

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Efeito da aplicação intrafolicular de lipopolissacarídeo sobre o desenvolvimento folicular e momento da ovulação em fêmeas bovinas

Patrícia Carvalho Gindri

Pelotas, 2019

Patrícia Carvalho Gindri

Efeito da aplicação de lipopolissacarídeo intrafolicular sobre o desenvolvimento folicular e momento da ovulação em fêmeas bovinas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção de do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal)

Orientador: Augusto Schneider

Coorientadoras: Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro
Jorgea Pradieé

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G492e Gindri, Patrícia Carvalho

Efeito da aplicação de lipopolissacarídeo intrafolicular sobre o desenvolvimento folicular e momento da ovulação em fêmeas bovinas / Patrícia Carvalho Gindri ; Augusto Schneider, orientador ; Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Jorgea Pradieé, coorientadoras. — Pelotas, 2019.
40 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Bovinos. 2. Fertilidade. 3. Resposta inflamatória. I. Schneider, Augusto, orient. II. Pegoraro, Lígia Margareth Cantarelli, coorient. III. Pradieé, Jorgea, coorient. IV. Título.

CDD : 636.2

Patrícia Carvalho Gindri

Efeito da aplicação de lipopolissacarídeo intrafolicular sobre o desenvolvimento folicular e momento da ovulação em fêmeas bovinas

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25/02/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Augusto Schneider (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dra. Eliza Rossi Komninou
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico esse trabalho aos meus pais, irmãos e sobrinho.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por sempre iluminar meu caminho, auxiliar nas minhas decisões e me proporcionar saúde e força durante minha jornada.

A minha família, minha mãe Tânia, meu pai Amir aos meus irmãos Érica e André e meu sobrinho Enzo, por serem meus esteios e estarem do meu lado tanto nas horas felizes como nos momentos difíceis, pelo apoio, amor e compreensão.

À minha Doralice, minha filha de quatro patas, por ser minha companheirinha, e aos meus amigos de São Chico que mesmos distantes estiveram sempre presentes, em todos os momentos.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Augusto Schneider, por sempre estar presente e principalmente pela paciência nos momentos de pânico.

Gostaria de agradecer as minhas coorientadoras, Lígia Pegoraro e Jorgea Pradisee, por serem exemplo de profissionais, pela compreensão, conselhos e principalmente pela paciência e aprendizados compartilhados.

Ao laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, por disponibilizar os animais, infraestrutura, recursos e matérias para realização das atividades e por contribuir tanto com meu aprendizado, durante este período.

À Bruna Mion, pela amizade, companheirismo, paciência, ensinamentos e por sempre estar presente mesmo estando fora no país.

À Natália Ávila de Castro, pela ajuda na realização do meu experimento, tanto nas horas boas como nas ruins.

Aos colaboradores do Laboratório de Reprodução animal da Embrapa: Joao e Giovani, pelas conversas, mates e risadas e por serem grandes amigos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, agradecer a todos que de alguma forma colaboraram para a realização do meu mestrado para o meu conhecimento profissional adquirido durante este período, pois sozinha nada disso teria sido possível.

“Sei que meus ensinamentos não se encerram por aqui, a única coisa que realmente sei é que ainda tenho muito que aprender”.
Autor Desconhecido

Resumo

Gindri, Patrícia Carvalho. **Efeito da aplicação de lipopolissacarídeo intrafolicular sobre o desenvolvimento folicular e momento da ovulação em fêmeas bovinas.** 2019.40f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) intrafolicular sobre o diâmetro folicular, momento da ovulação e taxa ovulatória, bem como diâmetro do corpo lúteo (CL) formado e a produção de progesterona (P4) na fase subsequente do ciclo em bovinos leiteiros. O estudo foi conduzido através de dois experimentos, utilizando protocolos de sincronização hormonal. Foram utilizadas 18 vacas da raça Jersey divididas em dois grupos (Controle ou LPS). As vacas do grupo tratado receberam uma dose de 1 µg/mL de LPS intrafolicular e foram acompanhadas através de avaliações ultrassonográficas de 12 em 12 horas para o acompanhamento do crescimento folicular, momento da ovulação e posterior mensuração do CL. No experimento 1, avaliamos o efeito do LPS no folículo dominante e constatamos que o crescimento folicular não foi interrompido após a injeção intrafolicular de LPS. No experimento 2, avaliamos o efeito do LPS no folículo pré-ovulatório e verificamos que a injeção intrafolicular de LPS provocou um retardo no crescimento folicular ($P=0,02$), aumento do fluxo sanguíneo folicular ($P=0,05$), atraso no momento da ovulação ($P=0,03$; Controle: $78,0 \pm 4,90$ h vs LPS: $106,0 \pm 13,02$ h) e menor taxa ovulatória quando comparadas ao grupo controle ($P=0,03$; Controle: 100% vs LPS: 66,6%). A temperatura corporal não apresentou alteração após 24 horas da injeção intrafolicular ($P=0,7$), demonstrando que o LPS pode ter uma influência em nível folicular local. No entanto, apesar do diferente padrão de crescimento folicular, o diâmetro ovulatório ($P=0,1$) e o momento do estro ($P=0,6$) não foram diferentes entre os grupos. A área do tecido lúteo formado após a ovulação, bem como os níveis séricos de progesterona não foram influenciados. Este foi o primeiro estudo a avaliar o efeito local do LPS em nível folicular *in vivo*. Os resultados demonstraram que o LPS induziu uma resposta em nível folicular no folículo pré-ovulatório atrasando o crescimento folicular o momento da ovulação e a taxa ovulatória, indicando que processos infecciosos podem influenciar a fertilidade de bovinos.

Palavras-chave: bovinos; fertilidade; resposta inflamatória

Abstract

Gindri, Patrícia Carvalho. **Effect of intrafollicular lipopolysaccharide injection on follicular development and ovulation in bovine females**. 2019. 40f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The objective of this study was to evaluate the effect of intrafollicular lipopolysaccharide (LPS) administration on follicular diameter, moment of ovulation, ovulatory rate, as well as the corpus luteum diameter, and progesterone production in the subsequent phase of estrous cycle in dairy cattle. The study was conducted in two experiments using hormonal synchronization protocols. Eighteen Jersey cows were divided in two groups (control or LPS). Cows in treated group received 1 µg/mL of LPS intrafollicular and were evaluated by ultrasonography every 12 hours to assess follicular growth, moment of ovulation and posterior luteal size. In Experiment 1, it was evaluated the effect of LPS on dominant follicle and the results demonstrated that follicular growth was not disturbed by intrafollicular LPS administration. In Experiment 2, it was evaluated the LPS effect on preovulatory follicle and the results demonstrated that LPS delays follicular growth ($P=0.02$), increases follicular blood flow ($P=0.05$), delays ovulation ($P=0.03$; Control: 78.0 ± 4.90 h vs LPS: 106.0 ± 13.02 h) and reduces ovulatory rate ($P=0.03$; Control: 100% vs LPS: 66.6%). Corporal temperature was not affected 24 hours after LPS administration ($P=0.7$), demonstrating that LPS could have a local effect in the ovarian follicle. However, despite of different follicular growth, ovulatory diameter ($P=0.1$) and moment of estrus ($P=0.6$) were not different between groups. Luteal area and the serum progesterone concentration were not affected. The current study was the first experiment to evaluate the local effect of LPS at follicular level *in vivo*. The results demonstrated that LPS induced a follicular response, delaying follicular growth, ovulation moment and reducing ovulatory rate, indicating that infectious process can affect fertility in cattle.

Keywords: cattle; fertility; inflammatory response

Lista de Figuras

Figura 1	Protocolo utilizado no experimento 1.....	17
Figura 2	Protocolo utilizado no experimento 2.....	19
Figura 3	Fluxo sanguíneo folicular após 24 horas da injeção intrafolicular de LPS.....	22
Figura 4	Crescimento folicular após a injeção intrafolicular de LPS e ou solução salina de acordo com o diâmetro ovulatório.....	23
Figura 5	Momento da ovulação após a injeção intrafolicular de LPS e ou solução salina.....	24
Figura 6	Curva de sobrevivência entre o tempo após a injeção intrafolicular e a ovulação.....	24

Lista abreviaturas e Siglas

ATL	Área de tecido lúteo
BE	Benzoato de estradiol
BEN	Balanço Energético Negativo
CL	Corpo lúteo
ECC	Escore de condição corporal
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
E2	Estradiol
FSCL	Fluxo Sanguíneo do Corpo Lúteo
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
IA	Inseminação Artificial
I.F.F.	Injeção Intrafolicular
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intravenoso
LH	Hormônio luteinizante
LPS	Lipopolissacarídeo
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PG	Prostaglandinas PGF2 α , PGE2
P4	Progesterona
TLRs	Receptores Toll-like
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
US	Ultrassonografia

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Objetivos.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 Metodologia.....	16
3.1 Experimento 1.....	16
3.2 Experimento 2.....	17
4 Resultados.....	22
4.1 Experimento 1.....	22
4.2 Experimento 2.....	22
5 Discussão.....	27
6 Considerações Finais.....	31
Referências.....	32
Anexos.....	38

1 Introdução

O período de transição em vacas leiteiras, intervalo compreendido entre o final da gestação e o início da lactação, ocorre entre as três semanas que antecedem o parto até três semanas pós-parto (ESPOSITO et al., 2014). Esse período caracteriza-se por uma mudança na demanda energética do animal e por alterações fisiológicas, nutricionais, metabólicas e imunológicas (SORDILLO, 2016). Durante este período, a fêmea ingressa em um status de balanço energético negativo (BEN), decorrente do maior requerimento nutricional pelo feto no final da gestação, o início da produção de leite e a incapacidade de ingestão de matéria seca, em níveis necessários para suprir todas essas exigências nutricionais (ESPOSITO et al., 2014).

Vacas de alta produção, devido à maior exigência nutricional, podem apresentar BEN mais acentuado. Além disso, sob esta condição os animais estão mais suscetíveis à ocorrência de doenças, como retenção de placenta, metrite e endometrite, o que conseqüentemente afeta negativamente a fertilidade (LUCY, 2008; DRACKLEY e CARDOSO, 2014). Entre 40 a 60% das vacas leiteiras de alta produção apresentam pelo menos um ou mais distúrbios clínicos nos primeiros 60 dias pós-parto (RIBEIRO et al., 2016).

Aproximadamente 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). Essas doenças têm sido associadas a uma redução no desempenho reprodutivo, como por exemplo, menores taxas de concepção, aumento no intervalo entre parto e concepção e maior descarte dos animais por falhas reprodutivas (LEBLANC et al., 2002; SHELDON e DOBSON, 2004; SHELDON et al., 2009).

A primeira resposta dos tecidos afetados por contaminação bacteriana consiste na inflamação, que é mediada por células do sistema imune inato que secretam moduladores inflamatórios tais como citocinas, quimiocinas, eicosanoides e aminas vasoativas. Esses mediadores recrutam e ativam células imunes para os locais de lesão ou infecção (MEDZHITOV, 2008; SHELDON et al., 2018).

As infecções são causadas geralmente por bactérias gram-negativas como a *Escherichia coli* (*E. coli*), que contém lipopolissacarídeo (LPS) na sua membrana externa, uma endotoxina, que age como um potente estimulador da resposta inflamatória (CARROLL et al., 2009; BROMFIELD e SHELDON, 2013). Os efeitos pró-inflamatórios das bactérias gram-negativas são mediados através do LPS, a partir do reconhecimento pelos receptores Toll-like (TLRs) (MORESCO et al., 2011). Estes receptores estão presentes principalmente nas células do sistema imune inato, incluindo macrófagos e neutrófilos, que iniciam cascatas de sinalização resultando na produção de mediadores inflamatórios e imunes com o objetivo de combater as infecções, através da ligação de seus padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (BEUTLER, 2004). Os receptores TLRs fazem parte de uma família de dez receptores (TRL1-10), sendo o receptor TLR4 responsável pelo reconhecimento da molécula de LPS em conjunto com os co-receptores CD14 e MD-2 (BEUTLER, 2004). Os receptores TLR4 estimulam respostas celulares, liberando interleucinas, citocinas, óxido nítrico, quimiocinas, prostaglandinas e Fator de Necrose Tumoral α (TNF α), importantes mediadores da resposta inflamatória (BEUTLER, 2004; MORESCO et al., 2011).

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 (E2), alterações nas fases luteínicas e interrupção da atividade cíclica ovariana (SHELDON et al., 2002; LAVON et al., 2008; CAMPOS et al., 2017). Estudos já demonstraram que o TLR4 está presente nas células da granulosa e células da teca de folículos de bovinos, indicando que as células foliculares são capazes de detectar a presença de LPS a nível folicular e iniciar uma resposta inflamatória localmente (HERATH et al., 2007; MAGATA et al., 2014). Células da granulosa de folículos dominantes de vacas desafiadas *in vivo* com o LPS, apresentaram uma redução na expressão dos genes TRL4 e TNF α (CAMPOS et al., 2017). Além disso, o LPS induziu uma resposta inflamatória dependente de TRL4 em células da granulosa de folículos antrais em um estudo realizado *in vitro* (BROMFIELD e SHELDON, 2011).

Os hormônios reprodutivos são fundamentais no crescimento e desenvolvimento de folículos no ovário, desde a fase antral até a ovulação, com papéis importantes na esteroidogênese, nutrindo o oócito, ovulação e subsequente formação do corpo lúteo (CL) (SCHAMS e BERISHA, 2002). Infecções causadas por

E. coli ou a infusão de LPS suprimem a produção de E2 e crescimento folicular nos bovinos, podendo causar danos nos folículos, afetando a produção e liberação de homônios reprodutivos (BATTAGLIA et al., 2000; SHELDON et al., 2002). Vacas que apresentaram contaminações no lúmen uterino no período pós-parto apresentaram um crescimento mais lento do primeiro folículo dominante, com níveis plasmáticos de E2 mais baixos e menores concentrações de progesterona (P4), bem como menores taxas de ovulação, sugerindo que contaminações uterinas podem estar relacionadas com menor fertilidade (SHELDON et al., 2002; WILLIAMS et al., 2007; SHELDON et al., 2009). Apesar disso, um estudo com infusão crônica de LPS mostrou que apesar de o crescimento folicular ser menor no grupo recebendo LPS, o nível de estradiol foi maior (DICKSON et al., 2018). Além disso, o LPS induziu a desregulação da secreção de prostaglandinas (PGFs), estimulando uma mudança na produção de PGF2 α para PGE $_2$ pelas células endometriais, prolongando a fase luteal e diminuindo a probabilidade de ovulação (HERATH et al., 2009).

A presença de LPS já foi detectada no plasma, no fluido uterino e fluido folicular de bovinos que apresentaram infecções uterinas e no plasma e leite de vacas com mastite por *E. coli* (HAKOGI et al., 1989; MATEUS et al., 2003; HERATH et al., 2007; MAGATA et al., 2015). É relatado que o LPS atua no hipotálamo ou hipófise suprimindo a liberação de gonadotrofinas e perturbando o crescimento e função folicular no ovário de ovelhas (BATTAGLIA et al., 2000), e vacas (SUZUKI et al., 2001). Animais com infecções uterinas apresentam menor capacidade na produção de P4 e menor diâmetro do CL, influenciando negativamente o estabelecimento da prenhez (WILLIAMS et al., 2007).

Além disso, foi anteriormente demonstrado que folículos saudáveis, não contêm células imunes, e sua resistência imunológica se dá através das células da granulosa (BROMFIELD e SHELDON, 2011). Folículos coletados após o abate de vacas que apresentavam endometrite apresentaram concentrações elevadas de LPS, com concentrações mais baixas de E2 e uma menor expressão nas enzimas esteroidogênicas (MAGATA et al., 2014). Nosso grupo relatou anteriormente que através da aplicação de LPS a nível sistêmico a expressão de genes ligados a esteroidogênese é reduzida (CAMPOS et al., 2017). Além disso, a secreção de E2 é menor em células da granulosa bovina cultivadas *in vitro*, em resposta ao LPS (PRICE et al., 2013). Interessantemente as concentrações de LPS foram maiores em folículos císticos, indicando uma participação do LPS neste processo também (SHMIZU et al.,

2018). Em nível uterino a exposição crônica ao LPS foi capaz de alterar a expressão de genes ligados a resposta inflamatória (FERNANDES et al., 2018).

Os resultados presentes na literatura indicam a 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 completamente elucidado. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de LPS intrafolicular sobre o crescimento e desenvolvimento folicular de bovinos. Por fim, a hipótese do presente trabalho é a de que o LPS afeta de maneira local o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da aplicação de LPS intrafolicular sobre o desenvolvimento folicular de bovinos *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da aplicação intrafolicular de LPS sobre o folículo dominante e sobre o folículo pré-ovulatório.

Avaliar o efeito da aplicação de LPS intrafolicular sobre o diâmetro folicular, momento da ovulação, momento do estro e taxa ovulatória.

Avaliar o efeito da aplicação de LPS intrafolicular sobre o volume do corpo lúteo formado, sua vascularização (fluxo sanguíneo) e sobre a concentração sérica de progesterona na fase subsequente do ciclo estral.

3 Metodologia

Os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas sob o número de protocolo 23110.048134/2018-05 (Anexo I).

Foram utilizadas 18 vacas da raça Jersey não lactantes, mantidas em sistema semi-extensivo de criação com acesso a campo nativo, pastagem cultivada de azevém, silagem de milho e água *ad libitum*, pertencentes à EMBRAPA Clima Temperado - Estação Experimental Terras Baixas, localizada no município de Capão do Leão, RS, Brasil.

3.1 Experimento 1

Esse experimento teve como intuito avaliar o efeito da aplicação de LPS intrafolicular no folículo dominante, e para isso utilizamos 18 fêmeas bovinas não lactantes da raça Jersey (*Bos taurus taurus*), com média de escore corporal (ECC) $2,75 \pm 0,05$ (em uma escala de 1 a 5).

Todos os animais foram submetidos a um protocolo de sincronização hormonal (Figura 1) para sincronização do crescimento folicular. No Dia 0 (D0), foi efetuado avaliação ultrassonográfica e as fêmeas com folículos ≥ 8 mm receberam anestesia epidural baixa (Cloridato de Lidocaína 2%, Anestésico Bavet®, Bravet LTDA, Rio de Janeiro/RJ, Brasil) e, após a limpeza da vulva, esses folículos foram aspirados através de punção folicular guiada por ultrassonografia transvaginal (Aquila, Esaote, São Paulo/SP, Brasil, transdutor transvaginal 7,5 MHz). Em seguida, todos os animais receberam um dispositivo intravaginal de P4 (1g, Primer®, Agener União, São Paulo/SP, Brasil), 2 mg de Benzoato de E2 (Sincrodiol®, Ouro Fino, Cravinhos/SP, Brasil) i.m. e 0,526 mg de Cloprostenol Sódico (Sincrocio®, Ouro Fino) i.m. No D4, outra dose de Cloprostenol Sódico foi administrada, seguido da retirada do dispositivo intravaginal de P4. Os animais foram avaliados por ultrassonografia transretal (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, somente as vacas que não

havam apresentado cio e que apresentavam folículos ≥ 8 mm, foram destinadas para o procedimento de injeção folicular, de acordo com o grupo de tratamento, totalizando 8 animais divididos aleatoriamente em grupo controle (injeção intrafolicular de NaCl; $n=4$) ou grupo LPS (injeção intrafolicular de LPS; $n=4$). A quantidade de LPS injetada foi calculada para que a dose final intrafolicular atingisse $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS (LPS de *E. coli* O111:B4, Sigma-Aldrich). No grupo controle, foi injetado o volume correspondente de solução salina. A concentração de LPS foi calculada de acordo com estudos anteriores realizados com células da granulosa *in vitro* e níveis encontrados em fluido folicular de animais com endometrite (HERATH et al., 2007; BROMFIELD e SHELDON, 2011).

Os animais foram acompanhados através da ultrassonografia transretal a cada 12 horas após o tratamento, para mensuração do diâmetro do folículo injetado e detecção da ovulação. A ovulação foi definida como o desaparecimento do folículo identificado nas avaliações anteriores (MARTINEZ et al., 2005). Considerou-se como diâmetro ovulatório, o diâmetro folicular mensurado na última visualização antes da detecção da ovulação. O momento da ovulação foi considerado como o momento em que foi detectada a ovulação reduzido de seis horas.

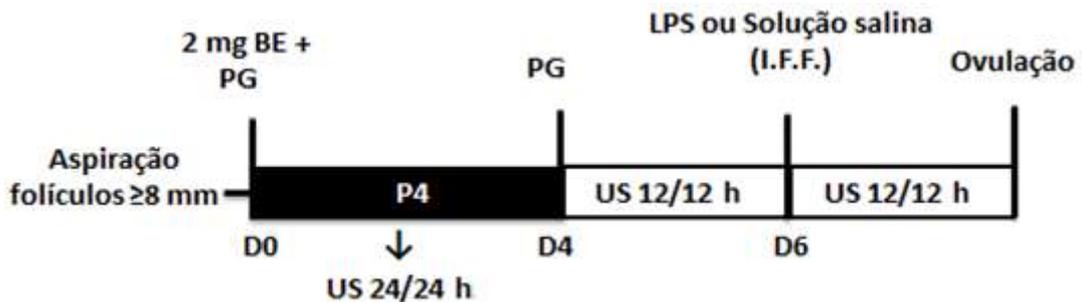


Figura 1 - Protocolo utilizado no experimento 1. BE: Benzoato de Estradiol; PG: Prostaglandina F2 α ; P4: Dispositivo Intravaginal de Progesterona; I.F.F: injeção intrafolicular; LPS: Lipopolissacarídeo US: Ultrassonografia; CL: Corpo Lúteo.

3.2 Experimento 2

Esse estudo teve como metodologia avaliar a aplicação de LPS intrafolicular no folículo pré-ovulatório, e para isso foram utilizadas 18 fêmeas bovinas não lactantes da raça Jersey (*Bos taurus taurus*), com média de escore de condição corporal (ECC) $3,0 \pm 0,07$ (em uma escala de 1 a 5).

No início do experimento, todas as vacas foram submetidas a um protocolo de sincronização hormonal (Figura 2) para sincronização do crescimento folicular, da mesma forma que para o experimento 1, entretanto como para este experimento, o protocolo foi modificado quantos aos momentos de aplicação do Cloprostenol Sódico e o momento da retirada do implante de P4. Sendo assim, no D0, foi efetuada avaliação ultrassonográfica e as fêmeas que possuíam folículos ≥ 8 mm receberam anestesia epidural baixa (Cloridato de Lidocaína 2%, Anestésico Bravet®) para a punção desses folículos, guiada por ultrassonografia transvaginal (Aquila, Esaote, transdutor transvaginal 7,5 MHz). Posterior a aspiração dos folículos, os animais receberam um implante P4 (1g, Primer®) e 2 mg de Benzoato de E2 (Sincrodiol®) i.m. No quarto (D4) e quinto (D5) dia do protocolo, as vacas receberam uma dose de 0,482 mg de Cloprostenol Sódico (Estron®, Agener União) i.m. A partir do D5, os animais foram avaliados a cada 24 horas por ultrassonografia (US) transretal para assegurar que novos folículos estavam em fase de crescimento e que folículos da onda anterior foram eliminados após a aspiração. Sete dias (D7) após o início do protocolo o dispositivo intravaginal de P4 foi removido.

Após 12h (D8) da remoção do dispositivo, os animais foram examinados por US transretal. Somente as vacas que apresentavam folículos $\geq 8,8$ mm permaneceram no experimento, totalizando 18 animais divididos aleatoriamente em um dos grupos de tratamento: 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS (LPS de *E. coli* O111:B4, Sigma-Aldrich) (Grupo LPS, n=9), e grupo controle (solução salina, n=9). A dose e volumes administrados em cada um dos grupos foi calculada conforme descrito no Experimento 1.

Após 24 horas da injeção intrafolicular (I.F.F), a temperatura retal dos animais dos dois grupos foi aferida com termômetro veterinário e as vacas avaliadas através de ultrassonografia transretal com doppler colorido (M5 VET®) para verificar a vascularização dos folículos injetados. Além disso, as vacas receberam um detector de estro Estrotect® (Spring Valley, Wisconsin, EUA) para que fosse possível avaliar o momento que as vacas aceitaram a monta. Foi considerado o momento do estro quando o identificador de cio Estrotect® estava marcado. Adicionalmente, após a injeção foi realizada ultrassonografia transretal com intervalo de 12 horas para acompanhar o crescimento do folículo injetado e para detecção da ovulação. A ovulação foi definida de acordo com o Experimento 1.

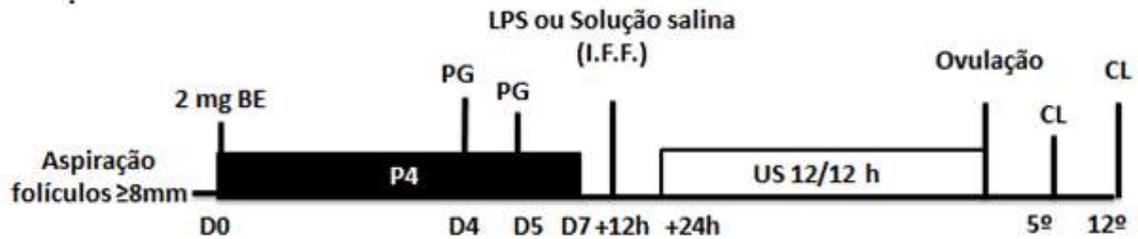


Figura 2 - Protocolo utilizado no experimento 2. BE: Benzoato de Estradiol; PG: Prostaglandina F2 alfa; P4: Dispositivo Intravaginal de Progesterona; +12h: após retirada do dispositivo Intravaginal de Progesterona foi aplicado a I.F.F.; I.F.F: injeção intrafolicular; +24h: após I.F.F foi realizada as avaliações US; LPS: Lipopolissacarídeo US: Ultrassonografia; CL: Corpo Lúteo.

As vacas que ovularam passaram por avaliação ultrassonográfica 5^o e 12^o dias após ovulação, para a mensuração do diâmetro do CL e avaliação da vascularização luteal através de US doppler colorido (M5 VET®).

Injeções Intrafoliculares

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). Previamente às injeções intrafoliculares, foi feita anestesia epidural através da injeção de Cloridato de lidocaína (2%), e a região perianal e vulvar foram higienizadas. As injeções intrafoliculares foram guiadas por ultrassonografia transvaginal (transdutor transvaginal, 7,5 MHz) em metodologia adaptada a partir dos métodos descritos por FERREIRA et al. (2007). Um sistema contendo a probe e uma agulha de 20G (0.8mm x 40mm; Becton, Dickinson and Company, EUA) foi utilizado para perfurar a parede vaginal, peritônio e estroma ovariano até atingir o folículo. Para injeção intrafolicular do LPS/controlado foi utilizada uma agulha 25G 3 ½ (BD, EUA).

Fluxo sanguíneo folicular

A avaliação do padrão de vascularização dos folículos foi realizada de acordo com GINTHER (2007). As imagens dos folículos foram obtidas a partir de imagens ultrassonográficas obtidas com máxima intensidade de cor e com foco no diâmetro mais amplo do folículo. As configurações de ganho de cor foram mantidas constantes para todas as avaliações. Quando sinais consistentes do Doppler foram detectados na parede folicular, considerou-se que o folículo tinha fluxo sanguíneo detectável, e

as vacas que apresentavam esta característica foram classificadas com score sanguíneo positivo. A intensidade da vascularização folicular foi expressa em porcentagem de fluxo sanguíneo, estimado de forma subjetiva por um técnico experiente que realizou a avaliação às cegas, a partir dos sinais de Doppler colorido observados na circunferência forma subjetiva como a porcentagem da circunferência perifoliculares que tinham sinais de Doppler colorido. Os escores foram classificados de 1 a 4, sendo escore de grau 1 compreendendo a vascularização discreta ($\leq 25\%$), grau 2 intermediária baixa (>25 e $\leq 50\%$), grau 3 intermediária alta (>50 e $<75\%$) e grau 4 vascularização intensa ($>75\%$).

Fluxo sanguíneo luteal

Ambos os ovários de todos os animais foram avaliados por US com Doppler e a localização do CL de cada animal foi registrada. Em seguida, foram feitos vídeos curtos, com duração de 7 segundos, que foram armazenados na memória interna do aparelho de US. Posteriormente, a área do CL foi medida utilizando mensurações internas do aparelho. Nos casos em que o CL era cavitário, foram calculadas a área do CL e a área da cavidade do CL e então se subtraiu a área de tecido lúteo (ATL) pela área da cavidade. A avaliação do fluxo sanguíneo do CL (FSCL) foi feita de forma indireta através de um avaliador experiente às cegas, utilizando a área de pixels coloridos dentro do CL, obtida a partir das imagens capturadas pelo ultrassom utilizando-se o software ImageJ. Assim, para se obter o FSCL ajustado o FSCL foi dividido pela ATL (relação FSCL:ATL), para que a proporção de pixels coloridos em relação à área do tecido fosse determinada.

Análises hormonais

Amostras de soro sanguíneo foram coletadas nos dias 5 e 12 após a ovulação (n=9 no grupo controle; n=6 no grupo LPS) para avaliação da concentração sérica de P4. As coletas foram realizadas através da punção da veia coccígea em tubos Vacutainer®, que foram centrifugados (Centrífuga Presvac 16-RV) a 10.000 rpm por 5 minutos para a separação do soro. O soro foi armazenado em tubos do tipo Eppendorf® em alíquotas de 2 mL, em temperatura de -20°C até avaliação. As análises foram realizadas em laboratório comercial (Laboratório Pasin, Santa Maria/RS), através do método de quimioluminescência.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através dos softwares GraphPad® 6.01 (GraphPad software, Inc., CA, USA) e SAS 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). As variáveis diâmetro folicular, temperatura retal, momento do cio, momento da ovulação, diâmetro ovulatório, P4 no 5^o e 12^o após a ovulação, área do tecido luteal e fluxo sanguíneo do CL, foram avaliados através do teste t de Student.

O crescimento folicular foi avaliado através do procedimento mixed models do SAS, considerando o efeito do tratamento, tempo e interação tratamento vs tempo. Quando significativas as médias individuais foram comparadas através do teste post-hoc de Tukey. Os valores do Doppler relacionados ao fluxo sanguíneo folicular 24 horas pós I.F.F foram avaliados através do teste de Mann Whitney. A distribuição do momento da ovulação foi avaliada pelo teste de levene usando o procedimento GLM do SAS.

A taxa ovulatória foi avaliada através da análise de qui-quadrado e análise de curva de sobrevivência (Gehan-Breslow-Winlcoxon). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4 Resultados

4.1 Experimento 1

As médias encontradas para o diâmetro do folículo injetado do grupo controle ($8,55 \pm 0,14$ mm) e do grupo LPS ($8,67 \pm 0,37$ mm) não diferiram estatisticamente ($P=0,76$). Ao compararmos as médias do crescimento folicular avaliado a partir do momento da injeção intrafolicular foi demonstrado que não houve uma diferença estatística entre os grupos, tempo e interação grupo*tempo, assim demonstrado na Figura 3. Da mesma forma, não houve diferença ($P=0,66$) entre as médias do diâmetro ovulatório do grupo controle ($10,73 \pm 0,73$ mm) e do grupo LPS ($11,50 \pm 1,72$ mm). Além disso, também não houve diferença ($P=0,28$) no momento da ovulação entre os grupos controle ($63,0 \pm 11,4$ horas) e LPS ($92,0 \pm 24,3$ horas).

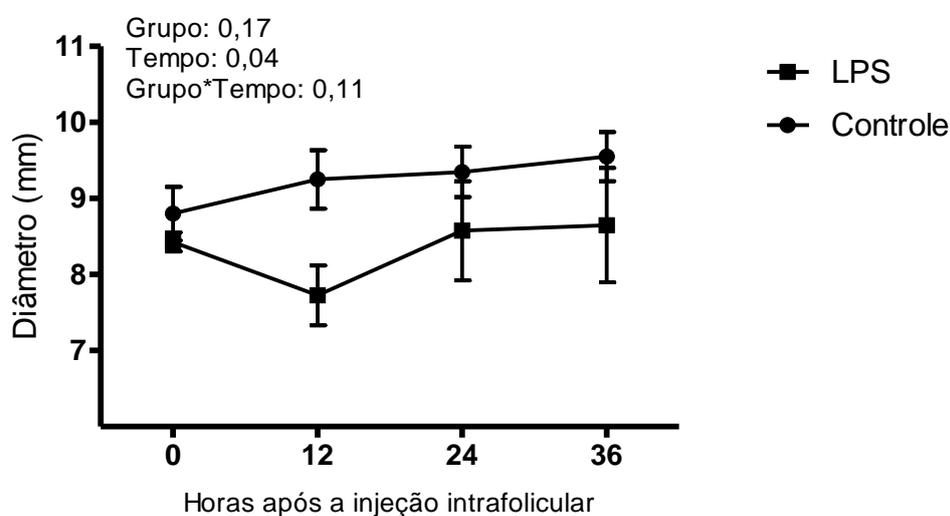


Figura 3- Crescimento folicular após a injeção intrafolicular de LPS e ou solução salina de acordo com o diâmetro folicular.

4.2 Experimento 2

De acordo com o nosso estudo, as médias de diâmetro folicular no momento da injeção não diferiram ($P=0,61$) entre o grupo controle ($10,94 \pm 0,60$), e o grupo LPS ($10,55 \pm 0,55$).

As médias de temperatura retal 24 horas após injeção intrafolicular foram similares ($P=0,79$) entre o grupo controle ($37,36 \pm 0,15$ °C) e, o grupo LPS ($37,61 \pm 0,13$ °C). Os valores apresentados pela análise do fluxo sanguíneo folicular após 24 horas da I.F.F demonstraram que houve maior escore de fluxo sanguíneo ($P=0,05$) no grupo LPS do que no controle e, que houve uma tendência de o fluxo sanguíneo folicular ser maior no grupo LPS no que do controle (Figura 4) ($P=0,06$), sendo seus valores 47% e 28%, respectivamente.

Em média, as vacas do grupo controle aceitaram monta 55h e 26min após a injeção intrafolicular, e as vacas do grupo LPS aceitaram monta 74h e 40 min, não sendo diferente ($P=0,68$) entre os grupos. O diâmetro ovulatório não apresentou diferença significativa entre os grupos ($P=0,14$). As vacas do grupo controle apresentaram diâmetro ovulatório de $12,82 \pm 0,43$ mm e as do grupo LPS de $11,60 \pm 0,69$ mm. Em média, entre o momento da injeção até o momento da ovulação os folículos do grupo controle cresceram $0,59 \pm 0,16$ mm/dia e os folículos do grupo LPS $0,39 \pm 0,15$ mm/dia ($P=0,41$).

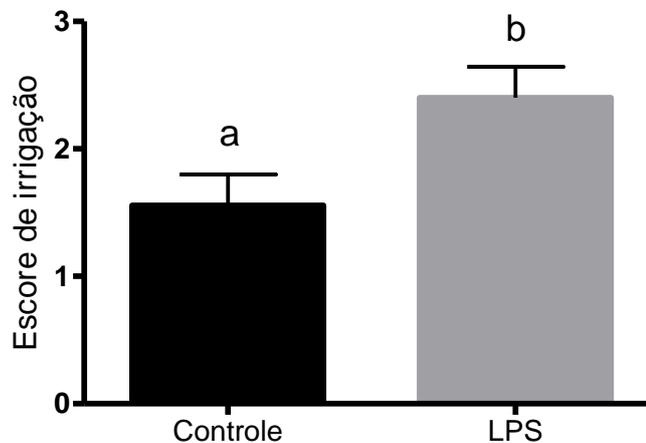


Figura 4- Escore do fluxo sanguíneo folicular 24 horas após a injeção intrafolicular de LPS ou solução salina.

A comparação do diâmetro folicular avaliado a partir do momento da injeção intrafolicular demonstrou que o crescimento folicular foi maior ($P<0,02$) no grupo controle do que no LPS (Figura 5).

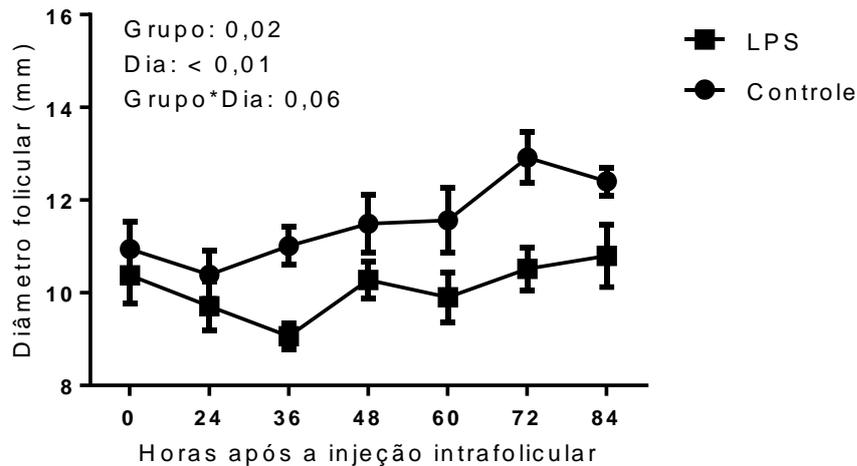


Figura 5- Crescimento folicular após a injeção intrafolicular de LPS ou solução salina de acordo com o diâmetro ovulatório.

As vacas do grupo LPS apresentaram uma ovulação mais tardia quando comparadas com o grupo controle ($P=0,03$) (Figura 6). As vacas do grupo controle ovularam entre 54 e 102 horas após a injeção intrafolicular, já as vacas do grupo LPS apresentaram um intervalo maior entre 78 e 162 horas. A média do momento da ovulação foi de $78,0 \pm 4,9$ horas para o grupo controle e $106,0 \pm 13,02$ para vacas do grupo LPS. A distribuição do momento da ovulação foi similar entre os grupos segundo o teste de Levene ($P=0.11$).

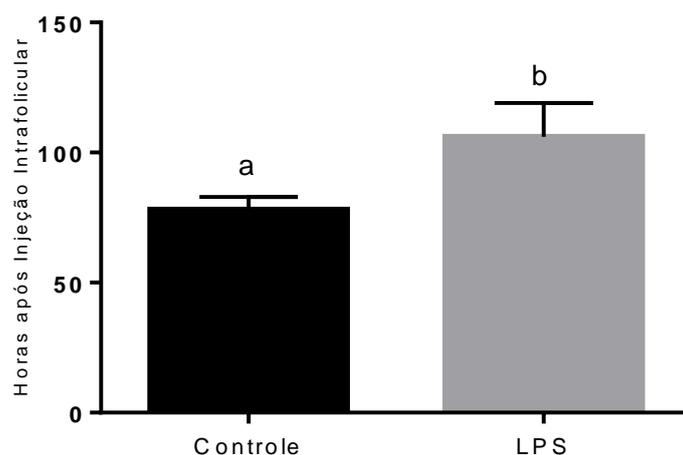


Figura 6 - Momento da ovulação após a injeção intrafolicular de LPS ou solução salina.

A taxa ovulatória do grupo controle foi de 100% (9/9), enquanto que do grupo LPS foi de 66,66% (6/9), contudo não houve diferença significativa entre os grupos

através do teste de qui-quadrado ($P=0,20$). Na Figura 7, pode ser observado através da curva de sobrevivência que houve uma diferença ($P=0,03$), demonstrando que a ovulação foi atrasada em vacas do grupo LPS.

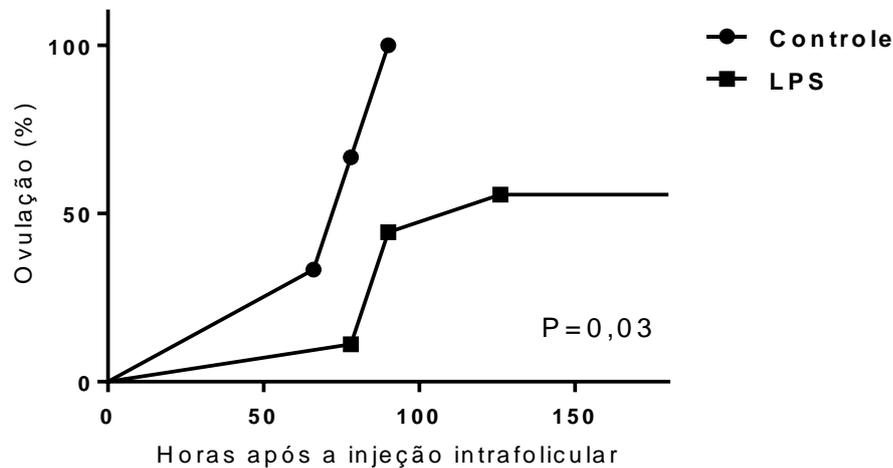


Figura 7 - Curva de sobrevivência entre o tempo após a injeção intrafolicular e a ovulação.

O diâmetro do CL no 5º dia após a ovulação não diferiu entre os grupos naquelas vacas que ovularam (Controle: $19,02 \pm 0,6$ mm; LPS $18,47 \pm 1,1$ mm; $P=0,66$). Em relação à área do tecido lúteo no 5º dia após a ovulação, não foi diferente entre os grupos (Controle: $16,53 \pm 1,9$ mm²; LPS $15,10 \pm 1,59$ mm²; $P=0,5$), bem como o fluxo sanguíneo do CL também não diferiu entre os grupos (Controle: $16,42 \pm 3,24$; LPS: $16,84 \pm 3,67$; $P= 0,9$).

De forma similar no 12º dia após a ovulação o diâmetro do CL dos grupos não diferiu (Controle: $22,69 \pm 1,01$ mm; LPS: $22,13 \pm 0,97$; $P=0,73$). A área do tecido lúteo (Controle: $18,43 \pm 1,32$ mm²; LPS: $18,83 \pm 1,32$ mm²; $P=0,8$), bem como o fluxo sanguíneo (Controle: $17,98 \pm 2,27$; LPS: $17,83 \pm 2,46$; $P= 0,9$) do CL no 12º após a ovulação não diferiram entre os grupos.

Além disso, as concentrações de P4 entre os grupos controle e LPS no 5º dia após a ovulação (Controle: $4,78 \pm 0,65$ ng/mL; LPS: $4,69 \pm 0,89$ ng/mL; $P=0,93$), bem como no 12º dia após a ovulação (Controle: $8,86 \pm 0,99$ ng/mL; LPS: $8,94 \pm 1,44$ ng/mL; $P=0,96$) não apresentaram diferenças.

5 Discussão

Neste estudo, a injeção intrafolicular de LPS foi utilizada como uma ferramenta para avaliar a interferência local do LPS nos processos de crescimento folicular e ovulação. De acordo com nossa revisão, não há nenhum estudo prévio avaliando o efeito local do LPS no folículo de bovinos *in vivo*. Os resultados do nosso estudo mostraram que o LPS alterou o fluxo sanguíneo folicular, reduziu o crescimento folicular, atrasou o momento da ovulação e acarretou em menor taxa de ovulação.

O primeiro experimento avaliamos o efeito da aplicação intrafolicular de LPS no folículo dominante e através dos nossos resultados demonstramos que o LPS não inibiu o crescimento folicular quando injetado no folículo dominante. No entanto, devido a maior parte dos animais ter apresentado cio no momento da injeção, uma vez que aplicássemos a injeção intrafolicular, influenciaria nossos resultados, pois o pico de LH poderia já ter ocorrido e isso acarretaria no bloqueio do crescimento folicular. No segundo experimento após adaptarmos um novo protocolo de sincronização hormonal, avaliamos o efeito da injeção intrafolicular de LPS no folículo pré ovulatório, uma vez que não encontramos efeito do LPS no folículo dominante.

A concentração de LPS injetada no presente estudo está de acordo com as concentrações observadas no folículo de vacas que apresentaram endometrite clínica (HERATH et al., 2007). Além disso, é importante ressaltar que no decorrer dos experimentos podemos perceber que o procedimento utilizado para injeção intrafolicular foi adequado, pois no grupo controle com a injeção de solução salina todas as vacas ovularam, demonstrando que a técnica não interferiu na probabilidade de ovulação das vacas utilizadas no estudo.

Foi observado que o desafio intrafolicular com LPS atrasou o momento da ovulação. Este resultado pode estar relacionado com uma alteração local através de uma maior resposta inflamatória, visto que as vacas do grupo LPS apresentaram um maior fluxo sanguíneo. Processos inflamatórios agudos são caracterizados pela expansão do leito vascular e aumento do fluxo sanguíneo local, favorecendo a exsudação de líquidos, proteínas plasmáticas e a migração de leucócitos e neutrófilos (WERNER, 2011).

Portanto seria uma resposta esperada após a injeção local de LPS no folículo. Além disso, o LPS pode ainda estar relacionado a uma menor resposta hormonal, uma vez que, doenças uterinas ou a infusão intrauterina de LPS em vacas leiteiras desencadeiam um processo inflamatório, estimulando uma resposta a nível sistêmico, que de forma indireta perturba a função endócrina do hipotálamo, hipófise e ovário (HERATH et al., 2006). O útero de vacas com infecções uterinas fica exposto a PAMPs, incluindo o LPS e mediadores inflamatórios, tais como citocinas e PGE₂, que em conjunto alteram o desenvolvimento folicular e o desenvolvimento oocitário (SHELDON et al., 2018). Em ovelhas desfiadas com LPS durante a fase folicular, a secreção de LH foi reduzida, sugerindo que esta alteração pode ser influenciada por uma menor resposta ao GnRH (BATTAGLIA et al., 2000). Além disso, a infusão de LPS no lúmen uterino de novilhas atrasou o pico de LH pré-ovulatório e a ovulação, ocasionando persistência do folículo dominante (PETER et al., 1989). Apesar destes efeitos sistêmicos, ao considerar a nível hipotalâmico não podemos afirmar que há um efeito direto, pois a secreção de LH também é controlada por hormônios secretados pelo ovário. Assim, mesmo que o LPS tenha apenas um efeito local, verifica-se que é possível caracterizar um reflexo na intensidade e momento do pico de LH (BATTAGLIA et al., 2000; SUZUKI et al., 2001). Apesar destas evidências, nosso estudo com a injeção intrafolicular aponta que o efeito da presença local de LPS é importante o suficiente para causar alteração no momento e probabilidade de ovulação, provavelmente mediado por alterações na produção de hormônios esteroides.

Nosso estudo demonstrou que o LPS intrafolicular promoveu um atraso no desenvolvimento folicular, maior fluxo sanguíneo folicular e atraso no momento da ovulação. Isto é importante pois, em termo práticos, um atraso no momento da ovulação em relação ao momento de manifestação de estro, poderia comprometer o momento da inseminação artificial (IA), já que o indicado é que esta ocorra entre 12 e 24 horas após a manifestação do estro (ROELOFS et al., 2006). Uma vez que, observamos um atraso de 28 horas na ovulação do grupo LPS, é provável que, estas vacas fossem inseminadas, observaríamos uma menor taxa de prenhez, já que não foi apresentada diferença significativa no momento da expressão do cio, estas seriam inseminadas em momento similar. De acordo com estudos anteriores, a injeção de LPS intrauterina ou intramamária no momento do estro atrasou a ovulação em média 72 horas em comparação ao grupo controle (LAVON et al., 2008). No mesmo sentido,

vacas que receberam LPS i.v. ovularam quatro dias mais tarde do que os animais do grupo controle (SUZUKI et al., 2001). Assim, estes estudos sugerem que é possível que o LPS sistêmico atinja o ovário como demonstrado por HERATH et al. (2007). Uma vez dentro do folículo pré-ovulatório, os efeitos negativos do LPS observados no nosso estudo podem ocasionar em um menor desenvolvimento folicular e consequente atraso na ovulação.

Além de atraso no momento da ovulação, o LPS pode comprometer a viabilidade oocitária, uma vez que nosso grupo relatou recentemente que oócitos provenientes de novilhas desafiadas com duas infusões de LPS i.v. com intervalo de 24 horas apresentaram diminuição na taxa de clivagem quando comparadas com novilhas não desafiadas (RINCÓN et al., 2018). Outros estudos *in vitro* também demonstram que o LPS durante a maturação oocitária afetou a maturação nuclear, diminuindo a taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário (SOTO et al., 2003; MAGATA e SHIMIZU, 2017; ZHAO et al., 2017). Desta maneira, é possível que além de afetar o momento da ovulação, o LPS pode comprometer a viabilidade e a qualidade oocitária, prejudicando ainda mais a fertilidade de animais afetados.

No nosso estudo não foi observada diferença no diâmetro ovulatório, porém os folículos do grupo LPS apresentaram um menor crescimento quando comparados com o grupo controle. Isto evidencia que, apesar de não termos encontrado diferença no diâmetro ovulatório, folículos do grupo LPS levaram mais tempo para atingir o diâmetro ovulatório, o que resultou no atraso da ovulação. O diâmetro folicular está associado à competência e capacidade ovulatória, pois folículos atingem a capacidade ovulatória quando apresentam aproximadamente 10 mm de diâmetro (SARTORI et al., 2001). Além disso, o tamanho folicular está relacionado com a concentração de E2 circulante, pois folículos maiores possuem uma maior quantidade de células da granulosa, e, possivelmente, uma maior capacidade na produção de E2 (VASCONCELOS et al., 2001; KHAN et al., 2012). Já foi demonstrado que o LPS tem efeito no ovário, principalmente nas células da teca e da granulosa, alterando a esteroidogênese e consequentemente a atividade ovariana (HERATH et al., 2007). Além disso, a produção de E2 pelas células da granulosa foi afetada quando células foliculares foram cultivadas com o LPS (MAGATA et al., 2014). Assim, o LPS apesar de não afetar o diâmetro ovulatório, aumentou o tempo que este folículo leva para atingir o diâmetro ovulatório, comprometendo o momento da ovulação.

A capacidade imune das células da granulosa e suas respostas frente ao LPS pode ser um importante mecanismo relacionado à infertilidade de bovinos, uma vez que a produção de E2 pelas células da granulosa é essencial durante o desenvolvimento folicular (BROMFIELD e SHELDON, 2011). Estudos prévios demonstraram que o acúmulo de LPS intrafolicular pode alterar a produção de E2 (MAGATA et al., 2014). De fato, vacas com infecções uterinas apresentaram redução do crescimento folicular e dos níveis de E2 (WILLIAMS et al., 2007). Da mesma forma, foi constatado que a injeção i.v. de LPS diminui a expressão de genes esteroideogênicos em células da granulosa em vacas (CAMPOS et al., 2017). Portanto, estes dados evidenciam que o efeito do LPS pode se dar devido à modulação da síntese de E2 intrafolicular, uma vez que o LPS inibiu a produção de E2 pelas células da granulosa em pequenos e grandes folículos (SHIMIZU et al., 2012). Nossos dados sugerem que, como consequência da reduzida produção de E2 temos um atraso no crescimento do folículo e momento da ovulação.

Diante disso, apesar de uma alta porcentagem de vacas do grupo LPS terem ovulado, esta ovulação foi mais tardia quando comparada com as vacas do grupo controle, as quais todas ovularam. Em experimento efetuado por WILLIAMS et al. (2008), foi observado que vacas que receberam LPS intrauterino não apresentaram alterações hormonais, porém, menor número de animais tratados com LPS ovularam. Além disso, a ocorrência de doenças inflamatórias, como metrite e endometrite, nas primeiras semanas pós-parto estão relacionadas à menores taxas ovulatórias e de fertilidade em bovinos leiteiros (RIBEIRO et al., 2016). O diâmetro folicular está associado à ovulação e fertilidade, pois folículos de menor diâmetro formam um CL de menor volume, e, conseqüentemente, com uma menor capacidade de produzir P4 (VASCONCELOS et al., 2001). Em um estudo anterior, foi demonstrado que células da teca apresentaram uma menor produção de P4 quando cultivadas com o LPS (SHIMIZU et al., 2012). No nosso estudo, o diâmetro do CL assim como a produção de P4, não diferiram entre animais que receberam ou não LPS. Do mesmo modo, não observamos diferença na área do tecido lúteo e no fluxo sanguíneo do CL. Isto se deve ao fato de que apesar do LPS ter atrasado a ovulação, considerando as vacas que ovularam, o diâmetro do folículo ovulatório não diferiu entre grupo controle e LPS. Assim, o CL gerado após a ovulação teve volume semelhante entre grupos e apresentou produção de P4 similar. Isto evidencia que a exposição do LPS durante o crescimento folicular não possui efeito posterior sobre a síntese de P4.

Por fim, é importante ressaltar que não foi observado aumento da temperatura corporal após a injeção intrafolicular no presente estudo, o que indica que o processo inflamatório pode ter ocorrido somente a nível folicular e não sistêmico. Estudos apontam que em nível sistêmico, o LPS pode provocar um aumento da temperatura corporal em até 6 horas após o desafio (CAMPOS et al., 2017), indicando, portanto, que no nosso estudo não houve comprometimento sistêmico. Além disso, a dose total injetada foi de no máximo 2 μg no presente estudo, sendo que no estudo com efeito sistêmico a dose injetada foi de aproximadamente 1.250 μg por vaca (CAMPOS et al., 2017).

6 Considerações Finais

Conforme os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o efeito do LPS foi local, ou seja, limitado ao ambiente folicular. Desta forma, observa-se que o LPS não apresentou efeito no folículo dominante, porém quando injetado no folículo pré ovulatório tal efeito ocasionou um atraso no momento da ovulação e maior fluxo sanguíneo, acarretando no menor crescimento folicular, tendo por consequência uma menor taxa de ovulação ao longo do tempo. Estes resultados contribuíram com o entendimento de como o LPS pode afetar a fertilidade, porém são necessários mais estudos para se identificar os mecanismos que estão envolvidos neste processo.

Referências

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, n.1, p.45-53, 2000.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature**, v.430, n.6996, p.257-263, 2004.

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.5029-5040, 2011.

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, 2013.

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.

CARROLL, J.A.; REUTER, R.R.; CHASE, C.C., JR.; 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, n.2, p.81-89, 2009.

DRACKLEY, J.K.; CARDOSO, F.C. Prepartum and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. **Animal**, v.8 Suppl 1, p.5-14, 2014.

DICKSON, M.J.; KVIDERA, S.K.; HORST, C.E.; MAYORGA, E.J.; YDSTIE, J.; PERRY, A.; BAUMGARD, L.H.; KEATING, A.F. Impacts of chronic and increasing lipopolysaccharide exposure on production and reproductive parameters in lactating Holstein dairy cows. **Journal of dairy science**, v.102, n.4, p.1-15, 2018.

ESPOSITO, G.; IRONS, P.C.; WEBB, E.C.; CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal reproduction science**, v.144, n.3-4, p.60-71, 2014.

FERNANDES, A.C.C.; DAVOODI, S.; KAUR, M.; VEIRA, D.; MELO, L.E.H.; CERRI, R.L.A. Effect of repeated intravenous lipopolysaccharide infusions on systemic inflammatory response and endometrium gene expression in Holstein heifers. **Journal of dairy Science**, v.102, n.4, p.1-13, 2019.

FERREIRA, R.; OLIVEIRA, J.F.; FERNANDES, R.; MORAES, J.F.; GONCALVES, P.B. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-719, 2007.

GINTHER, O.J. Follicle blood flow. In: **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography**. 1. ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, 2007. cap. 5, p.87-114.

HAKOGI, E.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; KOHATA, A.; SHIMADA, Y.; TABUCHI, K. Endotoxin levels in milk and plasma of mastitis-affected cows measured with a chromogenic limulus test. **Veterinary microbiology**, v.20, n.3, p.267-274, 1989.

HERATH, S.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. **Journal of reproductive immunology**, v.69, n.1, p.13-22, 2006.

HERATH, S.; LILLY, S.T.; SANTOS, N.R.; GILBERT, R.O.; GOETZE, L.; BRYANT, C.E.; WHITE, J.O.; CRONIN, J.; SHELDON, I.M. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. **Reproductive biology and endocrinology**, v.7, p.55, 2009.

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.

KHAN, F.A.; DAS, G.K.; PANDE, M.; SARKAR, M.; MAHAPATRA, R.K.; SHANKAR, U. Alterations in follicular fluid estradiol, progesterone and insulin concentrations during ovarian acyclicity in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal reproduction science**, v.130, n.1-2, p.27-32, 2012.

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.

LEBLANC, S.J.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E.; BATEMAN, K.G.; KEEFE, G.P.; WALTON, J.S.; JOHNSON, W.H. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of dairy science**, v.85, n.9, p.2223-2236, 2002.

LUCY, M.C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. **Reproduction in domestic animals**, v.43(Suppl 2), p.31-39, 2008.

MAGATA, F.; HORIUCHI, 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, n.1-2, 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. **The Journal of veterinary medical science**, v.77, n.1, p.81-84, 2015.

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

MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BO, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal reproduction science**, v.86, n.1-2, p.37-52, 2005.

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.143-154, 2003.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, n.7203, p.428-435, 2008.

MORESCO, E.M.; LAVINE, D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. **Current biology** v.21, n.13, p.R488-493, 2011.

PETER, A.T.; BOSU, W.T.; DEDECKER, R.J. Suppression of preovulatory luteinizing hormone surges in heifers after intrauterine infusions of *Escherichia coli* endotoxin. **American journal of veterinary research**, v.50, n.3, p.368-373, 1989.

PRICE, J.C.; BROMFIELD, J.J.; SHELDON, I.M. Pathogen-associated molecular patterns initiate inflammation and perturb the endocrine function of bovine granulosa cells from ovarian dominant follicles via TLR2 and TLR4 pathways. **Endocrinology**, v.154, n.9, p.3377-3386, 2013.

RIBEIRO, E.S.; GOMES, G.; GRECO, L.F.; CERRI, R.L.A.; VIEIRA-NETO, A.; MONTEIRO, P.L.J., JR.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v.99, n.3, p.2201-2220, 2016.

RINCÓN, J.A.A.; MION, B.; GINDRI, P.; PEGORARO, L.M.C.; CORREA, M.N.; SCHNEIDER, A. O desenvolvimento embrionário inicial em bovinos pode ser afetado por lipopolissacarídeos? In: XX Encontro de Pós-graduação. 2018, Pelotas. **Anais eletrônicos...** Pelotas: UFPel, 2018. Disponível em: <http://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2018/CA_02272.pdf> Acesso em: 12 Dez. 2018.

ROELOFS, J.B.; GRAAT, E.A.; MULLAART, E.; SOEDE, N.M.; VOSKAMP-HARKEMA, W.; KEMP, B. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v.66, n.9, p.2173-2181, 2006.

SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of reproduction**, v.65, n.5, p.1403-1409, 2001.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic animal endocrinology**, v.23, n.1-2, p.53-65, 2002.

SHELDON, I.M.; 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, n.6, p.1025-1032, 2009.

SHELDON, I.M.; CRONIN, J.G.; BROMFIELD, J.J. Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. **Annual review of animal biosciences**, v.7, p.1-24, 2018.

SHELDON, I.M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal reproduction science**, v.82-83, p.295-306, 2004.

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.837-845, 2002.

SHIMIZU, T.; ISHIZAWA, S.; MAGATA, F.; KOBAYASHI, M.; FRICKE, P.M.; MIYAMOTO, A. Involvement of lipopolysaccharide in ovarian cystic follicles in dairy cow: Expressions of LPS receptors and steroidogenesis-related genes in follicular cells of cystic follicles. **Animal Reproduction Science**, v.195, p. 89-95, 2018.

SHIMIZU, T.; MIYAUCHI, K.; SHIRASUNA, K.; BOLLWEIN, H.; MAGATA, F.; MURAYAMA, C.; MIYAMOTO, A. Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol production in bovine granulosa cells from small and large follicles. **Toxicology in vitro**, v.26, n.7, p.1134-1142, 2012.

SORDILLO, L.M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of dairy science**, v.99, n.6, p.4967-4982, 2016.

SOTO, P.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2alpha, and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **American journal of reproductive immunology**, v.50, n.3, p.263-272, 2003.

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.267-278, 2001.

VASCONCELOS, J.L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.G.; WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, n.2, p.307-314, 2001.

WERNER, R.P. **Patologia geral veterinária aplicada**. São Paulo: Roca, 2011. 348p.

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.549-559, 2007.

WILLIAMS, E.J.; SIBLEY, K.; MILLER, A.N.; LANE, E.A.; FISHWICK, J.; NASH, D.M.; HERATH, S.; ENGLAND, G.C.; DOBSON, H.; SHELDON, I.M. The effect of Escherichia coli lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. **American journal of reproductive immunology**, v.60, n.5, p.462-473, 2008.

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.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
126/2018/CEEA/REITORIA
23110.048134/2018-05

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito da aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) intrafolicular sobre o desenvolvimento folicular” processo número 23110.048134/2018-05, de responsabilidade de Augusto Schneider - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/12/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	15/12/2018 a 01/12/2019	
Espécie/linhagem/raça	Bovino/Jersey	
Nº de animais	20	
Idade	15 a 48 meses	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Embrapa Clima Temperado – Capão do Leão/RS	

Código para cadastro CEEA 48134-2018

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário, em 14/12/2018, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0390134 e o código CRC 2883D706.