

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE OÓCITOS BOVINOS DESAFIADOS COM LIPOPOLISSARÍDEOS DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO*

MARCIO BRACHAK¹; JOAO A. A. RINCÓN^{1,3}; JORGEA PRADIEÉ²; BRUNA
MION³; LÍGIA M. C. PEGORARO³; MARCIO N. CORRÊA^{1,4}

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), UFPEl
Marciobrachak.14@hotmail.com

²Pos doc CAPES/Embrapa Clima Temperado

³Embrapa Clima Temperado

⁴Faculdade de Medicina Veterinária – Marcio.nunescorreia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira tem sido intensificada nos últimos anos, resultando em aumento na produção de leite. Contudo, esse aumento na produção gera como consequência superlotação, estresse e aumento de incidência de doenças no primeiro mês de lactação. A reprodução é o principal fator a ser considerado dentro de um sistema de produção, pois garante a permanência na atividade (LEBLANC et al., 2006). Entretanto no pós-parto recente, a incidência de doenças como metrite chega a 40% e a de mastite varia de 20-50% (SHELDON et al., 2002), causando grandes perdas econômicas. Um dos principais agentes causadores dessas doenças é a bactéria gram negativa *Escherichia coli* (SHELDON et al., 2002).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são endotoxinas presentes na parede de bactérias gram negativas, responsáveis por promover a resposta inflamatória, através do sistema imunológico (MATEUS et al., 2003). A princípio, acreditava-se que o LPS atuava a nível de hipotálamo ou hipófise, inibindo a liberação de gonadotrofinas e, conseqüentemente, afetando o desenvolvimento folicular (SUZUKI et al., 2001). Entretanto, o LPS pode também ter um efeito direto no folículo ovariano, visto que estudos *in vitro* (BROMFIELD e SHELDON, 2011) e *in vivo* (CAMPOS et al., 2017) indicam que as células da granulosa podem gerar uma resposta inflamatória semelhante às células do sistema imunológico, uma vez que foi detectada a expressão do receptor TLR4, principal mecanismo de reconhecimento do LPS e ativação da resposta imune. Além disso, foi observada uma diminuição na taxa de maturação nuclear, aumento do estresse oxidativo e aumento na apoptose de oócitos maturados *in vitro* com 10 µg/mL de LPS (ZHAO et al., 2017).

Tanto *in vivo* quanto *in vitro*, somente oócitos maduros são capazes de retomar a meiose, adquirir a habilidade de serem fecundados, atingir o estágio de blastocisto e, conseqüentemente, gerar uma prenhez (FAIR et al., 1996). Neste sentido, qualquer fator endógeno ou exógeno que altere o ambiente intrafolicular pode acarretar em efeitos negativos na maturação oocitária (AGARWAL et al., 2005), reduzindo a fertilidade. Portanto, a maturação oocitária é um dos mecanismos chave no sucesso de programas reprodutivos. Diante disso, objetivou-se avaliar o efeito de doses crescentes de LPS durante a maturação oocitária *in vitro* sobre desenvolvimento embrionário inicial em bovinos.

2. METODOLOGIA

Para verificar o efeito do LPS durante a maturação oocitária, foram utilizadas as seguintes concentrações: 0 (controle); 0,1; 1 e 5 µg/mL de LPS (SIGMA®, St.

Louis, MO, USA) no meio de MIV. As concentrações foram definidas com o objetivo de mimetizar o acúmulo de LPS intrafolicular que ocorre em processos infecciosos *in vivo*, como a endometrite subclínica, em que a concentração de LPS varia entre 0-0,04 µg/mL e a endometrite clínica, cuja concentração varia entre 0,042-0,875 ng/mL (HERATH et al., 2007).

A produção *in vitro* de embriões foi realizada a partir de ovários bovinos provenientes de abatedouros locais. Para obtenção dos complexos cumulus oócitos (COCs), foram aspirados folículos com diâmetro de 3 a 8 mm. Os COCs foram selecionados quanto à morfologia e distribuídos aleatoriamente em grupos (40-50 oócitos/grupo) e adicionados ao meio de MIV, com a respectiva concentração de LPS (0, 0,1; 1 e 5 µg/mL). A maturação ocorreu em gotas de 400 µL de meio de MIV (Progest® Biotecnologia em Reprodução Animal, Botucatu, SP, Brasil), em estufa com 5% de CO₂ e 39 °C durante 22 horas. Após a MIV, os COCs foram transferidos a gotas de 400 µL de meio FIV (Progest®) e conduzida a inseminação com concentração de 1x10⁶ espermatozoides/mL. Os COCs foram incubados com os espermatozoides sob as mesmas condições da MIV durante 20 horas e o dia da inseminação foi considerado como o dia 0 de cultivo. Após, os prováveis zigotos foram desnudados das células do cumulus mediante sucessivas pipetagens e, transferidos a gotas de 200 µL de meio de cultivo (Progest®) sob óleo mineral. O cultivo embrionário ocorreu durante 7 dias. No dia 3 (D3), foi avaliada a taxa de clivagem (clivados/inseminados) e ao sétimo dia foi avaliada a taxa de desenvolvimento embrionário (blastocistos/inseminados). Adicionalmente, em D3 e D5 foi realizada a troca de 70% do meio de cultivo por meio de cultivo fresco. Foram realizadas 8 repetições, totalizando 400 COCs/grupo.

Além disso, também foi realizada análise de maturação nuclear. Após a MIV, 40-50 COCs/grupo foram desnudados das células do cumulus através da enzima hialuronidase (1 mg/mL) (SIGMA®) e sucessivas pipetagens. Os oócitos desnudos foram fixados por 30 min em PBS suplementado com 0,5% de glutaraldeído, corados por 15 min em PBS acrescido de 1 mg/mL de PVA e 5 µg/mL de Hoechst 33342 (SIGMA®), lavados por 5 min em PBS e transferidos às lâminas em gotas de ~10 µL de PBS-Glicerol (1:1) acrescido de 0,5 µg/mL de Hoechst 33342. A fluorescência foi avaliada utilizando o microscópio de fluorescência invertido IX 71 (Olympus®, Shinjuku-ku, Tokyo, Japão) equipado com filtros UV de 330-385 nm. Foram considerados como oócitos maduros os que apresentaram extrusão do primeiro corpúsculo polar (metáfase II) e não maduros, os que não apresentaram esta configuração. Desta forma foram conduzidas 3 repetições, totalizando 135 oócitos/grupo.

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para a comparação de médias, no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão. Foi considerado como diferença estatística $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contrário ao esperado, o LPS não afetou a taxa de maturação nuclear ($P > 0,05$), que foi de $63,57 \pm 8,64\%$ no controle e de $54,69 \pm 4,89\%$, $40,94 \pm 2,77\%$ e $54,60 \pm 6,80\%$ nas concentrações de 0,1; 1 e 5 µg/mL de LPS respectivamente (Figura 1). A taxa de clivagem do grupo controle foi de $73,02 \pm 4,65\%$ semelhante aos grupos desafiados com 0,1; 1 e 5 µg/mL LPS que foi de $69,0 \pm 6,34$, $71,05 \pm 6,88$ e $75,62 \pm 4,78\%$ respectivamente ($P > 0,05$, Figura 1). Da mesma forma, a taxa de blastocisto não diferiu entre o controle ($24,24 \pm 1,92\%$) e

os grupos desafiados com LPS ($20,91 \pm 4,27$, $26,76 \pm 3,41$ e $24,16 \pm 3,66\%$ respectivamente, $P > 0,05$) como evidenciado na Figura 2.

Nossos resultados contrariam o reportado por outros trabalhos que encontraram redução da taxa de maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro* com $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS (BROMFIELD e SHELDON, 2011; ZHAO et al., 2017). Além disso, ZHAO et al. (2017) reportaram que o LPS aumentou a presença de anormalidades no fuso meiótico, assim como levou ao aumento do status oxidativo e da taxa apoptótica. Adicionalmente, ROTH et al. (2015) observaram diminuição na taxa de clivagem e na taxa de blastocisto de oócitos maturados *in vitro* no fluido folicular de vacas desafiadas com LPS intramamário ($0,5 \mu\text{g}$) durante 20 dias, indicando que alterações no ambiente intrafolicular decorrente do desafio com LPS afetam negativamente a maturação oocitária.

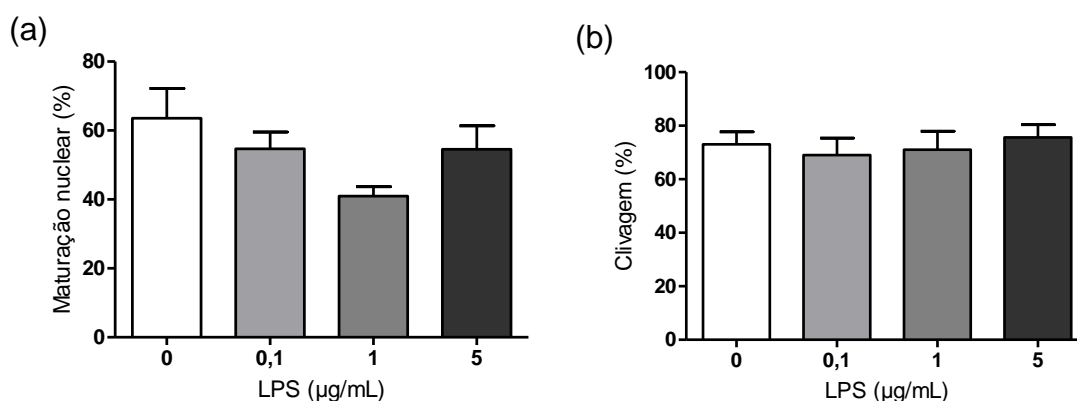


Figura 1. Taxa de maturação nuclear (a) e taxa de clivagem (D3) (b) de oócitos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de LPS.

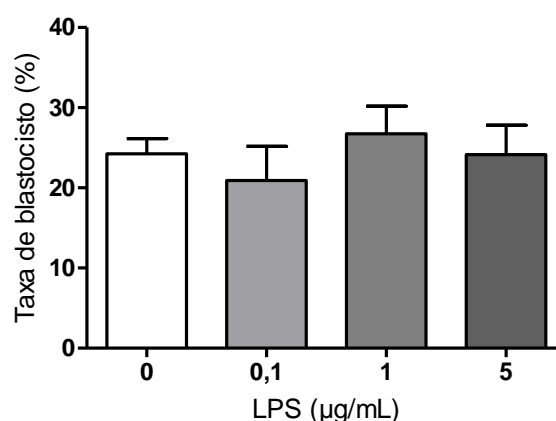


Figura 2. Taxa de blastocisto em D7 de oócitos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de LPS durante 22 horas.

Os estudos que reportam alterações na maturação oocitária decorrentes do LPS, utilizaram concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS no meio de MIV. Em contrapartida, a maior concentração testada no nosso estudo foi de $5 \mu\text{g/mL}$ de LPS. Isto poderia explicar a divergência dos nossos resultados em comparação com os outros trabalhos. Porém, são poucos os estudos que mensuraram o LPS intrafolicular. Nesse estudo, buscamos nos assemelhar às condições observadas *in vivo*, portanto utilizamos como referência o trabalho de HERATH et al. (2007) que encontrou concentrações intrafoliculares de LPS de $<0,04$ e $<0,875 \mu\text{g/mL}$ em animais com endometrite subclínica e clínica, respectivamente. Sendo assim,

uma concentração de 10 µg/mL durante a maturação oocitária seria pouco provável de acontecer *in vivo*.

A maturação oocitária é um conjunto de eventos complexos, em que, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, os mecanismos ainda não estão completamente elucidados. A vista disso, mais estudos estão sendo conduzidos pela nossa equipe para compreender como o LPS pode influenciar a fertilidade em bovinos, a nível de oócito e desenvolvimento embrionário inicial. Assim como, para conhecer as concentrações reais de LPS intrafolicular de animais acometidos com diferentes infecções, subclínicas e clínicas.

4. CONCLUSÕES

Considerando as taxas de maturação nuclear, clivagem e desenvolvimento embrionário obtidos neste experimento concluímos que o LPS nas concentrações testadas não afeta o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* em bovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 3, p. 28, 2005.

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. 5029-40, 2011.

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.

FAIR, T.; HYTTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular reproduction and development**, v. 43, n. 4, p. 503-12, 1996.

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. 683-93, 2007.

LEBLANC, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 4, p. 1267-79, 2006.

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. **Anim Reprod Sci**, v. 76, n. 3-4, p. 143-54, 2003.

ROTH, Z.; ASAF, S.; FURMAN, O.; LAVON, Y.; KALO, D.; WOLFENSON, D.; LEITNER, G. Subclinical mastitis disrupts oocyte cytoplasmic maturation in association with reduced developmental competence and impaired gene expression in preimplantation bovine embryos. **Reproduction, fertility, and development**, 2015.

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. 837-45, 2002.

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. 267-78, 2001.

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.