in Bovine Preovulatory Follicles Are Regulated by the Progesterone Receptor. **Endocrinology**, v.147, n.10, p.4713-4722, 2006.

CARSON, R. L.; KEMPPAINEN, R. J.; SCANLAN, C. M. The effects of ovarian hormones and acth on uterine defense to *Corynebacterium pyogenes* in cows. **Theriogenology**, v.30, n.1, p.91-97, 1988

CASTRO, N. A.; NEVES, P. M. A.; CESTARO, J. P.; MELO, V. T. O.; SCHNEIDER, A.; PFEIFER, L. F. M. Use of prostaglandin F₂ α as ovulatory stimulus for synchronizing dairy cattle. **Research in Veterinary Science**, v.118, p.151-154, 2018.

COLLIER, R. J.; BAUMAN, D. E.; HAYS, R. L. Milk Production and Reproductive Performance of Cows Hormonally Induced into Lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 10, p. 1524-1527, 1975.

CUERVO-ARANGO, J. The effect of treatment with flunixin meglumine at different times relative to hCG administration on ovulation failure and luteal function in mares. **Animal Reproduction Science**, v.127, n.1-2, p.84-90. 2011.

CUERVO-ARANGO, J. The effect of systemic administration of cloprostenol on ovulation in mares treated with a prostaglandin synthetase inhibitor. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n.1, p.32-38, 2012.

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.

CURCIO, B. R.; CANISSO I. F.; PAZINATO F. M.; BORBA, L. A.; FEIJO, L. S.; MULLER, V.; FINGER, I. S.; TORIBIO, R. E.; NOGUEIRA, C. E. W. Estradiol cypionate aided treatment for experimentally induced ascending placentitis in mares. **Theriogenology**, v.102, p.98-107,2017.

D'AVILA, C. A. **Efeito da prostaglandina e anti-inflamatório não esteroideal no processo ovulatório em bovinos**. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

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

DHALIWAL, G. S; MURRAY, R. D.; WOLDEHIWET, Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.135-152, 2001.

DONNELLY, C. G.;SONES, J. L.; DOCKWEILER, J. C.; NORBERG, L. A.; NORBERG, L. E.; CHEONG, S. H.; GILBERT, R. O. Effects of flunixin meglumine on

postponement of ovulation in mares. **American Journal of Veterinary Research**, v.80, n.3, p.306-310, 2019.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2019**. Embrapa. São Paulo, 2019. 53p.

FERRERO, S., BARRA, F., MAGGIORE, L. R. U. Current and Emerging Therapeutics for the Management of Endometriosis. **Drugs**, v.78, n.10, p.995-1012, 2018.

FONSECA, J. F.; ALVIM, G. P.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; OLIVEIRA, M. E. F.; BRAIR, V. L.; BRANDÃO, F. Z.; FACÓ, O. 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.

FORTUNE, J. E.; YANG, C. S.; WILLIS, E. R. Prostaglandins stimulate progesterone production in vitro by theca and granulosa cells from ovulatory follicles of cattle. **Proceedings of the 41st annual meeting of the Society for the Study of Reproduction**; Kailua-Kona, Hawaii. 2008; Madison, WI: SSR/Biol Reprod Special Issue; 2008.180-181p.

FREITAS, P. R. C.; COELHO, S. G.; RABELO, E.; LANA, A. M. Q.; ARTUNDUAGA, M. A. T.; SATURNINO, H. M. Artificial induction of lactation in cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.2268-2272, 2010.

GREEN, M. P.; LEDGARD, A. M.; BEAUMONT, S. E.; BERG, M. C.; MCNATTY, K. P.; PETERSON, A. J.; BACK, P. J. Long-term alteration of follicular steroid concentrations in relation to subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Journal Animal Science**, v.89, p.3551-3560, 2011.

GROOTHUIS, P. G; DASSEN, H. H. N. M.; ROMANO, A.; PUNYADEERA, C. Estrogen and the endometrium: Lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. **Human Reproduction Update**, v.13, n.4, p.405-417, 2007.

HAWK, H. W. Sperm Survival and Transport in the Female Reproductive Tract. **Journal of Dairy Science**, v.66, n.12, p.2645-2660, 1983.

HEIDARI, M.; KAFI, M.; KHODAKARAM-TAFTI, A.; DERAKHSHANDEH, A.; MIRZAEI, A. Relationships between follicular fluid steroid concentrations and uterine infections in ovarian cystic cows. **Comparative Clinical Pathology**, v.25, n.4, p.865-870, 2016.

HERATH, S.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. **Journal of Reproductive Immunology**, v.69, p.13-22, 2006.

KATAGIRI, S.; MORIYOSHI, M.; TAKAHASHI, Y. Low Incidence of an Altered Endometrial Epidermal Growth Factor (EGF) Profile in Repeat Breeder Holstein Heifers and Differential Effect of Parity on the EGF Profile Between Fertile Holstein (Dairy) and Japanese Black (Beef) Cattle. **The Journal of Reproduction and Development**, v.59, n.6, p.575-579, 2013.

KATAGIRI, S.; MORIYOSHI, M.; YANAGAWA, Y. Endometrial epidermal growth factor profile and its abnormalities in dairy cows. **The Journal of Reproduction and Development**, v.62, n.5, p.465-470, 2016.

KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Potential relationship between normalization of endometrial epidermal growth factor profile and restoration of fertility in repeat breeder cows. **Animal Reproduction Science**, v.95, n.1–2, p.54-66, 2006.

KIMMINS, S.; MACLAREN, L. A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. **Placenta**, v.22, n.8–9, p.742-748, 2001.

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 F₂ α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v.78, n.7, p.1578-1582, 2012.

MANN, G. E; SCHOLEY D. V.; ROBINSON, R. S. Identification of elevated concentrations of estradiol in bovine uterine endometrium. **Domestic Animal Endocrinology**, v.33, p.437-441, 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.

MELLADO, M.; NAZARRE, E.; OLIVARES, L.; PASTOR, F.; ESTRADA, A. Milk production and reproductive performance of cows induced into lactation and treated with bovine somatotropin. **Animal Science**, v. 82, n. 4, p.555-559, 2007.

MOTAVALLI, T.; DIRANDEH, E.; DELDAR, H.; COLAZO, M. G. Evaluation of shortened timed-AI protocols for resynchronization of ovulation in multiparous Holstein dairy cows. **Theriogenology**, v. 95, p.187-192, 2017.

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.

OVERTON, M. W.; SISCHO, W. M.; REYNOLDS, J. P. Evaluation of effect of estradiol cypionate administered prophylactically to postparturient dairy cows at high risk for metritis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.223, n.6, p.846-851, 2003.

PERRY, G. A; PERRY, B. L. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v.34, p.333-338, 2008.

PESTANO, H. S.; HAAS, C. S.; SANTOS, M. Q.; OLIVEIRA, F. C.; GASPERIN, B. G. Indução artificial de lactação em bovinos: histórico e evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.3, p.2268-2272, 2015.

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 2α 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 2α as ovulation inducer in Nelore cows subjected to estradiol-progesterone timed AI based protocols. **Theriogenology**, v.120, p.56-60, 2018.

RAWY, M.; MIDO, S.; ALI, H. E.; DERAR, D.; MEGAHED, G.; KITAHARA, G.; OSAWA, T. Effect of exogenous estradiol Benzoate on uterine blood flow in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.192, p.136-145, 2018.

REMNANT, J. G.; GREEN, M. J.; HUXLEY, J. N.; HUDSON, C. D. Associations between dairy cow inter-service interval and probability of conception.

Theriogenology, v.114, p.324-329, 2018.

REYNOLDS, L. P.; KIRSCH, J. D.; KRAFT, K. C.; REDMER, D. A. Time-course of the uterine response to estradiol-17beta in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors. **Biology of Reproduction**, v.59, n.3, p.613-620, 1998.

RISCO, C. A; HERNANDEZ, J. Comparison of ceftiofur hydrochloride and estradiol cypionate for metritis prevention and reproductive performance in dairy cows affected with retained fetal membranes. **Theriogenology**, v.60, n.1, p.47-58, 2003.

ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; WATHES, D. C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v.122, p.965-979, 2001.

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 F2 α in cattle: Systemic or local mechanism? **Livestock Science**, v.148, n.1, p.60-66, 2012.

SÁ FILHO, M. F.; GONELLA-DIAZA, A. M.; SPONCHIADO, M.; MENDANHA, M. F.; PUGLIESI, G., RAMOS, R. S.; ANDRADE, S. C. S.; GASPARIN, G.; COUTINHO, L. L.; GOISSIS, M. D.; MESQUITA, F. S.; BARUSELLI, P. S.; BINELLI, M. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrous beef cows. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.8, n.1, p.1-14, 2017.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E. Comparison of three treatments for bovine endometritis. **The Veterinary record, England**, v. 142, n. 21, p. 575-579, 1998.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N.; DOBSON, H. Effect of intrauterine administration of oestradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. **Animal Reproduction Science**, Netherlands, v. 81, n. 1-2, p.13-23, 2004.

SHIRASUNA, K.; SHIRASUNA, K.; JIEMTAWEEBOON, S.; RADDATZ, S.; NITTA, A.; SCHUBERTH, H.; BOLLWEIN, H.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Rapid Accumulation of Polymorphonuclear Neutrophils in the Corpus luteum during Prostaglandin F2 α -Induced Luteolysis in the Cow. **Plos One**, v.7, n.1, 2012.

SILPER, B. F.; MADUREIRA, A. M. L.; BURNETT, T. A.; FERNANDES, A. C. C.; ABREU, F. M.; VEIRA, D. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; CERRI, R. L. A. Diagnosis of uterine and vaginal disorders by different methodologies is affected by

concentration of estradiol in plasma from lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.6, p.4795-4807, 2016.

SILVA, L. A. F.; SILVA, E. B.; SILVA, L. M.; TRINDADE, B. R.; SILVA, O. C.; ROMANE, A. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; SOUZA, J. N.; FRANCO, L. G.; GARCIA, A. M. Causas de descarte de fêmeas bovinas leiteiras adultas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.5, p.9-17, 2005.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, United States, v. 56, n. 3, p. 387-437, 2004.

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.

SUGIURA, T.; AKIYOSHI, S.; INOUE, F.; YANAGAWA, Y.; MORIYOSHI, M.; TAJIMA, M.; KATAGIRI, S. Relationship between bovine endometrial thickness and plasma progesterone and estradiol concentrations in natural and induced estrus. **The Journal of Reproduction and Development**, v.64, p.135-143, 2018.

TRÍBULO, P.; SIQUEIRA, L. G. B.; OLIVEIRA, L. J.; SCHEFFLER, T.; HANSEN, P. J. Identification of potential embryokines in the bovine reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.690-704, 2018.

ULBRICH, S. E.; FROHLICH, T.; SCHULKE, K.; ENGLBERGER, E.; WALDSCHMITT, N.; ARNOLD, G. J.; REICHENBACH, H. D.; REICHENBACH, M.; WOLF, E.; MEYER, H. H. D.; BAUERSACHS, S. Evidence for Estrogen-Dependent Uterine Serpin (SERPINA14) Expression During Estrus in the Bovine Endometrial Glandular Epithelium and Lumen. **Biology of Reproduction**, v.81, p.795-805, 2009.

WAGNER, D.; BONDURANT, R.; SISCHO, W. Reproductive effects of estradiol cypionate in postparturient dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 220-3, 2001.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 16 de novembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)
Para: Prof. Bernardo Garzeira Gasperin
Departamento de Patologia - Faculdade de Veterinária

Senhor Pesquisador:

A CEEA analisou a solicitação o projeto intitulado: "**Controle da ovulação em bovinos e suínos**", processo nº23110.000288/2015-65, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEEA 0288-2015**).

Vigência do Projeto: 17/11/2015 a 20/12/2019

Espécie/Linhagem: Suínos e Bovinos/variados

Nº de animais: 740 suínos e 110 bovinos

Idade: 4 meses a 4 anos (suínos) e 2 a 8 anos (bovinos)

Sexo: Fêmeas

Origem: Granjas comerciais de suínos e Fazenda Experimental de Bovinos



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2015

Assinatura do Professor Responsável: _____