



MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM OVELHAS SUBMETIDAS À COLETA DE EMBRIÕES PELAS VIAS TRANSCERVICAL OU LAPAROTOMIA

Oliveira, F.C.¹; Haas, C.S.¹; Ferreira, C.E.R.¹; Goulart, K, L.¹; Pegoraro, L.M.C.²; Gasperin, B.G.¹; Schneider, A.¹; Mondadori, R.G.¹; Vieira, A.D.¹

¹ Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão-RS.

² Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS.

RESUMO

Os métodos de coleta de embriões disponíveis para ovinos são laboriosos e invasivos. Entretanto, não existem dados comparativos das diferentes abordagens de coleta sobre os níveis de marcadores inflamatórios. O objetivo deste estudo foi determinar a resposta inflamatória em ovelhas submetidas à superovulação e coleta de embriões pelas vias transcervical (TC) ou laparotomia (LP). Amostras de sangue foram coletadas no início do procedimento (dia zero = D0), D3, D6 e no D9, para determinação dos níveis de proteínas totais e de fase aguda positiva (haptoglobina e fibrinogênio) e negativa (paraoxonase). Os níveis dos marcadores avaliados não variaram ($P>0,05$) entre os grupos TC e LP, porém, quando analisados coletivamente, observou-se um efeito do momento ($P<0,05$), indicando que os dois métodos causaram uma resposta inflamatória semelhante. Conclui-se que apesar de ser menos invasivo, o método TC induz a uma alteração nos parâmetros inflamatórios de forma similar a observada no LP.

ABSTRACT

Methods currently available for embryo collection in sheep are laborious and invasive. However, there is no data available comparing levels of inflammatory markers using different collection approaches. Thus, the objective of this study was to measure inflammatory response in ewes submitted to superovulation and embryo collection via transcervical (TC) route or laparotomy (LP). Blood samples were collected before each of the procedures (day zero = D0) and 3, 6 and 9 days post-procedure to measure the levels of total protein, positive (haptoglobin and fibrinogen) and negative (paraoxonase) acute phase proteins. The levels of inflammatory markers did not differ ($P>0.05$) between TC and LP. However, when evaluated together, an effect of time was observed ($P<0.05$), indicating that both procedures induced a similar inflammatory

response. In conclusion, despite being less invasive, the TC method induces an alteration in inflammatory markers similar to LP.

INTRODUÇÃO

Em função da dificuldade de transposição cervical na espécie ovina, o método de coleta de embriões que mais se difundiu foi a laparotomia (Tervit and Havik, 1976). Entretanto, apesar da alta eficiência na recuperação dos embriões a abordagem cirúrgica induz a formação de aderências e, em função da invasividade, afeta o bem estar animal. Como alternativa foram desenvolvidos procedimentos de coleta via transcervical baseados em tratamentos de indução da dilatação cervical usando análogos de prostaglandina E (PGE) associados (Barry et al., 1990) ou não (Gusmão, 2011) ao estradiol ou usando a ocitocina associada ao estradiol (Azawi, 2011), como dilatadores cervicais. O método de coleta transcervical é de menor invasividade, sendo portanto, potencialmente capaz de determinar menor comprometimento do bem estar animal. 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).

METODOLOGIA

Foram utilizadas ovelhas múltiplas da raça crioula lanada previamente classificadas quanto a possibilidade ($n=5$) ou impossibilidade ($n=5$) de transposição cervical durante o estro e diestro. O estro base e a ovulação foram sincronizados mediante tratamento com CIDR-G[®] por 6 dias, associado a aplicação de 300 UI de eCG + 75 µg de PGF2 e 1mL de Lecirelina (análogo de GnRH) no momento da remoção do CIDR-G[®] e 12 horas após a detecção do estro, respecti-



vamente (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 and Rubianes, 2004). Um CIDR-G® foi reinserido no momento da aplicação da primeira dose de FSH e removido no momento da penúltima dose, quando os animais receberam um flushing agudo com 100mL de glicerol (Gutierrez et al., 2011). Nos momentos da sétima e oitava doses de FSH os animais receberam uma aplicação de PGF2, sendo iniciada a observação de estro duas vezes ao dia. 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. No quinto dia após a primeira inseminação, os animais do grupo para coleta cirúrgica por laparotomia (LT) foram submetidos ao jejum hídrico e alimentar e os animais do grupo para coleta transcervical (TC) receberam uma aplicação 100µg de benzoato de estradiol. No sexto dia após o estro os animais do grupo LT foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos e os animais do grupo TC receberam uma aplicação de 100UI de ocitocina antes de serem submetidos ao procedimento de coleta (Gusmão, 2011). Antes dos procedimentos foi realizada a coleta de sangue (DO) para comparação com os níveis de proteínas plasmáticas totais (PPT), haptoglobina (Hp), fibrinogênio (Fib) e paraoxonase (PON) observados a partir do sangue coletado nos dias três, seis e nove após a intervenção.

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 de 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%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) nos níveis de PPT, Hp, Fib e PON entre os grupos LP e TC (Fig. 1; $P>0,05$). Entretanto, quando os resultados dos dois tratamentos foram considerados identificou-se a alteração dos parâmetros

caracterizando um efeito sistêmico. Os níveis de PPT apresentaram elevação somente 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; Lephherd et al., 2009). Os níveis de Hp, que é uma PFA positiva que aumenta rapidamente em resposta ao estímulo subiram no D3 e D6 atingindo concentrações superiores a 0,1g/l, caracterizando a presença de um estressor (Ceciliani et al., 2012). Já os níveis de Fib, uma PFA positiva com velocidade de liberação moderada, não foi identificada uma alteração de seus níveis dentro do intervalo considerado. Este resultado pode ser decorrente da sensibilidade do teste utilizado, porém, esperava-se a observação de um aumento nas concentrações ao menos no grupo LP em virtude da invasividade do procedimento. Com relação a PON, uma PFA negativa, era esperado uma redução em seus níveis após um trauma (Devarajan et al., 2014; Schneider et al., 2013). Entretanto, não houve redução e sim um aumento transitório no D3 (Fig. 3) que dificulta a identificação de qualquer efeito biológico significativo. Embora não existam marcadores específicos e fidedignos de estresse e dor (Ceciliani et al., 2012; Ott et al., 2014), 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.

CONCLUSÃO

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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azawi, O., 2011. A new technique for nonsurgical embryo recovery in superovulated ewes treated with estradiol and oxytocin. *AL-Qadisiya J. Vet. Med. Sci*10.
- Barry, D., Van Niekerk, C., Rust, J., Van der

Walt, T., 1990. Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E 2 and estradiol. *Theriogenology*33, 190.

• Browne, R.W., Koury, S.T., Marion, S., Wilding, G., Muti, P., Trevisan, M., 2007. Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase 1 Activity and Polymorphism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. *Clinical Chemistry*53, 310-317.

• Ceciliani, F., Ceron, J., Eckersall, P., Sauerwein, H., 2012. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of proteomics*75, 4207-4231.

• Devarajan, A., Shih, D., Reddy, S.T., 2014. Inflammation, Infection, Cancer and All That The Role of Paraoxonases, In: *Oxidative Stress and Inflammation in Non-communicable Diseases-Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics*. Springer, pp. 33-41.

• Gusmão, A.L., 2011. State-of-the-art in the transcervical embryo collection in goats and sheep. *Brazilian Embr azilian Embr azilian Embryo Technology Society (SBTE)*39, 37.

• Gutierrez, C.G., Ferraro, S., Martinez, V., Saharrea, A., Cortez, C., Lassala, A., Basurto, H., Hernandez, J., 2011. Increasing ovulation quota: more than a matter of energy. *Brazilian Embr azilian Embr azilian Embryo Technology Society (SBTE)*39, 305.

• Lephherd, M., Canfield, P., Hunt, G., Bosward, K., 2009. Haematological, biochemical and selected acute phase protein reference intervals for weaned female Merino lambs. *Australian veterinary journal*87, 5-11.

• Lowe, G.D., Rumley, A., Mackie, I.J., 2004. Plasma fibrinogen. *Annals of clinical biochemistry*41, 430-440.

• Menchaca, A., Rubianes, E., 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*16, 403-413.

• Menchaca, A., Vilariño, M., Pinczak, A., Kmaid, S., Saldaña, J.M., 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*72, 477-483.

• Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*168, 28-40.

• Ott, S., Soler, L., Moons, C.P., Kashiha, M.A., Bahr, C., Vandermeulen, J., Janssens, S., Gutierrez, A.M., Escribano, D., Ceron, J.J., Berckmans, D., Tuyttens, F.A., Niewold, T.A., 2014. Different stressors elicit different responses in the salivary biomarkers cortisol, haptoglobin, and chromogranin A in pigs. *Research in veterinary science*97, 124-128.

• Schneider, A., Corrêa, M.N., Butler, W.R., 2013.

Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. *Research in veterinary science*95, 269-271.

• Tervit, H., Havik, P., 1976. A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. *New Zealand veterinary journal*24, 138-140.

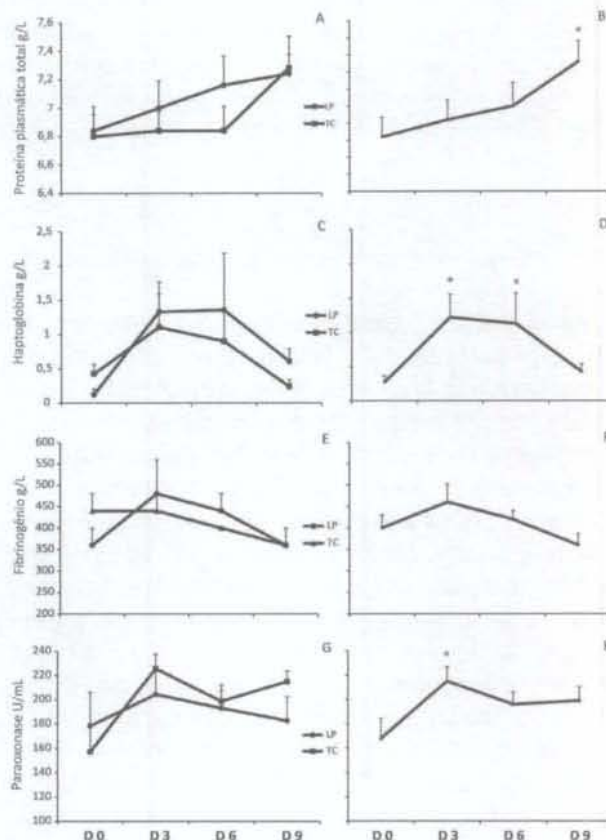


Figura 1: Níveis de proteína plasmática total (g/L), haptoglobina (g/L), fibrinogênio (g/L) e paraoxonase (U/mL). Os gráficos A, C, E e G demonstram os níveis nos animais submetidos aos diferentes procedimentos (LP ou TC; n=5/grupo). Nos gráficos B, D, F e H são demonstrados os níveis em todos os animais, independente do procedimento (n=10). As amostras de sangue foram coletas antes dos procedimentos (dia 0) e 3, 6 e 9 dias após o procedimento. *Indicam diferença significativa (P<0,05).

