

PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM RESPOSTA AOS DIFERENTES MÉTODOS DE COLETA DE EMBRIÕES EM OVINOS

**ROBERTO VASCONCELOS ESCOBAR¹; FERNANDO CAETANO DE OLIVEIRA²;
ARNALDO DINIZ VIEIRA³; AUGUSTO SCHNEIDER⁴; BERNARDO GARZIERA
GASPERIN⁵**

¹ Faculdade de Veterinária - UFPel – roberto.escobar@hotmail.com

² Faculdade de Veterinária - UFPel – fcoliveiravet@gmail.com

³ Faculdade de Veterinária – UFPel – vieira_ad@yahoo.com.br

⁴ Faculdade de Veterinária – UFPel - augustoschneider@gmail.com

⁵ Faculdade de Veterinária - UFPel – bbgasperin@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho aproximado de 17,3 milhões de cabeças de ovinos. Mesmo com um aumento crescente na produção ovina no Brasil, a demanda ainda está muito além da oferta (KIYC, 2013). Sendo assim, o aprimoramento e uso das biotécnicas aplicadas à reprodução animal, como a Inseminação Artificial (IA) e a transferência de embriões (TE), são atualmente indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos. Devido as características anatômicas peculiares da cervix da ovelha e consequente dificuldade de transposição do canal cervical, a técnica de transferência e coleta de embriões mais difundida tem sido por laparotomia.

Porém, a abordagem cirúrgica traz como desvantagem a aderência decorrente da exposição e manipulação uterina, além da redução no número de coletas (GUSMÃO et al., 2007). Estudos com o objetivo de dilatar o canal cervical de ovelhas em programas de IA e TE transcervicais têm sido conduzidos por vários autores, usando análogos de prostaglandina E (PGE) associados (BARRY et al., 1990) ou não (GUSMÃO et al., 2009) ao estradiol ou usando a ocitocina associada ao estradiol (AZAWI et al., 2011), como dilatadores cervicais.

Visto que ambas as técnicas possuem igual eficiência para coleta de embriões, o bem estar animal deve ser levado em consideração na escolha do procedimento. Por se tratar de um método menos invasivo do que o procedimento cirúrgico, o método transcervical possui um potencial de causar um menor comprometimento do bem estar. Entretanto, não existem informações do grau de alteração sistêmica causada pelos métodos cirúrgico e transcervical. Desta forma, este trabalho objetivou determinar o impacto do método de coleta de embriões sobre os níveis de proteínas séricas totais, proteínas de fase aguda positiva (haptoglobina e fibrinogênio) e negativa (paraoxonase).

2. METODOLOGIA

Para o experimento foram utilizadas 10 ovelhas multíparas da raça Crioula lanada. Primeiramente os animais foram avaliados quanto a possibilidade de transposição cervical em condições de estro e diestro, sendo então divididos em dois grupos para coleta de embriões, os de maior possibilidade de transposição cervical selecionados para a forma Transcervical (n=5) (TC) e os de menor possibilidade de transposição para a realização de laparotomia (n=5) (LP).

A superovulação foi feita com cio base (MENCHACA et al., 2009) cada animal recebeu 200mg de FSH (Folltropin V; Bioniche, Can) aplicado em duas doses diárias durante quatro dias, iniciando 60 horas após o estro (MENCHACA e RUBIANES, 2004). Um CIDR-G® foi reinserido no momento da aplicação da primeira dose de FSH e removido no momento da penúltima dose.

Nos momentos da sétima e oitava doses de FSH foi aplicado PGF2 α , sendo iniciada a observação de estro. Os animais receberam duas inseminações pela via cervical em intervalos de 12 horas, sendo que no momento da primeira inseminação foi aplicada uma dose de GnRH. Para o procedimento de LT os animais sofreram jejum alimentar e para TC aplicação de 100 μ g de benzoato de estradiol. No momento da TC receberam uma aplicação de 100UI de ocitocina prévio a coleta (Gusmão, 2011).

As coletas de sangue foram imediatamente antes do procedimento (D0) e nos dias 3, 5 e 7 pós procedimento. Foi avaliado as proteínas plasmáticas totais (PPT), haptoglobina (Hp), fibrinogênio (Fib) e paraoxonase (PON). Os níveis de PPT foram determinados através de refratômetro clínico. Os níveis de Hp foram determinados com base na sua capacidade de ligação à hemoglobina pelo teste da peroxidase em guaiacol (SCHNEIDER et al., 2013) com a leitura espectrofotométrica da absorbância, realizada em leitor de microplacas. Os níveis do Fib foram determinados através da técnica de precipitação pelo calor (LOWE et al., 2004) e a atividade da PON foi determinada por espectrofotometria (BROWNE et al., 2007). O efeito dos tratamentos sobre os níveis dos marcadores inflamatórios foi calculado pelo método de dados repetidos utilizando o procedimento MIXED do SAS, determinando o efeito do grupo, tempo e sua interação. O nível de significância utilizado foi 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores individuais de PPT, Hp, Fib e PON, demonstraram que não houveram diferenças significativas em seus níveis ($P>0,05$) em ambos os grupos LP e TC quando comparados (Figura 1). De acordo com (ECKERSALL, 2010), as proteínas de fase aguda são comumente usadas em medicina veterinária como biomarcadores altamente sensíveis na detecção de processos inflamatórios o no monitoramento de terapias específicas.

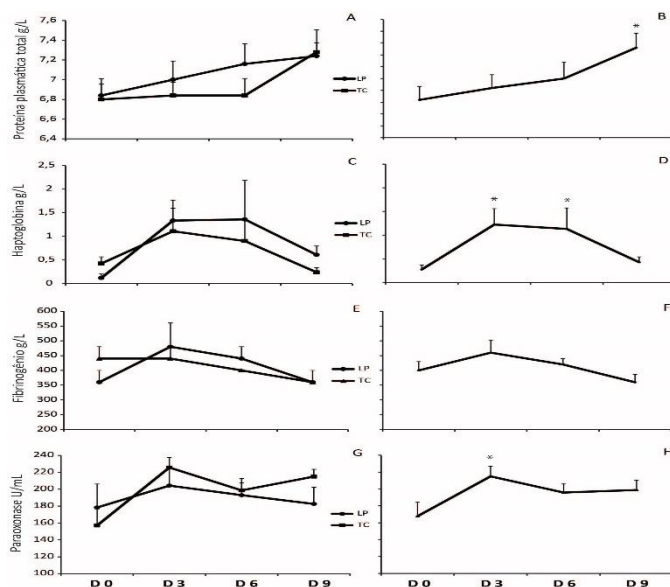


Figura 1: Níveis de PPT(g/L), Hp(g/L), Fib(g/L) e PON (U/mL). Os gráficos A, C, E e G demonstram os níveis nos animais submetidos aos diferentes procedimentos (LP ou TC; n=5/grupo). Nos gráficos B, D, F e H são demonstrados os níveis em todos os animais, independente do procedimento (n=10).

Classificadas em proteínas de fase aguda “negativa” e “positiva”, e seus níveis podem aumentar ou diminuir, respectivamente, em resposta a alguma agressão (MURATA et. al., 2004). O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda positiva de liberação moderada e se manifesta tardiamente alguns dias após a infecção (GRUYS et. al., 2005), no entanto, os valores observados no intervalo de dias analisados não se elevaram, como era o esperado pelo menos no grupo LP, por se tratar de um procedimento de maior invasividade, o que pode ter sido causado devido a sensibilidade do teste aplicado.

A Hp é considerada uma das principais PFA encontradas em pequenos ruminantes e pode aumentar em até 80 vezes em inflamações agudas (CECILIANI et. al., 2012), além de ajudar no reparo de feridas por estimularem a angiogênese. Os valores de Hp atingiram um pico entre os D3 e D6, e retornando a níveis semelhantes aos do D0 no D9, demonstrando que houve uma reação a agentes estressantes.

Já a PON é uma proteína de fase aguda negativa que tem uma importante função no metabolismo dos lipídeos, promovendo uma ação anti-oxidativa/anti-inflamatória do HDL (TURK et. al. 2009). Segundo FEINGOLD et. al. (1998), demonstraram que a atividade de PON no soro sanguíneo diminuiu durante a fase aguda da resposta inflamatória em hamsters, entretanto, não houve uma redução em seus níveis como o esperado e sim uma elevação transitória no D3. Com relação aos níveis de PPT, pode-se observar uma elevação apenas no D9, porém, era esperado que essa resposta se manifestasse mais cedo pelo fato de que seus níveis seriam influenciados pelo aumento nos níveis das proteínas de fase aguda (PFA), que são liberadas de forma lenta e com níveis diretamente ligados ao efeito do estímulo (CECILIANI et al., 2012). Os parâmetros avaliados no presente estudo são reconhecidos como capazes de identificar respostas individuais frente a agentes estressores (MURATA et al., 2004). Porém, como não foi possível indicar diferenças de nível de resposta inflamatória gerada pelos procedimentos de coleta cirúrgica ou transcervical, deve-se considerar a possibilidade de utilizar o método que permita a preservação da maior longevidade produtiva das doadoras com anatomia cervical favorável.

4. CONCLUSÕES

Apesar de ser menos invasivo, o método de coleta transcervical induz a uma alteração nos parâmetros inflamatórios em níveis similares aos observados quando se utiliza o método de coleta cirúrgico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KIYA, C. K. **Utilização de protocolos curtos na inseminação artificial em tempo fixo em ovelhas deslanadas do semiárido baiano**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Universidade Federal da Bahia.
- GUSMÃO, A. L. Colheita Transcervical de Embriões Ovinos da Raça Santa Inês no Semi-árido Nordestino. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.8, n.1, p. 01-10-, 2007 <http://www.rbspa.ufba.br> ISSN 1519 9940.
- GUSMÃO, A.L. State-of-the-art in the transcervical embryo collection in goats and sheep. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2011. V.39, p. 37-42.
- BARRY, D. et. al. Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E 2 and estradiol. **Theriogenology**, 1990. 33, 190.
- AZAWI, O. A new technique for nonsurgical embryo recovery in superovulated ewes treated with estradiol and oxytocin. **AL-Qadisiya J. Vet. Med. Sci**, 2011. v.10.

- MENCHACA, A., RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, 2004. v.16, p.403-413.
- MENCHACA, A., VILARIÑO, M., PINCZAK, A., KMAID, S., SALDAÑA, J.M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology**, 2009. v.72, p.477-483.
- SCHNEIDER, A., CORRÊA, M.N., Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in veterinary science**, 2013. v.95, p.269-271.
- LOWE, G.D., RUMLEY, A., MACKIE, I.J. Plasma fibrinogen. **Annals of clinical biochemistry**, 2004. v.41, p.430-440.
- BROWNE, R.W., KOURY, S.T., MARION, S., WILDING, G., MUTI, P., Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase 1 Activity and Polymorphism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. **Clinical Chemistry**, 2007. v.53, p.310-317.
- ECKERSALLA, P.D., BELLB, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, 2010. v.185 p.23-27.
- MURATA, H., SHIMADA, N., YOSHIOKA, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**. v.168, p.28-40.
- GRUYS, E., TOUSSAINT, M. J. M., Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, 2005. 6B(11), p.1045-1056.
- CECILIANI, F., CERON, J., ECKERSALL, P., SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of proteomics**, 2012. v.75, p.4207-4231.
- TURK, R., VNUK, D., SVETINA, A., MEŠTRIĆ, Z. F., BOTTEGARRO, N. B., JURETIĆ, D. Anti-oxidative/anti-inflammatory paraoxonase activity and lipid alterations after total splenectomy and autologous spleen transplantation in pigs. **Vet. Arhiv**, 2009. v.79(1) p. 1-10.
- FEINGOLD, K. R., MEMON, R. A., MOSER, A. H., GRUNFELD, C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. **Atherosclerosis**, 1998. v.139 p.307-315.