

INFLUÊNCIA DA INJEÇÃO INTRAFOLICULAR DE LIPOPOLISSACARÍDEO SOBRE A RESPOSTA OVULATÓRIA DE BOVINOS LEITEIROS

PATRÍCIA CARVALHO GINDRI¹; BRUNA MION²; NATÁLIA ÁVILA DE CASTRO³;
BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁴; LÍGIA MARGARETH CANTARELLI
PEGORARO⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – patriciagindri@gmail.com; ²Universidade Federal de Pelotas – brunamion.vet@gmail.com; ³Universidade Federal de Pelotas – nataliavetufpel@gmail.com; ⁴Universidade Federal de Pelotas – bqgasperin@gmail.com; ⁵Embrapa Clima Temperado – ligia.pegoraro@embrapa.br; ⁶Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias pós-parto são predominantes em rebanhos leiteiros, prejudicando o desempenho reprodutivo. Em média, 40% dos animais apresentam quadros de metrite nas três primeiras semanas após o parto, sendo que a doença uterina pode persistir na forma de endometrite em até 20% destes animais, enquanto que as mastites estão presentes em 20-50% nos rebanhos leiteiros (SHELDON et al., 2009; MAGATA et al., 2014). De forma indireta, as infecções uterinas e mamárias podem interferir em vários aspectos da função ovariana, resultando em crescimento folicular mais lento, redução na concentração de estradiol, alteração das fases luteínicas e interrupção da atividade cíclica ovariana (LAVON et al., 2008; SHELDON et al., 2002).

As infecções são causadas geralmente por bactérias gram-negativas como a *Escherichia coli* (E. coli), que contém lipopolissacarídeo (LPS) na sua membrana externa. O LPS é uma endotoxina, que age como um potente estimulador da resposta inflamatória (CARROL et al., 2009; BROMFIELD e SHELDON, 2013). O reconhecimento do LPS ocorre a partir dos receptores Toll-like. Estes receptores estão associados a células do sistema imune, incluindo macrófagos e neutrófilos, que iniciam cascatas de sinalização, resultando na produção de mediadores inflamatórios e imunes com o objetivo de combater os patógenos (BEUTLER, 2004).

A presença de LPS já foi detectada no fluido uterino e fluido folicular de bovinos que apresentaram infecções uterinas (HERATH et al., 2007; MAGATA et al., 2015). Além disso, também foi observada presença de LPS no plasma e leite de vacas com mastite por E. coli (MATEUS et al., 2003). Infecções por E. Coli tem sido associadas a redução do crescimento e função de folículos ovarianos, resultando em menor taxa ovulatória (SHELDON et al., 2002; WILLIAMS et al., 2007). Pesquisas anteriores realizadas *in vitro* e *in vivo*, têm demonstrado associação do LPS com desempenho reprodutivo de bovinos leiteiros no período pós-parto, no entanto, o mecanismo pelo qual o LPS interfere a reprodução ainda não está bem claro.

Dessa forma, o mecanismo pelo qual o LPS afeta o desenvolvimento folicular e a ovulação ainda deve ser estudado. Assim, nosso objetivo é avaliar o efeito da injeção intrafolicular de LPS sobre o desenvolvimento folicular e ovulação em bovinos leiteiros.

2. METODOLOGIA

. Nesse estudo foram utilizadas oito fêmeas bovinas não lactantes da raça Jersey, com média de escore corporal (ECC) $3,2 \pm 0,48$ (em uma escala de 1 a 5) com peso médio de 380 kg, mantidas em sistema extensivo na EMBRAPA Clima

Temperado. Todos os animais foram submetidos a um protocolo de sincronização hormonal. No dia 0 (D0), folículos ≥ 8 mm foram aspirados através de punção vaginal guiada por ultrassonografia transvaginal.

Após a aspiração, os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1g, Primer®), 2 mg de Benzoato de Estradiol (Sincrodiol®) i.m. e 25 mg de Cloprostenol Sódico (Sincrocio®) i.m.. No D4, outra dose de Cloprostenol Sódico foi administrada, seguido da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona. Os animais foram avaliados por ultrassonografia (Aquila pro, Esaote, São Paulo, SP, Brasil, transdutor linear 6 MHz), a cada 24 horas, para assegurar que novos folículos estavam em fase de crescimento e que os folículos da onda anterior foram eliminados após a aspiração. No D6, quando o maior folículo alcançou $8,6 \pm 0,53$ mm, foi injetada uma dose final de 1 ug/mL de LPS (LPS de E. coli O111:B4, Sigma-Aldrich) (Grupo LPS) no interior no folículo, através de um sistema com uma agulha acoplada e o auxílio de ultrassonografia transvaginal. O volume injetado foi calculado com base no volume de fluido folicular estimado através da equação de regressão $V = -685,1 + 120D$, onde V corresponde ao volume folicular estimado e D ao diâmetro do folículo a ser injetado, segundo estudo de Ferreira et al. (2007). No grupo controle, foi injetado o volume correspondente de solução salina. Os grupos foram divididos aleatoriamente, totalizando quatro animais em cada grupo. Os animais foram acompanhados através da ultrassonografia de 12 em 12 horas após a injeção para mensuração do diâmetro do folículo injetado e detecção da ovulação.

Os dados foram avaliados através do software estatístico GraphPad® 6.01 (GraphPad software, Inc., CA, USA). O diâmetro ovulatório e momento da ovulação foram avaliados através do teste t e a taxa ovulatória por qui-quadrado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diâmetro ovulatório do grupo controle ($10,73 \pm 0,73$ mm) não diferiu ($P=0.6$) do grupo LPS ($11,50 \pm 1,72$ mm). O crescimento folicular até o momento da ovulação de ambos os grupos é demonstrado na Figura 1. Apesar de não termos encontrado diferença no crescimento folicular neste estudo, já foi relatado que animais com infecções uterinas, apresentam efeito negativo na seleção, crescimento e função de folículos (SHELDON et al., 2002).

Além disso, a taxa ovulatória do grupo controle (100%; 4/4) não foi diferente do grupo LPS (75%; 3/4) ($P= 1.0$). O efeito das contaminações uterinas sobre o crescimento folicular pode estar relacionado com a interrupção da secreção de LH, ou até mesmo por um efeito direto sobre o ovário (BATAGLIA et al., 2000). Sabe-se que quanto maior os níveis de LH durante o crescimento folicular, maior as chances de folículos se tornarem dominantes e ovularem (PFIFFER, et al., 2009). No entanto, quando os níveis de LH durante as infecções são interrompidos, a ovulação pode não ocorrer.

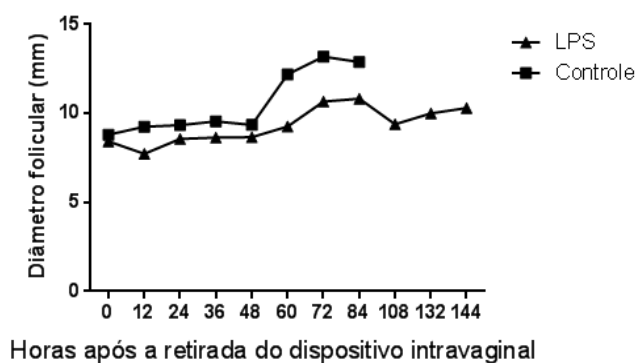


Figura 1: Crescimento folicular após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona das vacas do grupo controle e LPS.

No nosso estudo também não foi observado diferença estatística ($P= 0.28$) no momento da ovulação entre os grupos controle ($63:00 \text{ hs} \pm 11.36$) e LPS ($92:00 \text{ hs} \pm 24:33$). No entanto, estudos realizados por LAVON et al. (2008) demonstraram que ao injetar LPS intravenoso ou intramamário, as fêmeas apresentaram ovulação mais tardia quando comparadas às fêmeas do grupo controle. No mesmo sentido, novilhas que receberam LPS pela via intrauterina, apresentaram ovulação tardia (PETER et al., 1989). Já foi demonstrado que o LPS influencia negativamente o crescimento folicular e a produção de estradiol, fazendo com que haja consequências importantes para o sucesso da ovulação e posterior gestação nos bovinos (HERATH et al., 2007). Nosso grupo relatou anteriormente que ao injetar LPS intravenoso em bovinos, expressão de genes ligados a esteroidogênese foi diminuída (CAMPOS et al., 2017).

Como este estudo se trata apenas de um estudo preliminar, mais testes são necessários para avaliar a relação do LPS intrafolicular com a ovulação, assim como outras análises hormonais devem ser realizadas para que possamos chegar numa conclusão mais específica. Porém há um indicio de que o LPS causa retardo no crescimento folicular, atraso na ovulação e diminuição da taxa ovulatória.

4. CONCLUSÕES

Não houve influência da injeção de LPS intrafolicular sobre o diâmetro folicular, momento da ovulação e taxa ovulatória dos bovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATTAGLIA, D.F.; KRASA H.B.; PADMANABHAN, V.; VIGUIE, C.; KARSCH, F.J. Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 62, p.45–53, 2000.
- BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. **Nature**, v.430, p.257-263, 2004.
- BROMFIELD, J.; SHELDON, M. Lipopolysaccharide Reduces the Primordial Follicle Pool in the Bovine Ovarian Cortex Ex Vivo and in the Murine Ovary In Vivo. **Biology of Reproduction**, v.88, n. 4, pg. 98, 1-9, 2013.
- CARROLL, J.A.; REUTER, R.R.; CHASE, C.C.; COLEMAN, S.W.; RILEY D.G.; SPIERS D.E.; ARTHINGTON, J.D.; GALYEAN, M.L. Profile of the bovine acute-

phase response following an intravenous bolus dose lipopolysaccharide challenge. **Innate Immunity**, v.15, p.81-89, 2009.

De CAMPOS, F.T.; RINCON, J.A.A.; ACOSTA, D.A.V.; SILVEIRA, P.A.S.; PRADIEE, 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 componentes and gene expression. In granulose cells of the bovine dominant follicle. **Theriogenology**, v.89, p. 244-249, 2017.

FERREIRA, R.; OLIVEIRA, F.J.; FERNANDES, R.; MORAES, J.F.; GONÇALVES, P.B. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, p.713-719, 2007.

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, p.683–693, 2007.

LAVON, Y.; LEITNER, G.; GOSHEN, T.; BRAW-TAL, R.; JACOBY, S.; WOLFENSON, D. Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. **Theriogenology**, v 70, n.6, p. 956-967, 2008.

MAGATA, F.; HORIUCHU, M.; ECHIZENYA, R.; MIURA, R.; CHIBA, S.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A.; KOBAYASHI, Y.; SHIMIZU, T. Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.144, p.6-13, 2014.

MAGATA, F.; ISHIDA, Y. MIYAMOTO, A., FURUOKA, H., INOKUMA, H., SHIMIZU, T. Comparison of bacterial endotoxin lipopolysaccharide concentrations in the blood, ovarian follicular fluid and uterine fluid: a clinical case of bovine metritis. **Theriogenology**, v.77, p.81–84, 2015.

MATEUS, L.; LOPES, C.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, p. 143-154, 2003.

PETER, A.T.; BOSU, W.T.K.; DEDECKER, R.L. Suppression of preovulatory luteinizing hormone surges in heifers after intrauterine infections of Escherichia coli endotoxin. *American Journal of Veterinary Research*, v.50, p.368–373, 1989.

PFEIFER, L. F.M.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, J. P.; SMALL, J. A.; ADAMS, G.P.; DIONELLO, N.J.; SINGH, J. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. **Theriogenology**, v. 72, p. 1237-1250, 2009.

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, p.837-845, 2002.

SHELDON, M.I.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SCHUBERTH, H.J. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of infection and immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 81, p.1025-1032, 2009.

WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; NOAKES, D.D.; ENGLAND, G.C.W.; RYCROFT, A.; DOBSON, H.; SHELDON, I.M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian fuction in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v.68, p.549-559, 2007.