

## MODULAÇÃO ENDÓCRINA E GÊNICA NO ÚTERO DE VACAS SUBMETIDAS À PROLONGADA EXPOSIÇÃO A ESTRÓGENO

NATHÁLIA WACHOLZ KNABAH<sup>1</sup>; SERGIO FARIAS VARGAS Jr.<sup>2</sup>; CRISTINA SANGOI HAAS<sup>2</sup>, BERNARDO GARZIERA GASPERIN<sup>2</sup>, THOMAZ LUCIA Jr.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS – [nathaliaknabah@gmail.com](mailto:nathaliaknabah@gmail.com)*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/ RS – [tluciajr@gmail.com](mailto:tluciajr@gmail.com)*

### 1. INTRODUÇÃO

Os problemas reprodutivos são uma das principais causas de descarte em rebanhos leiteiros, o que leva a grandes prejuízos econômicos ao produtor. A seleção contínua para produção de leite resultou em uma combinação antagônica entre aumento da produção e redução de fertilidade na pecuária leiteira (Pryce et. al., 2004).

Protocolos de indução artificial de lactação (IAL) são alternativas para extrair alta produção leiteira de vacas com problemas reprodutivos que não poderiam entrar naturalmente em lactação, evitando assim o seu descarte precoce. Ainda que uma parcela significativa (entre 40-70%) das fêmeas inférteis ou “repetidoras de serviço” submetidas à IAL retoma a fertilidade posteriormente, os mecanismos envolvidos no restabelecimento desta fertilidade ainda são desconhecidos.

Os protocolos de IAL são baseados em um prolongado período de exposição à progesterona (P4) e estrógeno (E2), com aplicações isoladas de prostaglandina, corticoides e somatotrofina recombinante bovina (bST). Dados anteriores obtidos pelo nosso grupo demonstram que os níveis de progesterona alcançados ao longo dos sete dias de aplicação são inferiores aos níveis fisiológicos observados durante o metaestro e diestro. Por outro lado, os níveis de estrógeno são extremamente elevados e se mantêm por período muito longo (mais de 15 dias), o que não ocorre em nenhum momento fisiológico da fêmea bovina não gestante.

Ainda, os efeitos positivos do estrógeno sobre o ambiente uterino (na prevenção e no combate a processos inflamatórios) e sobre a modulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal são bem estabelecidos. Com base nestas observações, elaboramos a hipótese de que o longo período de exposição aos esteroides, em especial ao estrógeno, está envolvido no retorno à fertilidade dos animais tratados através da modulação do ambiente endócrino, uterino e ovariano. Este trabalho tem por objetivo geral determinar as modulações gênicas uterinas e endócrinas em vacas submetidas a longos períodos de exposição ao estrógeno.

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizadas seis fêmeas bovinas leiteiras, com atividade cíclica, porém com histórico de repetição de serviços. As vacas foram previamente sincronizadas com o seguinte protocolo hormonal: no D0 foi realizada a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol por via i.m. e a inserção de um dispositivo vaginal (DIV) contendo 1g de progesterona. Oito dias após (D8), o DIV foi removido e foi feita a aplicação de 150 µg de cloprostenol sódico (análogo de prostaglandina). O crescimento folicular foi monitorado diariamente por

ultrassonografia transvaginal até que o folículo dominante atingisse 10-12 mm, quando foi realizada a aspiração folicular.

Cinco dias após a aspiração folicular, as vacas foram submetidas a um protocolo de IAL, com administração de: P4 (0,25 mg/kg) e de benzoato de estradiol (BE; 0,1 mg/kg) por via i.m., diariamente, durante sete dias (D0 a D6); BE isoladamente (0,1 mg/kg), por mais 7 dias (D7 a D13); dexametasona (0,05 mg/kg via i.m; em três aplicações do D19 até o D21) e cloprostenol sódico (150 µg no D17). As vacas tiveram os úberes massageados duas vezes ao dia durante 5 minutos (do D13 ao D19).

Foram realizadas biopsias uterina, imediatamente antes da primeira aplicação hormonal do protocolo IAL, no D0 e 7 dias após o término do protocolo. Também foram realizadas coletas de sangue nos dias -5, -4, -3, -2, -1, 0, 7, 14 e 21 do protocolo. Quarenta e cinco dias após o término do protocolo de IAL, as fêmeas foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização de estro acima descrito, sendo repetidos os mesmos procedimentos de dinâmica, aspiração folicular e coleta de sangue nos cinco dias após a remoção dos DIV.

A partir das amostras de sangue, foram determinados os níveis de P4 e E2, antes a após a exposição das vacas a IAL. Também foram determinados os níveis de cortisol, para avaliar possíveis desconfortos dos animais, através da técnica de eletroquimioluminescência (BOSSAERT et al., 2008).

As amostras de endométrio foram coletadas via transcervical, utilizando pinça específica (pinça de Yeoman), em locais diferentes do corpo do útero.

O RNA total das células foi extraído utilizando Trizol (Invitrogen, Brasil) e as amostras foram quantificadas (RNA extraído) em espectrofotômetro (NanoDrop) e a pureza foi avaliada através da taxa de absorção da relação OD260/OD280, desconsiderando valores inferiores a 1.6. O RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI) a 37°C por 15 min, para digerir qualquer DNA contaminante. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o kit iScript (BioRad), seguindo as instruções do fabricante. A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (CFX384, BioRad) com SsoFast EvaGreen supermix (CFX384, BioRad), sendo a variabilidade na quantidade de RNAm acessada em relação à amplificação dos genes constitutivos ciclofilina, histona e GAPDH. Os genes avaliados no endométrio foram: ESR2, PGR, OXTR, SLC2A1, AKR1C4, LPL, SERPINA14, EGFR e IGF-1R.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da mensuração de P4, E2 e Cortisol (Figura 1) durante a exposição, permitem comprovar a eficácia do protocolo utilizado, para nortear os estudos *in vitro*. Houve um aumento no nível de cortisol nos D8 e D10, seguidos de uma queda nos níveis no D13. O estrógeno teve um pico de concentração plasmática no D4, caindo a níveis basais após 17 dias de tratamento. Os níveis de progesterona se mantiveram elevados nos primeiros sete dias de tratamento (período de permanência dos dispositivos de P4) seguidos de queda para níveis basais após o oitavo dia de tratamento.

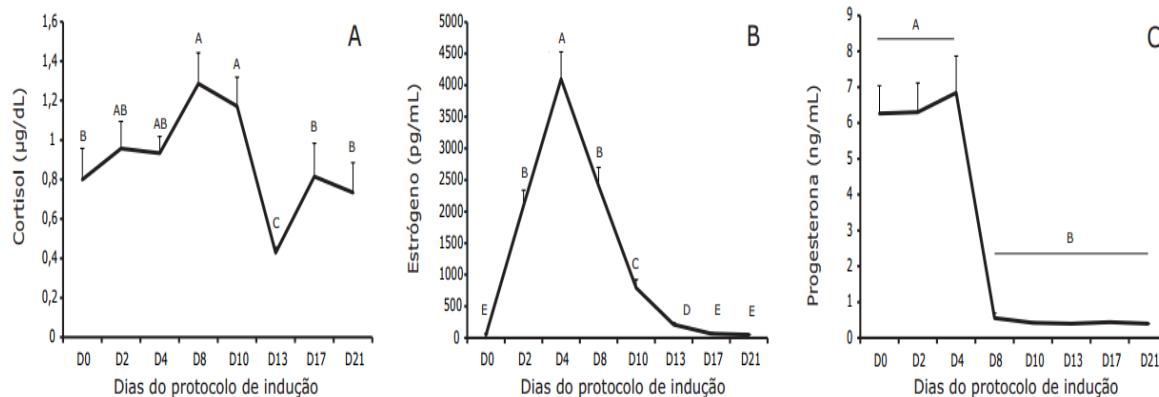


FIGURA 1: Níveis sanguíneos de cortisol (A), estrógeno (B) e progesterona (C) durante os 21 dias de exposição a estrógenos.

A,B,C,D,E :Média ± erro padrão da média diferem entre os dias ( $p < 0,05$ ).

A abundância de RNAm dos receptores EGFR e ESR2 não diferiu ( $p > 0,05$ ) no endométrio de vacas, antes e após a exposição a estrógenos (Figura 2). Porém, o receptor OTR apresentou menor expressão após o tratamento ( $p = 0,0061$ ), corroborando os dados de ARAÚJO et al. (2015), que relataram menor expressão de OTR em vacas que ovularam folículos de maior diâmetro. Assim, uma maior exposição a E2 antes da ovulação poderia ser relacionada com regulação negativa do E2 na expressão deste receptor.

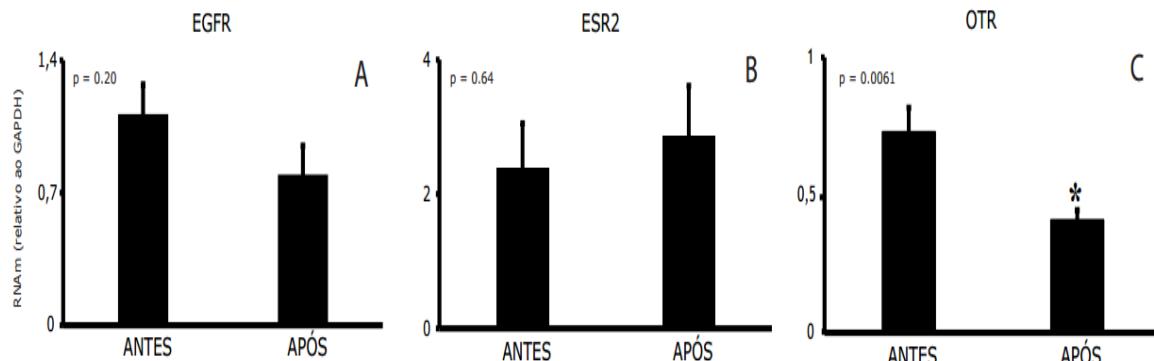


FIGURA 2: Abundância de RNAm para EGFR (A), ESR2 (B) e OTR (C) no endométrio, antes e após a exposição a estrógenos.

De seis vacas submetidas ao protocolo de IAL, cinco desenvolveram lactação, sendo inseminadas novamente após o protocolo. Destas, quatro tiveram gestação confirmada 60 dias após a inseminação.

Os presentes resultados indicam que o protocolo utilizado possibilita a indução de lactação em vacas que não estejam em gestação, também permitindo o retorno de sua ciclicidade, o que evitaria o seu descarte precoce. Estes resultados corroboram relatos de estudos que indicam que vacas com diversos problemas reprodutivos, como metrite, cistos ovarianos, abortos e outros transtornos, se tornaram gestantes após serem submetidas à IAL (SMITH et. al., 1973; JEWELL, 2002; FREITAS et al., 2010; MELLADO et al., 2011).

## 4. CONCLUSÕES

Como este experimento ainda está em andamento, os resultados ainda são parciais. O protocolo de IAL utilizado promoveu um aumento nos níveis de cortisol nos dias 8 e 10 de tratamento, seguidos de queda no dia 13. Ainda, promoveu um pico de estrógeno no quarto dia de exposição ao protocolo, seguido de queda para níveis basais no D17. Com relação à progesterona, esta se manteve elevada nos sete primeiros dias de tratamento, seguida de queda para níveis basais no oitavo dia de protocolo. Também houve modulação na expressão de receptores de oxitocina (OTR) no endométrio das vacas, havendo uma menor expressão destes receptores após o tratamento.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, E.R. et al. Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene transcription by periovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 1533-1544, 2015.
- BOSSAERT, P. et al. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3363-3371, 2008.
- FREITAS, P.R.C. et al. Artificial induction of lactation in cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 2268-2272, 2010.
- JEWELL T. Artificial induction of lactation in nonbreeder dairy cows. 2002, 47f. **Dissertation (Master of Science)** - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA, 2002.
- MELLADO M. et. al. Effect of lactation number, year, and season of initiation of lactation on milk yield of cows hormonally induced into lactation and treated with recombinant bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.4524-4530, 2011.
- PRYCE, J.E. et. al. Fertility in the high-producing dairy cow. **Livestock Production Science** v. 86, p. 125-135, 2004.
- SMITH K. L. et. al. Hormone induced lactation in the bovine. I. Lactational performance following injections of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone1. **Journal of Dairy Science**, v. 56, p. 738-743, 1973.