

Efeito da dose de prostaglandina E₂ na ovulação de camundongos fêmeas pré-púberes: Estudo piloto

Jéssica de Souza Andrade¹, Juliana Pavan Zuliani², Sulamita da Silva Setubal³, Luiz Francisco Machado Pfeifer^{4*}

¹Mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente – PGDRA/UNIR, bolsista CAPES, Porto Velho - RO Brasil. E-mail: jessica_andrade@hotmail.com

²Pesquisadora do Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais e Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia - IPEPATRO/FIOCRUZ Rondônia, Porto Velho – RO Brasil.

³Pesquisadora do Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Medicina - CEBIO, Porto Velho - RO Brasil.

⁴Pesquisador A da Embrapa Rondônia, Porto Velho – RO. E-mail: luiz.pfeifer@embrapa.br.

*Autor para correspondência

RESUMO. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial ovulatório de diferentes doses de prostaglandina E₂ em camundongos fêmeas pré-púberes. Foram utilizadas 18 fêmeas BALB/c pré-púberes, tratadas com 5 UI de eCG via intraperitoneal (i.p.), no Dia 0. No Dia 2, os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos, para receberem via i.p.; 1) 0.5 mL de PBS (n = 3), 2) 5 µg de GnRH (n = 3), 3) 25 µg de PGE₂ (n = 3), 4) 50 µg de PGE₂ (n = 3), 5) 150 µg de PGE₂ (n = 3) e 6) 250 µg de PGE₂ (n = 3). No Dia 3, as fêmeas foram mortas por deslocamento da coluna cervical e os ovidutos foram coletados para contagem de oócitos através da técnica de transiluminação sob estereomicroscópio. Não houve diferença no número de camundongos fêmeas que ovularam e o número de oócitos ovulados nas fêmeas tratadas com GnRH e 250 µg de PGE₂, e ambos os grupos apresentaram diferenças em relação ao grupo PBS (P < 0.001). Os resultados deste estudo demonstram que a PGE₂ na dose de 250 µg é capaz de induzir a ovulação em camundongos fêmeas pré-púberes.

Palavras chave: Mamíferos, murinos, oócitos

Effect of prostaglandin E₂ dose on ovulation in prepubertal mice: a pilot study

ABSTRACT. The objective of this study was to evaluate the effect of different doses of prostaglandin E₂ (PGE₂) on the ovulation of prepubertal female mice. Eighteen In BALB/c prepubertal mice were treated with 5 IU of intraperitoneal (i.p.) eCG on day 0. On day 2, the mice were randomly distributed into 6 groups for the i.p. administration of: 1) 0.5 mL of PBS (n = 3), 2) 5 µg of GnRH (n = 3), 3) 25 µg of PGE₂ (n = 3), 4) 50 µg of PGE₂ (n = 3), 5) 150 µg of PGE₂ (n = 3) e 6) 250 µg of PGE₂ (n=3). On day 3, the mice were killed and the oviducts were collected for the oocyte count by transillumination technique under stereomicroscopy. There were no difference in the number of ovulated mice and number of ovulated oocyte in the females treated with GnRH and 250 µg de PGE₂, and both groups showed differences in comparison with PBS group (P<0.001). The results demonstrated that the PGE₂ dose of 250 µg induces the ovulation in prepubertal female mice.

Keywords: Mammals, mice, oocyte

Efecto de la dosis de prostaglandina E₂ en la ovulación de ratones prepuberales: Estudio piloto

RESUMEN. El objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial ovulatorio con diferentes dosis de prostaglandina E₂ en ratones hembras prepúberes. Fueron utilizadas 18 hembras BALB/c tratadas con 5 UI de eCG via intraperitoneal (i.p.), en el día 0. En el segundo día, los animales fueron divididos aleatoriamente en 6 grupos para recibir via i.p.; 0.5 mL de PBS (n = 3), 2) 5 µg de GnRH (n = 3), 3) 25 µg de PGE₂ (n = 3), 4) 50 µg de PGE₂ (n = 3), 5) 150 µg de PGE₂ (n = 3) y 6) 250 µg de PGE₂ (n = 3). En el tercer día, las hembras murieron por dislocación de columna cervical y los oviductos fueron coelotados para contaje de sus óvulos a través de la técnica de transiluminación sob estereomicroscópio. No hubo diferencia en el números de ratones que ovularon y el número de ovocitos ovulados por hembras tratadas con GnRH e 250 µg de PGE₂, ambos grupos tienen diferencias en relación al grupo PBS. Los resultados de este estudio demostraron que la PGE₂ en dosis de 250 µg es capaz de inducir ovulación en ratones hembras pre púberes.

Palabras clave: Mamíferos, ovócitos, roedores

Introdução

As prostaglandinas (PGs) exercem diferentes funções fisiológicas e farmacológicas sobre o sistema reprodutivo feminino de diferentes espécies (Weems et al., 2006). Nos ovários, as prostaglandinas atuam como mediadores de algumas ações periovulatórias após o aumento do hormônio luteinizante (LH), estimulando as contrações do músculo liso do ovário e também o aumento do fluxo sanguíneo e da pressão intrafolicular (Espey, 1978, Walles et al., 1986). Aumentos nas concentrações de PGs no fluido folicular, após o pico de LH, foram detectados em animais domésticos e roedores, aproximadamente 10 horas antes da ruptura do folículo, sugerindo que a prostaglandina tenha papel importante no momento da ovulação (Duffy and Stouffer, 2001). Camundongos *knockout* para a expressão de receptor de PGE₂ (EP2) apresentaram defeitos na expansão das células do cúmulus do oócito, redução do número de embriões implantados e também da prole, sugerindo que a PGE₂ afeta a ovulação e desempenha um papel importante na fertilidade da fêmea (Hizaki et al., 1999, Kennedy et al., 1999). Além disso, receptores funcionais para a PGE₂ (EP2 e EP4) foram identificados na vesícula germinativa de oócitos de camundongos e macacos, mostrando que a PGE₂ atua diretamente nos gametas femininos de mamíferos (Duffy et al., 2010). Estudos anteriores, realizados em ratas, já haviam demonstrado a capacidade da PGE₂ de reverter o efeito bloqueador de ovulação da indometacina, um potente inibidor da síntese de prostaglandinas (Tsafiriri et al., 1972, Tsafiriri et al., 1973). Apesar dessas constatações, ainda não foram realizados estudos sobre o efeito destas PGs

na ovulação de camundongos pré-púberes. Assim, este estudo visa estudar o efeito de diferentes doses de prostaglandina E₂ na indução da ovulação de camundongos fêmeas pré-púberes. A hipótese testada nesse estudo piloto foi que existe uma dose de PGE₂ capaz de induzir a ovulação em camundongos pré-púberes.

Material e Métodos

O estudo foi realizado em setembro de 2016. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz Rondônia (Protocolo 2014/12).

Este estudo foi realizado no biotério da Fundação Oswaldo Cruz de Rondônia (Fiocruz – Rondônia), situado no município de Porto Velho, RO, Brasil (8°47'01.52" S; 63°51'32.95" O). Foram utilizados 18 camundongos fêmeas (linhagem BALB/c), pré-púberes, entre 18 e 22 dias de idade e pesando 20-25g. As fêmeas foram isoladas em gaiolas em sala climatizada a 24°C com iluminação artificial das 05:00 às 19:00 horas e com livre acesso a comida e água.

O desenho experimental está ilustrado na Figura 1. Os camundongos fêmeas foram tratadas com uma dose intraperitoneal (i.p.) de 0,2 UI/g de p.v. de eCG (Gonadotrofina coriônica equina; Novormon®, Zoetis-Pfeizer, Cotia, Brasil; dose total = 5 UI por animal), no Dia 0 (arbitrário com o início do experimento) para superestimulação dos ovários. No Dia 2, os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais, e receberam: 1) 20 µL/g de peso vivo (p.v.) de PBS (Tampão fosfato-salino modificado por dulbecco;

Biodux[®], Campinas, Brasil; dose total = 0.5 mL por animal; n = 3), 2) 0,2 µg/g de p.v. de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina; Gonaxal[®], Biogénesis-Bagó, Curitiba, Brasil; dose total = 5 µg por animal; n=3), 3) 1 µg/g de p.v. de PGE₂ (Prostaglandina E₂; dose total = 25 µg por animal; n = 3), 4) 2 µg/g de p.v. de PGE₂ (dose total = 50 µg por animal; n=3), 5) 6 µg/g de p.v. de PGE₂ (dose total = 150 µg por animal; n=3), e 6) 10 µg/g de p.v. de PGE₂ (dose total = 250 µg por animal; n=3). A PGE₂ utilizada nesse estudo foi obtida junto ao laboratório comercial Sigma-Aldrich (MO, USA). No Dia 3, cerca de 15h após a aplicação dos indutores de ovulação, as fêmeas foram mortas através de deslocamento da cervical. Os ovidutos foram coletados e visualizados sob lupa estereomicroscópica para detecção dos complexos cumulus-oócito (CCO) no lúmen do

oviduto, pela técnica de transiluminação, de acordo com [Bogle et al. \(2011\)](#). Com agulha hipodérmica 22G foi realizada a ruptura do oviduto para efetuar a contagem dos CCOs. A ovulação foi determinada pela presença dos CCOs na ampola do oviduto.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico do [SAS \(2004\)](#). A proporção de camundongos fêmea que ovularam foi analisada pelo teste de Pearson. A média de oócitos coletados por camundongo fêmea foi analisada por One-Way ANOVA e as médias foram comparadas entre os grupos por meio do teste de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas com base em um valor de P menor que 0.05.

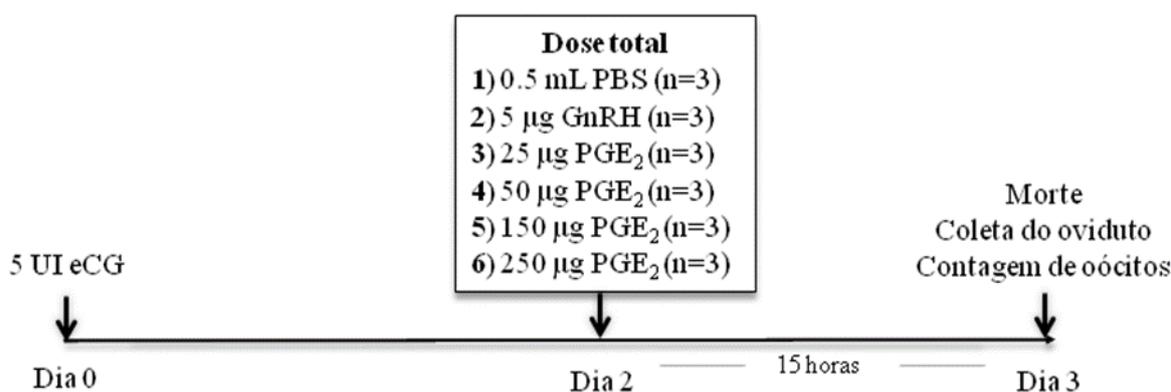


Figura 1. Tratamento hormonal utilizado para indução da ovulação em camundongos fêmeas pré-púberes. Abreviaturas: eCG – Gonadotrofina coriônica equina; PBS, tampão fosfato-salino; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofina; PGE₂, prostaglandina E₂; µg, micrograma.

Resultados

A proporção de camundongos fêmea ovulada e a média de oócitos por camundongo, de acordo com o grupo, podem ser observadas na [Tabela 1](#). Não houve diferença na proporção de fêmeas ovuladas entre os Grupos GnRH e 250 µg PGE₂ (P = 0.2). Quando comparado aos demais grupos

experimentais, fêmeas tratadas com GnRH tenderam a ter (P<0.1) e as tratadas com 250 µg de PGE₂ tiveram (P<0.05) mais ovulações. Nenhum camundongo fêmea tratada com PBS, 25, 50 e 150 de µg de PGE₂ ovulou. A média de oócitos detectados tendeu a ser maior no grupo GnRH do que nos demais grupos (P = 0.08).

Tabela 1. Proporção de camundongos fêmeas pré-púberes que ovularam e média de oócitos por fêmea tratada com PBS, GnRH e diferentes doses de PGE₂.

Resposta ovariana	PBS	GnRH	25 µg PGE ₂	50 µg PGE ₂	150 µg PGE ₂	250 µg PGE ₂	Valor de P
Proporção de fêmeas ovuladas, n	0%, 0/3 ^{aA}	66.6%, 2/3 ^b	0%, 0/3 ^{aA}	0%, 0/3 ^{aA}	0%, 0/3 ^{aA}	100%, 3/3 ^B	< 0.01
Média de oócitos por camundonga	0.0 ± 0.0 ^a	5.6 ± 3.1 ^b	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	2.6 ± 0.3 ^{ab}	< 0.04

Abreviaturas: PBS, tampão fosfato-salino; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofina; PGE₂, prostaglandina E₂; µg, micrograma. ^aValores com letras diferentes na mesma linha tendem a ser diferentes entre si (P < 0.10). ^{AB}Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P < 0.05).

Discussão

Os resultados deste estudo confirmaram a hipótese de que a PGE₂ injetável induz ovulação em camundongos fêmeas pré-púberes. Além disso, este é o primeiro estudo em que se avaliou a capacidade das prostaglandinas E₂ em induzir ovulações em camundongos fêmeas pré-púberes, como também o primeiro a testar a PGE₂ como indutor de ovulação em mamíferos pré-púberes.

Neste experimento, tanto camundongos fêmeas que receberam 25, 50 e 150 µg, como as que não receberam nenhum estímulo ovulatório (grupo PBS) não apresentaram oócitos no oviduto. Em contraste, animais que receberam 250 µg de PGE₂ exibiram oócitos no oviduto, tal qual camundongos que receberam GnRH.

A ovulação resultante da injeção de 250 µg de PGE₂ está em conformidade com os resultados observados por [Evans et al. \(1983\)](#), onde constatou que quantidades relativamente altas de prostaglandinas podem desempenhar um importante papel na ovulação, além de contribuir na luteinização das células da granulosa. Neste mesmo estudo, porcas pré-púberes tratadas com eCG tiveram uma maior produção de prostaglandinas pelas células da teca e granulosa ([Evans et al., 1983](#)) e a aplicação de indometacina em fêmeas imaturas de ratos tratadas previamente com eCG, bloqueou a ovulação e inibiu a secreção de LH, sugerindo que as PGs possam atuar em nível hipotálamo-hipófise ([Armstrong and Grinwich, 1972](#), [Orczyk and Behrman, 1972](#)). [Tsafriri et al. \(1973\)](#) conseguiram induzir a ovulação por injeções de 25 µg, 100 µg, 250 µg e 750 µg de PGE₂ em ratas em plena atividade estral que haviam sido tratadas com indometacina.

Aparentemente, em camundongos, a PGE₂ liberada por astrócitos no hipotálamo estimula a secreção de GnRH, mostrando exercer um efeito excitatório sobre os neurônios de GnRH, e sugerindo que a PGE₂ possui atuação como um gliotransmissor dentro do sistema neurosecretório de GnRH mediada por ativação de receptores EP2 ([Clasadonte et al., 2011](#)). O glutamato é o principal neurotransmissor na ativação dos neurônios de GnRH e possui capacidade de induzir a liberação de PGE₂ a partir de astrócitos por ativação dos receptores ErbB de astrócitos hipotalâmicos (ErbB1 e ErbB4), tendo a participação destes receptores na liberação de GnRH, início da puberdade e na função reprodutiva adulta ([Prevot et al., 2003](#), [Prevot et al., 2005](#), [Clasadonte et al., 2011](#)). [Naor et al.](#)

[\(2007\)](#) mostraram, em ratos, que a PGE₂ induziu a expressão de receptores para GnRH, diferentemente da PGF₂α e PGI₂, além do que a PGE₂ induziu a secreção de LH através do GnRH. A aplicação direta de PGE₂ no terceiro ventrículo do cérebro de ratas maduras aumentou a concentração e amplitude de pulsos de LH no fluido cérebro-espinhal e no soro destes animais ([Matsuwaki et al., 2017](#)).

Apesar de observarmos o efeito da PGE₂ na ovulação de camundongos fêmeas pré-púberes, ainda não foi possível estudar se a indução da ovulação via PGE₂ pode resultar em iniciação da atividade estral e em sucesso no estabelecimento e manutenção da gestação. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa encontra-se trabalhando em novos experimentos para responder de maneira satisfatória a estes desafios. Além disso, novos estudos estão em andamento na tentativa de responder se PGE₂ pode ser utilizada como indutor de ovulação em diferentes espécies, como em animais de grande porte, especialmente àquelas de interesse zootécnico.

Em suma, a dose de 250 µg de PGE₂ é capaz de antecipar a ovulação em camundongos fêmeas pré-púberes. Entretanto, fica evidente a necessidade de realizarem-se mais estudos para elucidar o mecanismo de ação da PGE₂ na ovulação em diferentes mamíferos.

Referências Bibliográficas

- Armstrong, D. T. & Grinwich, D. L. 1972. Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins*, 1, 21-28.
- Bogle, O. A., Ratto, M. H. & Adams, G. P. 2011. Evidence for the conservation of biological activity of ovulation-inducing factor in seminal plasma. *Reproduction*, 142, 277-283.
- Clasadonte, J., Poulain, P., Hanchate, N. K., Corfas, G., Ojeda, S. R. & Prevot, V. 2011. Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 16104-16109.
- Duffy, D. M., McGinnis, L. K., VandeVoort, C. A. & Christenson, L. K. 2010. Mammalian oocytes are targets for prostaglandin E2 (PGE2) action. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 1-12.

- Duffy, D. M. & Stouffer, R. L. 2001. The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 7, 731-739.
- Espey, L. L. 1978. Ovarian contractility and its relationship to ovulation: a review. *Biology of Reproduction*, 19, 540-551.
- Evans, G., Dobias, M., King, G. J. & Armstrong, D. T. 1983. Production of prostaglandins by porcine preovulatory follicular tissues and their roles in intrafollicular function. *Biology of Reproduction*, 28, 322-328.
- Hizaki, H., Segi, E., Sugimoto, Y., Hirose, M., Saji, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Noda, Y., Tanaka, T. & Yoshida, N. 1999. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 10501-10506.
- Kennedy, C. R. J., Zhang, Y., Brandon, S., Guan, Y., Coffee, K., Funk, C. D., Magnuson, M. A., Oates, J. A., Breyer, M. D. & Breyer, R. M. 1999. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nature Medicine*, 5, 217-220.
- Matsuwaki, T., Komatsuda, M., Fujisawa, A., Doke, M., Yamanouchi, K. & Nishihara, M. 2017. Molecular species of prostaglandins involved in modulating luteinizing hormone pulses of female rats under infectious stress conditions. *Journal of Neuroendocrinology*, 29, 1-8.
- Naor, Z., Jabbour, H. N., Naidich, M., Pawson, A. J., Morgan, K., Battersby, S., Millar, M. R., Brown, P. & Millar, R. P. 2007. Reciprocal cross talk between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and prostaglandin receptors regulates GnRH receptor expression and differential gonadotropin secretion. *Molecular Endocrinology*, 21, 524-537.
- Orczyk, G. P. & Behrman, H. R. 1972. Ovulation blockade by aspirin or indomethacin-in vivo evidence for a role of prostaglandin in gonadotrophin secretion. *Prostaglandins*, 1, 3-20.
- Prevot, V., Lomniczi, A., Corfas, G. & Ojeda, S. R. 2005. erbB-1 and erbB-4 receptors act in concert to facilitate female sexual development and mature reproductive function. *Endocrinology*, 146, 1465-1472.
- Prevot, V., Rio, C., Cho, G. J., Lomniczi, A., Heger, S., Neville, C. M., Rosenthal, N. A., Ojeda, S. R. & Corfas, G. 2003. Normal female sexual development requires neuregulin-erbB receptor signaling in hypothalamic astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 23, 230-239.
- SAS. 2004. *SAS/STAT User guide, Version 9.1.2*. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.
- Tsafiriri, A., Koch, Y. & Lindner, H. R. 1973. Ovulation rate and serum LH levels in rats treated with indomethacin or prostaglandin E₂. *Prostaglandins*, 3, 461-467.
- Tsafiriri, A., Lindner, H. R., Zor, U. & Lamprecht, S. A. 1972. Physiological role of prostaglandins in the induction of ovulation. *Prostaglandins*, 2, 1-10.
- Wallis, B., Owman, C., Schmidt, G. & Sjöberg, N.-O. 1986. Evidence for a role of prostaglandins in the adrenergic neuromuscular mechanism of the ovarian follicle wall. *Neuroendocrinology*, 43, 18-23.
- Weems, C. W., Weems, Y. S. & Randel, R. D. 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *The Veterinary Journal*, 171, 206-228.

Article History:

Received 7 August 2017

Accepted 13 September 2017

Available on line 25 October 2017

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.