

THE EFFECT OF BLOCKING PROGESTERONE RECEPTORS ON THE MECHANISM OF OVULATION IN SUPEROVULATED EWES

Cavaco Gonçalves, S.* , Horta, A.E.M.**

*Direcção Geral de Veterinária, Lisboa

** Departamento de Reprodução, Estação Zootécnica Nacional - INIA, Vale de Santarém, Apartado 17, 2000 Vale de Santarém

Summary:

The aim of this work was to check the effect of blocking progesterone receptors on the mechanism of ovulation, in superovulated ewes. The oestrous cycle of 10 ewes was synchronised with vaginal sponges containing 40 mg of fluorogestone acetate (FGA, "Chronogest®", Intervet) during 9 days. The day before sponge withdrawal, all animals received 7.5 mg of PGF2 alpha and 1500 u.i. of PMSG, intramuscularly. The control group received only the treatment above (C, n=5). To the remaining animals (T, n=5) it was further administered a progesterone antagonist (onapristone, ZK 98.299, Schering AG) every 12 h from sponge withdrawal to 24 h after the onset of oestrus (1 mg Kg⁻¹ b.w., intravenously). In both groups, peripheral concentrations of progesterone and LH were respectively measured by radioimmunoassay and ELISA during the periovulatory period.

All animals in both groups showed oestrous behaviour, LH surge and ovulated. Animals receiving the progesterone antagonist started oestrous behaviour significantly sooner than controls (24 h vs. 31.2 h, respectively, P<0.05). Intervals from sponge withdrawal and onset of oestrus to LH surge were not different between groups. The average number of ovulations per animal was not significantly different between groups (5.4 vs. 10, respectively for groups T and C; P>0.05). Peripheral progesterone concentrations were found basal in both groups during the studied period.

Progesterone blockade during the follicular phase of the oestrous cycle in the ewe did not prevent ovulations to occur, suggesting a non essential role of the intrafollicular progesterone on the mechanism of ovulation in this species. Oestrous behaviour on the antiprogestosterone treated animals occurred significantly sooner and in a more synchronised way than in controls, suggesting that intrafollicular progesterone may interfere locally delaying follicular growth.

EFEITO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES DA PROGESTERONA SOBRE O MECANISMO DA OVULAÇÃO EM OVELHAS SUPEROVULADAS

Cavaco Gonçalves, S. *, Horta, A.E.M. **

*Direcção Geral de Veterinária, Lisboa

** Departamento de Reprodução, Estação Zootécnica Nacional - INIA,
Vale de Santarém, Apartado 17, 2000 Vale de Santarém

Sumário:

Com este trabalho pretendeu-se verificar o efeito do bloqueio dos receptores à progesterona sobre o mecanismo de ovulação em ovelhas superovuladas. O ciclo de 10 ovelhas foi sincronizado com esponjas vaginais impregnadas com 40 mg de acetato de fluorgestona (FGA, "Chronogest®", Intervet) durante 9 dias. Vinte e quatro horas antes da remoção das esponjas administraram-se por via i.m. 7,5 mg de PGF_{2α} e 1500 u.i. de PMSG. O grupo placebo (P; n=5) apenas recebeu o tratamento descrito. Aos restantes animais (T; n=5) administrou-se o antagonista da progesterona ZK 98.299, por via endovenosa lenta (1 mg Kg⁻¹ p.v.) de 12 em 12 horas, desde a remoção das esponjas até 24 h após o início do cio, de modo a exercer o seu efeito durante o período das ovulações. Em ambos os grupos doseou-se a progesterona e a LH por radioimunoensaio e ELISA, respectivamente, durante o período pré-ovulatório.

Todos os animais em ambos os grupos mostraram cio, pico de LH e ovulações. Os animais do grupo T iniciaram o cio significativamente mais cedo que os do grupo placebo (24 h vs. 31,2 h, respectivamente, P<0,05). Os intervalos entre a remoção das esponjas e o pico de LH e entre o cio e o pico de LH, não foram diferentes entre os grupos estudados. O número de ovulações por animal, embora apresentando um valor absoluto médio mais baixo no grupo T, não apresentou diferenças significativas entre os grupos (5,4 vs 10, P>0,05). As concentrações periféricas de progesterona mantiveram-se nos valores basais em ambos os grupos, durante o período estudado.

O bloqueio da acção da progesterona durante a fase folicular não inibiu a ovulação em ovelhas superovuladas, sugerindo que a acção desta hormona ao nível do folículo não é essencial ao mecanismo da ovulação. O cio dos animais tratados com o antagonista manifestou-se mais cedo e de forma mais sincronizada do que no grupo placebo, sugerindo que a acção progesterona intrafolicular (não detectada no sangue periférico) parece interferir localmente atrasando o crescimento folicular.

Trabalho parcialmente financiado pelo projecto PRAXIS/3.2/AGR/01/94

Introdução

Os folículos pré-ovulatórios, em resposta ao pico de LH, sintetizam progesterona. A superovulação pode provocar desvios na síntese folicular de progesterona, tendo anteriormente sido detectados níveis plasmáticos periféricos elevados da hormona mesmo antes do pico da LH (Cavaco Gonçalves et al., 1992)

Num trabalho anterior, verificou-se que o bloqueio da acção da progesterona em ovelhas superovuladas desde o início do cio até ao momento do pico da LH não interferiu com o processo da ovulação (Cavaco Gonçalves et al, 1997). O delineamento então utilizado não permitia saber com segurança se a acção da progesterona normalmente sintetizada pelas células da granulosa após o pico da LH tinha ou não sido bloqueada durante o momento da ovulação. Assim, dadas as dúvidas e contradições aparentes suscitadas pelos resultados de Murdoch et al. (1986) relativamente ao trabalho anterior, nos quais a inibição da síntese desta hormona nos ovinos durante o período péri-ovulatório bloqueou a ovulação, decidiu-se clarificar este aspecto no presente trabalho, estendendo o período de bloqueio dos receptores à progesterona para além do momento do pico de LH e da ovulação. O efeito deste tratamento na ocorrência de cios, pico de LH e ovulações foi avaliado.

Materiais e métodos

Neste ensaio foram utilizadas 10 ovelhas, sujeitas a um tratamento de sincronização de cios e superovulação com PMSG. Para a sincronização de cios foram utilizadas esponjas intravaginais impregnadas com 40 mg de acetato de fluorgestona (FGA) ("Chronogest®", Intervet) que permaneceram *in situ* por um período de 9 dias. Vinte e quatro horas antes da remoção das esponjas foram administrados por via intramuscular 7,5mg de PGF_{2α} (Dinolytic®, UpJonh) e 1500 u.i. de PMSG (Intergonan 500®, Intervet).

Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo placebo (P; n=5) apenas recebeu o regime acima descrito. Aos restantes cinco animais (grupo T) foi administrado o antagonista da progesterona ZK 98.299 (Onapristone, 11β-(4-Dimethylaminophenyl)-17α-hydroxy-17-(3-hydroperoxypropyl)-13α-estra-4,9-dien-3one), por via endovenosa lenta, numa dose de 1mg Kg⁻¹ p.v., numa solução de 5mg ml⁻¹ NaCl com 1N HCl e pH=3. A primeira administração foi efectuada no momento da remoção das esponjas, tendo sido efectuadas novas administrações a intervalos de 12 horas até vinte e quatro horas depois de entrada em cio (0, 12, 24, 36 e 48 horas após a remoção das esponjas).

A detecção de comportamento éstrico foi realizada por machos inteiros, a intervalos de 4 horas até que a cobertura ocorresse, num período máximo de 72 horas, com início 24 horas após a remoção das esponjas. Foram realizadas colheitas de sangue por punção da jugular, no momento da inserção das esponjas, da administração da gonadotrofina, da remoção das esponjas e por um período de 72 horas com início 24 horas após a remoção do progestagénio, a intervalos de 4 horas, para posterior doseamento de progesterona e LH (por RIA e ELISA, respectivamente, Cavaco Gonçalves et al., 1997). Foram também realizadas colheitas sanguíneas diárias até aos 7 dias depois da detecção do cio. Realizaram-se endoscopias a todos os animais 48 horas e 7 dias após a detecção do cio.

Resultados

Em todos os animais de ambos os grupos foi detectado comportamento éstrico, pico de LH e ovulações (Tabela 1).

No grupo placebo (P), 4 animais fizeram cio 28 horas após a remoção das esponjas, tendo o quinto animal feito cio às 44 horas. No grupo tratado com o antagonista da progesterona (T) todos os animais apresentaram cio às 24 horas. Verifica-se um encurtamento significativo do intervalo entre a remoção das esponjas e o cio nos animais aos quais foi administrado o antagonista da progesterona ($P < 0,05$). Quanto aos intervalos remoção das esponjas - pico de LH e cio - pico de LH, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos, embora se observe uma tendência para haver um intervalo mais curto no grupo T entre a remoção das esponjas e o pico de LH (Tabela 2).

Tabela 1 - Efeito dos tratamentos sobre o comportamento éstrico, detecção de pico de LH e animais apresentando ovulações.

	Cio (n)	Pico LH (n)	Animais com ovulações
Grupo P (n=5)	5	5	5
Grupo T (n=5)	5	5	5

Tabela 2 - Efeito dos tratamentos sobre o intervalo entre a remoção do progestagénio e o cio, entre aquele e o pico de LH, entre o cio e o pico de LH e o número de ovulações por ovelha.

	n	Remoção-cio (horas)	Remoção-LH (horas)	Cio-LH (horas)	Ovulações por animal
Grupo P	5	31.2 ± 7.16 a	35.2 ± 11.1	4.0 ± 6.33	10.0 ± 5.29
Grupo T	5	24.0 ± 0 b	27.2 ± 4.38	3.2 ± 4.38	5.4 ± 3.85
ANOVA		P=0.0545 F=5.06	P=0.17 F=2.247	P=0.82 F=0.05	P=0.15 F=2.47

A taxa de ovulação, definida como o número médio de ovulações por animal, embora tendencialmente inferior no grupo T, não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos (Tabela 2).

Discussão

Os resultados apresentados permitem concluir que a progesterona intrafolicular não é essencial ao mecanismo da ovulação. Estes resultados parecem contrariar os obtidos por Murdoch et al (1986), que não conseguiram obter ovulações em nenhum dos animais tratados com um inibidor da progesterona (Isoxazol) durante este período. Confrontando os dois resultados, somos levados a concluir que a inibição da síntese da progesterona por este processo é acompanhada por perturbação da síntese de outros produtos directa ou indirectamente dependentes da 3β -hidroxi-esteróide-deshidrogenase (3β -HSD), eles sim, essenciais ao

mecanismo da ovulação. Com efeito o bloqueio dos receptores celulares da progesterona é um método mais específico do que a inibição enzimática da 3β -HSD a qual pode interferir com a síntese de outras substâncias como a 17α -hidroxiprogesterona, a androstenediona, o androstenediol, a testosterona, a estrona e o 17β -estradiol (Edqvist e Stabenfeldt, 1993). Relativamente à utilização de inibidores da 3β -HSD (cyanoketone), Mitchell et al. (1979) confirmaram haver uma diminuição da síntese da progesterona e dos estrogénios. Embora não essenciais à síntese de prostaglandinas, os estrogénios são conhecidos como agentes estimulantes da actividade da ciclooxygenase e consequente síntese de prostaglandinas, tal como indicam estudos realizados sobre o papel luteolítico dos estrogénios na vaca (Lewis e Warren, 1974) e na ovelha (Lewis e Warren 1975). Por outro lado, o papel essencial ao mecanismo íntimo da ovulação em ovinos por parte da $PGF_{2\alpha}$ e da PGE_2 foi claramente demonstrado por Murdoch et al. (1986). Assim, o bloqueio da ovulação por agentes inibidores da actividade enzimática da 3β -HSD, parece dever-se à inibição concomitante da síntese de estrogénios e consequentemente uma menor produção das prostaglandinas essenciais ao mecanismo da ovulação.

Na ratinha, a administração de um antagonista da progesterona (RU 486) durante o período péri-ovulatório, também não interferiu com a ovulação nem com a maturação do oócito, tendo unicamente diminuído o número de embriões recolhidos no oviducto e útero a partir do 3º dia (Roh et al., 1988). Este trabalho, concordando com os nossos resultados na ovelha, parece questionar de igual modo o papel essencial da progesterona no mecanismo da ovulação na ratinha, o qual havia sido postulado por Lipner e Greep (1971) através do bloqueio da 3β -HSD nesta espécie.

Parece deste modo claro que a progesterona não desempenha um papel essencial durante o mecanismo da ovulação na ovelha, quando os resultados deste trabalho e anteriores (Cavaco-Gonçalves et al., 1992, Cavaco-Gonçalves et al., 1997) são confrontados com os de Murdoch et al. (1986).

Bibliografia

- Cavaco Gonçalves, S., Marques, C.C., Stockemann, K., Wang, W., Horta, A.E.M. (1997). Influence of an antiprogestin (onapristone) on in vivo and in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, 46: 55-67.
- Cavaco Gonçalves, S., Marques, C.C., Vasques, M.I., Horta, A.E.M. (1992). Use of RU 486 during superovulation in ewes with PMSG. *Proceedings das VI JORNADAS INTERNACIONALES EN REPRODUCCIÓN ANIMAL E IA*, Asociación Española de Reproducción Animal, pp. 343-347
- Edqvist, L-E., Stabenfeldt, G.H. (1993). The hormones of reproduction. In: "Reproduction in Domestic Animals", B, 9, Ed. G.J. King, Elsevier, pp. 55-73.
- Lewis, P.E., Warren, J.E. (1974). Indomethacin inhibits estrogen-induced luteolysis in heifers. *J. Anim. Sci.*, 39: 992.
- Lewis, P.E., Warren, J.E. (1974). Indomethacin inhibits luteolysis in the ewe. *J. Anim. Sci.*, 41: 365-366
- Lipner, H., Greep, R.O. (1971). Inhibition of steroidogenesis at various sites in the biosynthetic pathway in relation to induced ovulation.
- Mitchel, M.D., Ellwood, D.A., Robinson, J.S., Anderson, A.B.M., Turnbull, A.C. (1979). Prostaglandins and parturition in sheep. *Les Colloques de l'INSERM, Prostaglandines et Physiologie de la Reproduction*. INSERM, septembre 1979, Vol 91, pp. 265-278.

- Murdoch, W.J., Peterson, T.A., Van Kirk, E.A., Vincent, D.L., Inskoop, E.K. (1986). Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol. Reprod.*, 35: 1187-1194.
- Roh, S.I., Batten, B.E., Friedman, C.I., Kim, M.H. (1988). The effects of progesterone antagonist RU 486 on mouse oocyte maturation, ovulation, fertilization and cleavage. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 159: 1584-1589.