

AVALIAÇÃO DE UMA PLATAFORMA FARMACÊUTICA DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE FSH PARA SUPEROVULAÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS

CLEOTAVIO DIAS^{1,2}; STEFANE GABRIELA BORK SOARES^{1,3}; MAGNA FABRÍCIA SVELA¹; THAÍS CASARIN DA SILVA¹; URIEL SECCO LONDERO¹; MARCIO NUNES CORRÊA^{1,4}

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC)
Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Campus Universitário – 96010 900 – Pelotas/RS – Brasil
nupeec@ufpel.edu.br – www.ufpel.edu.br/nupeec

²payacam-2012@hotmail.com; ³stefanebork@gmail.com; ⁴marcio.nunescorreia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Folículos em distintos estágios de desenvolvimento estão normalmente presentes nos ovários, os quais crescem, maturam, e dentre todos apenas um folículo torna-se dominante e capaz de ovular (BALZ et al., 2019). Com intuito de aumentar a eficiência reprodutiva e ganho genético do rebanho bovino em menor espaço de tempo, são utilizadas biotecnologias, como a técnica de superovulação (TSOV).

A TSOV é responsável por estimular o desenvolvimento de um maior número de folículos para ovulação através da administração de gonadotrofinas, principalmente, o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) (RAMOS et al., 2017). Sendo assim, os folículos que sofreriam atresia por privação de FSH podem continuar seu desenvolvimento através da TSOV, pois estes adquirem características fisiológicas parecidas com as do folículo dominante, havendo o desenvolvimento de um maior número de folículos e não a dominância de apenas um (PAULA et al., 2022).

Entretanto, o FSH possui meia-vida curta - aproximadamente 5 horas - e os produtos comercializados no Brasil são de solução aquosa e de liberação rápida. Dessa forma, os protocolos da TSOV são de diversas doses com múltiplas aplicações, o que pode gerar estresse nos animais e causar perdas produtivas e reprodutivas (KIMURA et al., 2016).

Uma forma de diminuir os manejos e, conseqüentemente reduzir o estresse, é através da utilização de plataformas tecnológicas de liberação prolongada, como por exemplo, hidrogéis termossensíveis (GOVERT et al., 2015). Os hidrogéis termossensíveis são veículos farmacêuticos de liberação prolongada, constituídos por polímeros hidrossolúveis sensíveis à temperatura fisiológica dos animais, que ao entrar no organismo, geleifica através de uma transição de estado líquido para um hidrogel (DETERMAN et al., 2007). Em vista disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a geleificação, viabilidade de aplicação e o perfil de liberação do FSH *in vivo*, a partir de plataformas farmacêuticas termossensíveis de liberação prolongada.

2. METODOLOGIA

A fim de resguardar a propriedade intelectual envolvida nesse estudo, não será mencionado os insumos utilizados para o desenvolvimento das formulações termossensíveis. Previamente ao estudo *in vivo*, testes *in vitro* foram realizados, como testes de geleificação e perfil de liberação do princípio ativo em triplicata para validar as formulações. Foram desenvolvidas duas formulações, ambas com 100mg de FSH: Formulação V1 composta pelos polímeros A e B; Formulação V2

composta pelos polímeros A, B e C, ambas através do *cold method* (SCHMOLKA, 1972).

Foi realizado um teste *piloto in vivo* (previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o código 55083-2019), para avaliar a geleificação, viabilidade de aplicação e perfil de liberação plasmática de FSH, utilizando três vacas da raça Jersey, clinicamente saudáveis, mantidas sob a mesma condição de manejo e alimentação, provenientes do Centro Agropecuário da Palma/UFPEL, no município de Capão do Leão/RS.

Todos os animais foram submetidos a um protocolo para transferência de embriões (TE), no qual receberam administração de 2mg de Benzoato de Estradiol intramuscular e implante intravaginal com 1g de progesterona (P4) no dia zero, e no dia quatro foram divididos aleatoriamente em três tratamentos: **Controle**: recebeu o tratamento convencional, com oito doses decrescentes, duas vezes ao dia, durante 4 dias, por via intramuscular de Folltropin-V® (Vetoquinol); **Formulação V1**: recebeu duas doses da formulação V1, com 100mg de FSH, com intervalo de 24 horas (via subcutânea na tábua do pescoço); **Formulação V2**: recebeu duas doses da formulação V2, também com 100mg de FSH, com intervalo de 24 horas (via subcutânea na tábua do pescoço).

Para avaliar as concentrações sanguíneas de FSH, foram coletadas amostras de sangue por punção do complexo arteriovenoso coccígeo através de tubos (10mL, Vacutainer®) com EDTA no dia quatro, nas horas 0 (antes do tratamento com FSH), 3, 6, 9, 24, 33, 48, 57, 72, 81 e 119 horas após o tratamento. As amostras foram centrifugadas a 1500 XG durante 15 minutos. O plasma foi transferido para microtubos do tipo Eppendorf®, identificados e armazenados a -20°C até a realização das análises. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 450nm, através do teste imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), utilizando o Kit Monobind Inc. Lake, Forest, CA 92630, USA. AccuBind ELISA Microwells.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambas formulações foram de fácil aplicação e geleificaram após entrar em contato com a temperatura animal. A concentração de FSH sanguíneo, a partir de duas aplicações da Formulação V1, mostrou-se constante até às 119 horas (Figura 1). Entretanto, cabe mencionar que na hora zero, as concentrações de FSH já estavam elevadas. No trabalho de KIMURA et al. (2016), que utilizou uma formulação de gel de hidróxido de alumínio, obteve liberação do FSH por aproximadamente 60 horas.

Já a Formulação V2 permaneceu na circulação por 24 horas, entretanto em concentrações bem menores ($\leq 0,2\text{ng/mL}$; Figura 1) em comparação ao tratamento controle ($\leq 0,75\text{ng/mL}$) e Formulação V1 ($\geq 0,6\text{ng/mL}$). Segundo RAMOS et al. (2006), concentrações séricas de FSH superiores a $0,5\text{ng/mL}$, podem induzir o primeiro pico de FSH e resultar em ovulação. Portanto, esta formulação não apresentou o desempenho desejado.

Sabe-se que alguns fatores podem influenciar no perfil de FSH sanguíneo, como o escore de condição corporal (ECC), raça e variação animal (PADILHA et al., 2023). Neste estudo, por ser um teste *piloto*, foi utilizado um pequeno número

de animais e não foi avaliado o ECC. Isso, pode ter influenciado nas concentrações plasmáticas de FSH na hora zero.

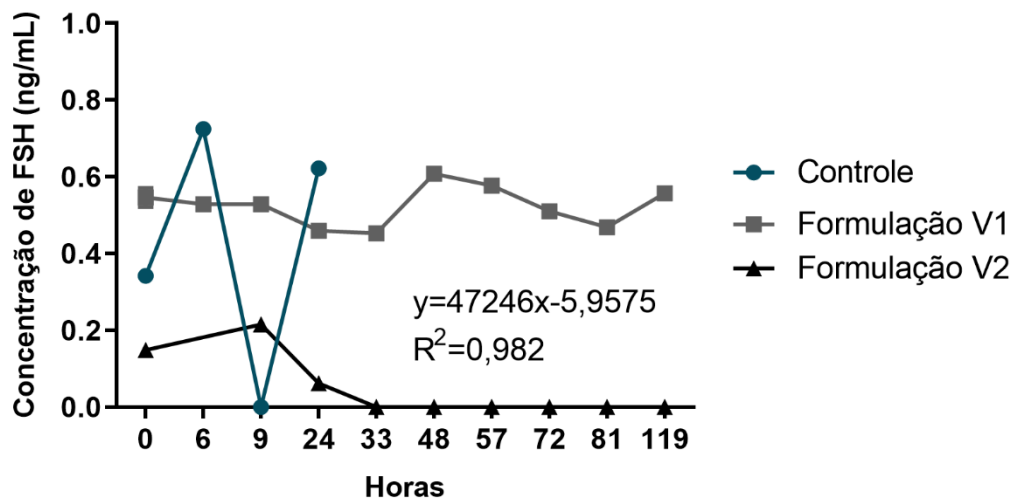


Figura 1: Liberação *in vivo* de FSH, a partir de duas doses (100mg) de FSH, com intervalo de 24 horas, utilizando duas plataformas farmacêuticas termossensíveis de liberação prolongada.

Também foi possível observar que a concentração plasmática de FSH no tratamento controle, foi semelhante ao esperado, tendo pico de liberação 6 horas após a primeira aplicação e queda 9 horas após a primeira aplicação, visto que, a meia-vida deste hormônio é aproximadamente 5 horas (KIMURA et al. 2016).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que ambas formulações geleificaram em temperatura corporal e foram de fácil aplicação. A partir da Formulação V1, as concentrações circulantes de FSH sanguíneo permaneceram mais altas por um tempo maior em comparação a Formulação V2. Entretanto, houve variação nas concentrações de FSH na hora zero, que dificultou a interpretação dos resultados. Outros estudos utilizando maior número de animais com semelhante ECC, será necessário para melhor avaliar o perfil de FSH de ambas formulações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALZ, Déborah Maria et al. VANTAGENS DA SUPEROVULAÇÃO EM BOVINOS. In: **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar (ISSN-2527-2500) & Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar**. 2019.

CARVALHO, B. C. DE et al. Produção de embriões em vacas zebuínas após superovulação com duas formulações comerciais de gonadotrofina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 155–159, 2013.

CAVICHIOLO, Carina et al. **EFEITO DA SUPEROVULAÇÃO NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO EM VACAS DA RAÇA NELORE**. 2015.

DETERMAN, M. D.; COX, J. P.; MALLAPRAGADA, S. K. Liberação de drogas a partir de copolímeros pentablocos termogelificantes responsivos ao pH. **Jornal de pesquisa de materiais biomédicos . Part A**, v. 81, n. 2, p. 326–333, 2007.

GOFERT, L. **Análogo de GnRH em veículo de liberação lenta para indução de crescimento folicular em fêmeas bovinas em anestro**. [s.l: s.n.].

KEMPSWADE, A.; TARANALLI, A. Formulação e avaliação de gel intranasal in situ termorreversível e mucoadesivo de benzoato de rizatriptana. **Jornal de ciência e tecnologia sol-gel**, v. 72, n. 1, p. 43–48, 2014.

KIMURA, K. Superovulação com administração única de FSH em gel de hidróxido de alumínio: um novo método de superovulação para bovinos. **O Jornal de reprodução e desenvolvimento**, v. 62, n. 5, p. 423–429, 2016.

PADILHA, Helen Laysa Zuchinali; GUERIOS, Euler Marcio Ayres. Escore de Condição Corporal (ECC) relacionado a taxa de prenhez em fêmeas bovinas submetidas a procedimento de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 6, n. 1, p. 46-55, 2023.

PAULA, S. **As principais biotécnicas e cenário econômico atual em transferência de embriões em bovinos no Brasil: revisão de literatura**. [s.l: s.n.].

RAMOS, A. F. et al. Efeito de diferentes protocolos de superovulação sobre a concentração plasmática de progesterona e de metabólitos lipídicos de vacas Nelore. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 273–279, 2007.

RAMOS, Alexandre Floriani. **Efeito de progesterona e benzoato de estradiol na dinâmica folicular e produção in vitro de embriões bovinos**. 2006.

SCHMOLKA, I. R. Pele artificial I. **Preparação e propriedades dos géis Pluronic F-127 para tratamento de queimaduras**. **Jornal de pesquisa de materiais biomédicos**, v. 6, n. 6, p. 571-582, 1972.