

EFEITO DE BAIXAS DOSES DE LIPOPOLISSACARÍDEO INTRAVENOSO SOBRE OÓCITOS BOVINOS

ROSANA KLAUS¹; JOAO ALVEIRO ALVARADO RINCON¹;
ANDRESSA STEIN MAFFI¹; ANTONIO AMARAL BARBOSA¹; BRUNA MION¹;
CASSIO CASSAL BRAUNER³

¹ Universidade Federal de Pelotas, UFPel – rosanaklaus94@gmail.com

³ Departamento de Zootecnia – UFPel – cassiocb@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Em bovinos, doenças como mastite, metrite e endometrite são responsáveis por causar grandes perdas econômicas no setor produtivo, sendo que um dos principais agentes infecciosos causadores dessas doenças são as bactérias gram-negativas (BIDNE et al., 2018). Essas bactérias possuem na sua parede externa lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas capazes de induzir uma potente resposta inflamatória no animal (RAETZ&WHITFIELD, 2008). Quando há lise desse tipo de bactérias, o LPS é liberado, podendo entrar na corrente sanguínea e atingir locais distantes da origem da infecção.

Estudos demonstram que em bovinos, o LPS pode afetar negativamente a fertilidade, alterando a liberação e produção de hormônios gonadotróficos e esteroides, prolongando a fase lútea, diminuindo a maturação oocitária e reduzindo as taxas de clivagem, dentre outros (HERATH et al., 2007; DE CAMPOS et al., 2017; BIDNE et al., 2018;). No entanto, os mecanismos pelos quais ocorrem esses efeitos ainda não estão bem claros. Assim, diversos estudos têm utilizado a aplicação de LPS exógeno como ferramenta para tentar elucidar ditos mecanismos, porém, a maioria dos estudos utilizam altas doses de LPS e demonstram que este induz uma potente resposta inflamatória e provoca vários efeitos negativos em diferentes tecidos (RAETZ & WHITFIELD, 2008). Entretanto, altas doses de LPS assemelham-se às concentrações de LPS sanguíneo de doenças na sua forma clínica. Contudo, sabe-se que doenças subclínicas acarretam muitas vezes em mais perdas econômicas nos sistemas pecuários do que sua forma clínica, devido à dificuldade em serem diagnosticadas e, conseqüentemente, tratadas.

A compreensão desses efeitos tem grande importância no que tange à eficiência reprodutiva em sistemas pecuários, tendo em vista o impacto provocado por algumas doenças através do LPS sobre a fertilidade, principalmente à nível folicular e oocitário (BIDNE et al., 2018; SHELDON et al., 2009). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de baixas doses de LPS intravenoso sobre o número e viabilidade de oócitos bovinos.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil (Protocolo 9364). Foram utilizadas 16 novilhas de corte da raça Aberdeen Angus, saudáveis, em média 14 meses de idade, manejadas em sistema de confinamento, recebendo uma dieta a

base de volumoso e concentrado, em uma proporção de 60:40 respectivamente e água à vontade. Todos os animais permaneceram sob as mesmas condições de manejo e foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo LPS (n=8), que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA) via intravenosa, com intervalo de 24 horas; ou 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 (D1), em relação ao protocolo de sincronização da onda folicular. 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).

Para sincronização da onda folicular, os animais receberam uma dose de 25 mg de prostaglandina (PGF2α, IM, Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil), quatorze dias antes de iniciar o protocolo. No dia zero do protocolo (D0) foi realizada a colocação do dispositivo intravaginal liberador de progesterona (1g de P4, CIDR®, Zoetis®,) mais 2 mg de Benzoato de estradiol (IM, Gonadiol®, Zoetis) e 25 mg de PGF2α (Lutalyse®, Zoetis) via IM. No dia cinco (D5) do protocolo, todos os animais foram abatidos em frigorífico local. No abate foram coletados, pesados e identificados os ovários de cada animal e transportados ao laboratório em solução salina (NaCl 0,9%) suplementada com antibiótico e aquecida à 30 °C. Para obtenção dos complexos cumulus oócitos (COCs), foram aspirados folículos com diâmetro de 2-8 mm de cada par de ovários por animal. Com auxílio de estereoscópio foi registrado o número total de COCs recuperados e o número de COCs viáveis de cada animal. Foram considerados viáveis os COCS de grau I (cumulus compacto, com três ou mais camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneo, coloração marrom em todo espaço), II (menos camadas de células, heterogêneo, coloração mais intensa no centro e mais clara na periferia) e III (cumulus expandido com apenas uma camada de células, heterogêneo), conforme descrito por DE LOOS et al. (1991).

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) através do teste t para COCs totais e peso dos ovários e, teste de qui-quadrado para COCs viáveis, nos grupos LPS e controle. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão. Foi considerada diferença estatística valores de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração intravenosa de baixas doses (0,5 µg/kg) de LPS provocou o aumento da temperatura retal, quatro horas após a aplicação, em comparação com o grupo controle. Em ambos os desafios com LPS, os animais apresentaram quadro febril, com temperatura retal acima do fisiológico, como demonstrado na Tabela 1. Este achado reforça a resposta sistêmica desenvolvida pela aplicação da endotoxina, semelhante ao que foi demonstrado por Campos et al. (2017), embora naquele estudo tenha sido utilizado uma dose superior de LPS (2,5 µg/kg) em comparação a usada no presente estudo.

Tabela 1. Temperatura retal registrada durante os desafios com LPS.

| Hora da aferição | Controle | LPS | Valor de P |
|------------------|--------------|--------------|------------|
| 0* | 39,23 ± 0,14 | 39,49 ± 0,09 | 0,145 |
| 4 | 38,84 ± 0,14 | 39,94 ± 0,30 | 0,021 |
| 24* | 39,35 ± 0,20 | 39,26 ± 0,26 | 0,81 |
| 28 | 38,95 ± 0,21 | 39,43 ± 0,10 | 0,046 |

*Momento da aplicação do LPS.

Em animais acometidos por infecções bacterianas em que há liberação de LPS, os efeitos são provocados a partir do reconhecimento da endotoxina pelo sistema imunológico, promovendo resposta inflamatória (SHELDON et al., 2009). A nível reprodutivo, na foliculogênese, o LPS suprime o crescimento e reduz o número de folículos primordiais (BROMFIELD & SHELDON 2013). O LPS também possui efeitos sobre o eixo hipotalâmico hipofisário gonadal, diminuindo a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), conseqüentemente, inibindo ou atrasando a ovulação (SUZUKI et al., 2001; HOSHINO et al., 1999). Ainda, pode comprometer a produção de P4 pelo corpo lúteo (CL), levando à redução da fase luteínica, podendo provocar aborto (SUZUKI et al., 2001; HERZOG et al. 2012). Além disso, *in vitro*, o LPS é capaz de inibir a progressão meiótica durante a maturação oocitária e reduzir desenvolvimento de blastocistos (MAGATA & SCHIMIZU, 2017).

Apesar dos resultados encontrados na literatura, a baixa dose de LPS utilizada nesse estudo não demonstrou ter efeito ($P > 0,05$) sobre o peso dos ovários, oócitos totais e oócitos viáveis por animal (Tabela 2). A ausência de efeito pode ser explicada pelo curto período de exposição ao LPS, ou por este não ter atingido concentrações suficientes nos ovários para causar dano. Estudos anteriores (LÜTTGENAU et al., 2016) demonstraram que a mesma dose de LPS (0,5 µg/kg) tem efeito sobre o ovário, afetando negativamente a função do CL, porém nesse estudo o efeito sobre os oócitos não foi avaliado.

Tabela 2. Parâmetros avaliados em novilhas que reberam ou não doses baixas de LPS intravenoso.

| Parâmetro avaliado | Controle | LPS | Valor de P |
|--------------------------|------------------|-----------------|------------|
| Peso ovários | 9,76 ± 1,4 | 8,73 ± 1,0 | 0,56 |
| Estruturas totais/animal | 20,13 ± 4,6 | 15,88 ± 3,0 | 0,45 |
| Oócitos viáveis /animal | 13,5 ± 3,6 | 9,75 ± 2,1 | 0,39 |
| Oócitos viáveis grupo | 67,1 % (108/161) | 61,4 % (78/127) | 0,76 |

Apesar de não haver diferença estatística, é interessante observar que o número total de oócitos recuperados no grupo LPS foi de 127 e do grupo controle foi de 161, essa diferença numérica na prática pode se traduzir em menor número de embriões. Por outro lado, embora o LPS não tenha afetado o número de oócitos viáveis, o desafio com LPS intravenoso pode ter afetado os oócitos a nível

molecular, indiretamente através da resposta inflamatória ou diretamente atingindo o ovário, podendo induzir processos apoptóticos que conseqüentemente iriam diminuir a chance desses oócitos atingir o estágio de blastocisto. Para confirmar essa hipótese, mais análises estão sendo realizadas.

4. CONCLUSÕES

Baixas doses de LPS intravenoso durante a sincronização da onda folicular não afeta o número total de oócitos recuperados nem o número de oócitos viáveis. No entanto, mais análises estão sendo realizadas para avaliar outros possíveis efeitos do LPS a nível oocitário.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIDNE, K., DICKSON, M., ROSS, J. W., BAUMGARD, L., & KEATING, A. Disruption of female reproductive function by endotoxins. **Reproduction**, p. 17, 2018.
- BROMFIELD, J. J., & SHELDON, I. 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, p. 98-1, 2013.
- DE CAMPOS, F. T., RINCON, J. A. A., ACOSTA, D. A. V., SILVEIRA, P. A. S., PRADIEÉ, J., CORRÊA, M. N., ... & 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.
- 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. 683-693, 2007.
- HOSHINO K, TAKEUCHI O, KAWAI T, SANJO H, OGAWA T, TAKEDA Y, TAKEDA K & AKIRA S. Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 3749–3752, 1999.
- LÜTTGENAU, J., HERZOG, K., STRÜVE, K., LATTER, S., BOOS, A., BRUCKMAIER, R. M., & KOWALEWSKI, M. P. LPS-mediated effects and spatio-temporal expression of TLR2 and TLR4 in the bovine corpus luteum. **Reproduction**, REP-15 2016.
- MAGATA, FUMIE; SHIMIZU, TAKASHI. Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. **Reproductive Toxicology**, v. 71, p. 1-7, 2017.
- RAETZ CRH & WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 635–700, 2008.
- 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, 2013.
- 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, p. 267–278, 2001.