

## O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL EM BOVINOS PODE SER AFETADO POR LIPOPOLISSACARÍDEOS?

JOAO A. A. RINCÓN<sup>1,2</sup>; BRUNA MION<sup>2</sup>; PATRICIA GINDRI<sup>2</sup>; LIGIA M. C. PEGORARO<sup>3</sup>; MARCIO N. CORREA<sup>1</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) – UFPel – RS, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Veterinária – UFPel – RS, Brasil

<sup>3</sup>Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil

<sup>4</sup>Faculdade de Nutrição – UFPel – augustoschneider@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Em bovinos, a maior incidência de doenças ocorre no primeiro mês após o parto, no qual cerca de 40% do rebanho pode desenvolver metrite, enquanto que de 20 a 50% pode desenvolver mastite (OPSOMER et al., 2000). Animais acometidos por estas doenças apresentam redução do crescimento folicular, atraso na ovulação, extensão da fase lútea (DOHMEN et al., 2000), alteração nas concentrações dos hormônios estradiol (WILLIAMS et al., 2007), folículo-estimulante e luteinizante (SHELDON et al., 2002), causando uma diminuição da fertilidade e aumento do descarte de animais por incapacidade de concepção (BROMFIELD e SHELDON, 2011).

Um dos principais causadores de infecções como mastite e metrite, é a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* (SHELDON et al., 2002), que possui na sua parede celular lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas que provocam uma forte resposta por parte do sistema imunitário, promovendo a resposta inflamatória (MATEUS et al., 2003; KOHCHI et al., 2006). Com a lise de bactérias como a *E. coli* durante a infecção, o LPS pode entrar na corrente sanguínea e atingir locais distantes da origem da infecção, gerando uma resposta inflamatória e efeitos diretos em outros tecidos. Neste sentido, já foi reportada a presença de LPS no plasma sanguíneo, fluido uterino (MATEUS et al., 2003) e fluido folicular (HERATH et al., 2007) em vacas acometidas com mastite ou metrite infecciosa.

O LPS atua no hipotálamo ou na hipófise, inibindo a liberação de gonadotrofinas e conseqüentemente alterando o desenvolvimento folicular (SUZUKI et al., 2001). Também foi demonstrado que o LPS pode ter um efeito direto no ovário, alterando a esteroidogênese e conseqüentemente a atividade ovariana (HERATH et al., 2007; CAMPOS et al., 2017). Adicionalmente, foi encontrado *in vitro* que o LPS reduz a taxa de maturação meiótica de oócitos bovinos (BROMFIELD e SHELDON, 2011) e o desenvolvimento embrionário inicial (MAGATA e SHIMIZU, 2017). Entretanto, a maioria de estudos *in vivo* utilizam altas doses de LPS, buscando mimetizar as concentrações séricas de LPS em animais com doenças clínicas, ou até doses superiores ao fisiologicamente possível. Além disso, faltam evidências de como o LPS *in vivo* pode afetar o processo de maturação oocitária e desenvolvimento embrionário. Baseado no exposto anteriormente, tornou-se necessário estudar os mecanismos pelos quais concentrações séricas de LPS comumente encontradas em doenças subclínicas, podem afetar a fertilidade a nível de oócito e de embrião. Assim, objetivou-se avaliar o efeito do LPS intravenoso sobre o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* em bovinos.

## 2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (Protocolo 9364). Foram utilizadas 16 novilhas de corte (*Bos taurus*), saudáveis, idade média de 14 meses, manejadas em sistema de confinamento. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo LPS (n=8), que recebeu 2 aplicações de 2 mL de solução salina i.v. (0,9% de NaCl) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich®, Missouri, EUA), com intervalo de 24 horas; e grupo controle (n=8), que recebeu 2 aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) no mesmo intervalo. A primeira aplicação de LPS foi no dia 1 do protocolo de sincronização da onda folicular.

Quatorze dias antes de começar o protocolo, foi aplicada uma dose de 25 mg de PGF2α (i.m., Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, SP, Brasil). No dia zero do protocolo foi colocado o dispositivo intravaginal liberador de progesterona (1g de P4, CIDR®, Zoetis,) mais 2 mg de Benzoato de estradiol (i.m., Gonadiol®, Zoetis) e 25 mg de PGF2α (i.m., Lutalyse®, Zoetis). A temperatura retal de todos os animais foi aferida com o auxílio de termômetro digital às 0, 4, 24 e 28 horas, em relação ao primeiro desafio com LPS (hora 0). No quinto dia do protocolo de sincronização, todos os animais foram abatidos em frigorífico local e os ovários foram coletados e transportados ao laboratório.

No laboratório, foram aspirados folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm dos ovários por animal. Após, foram recuperados os complexos cumulus oócitos (COCs), selecionados quanto à morfologia (DE LOOS et al., 1991) e encaminhados para maturação *in vitro* (MIV). A MIV ocorreu em gotas individuais para cada animal, em meio TCM199B (Gibco®, Grand Island, NY, USA) suplementado com 0,2 mM de piruvato, 0,1 µL de FSH, 75 µg/mL de amicacina, 0,1 ng/mL de estradiol e 10 % de SFB, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e 39 °C durante 22 horas. Após a MIV, os COCs foram transferidos ao meio TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL de BSA, 0,2 mM de piruvato, 30 µg/mL de heparina, 20 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina, 1 µM de epinefrina e 75 µg/mL de amicacina. A inseminação foi conduzida com sêmen da mesma partida, na concentração de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, utilizando mini gradiente de Percoll (PARRISH et al., 1995) como método de seleção espermática.

Vinte horas após a inseminação, os prováveis zigotos foram desnudados das células do cumulus mediante sucessivas pipetagens e transferidos ao meio de cultivo (SOFaa acrescido de 2,7 mM de myo-inositol, 0,2 mM de piruvato, 5 mg/mL de BSA e 75 µg/ml de amicacina) sob óleo mineral. O cultivo embrionário ocorreu em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 39 °C durante 7 dias. No dia 3 foi avaliada a taxa de clivagem (clivados/inseminados) e ao sétimo dia foi avaliada a taxa de desenvolvimento embrionário (blastocistos/clivados).

Os resultados foram analisados através do teste de Chi-quadrado no programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), considerando significativos valores de  $P < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais do grupo LPS apresentaram maior temperatura corporal quatro horas após cada desafio, quando comparado com o grupo controle ( $P = 0,021$ ). Além disso, esse aumento de temperatura no grupo LPS foi característico do estado febril, visto que a temperatura foi >39,6°C, corroborando uma resposta

inflamatória sistêmica induzida pelo LPS. O grupo controle apresentou temperatura corporal de 38,8 a 39,2 °C durante todo o experimento.

Oócitos provenientes das novilhas desafiadas com duas infusões de LPS i.v. com intervalo de 24 horas, apresentaram diminuição ( $P = 0.032$ ) na taxa de clivagem em comparação aos oócitos de novilhas não desafiadas (Tabela 1). Entretanto, o desafio com LPS não afetou a taxa de desenvolvimento embrionário no dia 7 de cultivo, como demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário de oócitos provenientes de novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeos (LPS).

Parâmetro avaliado	Controle	LPS	Valor de $P$
Taxa de clivagem	70,2 % (73/104) <sup>a</sup>	54,3 % (38/70) <sup>b</sup>	0,032
Taxa de desenvolvimento embrionário	31,5 % (23/73) <sup>a</sup>	31,6 % (12/38) <sup>a</sup>	0,45

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na fila significam diferença estatística.

Estudos *in vitro* demonstram que o LPS durante a maturação oocitária afeta negativamente a maturação nuclear, diminuindo a taxa de clivagem e a taxa de desenvolvimento embrionário (MAGATA e SHIMIZU, 2017; ZHAO et al., 2017), isso comprova que o LPS pode ter efeitos diretos a nível oocitário. Entretanto, nós utilizamos baixas doses de LPS intravenoso em um curto período de tempo, essas doses visaram mimetizar a concentração sérica de LPS de animais acometidos por doenças subclínicas como mastite e metrite. À vista disso, possivelmente o LPS não tenha conseguido atingir o fluido folicular na quantidade necessária para causar efeitos deletérios com a mesma intensidade do que o evidenciado *in vitro*. Apesar disso, nossos resultados mostram que baixas doses de LPS são capazes de gerar uma resposta sistêmica no animal, acompanhado da diminuição da taxa de clivagem.

Contudo, destaca-se que mesmo que a porcentagem de embriões no grupo LPS (taxa de desenvolvimento embrionário) não diferiu do grupo controle, o grupo LPS apresentou cerca da metade de embriões do que o grupo controle (Tabela 1), o que na prática pode se traduzir em menor taxa de prenhez. Isso provavelmente está associado ao fato do grupo controle ter apresentado maior número de oócitos viáveis recuperados na aspiração folicular do que o grupo LPS (104 vs 70).

#### 4. CONCLUSÕES

A injeção de lipopolissacarídeo intravenoso diminui a taxa de clivagem em bovinos, porém não afeta a taxa de desenvolvimento embrionário. Entretanto, mais análises estão sendo realizadas para investigar possíveis mecanismos de ação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROMFIELD, J.J.; SHELDON, I.M. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression *in vitro*. **Endocrinology**, v. 152, n. 12, p. 5029-40, 2011.

CAMPOS, F.T.; RINCON, J.A.A.; ACOSTA, D.A.V.; SILVEIRA, P.A.S.; PRADIEÉ, J.; CORREA, M.N.; GASPERIN, B.G.; PFEIFER, L.F.M.; BARROS, C.C.; PEGORARO, L.M.C.; SCHNEIDER, A. The acute effect of intravenous

lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. **Theriogenology**, v. 89, p. 244-249, 2017.

DE LOOS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIP, T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular reproduction and development**, v. 28, n. 3, p. 255-9, 1991.

DOHMEN, M.J.; JOOP, K.; STURK, A.; BOLS, P.E.; LOHUIS, J.A. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. **Theriogenology**, v. 54, n. 7, p. 1019-32, 2000.

HERATH, S.; WILLIAMS, E.J.; LILLY, S.T.; GILBERT, R.O.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. **Reproduction**, v. 134, n. 5, p. 683-93, 2007.

KOHCHI, C.; INAGAWA, H.; NISHIZAWA, T.; YAMAGUCHI, T.; NAGAI, S.; SOMA, G. Applications of lipopolysaccharide derived from Pantoea agglomerans (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory. **J Biosci Bioeng**, v. 102, n. 6, p. 485-96, 2006.

MAGATA, F.; SHIMIZU, T. Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. **Reproductive toxicology**, v. 71, p. 1-7, 2017.

MATEUS, L.; LOPES DA COSTA, L.; DINIZ, P.; ZIECIK, A.J. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. **Animal reproduction science**, v. 76, n. 3-4, p. 143-54, 2003.

OPSOMER, G.; GROHN, Y.T.; HERTL, J.; CORYN, M.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, v. 53, n. 4, p. 841-57, 2000.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-69, 1995.

SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E.; RYCROFT, A.N.; PFEIFFER, D.U.; DOBSON, H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. **Reproduction**, v. 123, n. 6, p. 837-45, 2002.

SUZUKI, C.; YOSHIOKA, K.; IWAMURA, S.; HIROSE, H. Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. **Domestic animal endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 267-78, 2001.

WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; NOAKES, D.E.; ENGLAND, G.C.; RYCROFT, A.; DOBSON, H.; SHELDON, I.M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 549-59, 2007.

ZHAO, S.J.; PANG, Y.W.; ZHAO, X.M.; DU, W.H.; HAO, H.S.; ZHU, H.B. Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte in vitro and its possible mechanisms. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 4656-4667, 2017.