

MODULAÇÃO CELULAR NO ÚTERO DE VACAS SUBMETIDAS À PROLONGADA EXPOSIÇÃO A ESTRÓGENOS

NATHÁLIA WACHOLZ KNABAH¹; SÉRGIO FARIAS VARGAS JÚNIOR²; RAFAEL MIELKE BARBOSA²; THOMAZ LUCIA JÚNIOR³

¹*Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS – nathaliaknabah@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS*

³*Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, REPROPEL – Pelotas/ RS – tluciajr@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos demonstram que uma parcela significativa (40-70%) das fêmeas inférteis ou “repetidoras de serviço” submetidas a protocolos de IAL, recuperam a fertilidade posteriormente. O mecanismo através do qual ocorre o restabelecimento da fertilidade ainda é completamente desconhecido.

Os protocolos de IAL consistem, basicamente, de prolongado período de exposição à progesterona e estrógeno 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 observados durante o metaestro e diestro fisiológico. Por outro lado, os níveis de estrógeno são extremamente elevados e por período muito longo (mais de 15 dias), o que não ocorre em nenhum momento fisiológico da fêmea bovina não gestante.

Aliado a isso, os efeitos positivos do estrógeno sobre o ambiente uterino, na prevenção e combate de processos inflamatórios, e sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, modulando a função hipotalâmica, são bem estabelecidos. Portanto, com base nesta observação, 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 e celular do útero e ovários.

2. METODOLOGIA

Dezessete dias antes do início do protocolo de IAL (D-17), sete vacas leiteiras cíclicas, repetidoras de serviço, com peso médio de $576,7 \pm 31,8$ kg, tiveram o estro previamente sincronizado com a inserção de dispositivos intravaginais (DIV) contendo 1,0 g de progesterona. Simultaneamente à inserção dos DIV, foram aplicados 2 mg de benzoato de estradiol por via i.m.. Os DIV foram mantidos por nove dias. Após a remoção dos DIV, foram administrados 150 µg de cloprostenol sódico (PGF) por via i.m., sendo avaliada a dinâmica folicular. Dois dias após a retirada dos DIV (D-6), as vacas receberam 0,021 g de acetato de buserelina (GnRH) e foi realizada citologia uterina através da técnica de escova endometrial (Cytobrush) adaptada de Kasimanickam et al. (2004). Uma escova cervical não estéril (Labor Import®) foi adaptada e inserida em um aplicador universal de sêmen para passagem através da cérvix. Após isso, a escova foi exposta na ponta do aplicador, onde foi feita a coleta da amostra das células do endométrio e realizado um esfregaço em lâmina, estes foram corados com Panótico Rápido (Bastos et al., 2015) para avaliação do padrão das células do endométrio. As amostras foram avaliadas em microscópio ótico Olympus CX 41 (Olympus Corporation, Tokyo, Japão) em aumento de 1000x. A citologia foi

avaliada com base no padrão celular: presença de citoplasma, presença de núcleo isolado, tamanho do núcleo, forma da célula e do núcleo e presença de leucócitos e eritrócitos. Foram contadas 100 células e classificadas conforme padrão de tipo celular em: superficiais (T_I), intermediárias (T_{II}), basais (T_{III}), neutrófilos (N) e linfócitos (L) (Brodzki, Brodzki, Kurek, Marczuk, & Tatara, 2015). Seis dias após (D₀), iniciou-se o protocolo de IAL, com a inserção de dois DIV inseridos juntos, cada um contendo 1,9 g de P₄, além de aplicações diárias de 0,1 mg/kg de BE, por 7 dias (até o D₆). No D₁ e no D₇, foram aplicados 150 µg de cloprostenol sódico, no D₁₄ e no D₂₁ foram aplicados 500 mg de somatotropina bovina recombinante via s.c. (bSTr). No D₁₉, no D₂₀ e no D₂₁ foram feitas massagens no úbere, duas vezes ao dia durante 5 minutos, para estimular a liberação de prolactina endógena. No D₂₁ iniciou-se a ordenha dos animais. A dinâmica folicular foi avaliada durante o experimento para monitoramento da atividade ovariana. Cinquenta e cinco dias após o início do protocolo e indução, as vacas foram novamente sincronizadas através da inserção de um DIV contendo 1,0 g de P₄ e aplicação de 2 mg de BE. Nove dias após (D₆₄), o DIV foi retirado e os animais receberam 150 µg de cloprostenol sódico por via i.m.. Dois dias após (D₆₆), foi realizada nova coleta para citologia através de esfregaço das células do endométrio com a técnica descrita anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As vacas submetidas a IAL 100% lactaram após a conclusão do protocolo, manifestando estro por três dias após o término da exposição a P₄, atingindo taxa de prenhez de 66,6% que corroboram com os encontrados por outros pesquisadores, que além de possibilitar lactação sem uma gestação prévia, o protocolo hormonal utilizado para induzir a lactação permite que algumas vacas retornem à reprodução, evitando descarte precoce dos animais. Existem relatos na literatura de vacas com diversos problemas reprodutivos, como metrite, cistos ovarianos, abortos e outros transtornos, após protocolos de indução de lactação se tornarem gestantes (Smith e Schanbacher, 1973; Jewell, 2002; Freitas et al., 2010; Mellado et al., 2011) o que reforça a hipótese de que a prolongada exposição a estrógenos module o ambiente uterino, favorecendo o retorno a fertilidade.

Nas avaliações da citologia uterina foram observadas: células superficiais, células intermediárias, células basais, neutrófilos e linfócitos. As médias das quantidades de cada tipo celular estão listadas na tabela 1. Não houve diferença estatística entre os tratamentos ($P > 0,05$) no padrão de resposta inflamatória, tampouco nas células uterina antes e depois a exposição hormonal (Figura 1).

Tabela 1: Número de células avaliadas por citologia endometrial antes e depois da exposição a estrógenos (média ± erro padrão)

| | Células observadas | | | | |
|--------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------|-----------|
| | T _I (%) | T _{II} (%) | T _{III} (%) | N (%) | L (%) |
| Antes | 73,0 ± 5,1 | 17,3 ± 5,3 | 5,8 ± 2,8 | 3,0 ± 2,2 | 0,8 ± 0,5 |
| Depois | 72,8 ± 4,8 | 19,8 ± 4,9 | 1,0 ± 0,4 | 2,6 ± 1,3 | 3,6 ± 1,9 |

Células superficiais (T_I), células intermediárias (T_{II}), células basais (T_{III}), neutrófilos (N) e linfócitos (L).

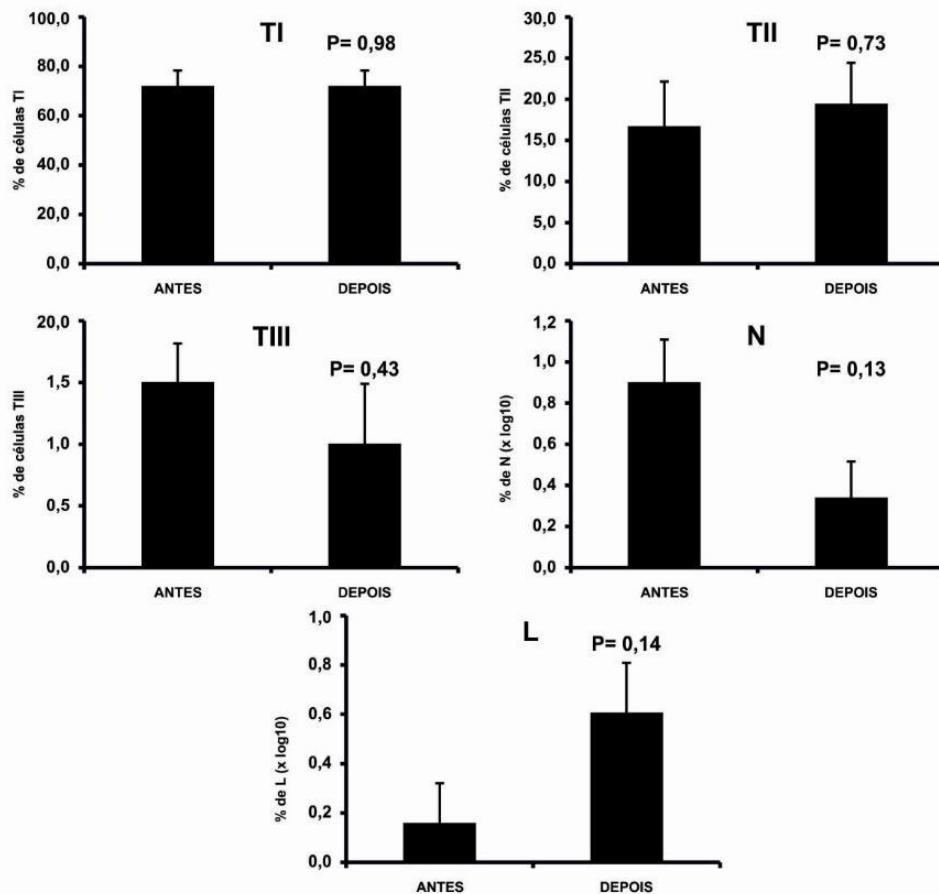


Figura 1: Porcentagem de células avaliadas no esfregaço feito a partir da citologia uterina nas vacas antes (D-6) e após tratamento de exposição a estrógeno (D66).

Nos dois momentos as células foram coletadas no proestro. Células superficiais (TI), células intermediárias (TII), células basais (TIII), neutrófilos (N) e linfócitos (L) ($p > 0,05$).

Vacas sob a influência de E2 apresentam maior fluxo sanguíneo no útero (Rawy et al., 2018) e maior grau de estímulo à divisão e proliferação celular (Fraser, Wilson, Silvestri, Morris, & Wiegand, 2008). No presente estudo, se observou grande quantidade de células em diferentes graus de degeneração (principalmente células TI) e também algumas células epiteliais jovens (TIII), tanto antes como depois a exposição ao estrógeno, indicando que ocorreu renovação celular no endométrio. Dados similares foram relatados por Brodzki et al. (2015), que encontraram maior quantidade de células degeneradas TI em vacas na fase folicular do ciclo estral. Entretanto, não houve diferença no padrão celular do endométrio antes e depois do tratamento, sugerindo que existam outros mecanismos envolvidos na retomada da fertilidade destas vacas. A avaliação da quantidade de células de defesa, principalmente polimorfonucleares, é utilizada para avaliação de endometrites clínicas (Sicsic et al., 2018) e subclínicas (Van Schyndel, Pascottini, & LeBlanc, 2018), sendo diretamente relacionada à capacidade das vacas emprenharem após o parto.

4. CONCLUSÕES

O protocolo utilizado foi capaz de induzir lactação artificial em todas as vacas testadas. A prolongada exposição a estrógenos não foi capaz de induzir modificações no padrão celular e na resposta imune no endométrio de vacas no proestro depois do tratamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOS YHGB, FERREIRA CS, GOMES GM., JÚNIOR KdCP, DE MACEDO GOMES LP, PAPA FO, & CRESPILO AM. Avaliação de diferentes técnicas de coloração para esfregaços obtidos por punção biópsia aspirativa testicular de bovinos. *Revista de Saúde*, 6(2), 05-10, 2015.
- BRODZKI P, BRODZKI A, KUREK Ł, MARCZUK J, & TATARA MR. Endometrial cytology at luteal and follicular phases of the ovarian cycle in cows. *Annals of Animal Science*, 15(1), 107-117, 2015.
- FRASER HM, WILSON H, SILVESTRI A, MORRIS KD, & WIEGAND SJ. The role of vascular endothelial growth factor and estradiol in the regulation of endometrial angiogenesis and cell proliferation in the marmoset. *Endocrinology*, 149(9), 4413-4420, 2008.
- FREITAS PRC, COELHO SG, RABELO E, LANA AMQ, ARTUNDUAGA MAT, & SATURNINO H M. Artificial induction of lactation in cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39(10), 2268-2272, 2010.
- JEWELL T. Artificial induction of lactation in nonbreeder dairy cows. *Virginia Polytechnic Institute and State University*, 2002.
- KASIMANICKAM R, DUFFIELD T, FOSTER R, GARTLEY C, LESLIE K, WALTON J, & JOHNSON W. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62(1-2), 9-23, 2004.
- MELLADO M, ANTONIO-CHIRINO E, MEZA-HERRERA C, VELIZ FG, AREVALO JR, MELLADO J, & DE SANTIAGO A. 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. *J Dairy Sci*, 94(9), 4524-4530, 2011.
- RAWY M, MIDO S, ALI HE, DERAR D, MEGAHED G, KITAHARA G, & OSAWA T. Effect of exogenous estradiol Benzoate on uterine blood flow in postpartum dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 192, 136-145, 2018.
- SICSIC R, GOSHEN T, DUTTA R, KEDEM-VAANUNU N, KAPLAN-SHABTAI V, PASTERNAK Z, R T. Microbial communities and inflammatory response in the endometrium differ between normal and metritic dairy cows at 5–10 days post-partum. *Veterinary research*, 49(1), 77, 2018.
- SMITH KL, & SCHANBACHER FL. Hormone Induced Lactation in the Bovine. I. VAN SCHYNDEL S, PASCOTTINI OB, & LeBLANC S. Comparison of cow-side diagnostic techniques for subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 120, 117-122, 2018.
- J Dairy Sci, 56(6), 738-743, 1973.