

EFEITO DA ATIVIDADE SÉRICA DE PARAOXONASE-1 NA TAXA DE PRENHEZ DE VACAS INSEMINADAS EM TEMPO-FIXO

NATÁLIA ÁVILA DE CASTRO¹; LUIZ FRANCISCO MACHADO PFEIFER²; JOAO ALVARADO RINCÓN³; JAMYLE PEREIRA CESTARO⁴; PAULO MARCOS ARAÚJO NEVES⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nataliavetufpel@gmail.com

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – Rondônia – luiz.embrapa@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – joaoal13@hotmail.com

⁴Faculdades Integradas Aparício Carvalho – jamyle_cestaro@hotmail.com

⁵Faculdades Integradas Aparício Carvalho – quepaulo@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os avanços nas pesquisas acerca dos mecanismos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento folicular e estabelecimento de prenhez em animais de produção permitiram o desenvolvimento de protocolos de controle do ciclo estral, especialmente para bovinos (BÓ e BARUSELLI et al., 2014). A aplicação desses protocolos permite o uso da inseminação artificial em tempo-fixo (IATF), em que as vacas são inseminadas em um mesmo dia, sem a necessidade de detecção de cio. Com isso, houve um aumento considerável no uso de inseminação artificial (IA) nas propriedades comerciais de corte. Entretanto, diversos fatores podem afetar a fertilidade em bovinos, como diâmetro do folículo pré-ovulatório (PERRY et al., 2005), comprimento do proestro (BRIDGES et al., 2010), níveis séricos de proteínas relacionadas ao status metabólico, como a insulina (PONSART et al., 2014) e relacionadas à saúde do trato reprodutivo no pós-parto (BURKE et al., 2010, SCHNEIDER et al., 2013a).

Nesse sentido, outro fator que tem sido associado com a fertilidade e o período periovulação é a secreção local de proteínas de fase aguda, como a Paraoxonase-1 (PON-1), a qual é uma enzima produzida no fígado, e que já foi detectada no fluido de folículos ovulatórios (SCHNEIDER et al., 2013b). Os níveis séricos de PON-1 são reduzidos durante processos inflamatórios como na metrite e endometrite pós-parto (SCHNEIDER et al., 2013b; KRAUSE et al., 2014). Vacas leiteiras que ovularam mais precocemente no período pós-parto tiveram maiores níveis séricos de PON-1 (KRAUSE et al., 2014). Além disso, recentemente foi demonstrado que a adição de PON-1 no meio de maturação de oócitos *in vitro* melhora o desenvolvimento embrionário inicial (RINCÓN et al., 2016). Em humanos, foi demonstrado haver uma correlação positiva entre os níveis séricos e intrafoliculares de PON-1 e o desenvolvimento embrionário na fertilização *in vitro* (BROWNE et al., 2008). Entretanto, não se tem estudos que demonstrem o efeito dos níveis séricos de PON-1 na prenhez de vacas inseminadas em tempo-fixo. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da atividade de PON-1 no momento da IATF sobre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e prenhez em vacas Nelore pós-parto.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi conduzido em duas propriedades comerciais no estado de Rondônia. Todos os animais eram mantidos em pastagem de *Brachiaria*

brizantha, com livre acesso à água e sal mineral. Para o estudo, 193 vacas da raça Nelore (53 primíparas e 140 múltiparas), com $69,82 \pm 11,37$ dias pós parto foram submetidas a um protocolo de sincronização de ovulação e inseminação artificial em tempo-fixo (IATF). Todas as vacas receberam um implante de liberação de progesterona (1,9g de Progesterona; CIDR®, Zoetis) associado a uma injeção intramuscular (i.m.) contendo 2mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen®, Biogénesis-Bagó, Curitiba) no Dia 0 do protocolo. Oito dias após, os implantes de progesterona foram removidos e as vacas receberam 150 µg de d-Cloprostenol (Croniben®, Biogénesis-Bagó, Curitiba), i.m., 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis, São Paulo), i.m. e 300 UI, i.m., de eCG (Novormon®, Syntex, Buenos Aires). No Dia 10 do protocolo, os ovários das vacas foram avaliados por ultrassonografia transretal (SIUI CTS-900, probe linear com 5MHZ, Gangdong, China) para identificar a presença e determinar o diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO). Imediatamente após a avaliação ultrassonográfica de todas as vacas, foi feita a IATF.

No momento da IATF, foi feita coleta de sangue de todas as vacas para determinar a atividade de PON-1. As amostras sangue foram coletadas a partir da veia cocígea, em tubos com vácuo, sem anticoagulante e em seguida refrigeradas a 4°C até serem encaminhadas ao laboratório para serem centrifugadas (3000 x g por 15 minutos) e estocadas em freezer a -20°C. A atividade de PON-1 sérica (kU/L) foi determinada através de espectrofotometria, conforme descrito por Browne et al. (2007). De acordo com a atividade sérica de PON-1 no momento da IATF, foi feita uma classificação em três grupos: baixa (< 70 kU/L), média (70 – 90 kU/L) e alta (> 90 kU/L) atividade. O diagnóstico de gestação foi feito 30 dias após a IATF.

Todas as análises estatísticas foram feitas pelo programa estatístico R, sendo as variáveis quantitativas analisadas por Análise de Variância e a taxa de prenhez por teste de Qui-quadrado. Análise de Correlação foi feita para analisar a correlação entre atividade de PON-1 e diâmetro FPO. Análises de Regressão logística foram feitas para avaliar a relação entre diâmetro do FPO e da atividade de PON-1 sobre a probabilidade de prenhez. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes a atividade de Paraoxonase-1 no momento da IATF em vacas Nelore estão demonstrados na tabela 1. Não houve efeito de categoria animal sobre a atividade de PON-1 ($P = 0,11$) e diâmetro do folículo pré-ovulatório ($P = 0,19$). No total, a taxa de prenhez/IA foi de 62,7% (121/193), não havendo diferença entre os grupos de Baixa, Média ou Alta atividade de PON-1.

Tabela 1. Atividade de Paraoxonase-1 (kU/L±EP), diâmetro do folículo pré-ovulatório (mm±EP) e taxa de prenhez em vacas Nelore pós-parto com Baixa, Média ou Alta atividade de Paraoxonase-1 no momento da Inseminação Artificial em Tempo-Fixo.

Parâmetro	Atividade de Paraoxonase-1			Valor de P
	Baixa	Média	Alta	
Paraoxonase-1 (kU/L±EP)	55,78±1,19 ^a	79,33±0,76 ^b	110,52±1,91 ^c	< 0,01
Diâmetro do Folículo pré-ovulatório (mm±EP)	13,22±0,23	13,25±0,32	12,87±0,26	0,55

Taxa de prenhez	65,7% (44/67)	64,40% (38/59)	58,2% (39/67)	>0,05
-----------------	------------------	-------------------	------------------	-------

Os resultados encontrados demonstraram não haver efeito dos níveis de PON-1 no estabelecimento de prenhez em vacas de corte pós-parto. Além disso, não houve correlação entre atividade de PON-1 e diâmetro do folículo pré-ovulatório ($R = 0,03$; $P = 0,65$). A análise de regressão indicou que não houve efeito da atividade de PON-1 ($P = 0,94$) e do diâmetro do folículo pré-ovulatório ($P = 0,15$) individualmente sobre a probabilidade de prenhez, assim como da sua interação ($P > 0,05$). A Paraoxonase-1 é uma proteína de fase aguda produzida no fígado, cujas concentrações séricas são reduzidas em processos inflamatórios, como no caso de infecções do trato reprodutivo, afetando a atividade ovariana em vacas leiteiras pós-parto (BURKE et al., 2010). Além disso, já foi demonstrado a presença de PON-1 no fluido folicular de bovinos (SCHNEIDER et al., 2013b). Dessa forma, no presente estudo, testou-se a hipótese de que vacas com níveis menores de PON-1 teriam um oócito de reduzida qualidade, e consequentemente menor sucesso no estabelecimento de prenhez; entretanto, por se tratarem de vacas de corte, naturalmente menos exigentes do que as vacas leiteiras, não houve efeito da atividade de PON-1 na prenhez das vacas. Além disso, todas as vacas apresentavam uma boa condição corporal e mais de 60 dias pós-parto, já havendo restabelecido a atividade uterina e ovariana. Por essa razão, em todos os grupos houve uma resposta ovariana adequada com alta taxa de prenhez/IA.

Recentemente, foi demonstrada uma alta correlação entre a atividade sérica de PON-1 e sua atividade intrafolicular, sendo maior em folículos saudáveis em comparação com os atresícos (SCHNEIDER et al., 2013b). De acordo com Browne et al. (2008), alterações na atividade sérica de PON-1 podem se refletir em alterações no fluido folicular, afetando a qualidade do oócito. Em outro estudo recente, foi demonstrado que a adição de PON-1 no meio de maturação *in vitro* melhorou a competência do oócito e o desenvolvimento embrionário inicial (RINCÓN et al., 2016), sendo sugerido que a PON-1 tem um papel importante na proteção de oócito contra estresse oxidativo e melhora da fertilidade. Dessa forma, a baixa atividade desta enzima pode prejudicar a ovulação de um gameta apto a ser fertilizado, impedindo o estabelecimento da gestação. No entanto, não foram observadas diferenças em nosso estudo com vacas de corte pelos motivos anteriormente descritos.

Em vacas leiteiras, atividade de PON-1 abaixo de 80 kU/L foi encontrada em casos de infecção uterina sete dias pós-parto, mas após 21 dias houve um aumento nos níveis, sendo semelhante aos níveis de vacas saudáveis (SCHNEIDER et al., 2013a). No presente estudo, como as vacas apresentavam condições adequadas para a reprodução, apesar de haver diferença nos níveis de PON-1, isso não interferiu na resposta dos animais ao protocolo de IATF. Dessa forma, sugere-se que mais estudos sejam conduzidos, no intuito de determinar se a PON-1 pode melhorar o desenvolvimento embrionário bovino *in vivo*.

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram não haver efeito dos diferentes níveis de PON-1 no diâmetro do folículo ovulatório e no estabelecimento de prenhez em vacas de corte submetidas a inseminação artificial em tempo-fixado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal**, Cambridge, p. 144-150, 2014.
- BROWNE, R.W., KOURY, S.T., MARION, S., WILDING, G., MUTI, P., TREVISAN, M. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. **Clinical Chemistry**, Boston, v. 53, p. 310–317, 2007.
- BROWNE, R.W., SHELLY, W.B., BLOOM, M.S., OCQUE, A.J., SANDLER, J.R., HUDDLESTON, H.G., FUJIMOTO, V.Y. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. **Human Reproduction**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 1884-1894, 2008.
- BRIDGES, P.J., LEWIS, P.E., WAGNER, W.R. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, New York, v. 52, p.573- 583,1999.
- BURKE, C.R., MEIER, S., MCDUGALL, S., COMPTON, C., MITCHELL, M., ROCHE, J.R. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 5363–5373, 2010.
- KRAUSE, A.R.T., PFEIFER, L.F.M., MONTAGNER, P., WESCHNFELDER, M.M., SCHWEGLER, E., LIMA, M.E., XAVIER, E.G., BRAUNER, C.C., SCHMITT, E., DEL PINO, F.A.B., MARTINS, C.F., CORREA, M.N., SCHNEIDER, A. Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v.145, p. 8-14, 2014.
- RINCÓN, J., MADEIRA, E.M., CAMPOS, F.T., MION, B., SILVA, J.F., ABSALÓN-MEDINA, V.A., BUTLER, W.R., CORRÊA, M.N., PEGORARO, L., SCHNEIDER, A. Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development in vitro. **Reproduction of Domestic Animals**, Oxford, p. 1-4, 2016.
- SÁ FILHO, O.G., MENEGHETTI, M., PERES, R.F.G., LAMB, G.C., VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, New York, v. 72, n. 2, p. 210-218, 2009.
- SCHNEIDER, A., ABSALÓN-MEDINA, V.A., ESPOSITO, G., CORREA, M.N., BUTLER, W.R. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and PON1 activity in follicular fluid of dairy cows. **Reproduction of Domestic Animals**, Oxford v. 48, n. 6, p. 989-994, 2013a.
- SCHNEIDER, A., CORREA, M.N., BUTLER, W.R. Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in Veterinary Science**, United Kingdom, v. 95, p.269-271, 2013b.