

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Tese

**Marcadores inflamatórios, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário  
inicial em bovinos**

**Joao Alveiro Alvarado Rincón**

Pelotas, 2019

**Joao Alveiro Alvarado Rincón**

**Marcadores inflamatórios, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário  
inicial em bovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Coorientador: Augusto Schneider

Coorientadora: Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

R579m Rincón, Joao Alveiro Alvarado

Marcadores inflamatórios, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovinos / Joao Alveiro Alvarado Rincón ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Augusto Schneider, Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro, coorientadores. — Pelotas, 2019.

90 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1 . HDL. 2. Inflamação. 3. LPS. 4. Oócito. 5. Embrião. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Schneider, Augusto, coorient. III. Pegoraro, Ligia Margareth Cantarelli, coorient. IV. Título.

CDD : 636.2

Joao Alveiro Alvarado Rincón

Marcadores inflamatórios, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial  
em bovinos

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade  
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26/02/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador)  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin  
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jorgea Pradieé  
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Bepalhok Jacometo  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico este trabalho a toda minha família que, com muito amor e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.**

## **Agradecimentos**

A realização desta tese de doutorado contou com enorme apoio e incentivo de muitas pessoas, sem as quais não teria conseguido tornar isso possível.

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À minha mãe Claudia, meu pai Hernando, meu irmão Felipe, e toda minha família, pelo amor, motivação, esforço e apoio, que mesmo à distância foram imprescindíveis.

Aos meu orientadores / coorientadores e hoje amigos, Augusto, Ligia e Marcio, que desde o mestrado sempre me ajudaram, orientaram, e prestaram todo o apoio pessoal e profissional quando precisei.

À toda a equipe NUPEEC, pelo aprendizado e parceria de cada um dos seus integrantes, que ao longo de seis anos contribuíram com minha formação profissional e pessoal.

Aos amigos Alcides, Andressa, Camila, Carol, Claudinha, Diego, Josiane, Lucas, Pedro, Rodrigo e Thais, por toda a ajuda, pela parceria e, por terem feito me sentir em Pelotas, como se estivesse na minha própria casa.

Aos amigos hispanofalantes, que da mesma forma que eu, saíram dos seus países para tornar seus sonhos realidade, pela ajuda e parceria em cada um dos momentos.

À EMRAPA, UFPEL, REPROPEL e GPO, pela ajuda e infraestrutura.

Aos frigoríficos Famile e Espinilho, pela disponibilidade e parceria.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade, o meu muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

***“Depois de escalar uma grande montanha se descobre que existem muitas outras montanhas para escalar” Nelson Mandela***

## Resumo

RINCÓN, Joao Alveiro Alvarado. **Marcadores inflamatórios, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovinos.** 2019. 90f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A resposta inflamatória surge como mecanismo do sistema imune para combater agentes infecciosos. Estudos sugerem uma associação entre a inflamação e a fertilidade, principalmente devido à modulação e síntese de mediadores inflamatórios. A lipoproteína de alta densidade (HDL) é a principal lipoproteína no fluido folicular, tem propriedades anti-inflamatória e antioxidante, que derivam principalmente de sua composição lipídica, porção de apolipoproteína AI (ApoAI) e paraoxonase-1 (PON1). Por outro lado, os lipopolissacarídeos (LPS) são endotoxinas bacterianas que agem como potente estimulador da resposta inflamatória. Neste sentido, objetivou-se avaliar o efeito do HDL durante a maturação *in vitro* (MIV) sobre a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, e avaliar o efeito da exposição de oócitos bovinos ao LPS *in vitro* e *in vivo*, sobre a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovinos. No primeiro estudo, complexos cumulus oócito (COCs) foram suplementados com proteína HDL durante a MIV, após, foram fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV). No segundo estudo, COCs foram desafiados com LPS durante a MIV e após, passaram pela FIV e CIV. Separadamente, COCs foram submetidos à MIV sem LPS, depois disso passaram pela FIV e, durante os 7 dias de CIV foram desafiados com LPS. Ainda no segundo estudo, novilhas foram desafiadas com LPS intravenoso durante a sincronização da onda folicular. Os animais foram abatidos, os ovários foram coletados e foi realizada a recuperação dos COCs. Os COCs selecionados passaram por MIV, FIV e CIV. Dessa forma, encontramos que, a adição do complexo HDL/ApoAI do plasma humano durante a MIV, na ausência de atividade da PON1, diminui o desenvolvimento embrionário inicial. Ainda, a exposição de oócitos bovinos ao LPS durante a MIV diminui a taxa de maturação nuclear, entretanto, não foi capaz de afetar o desenvolvimento embrionário inicial. Da mesma maneira, a exposição de zigotos ao LPS durante o CIV não afetou o desenvolvimento embrionário. No entanto, a infusão de LPS em novilhas diminuiu a taxa de clivagem, porém o desenvolvimento embrionário foi semelhante ao do grupo não desafiado com LPS. Conclui-se que a interação dos componentes do complexo HDL-ApoAI-PON1, pode afetar a fertilidade bovina, em nível de oócito e subsequente desenvolvimento embrionário. Da mesma forma o LPS, pode afetar o oócito e desenvolvimento embrionário, entretanto, os mecanismos pelos quais isso acontecem parecem ser diferentes *in vitro* e *in vivo*.

**Palavras-chave:** HDL; inflamação; LPS; oócito; embrião



## Abstract

RINCÓN, Joao Alveiro Alvarado. **Inflammatory markers, oocyte maturation and early embryonic development in cattle.** 2019. 90f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The inflammatory response arises as a mechanism of the immune system to fight infectious agents. Studies suggest an association between inflammation and fertility, mainly due to the modulation and synthesis of inflammatory mediators. High-density lipoprotein (HDL) is the main lipoprotein in follicular fluid. It has anti-inflammatory and antioxidant properties, mainly derived from its lipid composition, apolipoprotein AI (ApoAI) and paraoxonase-1 (PON1). On the other hand, lipopolysaccharides (LPS) are bacterial endotoxins that act as potent stimulator of the inflammatory response. The objective of this study was to evaluate the effect of HDL during *in vitro* maturation (IVM) on oocyte maturation and early embryonic development and to evaluate the effect of bovine oocyte exposure to LPS *in vitro* and *in vivo* on oocyte maturation and embryonic development in cattle. In the first study, cumulus oocyte complex (COCs) were supplemented with HDL protein during IVM, after, were fertilized (IVF) and cultured *in vitro* (IVC). In the second study, COCs were challenged with LPS during IVM and after, underwent IVF and IVC. Separately, COCs were subjected to IVM without LPS, thereafter they underwent IVF and during the 7 days of IVC they were challenged with LPS. Still in the second study, heifers were challenged with intravenous LPS during follicular wave synchronization. The animals were slaughtered, the ovaries were collected and COC recovery was performed. All recovered COCs underwent IVM, IVF, and IVC. In this way, we found that the addition of the HDL/ApoAI complex of human plasma during IVM, in the absence of PON1 activity, decreases the initial embryonic development. Furthermore, the exposure of bovine oocytes to LPS during IVM decreases the nuclear maturation rate, however, it was not able to affect the initial embryonic development. Similarly, exposure of zygotes to LPS during IVC did not affect embryonic development. However, infusion of LPS into heifers decreased the rate of cleavage, but the embryonic development was similar to that of the non-LPS challenged group. It is concluded that the interaction of HDL-ApoAI-PON1 complex components may affect bovine fertility at oocyte level and subsequent embryonic development. In the same way, the LPS can affect the oocyte and embryonic development; however, the mechanisms by which this happens appear to be different *in vitro* and *in vivo*.

**Keywords:** HDL; inflammation; LPS, oocyte; embryo

## Lista de Figuras

### Artigo 1

- Figura 1 Oocyte maturation and cleavage rates from oocytes without treatment (control) or treated with high density lipoprotein (HDL-P,  $n = 60-75$ ). (a) Oocyte maturation rate is expressed in percentage, as determined by chi-square test and (b) cleavage rate is also expressed in percentage, as determined by ANOVA followed by the Tukey test. Oocytes were *in vitro* matured for 22h with 0, 50 or 150 mg/dL HDL-P. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ )..... 42
- Figura 2 Effect of high density lipoprotein (HDL-P) during *in vitro* oocyte maturation on blastocyst rate and total number of cells/blastocyst of bovine embryos. (a) Blastocyst rate is expressed in percentage at day 7 of embryo culture, derived from oocytes *in vitro* matured with 0, 50 or 150 mg/dL HDL-P for 22h ( $n = 400$ ). (b) Number of cells/blastocyst on day 7 embryos, derived from oocytes matured *in vitro* with 0, 50 or 150mg/dL HDL-P for 22h ( $n = 30$ ). (c) Representative epifluorescence photomicrographs of embryos stained with Hoechst 33342 for total cell/blastocyst counts. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), as determined by ANOVA followed by the Tukey test. Scale bar = 100 $\mu$ m..... 43

- Figura 3 Effect of high density lipoprotein (HDL-P) in bovine oocytes submitted to *in vitro* maturation (IVM) on reactive oxygen species (ROS) and endogenous glutathione (GSH) levels. (a) ROS intracellular levels, measured by pixel intensity and (b) GSH intracellular levels, measured by pixel intensity of oocytes *in vitro* matured during 22h with 0, 50 or 150 mg/dL HDL-P ( $n = 60-75$ ). (c) Representative epifluorescence photomicrographs of *in vitro* matured oocytes stained with 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHFDA) to detect ROS levels and with CellTracker Blue to determine the level of intracellular GSH. The fluorescence intensity (pixel intensity) was not different between the treatments ( $P>0.05$ ), as determined by ANOVA followed by the Tukey test. Scale bar = 200 $\mu$ m..... 44
- Figura 4 Relative mRNA expression in bovine oocytes *in vitro* matured with 0, 50 or 150mg/dL HDL-P for 22h ( $n = 50$ ). (a) BCL2 associated X (BAX), (b) bone morphogenetic protein 15 (BMP15), (c) growth differentiation factor 9 (GDF9), (d) scavenger receptor B1 (SCARB1), and (e) ATP binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1), as determined by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction. Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ), as determined by ANOVA followed by the Tukey test..... 45
- Figura 5 Relative mRNA expression in bovine cumulus cells derived from oocytes *in vitro* matured with 0, 50 or 150 mg/dL HDL-P for 22h ( $n = 50$ ). (a) scavenger receptor B1 (SCARB1), (b) amphiregulin (AREG), (c) solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1) (d) low-density lipoprotein receptor (LDLR), (e) epiregulin (EREG) and (f) BCL2 associated X (BAX) mRNA, as determined by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction Different letters above columns indicate significant differences ( $P<0.05$ ), as determined by ANOVA followed by the Tukey test..... 46

Figura 6 Relative mRNA expression in D7 bovine embryos ( $n = 10$ ), derived from oocytes *in vitro* matured with 0, 50 or 150 mg/dL HDL-P for 22h. (a) scavenger receptor B1 (SCARB1), (b) ATP binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1), (c) BCL2 associated X (BAX), (d) placenta-specific 8 (PLAC8), (e) stearyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) (SCD), (f) low density lipoprotein receptor (LDLR) and (g) sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBF1) mRNA, as determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), as determined by ANOVA followed by the Tukey test..... 47

## Artigo 2

- Figura 1 Taxa de maturação nuclear (A) e taxa de clivagem (B) de oócitos bovinos desafiados com lipopolissacarídeos (LPS) durante a maturação oocitária *in vitro* (MIV). Os oócitos foram maturados durante 22h com 0 (controle), 0,1, 1, ou 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS. A taxa de maturação foi analisada pelo teste de chi-quadrado e a taxa de clivagem pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ )..... 68
- Figura 2 Taxa de blastocisto (A) e número de núcleos/embrião de oócitos bovinos desafiados com lipopolissacarídeos (LPS) durante a maturação oocitária *in vitro* (MIV). Os oócitos foram maturados durante 22 h com 0 (controle), 0,1, 1, ou 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA..... 68
- Figura 3 Expressão relativa dos genes TLR4 (A), TNF (B), AREG (C) e EREG (D) nas células do cumulus de oócitos desafiados com lipopolissacarídeos (LPS) durante a maturação oocitária *in vitro*. Os oócitos foram maturados durante 22 h com 0 (controle), 0,1, 1, ou 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS. A análise foi realizada pelo teste ANOVA..... 69

- Figura 4 Taxa de clivagem (A), taxa de blastocisto (B) e número de núcleos/embrião de zigotos desafiados com lipopolissacarídeos (LPS) durante o cultivo *in vitro* (CIV). Os zigotos foram cultivados durante 7 dias com 0 (controle), 0,1, 1, ou 5 µg/mL de LPS. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA..... 70
- Figura 5 Temperatura retal de novilhas que foram desafiadas ou não com lipopolissacarídeos (LPS) às 0 e 24 horas, analisada pelo teste Two-way ANOVA..... 70
- Figura 6 Taxa de clivagem (A), taxa de blastocisto (B) e número de núcleos/embrião (C) de oócitos provenientes de novilhas desafiadas (n=8) ou não (n=8) com lipopolissacarídeos (LPS). As novilhas do grupo controle receberam duas aplicações de 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) via intravenosa, com intervalo de 24 h, o grupo LPS recebeu com o mesmo intervalo duas aplicações de 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) contendo 0,5 µg/Kg de peso corporal de LPS, via intravenosa. A taxa de clivagem e taxa de blastocisto foram analisadas através do teste de chi-quadrado e, o número de núcleos/embrião foi analisado pelo teste de t. Letras diferentes indicam diferença estatística (P<0,05)..... 71
- Figura 7 Expressão relativa dos genes *TLR4* (A), *TNF* (B), *AREG* (C) e *EREG* (D) nas células do cumulus de oócitos provenientes de novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeos (LPS). As novilhas do grupo controle receberam duas aplicações de 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) via intravenosa, com intervalo de 24 h, o grupo LPS recebeu com o mesmo intervalo duas aplicações de 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) contendo 0,5 µg/Kg de peso corporal de LPS, via intravenosa. Os dados foram analisados pelo teste de t..... 72

## **Lista de Tabelas**

### **Artigo 1**

|          |                                                                                                              |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Primer sequence used for gene expression analysis of cumulus cells, oocyte and embryos by Real Time PCR..... | 41 |
| Tabela 2 | Biochemical parameters evaluated in IVM medium supplemented with different concentrations of HDL-P.....      | 42 |

### **Artigo 2**

|          |                                                                            |    |
|----------|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Genes e respectivas sequências analisadas nesse estudo.....                | 67 |
| Tabela 2 | Parâmetros avaliados em ovários de novilhas desafiadas ou não com LPS..... | 67 |

## Lista de Abreviaturas e Siglas

|                 |                                                                  |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|
| <i>ABCA1</i>    | <i>ATP binding cassette subfamily A member 1</i>                 |
| ApoAI           | Apolipoproteína AI                                               |
| <i>AREG</i>     | <i>Amphiregulin</i>                                              |
| <i>BAX</i>      | <i>BCL2 associated X protein</i>                                 |
| BEN             | Balanço energético negativo                                      |
| <i>BMP15</i>    | <i>Bone morphogenetic protein 15</i>                             |
| BSA             | <i>Bovine sérum almbumin</i> (Albumina sérica bovina)            |
| <i>CD14</i>     | <i>Cluster of differentiation 14</i>                             |
| cDNA            | DNA complementar                                                 |
| CIV             | Cultivo <i>in vitro</i>                                          |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                                               |
| COCs            | <i>Cumulus-oocyte complex</i> (Complexos cumulus oócito)         |
| DCHF-DA         | <i>2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>              |
| dL              | Decilitros                                                       |
| <i>E. coli</i>  | <i>Escherichia coli</i>                                          |
| EDTA            | Etilenodiaminotetracético                                        |
| <i>EREG</i>     | <i>Epiregulin</i> (Epiregulina)                                  |
| FBS             | <i>Fetal bovine sérum</i> (Soro fetal bovino)                    |
| FF              | Fluido folicular                                                 |
| FIV             | Fecundação <i>in vitro</i>                                       |
| <i>GDF9</i>     | <i>Growth differentiation factor 9</i>                           |
| GSH             | <i>Glutathione</i> (Glutationa)                                  |
| h               | Horas                                                            |
| HDL             | <i>High-density lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidade) |
| HDL-C           | Colesterol HDL                                                   |
| HDL-P           | <i>HDL-Protein</i> (Proteína HDL)                                |

|                  |                                                                                           |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>HIST1H2AC</i> | <i>H2A histone type 1-C</i>                                                               |
| i.m.             | Intramuscular                                                                             |
| i.v.             | Intravenoso                                                                               |
| IVC              | <i>In vitro culture</i>                                                                   |
| IVF              | <i>In vitro fertilization</i>                                                             |
| IVM              | <i>In vitro maturation</i>                                                                |
| Kg               | Quilograma                                                                                |
| LBP              | <i>Lipopolysaccharide binding protein</i> (Proteína ligante de lipopolissacarídeo)        |
| <i>LDLR</i>      | <i>low-density lipoprotein receptor</i>                                                   |
| LPS              | <i>Lipopolysaccharide</i> (Lipopolissacarídeo)                                            |
| <i>MD-2</i>      | <i>Myeloid differentiation factor 2</i>                                                   |
| Mg               | Miligrama                                                                                 |
| Min              | Minutos                                                                                   |
| MIV              | Maturação <i>in vitro</i>                                                                 |
| NaCl             | Cloreto de sódio                                                                          |
| Nm               | Nanômetro                                                                                 |
| P4               | Progesterona                                                                              |
| PAMPs            | <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> (Padrões moleculares associados a patógenos) |
| PBS              | <i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)                                  |
| PCR              | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)                         |
| PFA              | Proteína de fase aguda                                                                    |
| PGF2 $\alpha$    | Prostaglandina F2 $\alpha$                                                                |
| <i>PLAC8</i>     | <i>Placenta-specific 8</i>                                                                |
| PON1             | Paraoxonase-1                                                                             |
| PVA              | <i>Polyvinyl alcohol</i> (Álcool polivinílico)                                            |
| PVP              | <i>Polyvinylpyrrolidone</i> (Polivinilpirrolidona)                                        |
| <i>RN18S1</i>    | <i>18S ribosomal RNA</i>                                                                  |
| RNA              | <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)                                              |
| RNAm             | RNA mensageiro                                                                            |
| ROS              | <i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)                            |
| rPON1            | Paraoxonase-1 recombinante                                                                |



|               |                                                                 |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|
| <i>SCARB1</i> | <i>Scavenger receptor class B member 1</i>                      |
| <i>SCD</i>    | <i>Acyl-CoA desaturase</i>                                      |
| <i>SFB</i>    | Soro fetal bovino                                               |
| <i>SLC2A1</i> | <i>Facilitated glucose transporter member 1</i>                 |
| <i>SREBF1</i> | <i>Sterol regulatory element binding transcription factor 1</i> |
| <i>TLR4</i>   | <i>Toll like receptor 4</i>                                     |
| <i>TLRs</i>   | <i>Toll like receptors</i>                                      |
| <i>TNF</i>    | <i>Tumor necrosis factor</i>                                    |
| <i>UV</i>     | Radiação ultravioleta                                           |
| <i>XIAP</i>   | <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>                  |
| °C            | Graus Celsius                                                   |
| µL            | Microlitro                                                      |
| µM            | Micromolar                                                      |

## Sumário

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| <b>1 Introdução.....</b>              | <b>17</b> |
| <b>2 Objetivos.....</b>               | <b>23</b> |
| <b>2.1 Objetivo Geral.....</b>        | <b>23</b> |
| <b>2.2 Objetivos Específicos.....</b> | <b>23</b> |
| <b>3 Artigos.....</b>                 | <b>24</b> |
| <b>3.1 Artigo 1.....</b>              | <b>24</b> |
| <b>3.2 Artigo 2.....</b>              | <b>48</b> |
| <b>4 Considerações Finais.....</b>    | <b>73</b> |
| <b>Referências.....</b>               | <b>75</b> |
| <b>Anexos.....</b>                    | <b>88</b> |

## 1 Introdução

O período de transição é um momento crítico na vida produtiva e reprodutiva dos bovinos. Durante esse período, compreendido entre as três semanas pré-parto e três semanas pós-parto (GOFF e HORST, 1997), ocorrem alterações hormonais, metabólicas e físicas, que desencadeiam um desequilíbrio entre a demanda de energia necessária para o crescimento do feto e produção de leite, e a disponibilidade de energia proveniente da alimentação (BAUMAN e CURRIE, 1980). Como consequência disso, a vaca entra em balanço energético negativo (BEN) (BAUMAN e CURRIE, 1980; NEBEL e MCGILLIARD, 1993). A duração e intensidade do BEN têm sido associadas com a diminuição da eficiência reprodutiva (LUCY et al., 1991; BEAM e BUTLER, 1998; DRACKLEY e CARDOSO, 2014), a supressão do sistema imune (BURTON et al., 1995; WALDRON et al., 2003; STER et al., 2012) e aumento da ocorrência de enfermidades (MOYES et al., 2009; OSPINA et al., 2010). Nesse sentido, aproximadamente 75 % das doenças que acometem a vaca leiteira ocorrem durante o primeiro mês após o parto (LEBLANC et al., 2006), indicando a importância do período de transição.

Doenças uterinas como metrite e endometrite, e da glândula mamária, como a mastite, são comuns no período pós-parto das vacas leiteiras, causando perdas importantes para o setor produtivo. A ocorrência dessas doenças têm sido associadas com a diminuição do desempenho reprodutivo, queda na produção de leite e maior descarte dos animais por falhas reprodutivas (SHELDON et al., 2004; SHELDON et al., 2009). De forma indireta, doenças uterinas e mamárias podem afetar negativamente vários aspectos reprodutivos, incluindo a diminuição do crescimento folicular, alterações nas concentrações de hormônios esteróides, extensão da fase lútea e interrupção da atividade ovariana (SHELDON et al., 2002; LAVON et al., 2011a; LAVON et al., 2011b; KRAUSE et al., 2014).

As doenças do trato reprodutivo ocorrem no pós-parto recente, podendo persistir por longos períodos. Nas primeiras semanas pós-parto, de 80 a 100% das vacas apresentam contaminação bacteriana uterina, em consequência da abertura da cérvix para ocorrência do parto e a contaminação via ascendente (SHELDON et al.,

2006; GAUTAM et al., 2010). Quando os mecanismos de defesa do organismo não são capazes de eliminar totalmente essa carga bacteriana do útero, há uma persistência de bactérias patogênicas e o desenvolvimento da infecção, podendo evoluir para doenças como a metrite e endometrite (SHELDON e DOBSON, 2004). Estudos indicam que infecções uterinas acometem de 90 a 100% dos animais durante os primeiros 10 dias pós-parto, 30% aos 40 dias e de 10 a 20% ao redor do dia 60 pós-parto (SHELDON et al., 2009; GAUTAM et al., 2010). Outra doença de grande importância econômica e produtiva em bovinos é a mastite, que acomete até 50% do rebanho leiteiro (MAGATA et al., 2014; GANDA et al., 2016). A mastite, é caracterizada pelo processo inflamatório da glândula mamária e em 90% dos casos é provocada por bactérias (ASAF et al., 2014).

A presença de bactérias patogênicas no útero ou na glândula mamária ativa o sistema imune, gerando uma resposta inflamatória para combater o agente patogênico. Células imunes como macrófagos e neutrófilos, através dos receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll Like Receptors*) reconhecem os microrganismos invasores, mediante a identificação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são moléculas características de microrganismos patogênicos (TAKEUCHI e AKIRA, 2010). Os TLRs mais importantes para o reconhecimento de bactérias são o TLR1, TLR2 e TLR6, que reconhecem PAMPs de bactérias Gram-positivas e o TLR4 que reconhece PAMPs de bactérias Gram-negativas (BEUTLER, 2009; TAKEUCHI e AKIRA, 2010). A ligação dos PAMPs aos TLRs estimula a produção de mediadores inflamatórios como as citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (DINARELLO, 2007; ECKERSALL e BELL, 2010; MORESCO et al., 2011). Além disso, essa ligação desencadeia mudanças nas concentrações plasmáticas das proteínas de fase aguda (PFA) (BIANCHI, 2007; DINARELLO, 2007). As prostaglandinas, que são mediadores químicos e estão envolvidas em vários eventos reprodutivos, tais como a ovulação, fecundação e implantação do embrião (DROST, 1981; SHELTON et al., 1990), também participam do processo de inflamação (DINARELLO, 2007).

De modo geral, as citocinas e PFA têm a função de atrair e ativar células imunes, direcionar a resposta inflamatória para o local da infecção, promover a reação sistêmica à inflamação, induzir a produção de metabólitos do sistema complemento e auxiliar no reparo tecidual (DINARELLO, 2007; TAKEUCHI e AKIRA, 2010). As PFA podem reduzir (negativas) ou aumentar (positivas) seus níveis circulantes em função

da inflamação (MURATA et al., 2004). Dentro das PFA positivas encontram-se haptoglobina, fibrinogênio, proteína C reativa, amiloide A sérica e ceruloplasmina C3 e dentre as PFA negativas estão a albumina, transferrina e paraoxonase-1 (PON1) (ECKERSALL e BELL, 2010; CECILIANI et al., 2012; SCHRODL et al., 2016). Contudo, as PFA são consideradas como indicadores confiáveis da resposta sistêmica frente a processos inflamatórios, e dessa forma, são utilizadas no diagnóstico e monitoramento de processos inflamatórios, em humanos e em animais (ECKERSALL e BELL, 2010; SCHRODL et al., 2016). Além disso, alterações nas concentrações séricas das PFA têm sido associadas com a diminuição do desempenho reprodutivo (WIRA e FAHEY, 2004; KRAUSE et al., 2014).

A PON1 é uma enzima antioxidante sintetizada no fígado que é liberada na corrente sanguínea, onde encontra-se ligada exclusivamente à lipoproteína de alta densidade (HDL) (DRAGANOV et al., 2000). Essa enzima desempenha um papel fundamental na capacidade anti-inflamatória e antiaterogênica do HDL, protegendo lipoproteínas, células e lipídeos de danos oxidativos e peroxidativos (DRAGANOV et al., 2000; DRAGANOV et al., 2005). Em bovinos, a PON1 tem sido caracterizada principalmente como uma PFA negativa, reduzindo seus níveis circulantes em resposta às citocinas liberadas durante a inflamação (BIONAZ et al., 2007). Portanto, a resposta eficiente aos processos inflamatórios e a recuperação dos animais doentes está atrelada ao restabelecimento dos níveis normais de PON1 após o período de estresse (BOSSAERT et al., 2012). Nesse sentido, nosso grupo de estudo observou que ao induzir uma resposta inflamatória sistêmica, a atividade de PON1 sérica e intrafolicular foram diminuídas (CAMPOS et al., 2017).

No mesmo contexto, o HDL é a única lipoproteína presente no fluido folicular (FF), responsável por fornecer colesterol como substrato para a esteroidogênese (JASPARD et al., 1996). Além disso, possui propriedades anti-inflamatória, antioxidante e citoprotetora (DRAGANOV et al., 2000; DRAGANOV et al., 2005; VEDHACHALAM et al., 2007; LUND-KATZ e PHILLIPS, 2010), e desta forma, tem-se estabelecido uma relação entre o HDL e a fertilidade. Estudos indicam que o potencial anti-inflamatório e antioxidante do HDL deriva de sua composição lipídica, porção de Apolipoproteína AI (ApoAI) e presença de enzimas como a PON1 (FUJIMOTO et al., 2010). A ApoAI é a principal proteína associada ao HDL, compreende de 40 a 70% de sua massa total (BAUCHART et al., 1989; FUJIMOTO et al., 2010) e desempenha um papel crítico na biogênese, remodelação e catabolismo do HDL, estando

estritamente correlacionada com a quantidade de colesterol na molécula de HDL (HDL-C) (SANTOS-GALLEGO et al., 2008). A transferência da ApoA1 e da PON1 do sangue para o FF ocorre junto ao HDL, visto que estão correlacionados positivamente nos dois compartimentos, em humanos (BROWNE et al., 2008) e em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013). Entretanto, o HDL pode sofrer transformações metabólicas intrafoliculares, associadas à síntese hormonal e ao transporte reverso de colesterol (JASPARD et al., 1997). E além disso, um estudo anterior de nosso grupo encontrou que a concentração de HDL-C sérica diminui ao induzir uma resposta inflamatória sistêmica em vacas (CAMPOS et al., 2017).

Em humanos, foi observada uma associação negativa da concentração intrafolicular e sanguínea de HDL-C e de ApoA1 com o grau de fragmentação de embriões no dia 3 após a fecundação *in vitro* (BROWNE et al., 2008). Por outro lado, a atividade de PON1 e concentração de ApoA1 foram associadas positivamente com o número de blastômeros e qualidade embrionária (BROWNE et al., 2008). Somado a isso, nosso grupo observou previamente que, quando adicionada PON1 recombinante (rPON1) em doses crescentes durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, houve um efeito positivo e linear sobre o desenvolvimento embrionário no dia 7 de cultivo (RINCON et al., 2016), atribuído possivelmente ao seu efeito antioxidante. Além disso, foram associadas menores concentrações de HDL-C, triglicerídeos e colesterol total no FF de mulheres com o síndrome de ovário policístico ou síndrome metabólica (NIU et al., 2017), o que poderia explicar a menor fertilidade deste grupo.

Um dos principais causadores de doenças uterinas e da glândula mamaria é a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (SHELDON et al., 2002), que possui na sua membrana externa lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas que agem como potente estimulador da resposta inflamatória (MATEUS et al., 2003; KOHCHI et al., 2006). Para combater o agente patogênico, células imunes como macrófagos e neutrófilos reconhecem a presença de LPS através do receptor TLR4, que em conjunto com os co-receptores CD14 (do inglês *cluster of differentiation 14*) e MD-2 (do inglês *myeloid differentiation factor 2*) iniciam uma cascata de sinalização, induzindo a produção de mediadores inflamatórios (BEUTLER, 2009; BIDNE et al., 2018) e a resposta inflamatória propriamente dita. Entretanto, durante a infecção, o LPS pode entrar na corrente circulatória e se depositar em locais distantes da infecção, acarretando efeitos indiretos e adversos à infecção inicial. Nesse sentido, já foi detectada a presença de LPS no fluido uterino, no plasma sanguíneo (MATEUS et al., 2003) e no

FF (HERATH et al., 2007) de vacas com metrite, e no plasma e leite de vacas com mastite infecciosa (HAKOGI et al., 1989).

A exposição ao LPS causa uma resposta inflamatória sistêmica, aumentando a temperatura corporal e alterando a produção de PFA e citocinas (WALDRON et al., 2003; CAMPOS et al., 2017). Do ponto de vista reprodutivo, o LPS atua inicialmente no hipotálamo ou na hipófise, alterando a liberação de gonadotrofinas e consequentemente o desenvolvimento folicular (SUZUKI et al., 2001). No entanto, o LPS pode ter efeito direto no ovário, especialmente no folículo pré-ovulatório (PRICE et al., 2013). Embora o folículo ovariano careça de células imunes (BROMFIELD e SHELDON, 2011), as células foliculares podem modular a resposta inflamatória de forma semelhante às células do sistema imune, uma vez que foi detectada a expressão do receptor TLR4 (HERATH et al., 2007; BROMFIELD e SHELDON, 2011; MAGATA et al., 2014; CAMPOS et al., 2017), principal mecanismo de reconhecimento do LPS e ativação da resposta inflamatória. Somado a isso, a exposição de células da granulosa ao LPS altera o padrão de expressão e a concentração das interleucinas-1 $\beta$ , 6 e 8, que são citocinas pró-inflamatórias (PRICE et al., 2013) e também a expressão de enzimas da cascata esteroidogênica (PRICE et al., 2013; BROMFIELD e IACOVIDES, 2017; CAMPOS et al., 2017).

Assim, estudos demonstram que o LPS pode atuar diretamente no ovário, reduzindo o número de folículos primordiais (BROMFIELD e SHELDON, 2013), alterando a expressão de genes associados a esteroidogênese nas células foliculares (SHELDON et al., 2002; WILLIAMS et al., 2007; MAGATA et al., 2014; CAMPOS et al., 2017), diminuindo a concentração folicular de estradiol (HERATH et al., 2007; MAGATA et al., 2014) e progesterona (MAGATA et al., 2014), reduzindo o crescimento e função folicular (SHELDON et al., 2002; WILLIAMS et al., 2007) diminuindo o desenvolvimento oocitário (BROMFIELD e SHELDON, 2011), diminuindo a taxa ovulatória (SHELDON et al., 2002; WILLIAMS et al., 2007; HERATH et al., 2009), diminuindo a função e estendendo a fase lútea (SUZUKI et al., 2001; LAVON et al., 2011a; LUTTGENAU et al., 2016), aumentando as espécies reativas de oxigênio e genes apoptóticos de oócitos (ZHAO et al., 2017), aumentando a taxa de metilação em oócitos (ZHAO et al., 2017) e reduzindo a taxa de maturação meiótica de oócitos (BROMFIELD e SHELDON, 2011; MAGATA e SHIMIZU, 2017; ZHAO et al., 2017). Além disso, o LPS diminui o número de células trofoblásticas em blastocistos (MAGATA e SHIMIZU, 2017), reduz o desenvolvimento embrionário

(SOTO et al., 2003; MAGATA e SHIMIZU, 2017; ZHAO et al., 2017), diminui a taxa de concepção (HERATH et al., 2009) e associado à disfunção do corpo lúteo, produção de progesterona e disfunção endometrial, é capaz de causar aborto (AGRAWAL et al., 2013; BIDNE et al., 2018), podendo causar infertilidade (BIDNE et al., 2018). Pelos efeitos anteriormente mencionados, a inflamação decorrente de infecções bacterianas no pós-parto recente de vacas afeta negativamente a fertilidade a curto prazo, diminuindo a chance de gerar uma nova prenhez. Entretanto, a inflamação nesse período pode afetar o oócito e conseqüentemente o embrião a nível molecular, o que vai acarretar efeitos deletérios na gestação a longo prazo, podendo se estender por mais de 4 meses (RIBEIRO et al., 2016).

Como citado acima, as evidências mostram uma relação do complexo HDL-ApoAI-PON1 com a fertilidade, porém, ainda não foram completamente elucidados os mecanismos pelos quais isso acontece, a interação entre seus constituintes e sua transferência do sangue para o FF. Adicionalmente, a literatura evidencia uma associação do LPS com o desempenho reprodutivo de bovinos leiteiros no período pós-parto. No entanto, o mecanismo pelo qual o LPS interfere na reprodução ainda não está completamente esclarecido. Assim, é necessário estudar os mecanismos e rotas pelos quais o complexo HDL-ApoAI-PON1 e o LPS podem influenciar a fertilidade de bovinos, especialmente a nível de oócito e de embrião.



## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar os mecanismos, relação e interação do HDL e seus constituintes, sobre a fertilidade, assim como os mecanismos pelos quais o LPS pode afetar a fertilidade de bovinos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito da adição de HDL durante a maturação *in vitro* de oócitos sobre a competência oocitária e desenvolvimento precoce do embrião bovino.

Verificar a ação dos constituintes do HDL sobre a competência oocitária e desenvolvimento embrionário inicial.

Avaliar o efeito da exposição de oócitos ao LPS durante a MIV sobre a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial.

Verificar o efeito da exposição de zigotos ao LPS durante o cultivo *in vitro* sobre desenvolvimento embrionário inicial.

Avaliar o efeito da aplicação de LPS *in vivo* sobre a maturação e desenvolvimento embrionário inicial.

### **3 Artigos**

#### **3.1 Artigo 1**

##### **Effect of high-density lipoprotein on oocyte maturation and bovine embryo development *in vitro***

Joao Alveiro Alvarado Rincón, Jorgea Pradieé, Mariana Härter Remião, Tiago Veiras Collares, Bruna Mion, Bernardo Garziera Gasperin, Monique Tomazele Rovani, Marcio Nunes Corrêa, Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro, Augusto Schneider

Publicado na revista *Reproduction in Domestic Animals*, 2018.  
doi: 10.1111/rda.13373

**Effect of high-density lipoprotein on oocyte maturation and bovine embryo development  
*in vitro***

**Short running title: High-density lipoprotein during oocyte maturation on bovine**

Joao Alveiro Alvarado Rincón<sup>1</sup>, Jorgea Pradié<sup>1</sup>, Mariana Härter Remião<sup>1</sup>, Tiago Veiras Collares<sup>1</sup>, Bruna Mion<sup>1</sup>, Bernardo Garziera Gasperin<sup>1</sup>, Monique Tomazele Rovani<sup>1</sup>, Marcio Nunes Corrêa<sup>1</sup>, Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro<sup>2</sup> and Augusto Schneider<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 96160-000, Brasil.

<sup>2</sup> Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 96010-971, Brasil.

**\*Corresponding author:**

Address: Rua Gomes Carneiro 1, sala 239, Pelotas, RS, Brasil.

CEP: 96010-610

Phone: +55-53-39211279

E-mail: [augusto.schneider@ufpel.edu.br](mailto:augusto.schneider@ufpel.edu.br)

**Contents**

High-density lipoprotein (HDL) is the main lipoprotein in the follicular fluid and it has anti-inflammatory, antioxidant and cryoprotectant properties. The anti-inflammatory and antioxidant potential are derived from its lipid composition, especially the apolipoprotein AI (ApoAI) and paraoxonase 1 (PON1). The aim of this study was to evaluate the effect of HDL during *in vitro* maturation (IVM) on oocyte maturation and early bovine embryo development. For this, cumulus oocyte complexes (COCs) were obtained from bovine ovaries collected at a local slaughterhouse. COCs (n=2250) were allocated into three groups (n=50 COCs/group) according to the addition of HDL protein (HDL-P) during IVM for 22 h: 0 mg/dL (control), 50 mg/dL and 150 mg/dL. After IVM, COCs were inseminated (IVF) and cultivated for 7 days. Total cholesterol concentration, total protein, triglycerides and ApoAI concentrations on IVM medium increased proportionally to HDL-P addition. However, PON1 activity was not detected in any treatment. The addition of HDL-P did not affect nuclear maturation rate, endogenous reactive oxygen species and glutathione levels in COCs ( $P > 0.05$ ). The highest HDL-P concentration (150 mg/dL) decreased cleavage and blastocyst rate ( $P < 0.05$ ). Moreover, the HDL-P 150 mg/dL group had lower cellular count/blastocyst than the 50 mg/dL group ( $P <$

0.05). However, the addition of HDL-P did not affect relative gene expression of evaluated genes. In conclusion, the complex HDL/ApoAI obtained from human plasma, in absence of PON1 activity during *in vitro* oocyte maturation, decreased initial embryo development.

**Keywords:** Antioxidant; HDL; Paraoxonase.

## 1 INTRODUCTION

High-density lipoprotein (HDL) is known for its role in cardiovascular health (Fujimoto et al. 2010). However, previous studies have also demonstrated a relationship between HDL and fertility (Fujimoto et al. 2010, Browne et al. 2008, Campos et al. 2017, Rincon et al. 2016), as HDL is the main lipoprotein in the ovarian follicular fluid (FF) and supplies cholesterol for steroidogenesis (Jaspard et al. 1996). Additionally, HDL has anti-inflammatory, antioxidant and cryoprotectant properties (Vedhachalam et al. 2007, Lund-Katz and Phillips 2010, Draganov et al. 2005, Draganov et al. 2000). The anti-inflammatory and antioxidant potential are related to HDL lipid composition, especially to the presence of apolipoprotein AI (ApoAI) and enzymes such as paraoxonase 1 and 3 (PON1 and PON3) (Goulinet and Chapman 1997). ApoAI is the main protein associated to HDL (Santos-Gallego et al. 2008) and represents 40 to 70% of the HDL particle mass (Bauchart et al. 1989, Fujimoto et al. 2010). The transfer of ApoAI and PON1 from blood to the FF occurs in parallel with HDL, since these components are positively correlated in both compartments, in humans (Browne et al. 2008) and cattle (Schneider et al. 2013). Although the follicular membrane is semipermeable, suggesting that only small HDL particles (HDL<sub>3</sub>) are presented in FF (Shalgi et al. 1973), some studies detected 26 different sizes of HDL particle in human FF (Kim et al. 2017).

The normal metabolic activity on the ovarian follicle can result in oxidative stress (Agarwal et al. 2005). The oxidative stress is one of the main causes of low efficiency of oocyte *in vitro* maturation (IVM), impairing oocyte quality and, consequently inducing developmental blockade and decreasing early embryo development (Wang et al. 2002, Nasr-Esfahani et al. 1990). A negative relationship between intrafollicular and blood concentration of HDL-cholesterol (HDL-C) and ApoAI was observed with fragmentation score of human embryos on Day 3 after *in vitro* fecundation (Browne et al. 2008). In addition, the same study found a positive association between PON1 activity and ApoAI concentration with embryo quality (Browne et al. 2008). In the same way, our previous data indicated that the addition of PON1 during IVM of bovine oocytes resulted in a positive effect on embryo development (Rincon et al. 2016). The mechanisms and roles of HDL on fertility have not yet been elucidated. However,

it is suggested that HDL can improve oocyte quality and early embryo development, probably by antioxidant defense mechanisms promoted by ApoAI and PON1 (Rincon et al. 2016, Browne et al. 2008, Fuhrman et al. 2010). Based on this, the aim of this study was to evaluate the effect of HDL addition during IVM on oocyte maturation and early bovine embryo development.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Treatments**

All procedures were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation from Universidade Federal de Pelotas (Protocol 8593). The concentrations of HDL during IVM were selected based on the protein HDL concentrations (HDL-P) reported in bovine ovarian follicles of different sizes (Brantmeier et al. 1987). The concentrations used were defined as: 0 (control), 50 and 150mg/dL HDL-P during IVM. The HDL solution was prepared through the dilution of 10mg HDL-P (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, USA) in 1mL of IVM medium, homogenized, aliquoted and stored at -20°C for further use during IVM.

### **2.2 Collection, selection and in vitro maturation of oocytes**

The cumulus oocyte complexes (COCs) were obtained from the aspiration of 2-8mm follicles from ovaries collected at a local slaughterhouse. Only COCs of I, II and III grades were selected (de Loos et al. 1991) and randomly allocated into three groups (n=50 oocytes/group) according HDL-P concentration in the IVM medium: 0mg/dL (control), 50mg/dL and 150mg/dL. Oocyte maturation was performed in drops of 300µL TCM199B medium (Gibco®, Grand Island, NY, USA) supplemented with 0.2mM sodium pyruvate, 0.1µL FSH, 75µL/mL amikacin, 0.1µL/mL estradiol and 10% of fetal bovine serum (FBS), at 39°C with 5% CO<sub>2</sub> for 22 hours. After the maturation period, IVM medium was collected and stored at -20°C for further analysis. A total of 2,250 oocytes were used.

### **2.3 Evaluation of oocyte nuclear maturation**

After IVM, 20-25 oocytes/group were denuded from cumulus cells with hyaluronidase (1mg/mL, SIGMA-ALDRICH®) and successive pipetting. Denuded oocytes were fixed in PBS supplemented with 0.5% of glutaraldehyde for 30 minutes, stained with Hoechst 33342 (SIGMA-ALDRICH®) for 15 minutes, washed in PBS for 5 minutes and transferred to droplets of 10µL PBS:Glycerol (1:1) and 0.5µL/mL Hoechst 33342 in slides. Oocytes were evaluated using an inverted fluorescent microscope IX 71 (Olympus®, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan), with

UV filters of 330-385nm. Oocytes were considered as matured when extrusion of the first polar body (metaphase II) was observed. The analysis was performed in three replicates, with a total of 60-75 oocytes/group.

#### **2.4 Reactive oxygen species and endogenous glutathione levels in matured oocytes**

Mature oocytes (20-25 oocytes/group) were denuded from cumulus cells with hyaluronidase (1mg/mL) (SIGMA-ALDRICH®), washed three times in drops of PBS-PVP (1mg/ml) and incubated in a drop with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (10µM; DCHF-DA) to measure reactive oxygen species (ROS) levels and 4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin (10µM; Cell-Tracker Blue CMF2HC Molecular Probes; Beyotime Institute of Biotechnology) to measure glutathione (GSH) levels. They were kept for 30 minutes in the dark at room temperature, and after, they were washed three times in 70µL drops of PBS-PVP. The fluorescence was visualized in 100µL drops of PBS-PVP using an inverted fluorescent microscope IX 71 (Olympus®) equipped with UV (Hg) lamp and excitation/emission filters (450-490nm for ROS and 330-395nm for GSH). Images were recorded using digital camera DP72 (Olympus®) that was attached to the microscope. Fluorescence was evaluated by measuring pixel intensities using Cell<sup>F</sup> software (Olympus®). The analysis was performed in three replicates, in a total of 60-75 oocytes/group.

#### **2.5 *In vitro* fertilization and culture**

After IVM, 50 oocytes/group were transferred to 400µl drops of TALP-IVF medium supplemented with 6mg/mL BSA, 0.2mM sodium pyruvate, 30µg/mL heparin, 20µM penicillamine, 10µM hypotaurine, 1µM epinephrine and 75µg/mL amikacin. Spermatic selection was performed by mini Percoll double density gradient (Parrish et al. 1995), and insemination was performed with a  $1 \times 10^6$  spermatozoa/mL concentration. Oocytes were incubated with spermatozoa at 39°C and 5% of CO<sub>2</sub>. The day of insemination was considered as day 0 (D0) of culture.

Twenty hours after IVF, putative zygotes were denuded from cumulus cells through successive pipetting and transferred to 200µL drops of culture medium (SOFaa supplemented with 2.7mM of myo-inositol, 0.2mM sodium pyruvate, 5mg/mL BSA and 75µg/ml amikacin) under mineral oil. Embryo culture was performed at 39°C with 5% of CO<sub>2</sub> for seven days. On day 3 (D3), cleavage rate (cleaved/inseminated oocytes) was assessed and 70% of the culture medium was replaced by fresh medium with 2.5% FBS. On day 5 (D5), 70% of the culture medium was again replaced by fresh medium with 1µg/mL of glucose. On day 7 (D7), embryo

development rate (blastocysts/inseminated oocytes) was assessed. The experiment was performed in 8 replicates, with a total of 400 oocytes inseminated/group.

## **2.6 Cellular count of embryo on D7**

On day 7, approximately 10 embryos/group were fixed for 30 minutes (0.5% of glutaraldehyde in PBS), stained for 15 minutes (PBS and 1mg/mL of PVA and 5 µg/mL of Hoechst 33342, SIGMA®), washed in PBS for 5 minutes and transferred to slides containing PBS-Glycerol (1:1) with 0.5µg/mL Hoechst. Fluorescence was recorded using digital camera DP72 (Olympus®) attached to an inverted fluorescent microscope IX 71 (Olympus®). The analysis was performed in three replicates, with a total of 30 embryos/group.

## **2.7 RNA extraction and gene expression**

After IVM, 50 oocytes/group (in 3 replicates) were denuded from cumulus cells with hyaluronidase (1mg/mL, SIGMA-ALDRICH®) and successive pipetting. Denuded oocytes and cumulus cells were stored separately in microtubes in 100µL Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at -70 °C for RNA extraction. In addition, 10 embryos/group were collected (in five replicates, early blastocyst, blastocyst and expanded blastocyst stages) on D7 and stored in microtubes with 100µL Trizol (Invitrogen®) at -70 °C for RNA extraction.

Total RNA from oocyte, cumulus cells and embryos was extracted using Trizol (Invitrogen®), according to the manufacturer protocol, with some adaptations. RNA concentration was measured in a spectrophotometer (Nanodrop Lite, Thermo Fischer Scientific Inc., USA) and the 260/280nm ratio of absorbance was determined. Each sample was treated with 1U DNase I amplification-grade (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) for 5 minutes at 37 °C. After, DNase was inactivated with 1µL of EDTA (25nM) for 10 minutes at 65 °C. Reverse transcription was performed using 700 ng of RNA in a 20µL volume with the iScript Synthesis kit (BIORAD®, Hercules, CA, USA). Samples were incubated at 25 °C for 5 minutes, at 42 °C for 20 minutes and at 95 °C for 1 minute.

Real-time quantitative PCR (RT qPCR) was performed in a 20µL volume using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) and fluorescence was read in the StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each qPCR reaction was performed in duplicate using 20ng of cDNA, 10µL of GoTaq®, 0.2µL of DYE, 0.5µL of each primer (10µM) and 6.8µL of ultrapure water. For each assay, 50 cycles were run (95 °C for 15 sec and 60 °C for 1 minute) and a dissociation curve was included at the end of reaction to verify the amplification of a single PCR product.

The H2A histone type 1-C (*HIST1H2AC*) and 18S ribosomal RNA (*RN18S1*) were used as endogenous control for all evaluated genes. Target genes were related to apoptosis: BCL2 associated X protein (*BAX*); oocyte quality: bone morphogenetic protein 15 (*BMP15*) and growth differentiation factor 9 (*GDF9*); cumulus cells expansion and resumption of meiosis: amphiregulin (*AREG*) and epiregulin (*EREG*); oocyte energy metabolism: solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 (*SLC2A1*); HDL composition and conformation: scavenger receptor class B member 1 (*SCARB1*) and ATP binding cassette subfamily A member 1 (*ABCA1*); lipid metabolism: sterol regulatory element binding transcription factor 1 (*SREBF1*), acyl-CoA desaturase (*SCD*) and low density lipoprotein receptor (*LDLR*) and; embryo implantation ability: placenta-specific 8 (*PLAC8*). The primers sequences are described in Table 1. Relative expression was calculated using the  $2^{A-B}/2^{C-D}$  equation as described by (Campos et al. 2017), using geometric mean of *HIST1H2AC* and *RN18S1* expression as endogenous control of all evaluated structures.

## 2.8 Biochemical analysis

The collected IVM medium was used to measure total cholesterol concentrations by enzymatic method, and total protein and TAG concentration by colorimetric method using commercial kits (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil) according to manufacturer's protocol. ApoAI concentration was measured in the IVM medium by immunoturbidimetry in a commercial laboratory (Laboratório Pasin, Santa Maria, RS, Brazil). PON1 activity was determined in the IVM medium by enzymatic method as described by Rincon et al. (2016).

## 2.9 Statistical analysis

Results are presented as means  $\pm$  standard error of the mean. Nuclear maturation rate was analyzed by chi-square test. Metabolites evaluated in IVM medium, cleavage rate, embryo development rate, ROS and GSH levels, cellular count and gene expression were compared by analysis of variance (One-Way ANOVA) and Tukey's post-hoc test to compare individual means using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). *P* values lower than 0.05 were considered as significant.



### 3 RESULTS

#### 3.1 Nuclear maturation, cleavage and embryo development

The addition of HDL-P during oocyte maturation did not affect nuclear maturation rate ( $66.6 \pm 4.0$ ,  $71.8 \pm 1.8$  and  $66.4 \pm 6.4\%$ , for control, 50 and 150mg/dL HDL-P, respectively,  $P>0.05$ , Figure 1a). The group supplemented with 150mg/dL HDL-P had lower cleavage rate on D3 ( $56.4 \pm 4.0\%$ ,  $P<0.05$ ) than control and 50mg/dL groups ( $68.9 \pm 2.3$  and  $68.1 \pm 3.3\%$ , respectively), although control and 50mg/dL groups were not different ( $P>0.05$ , Figure 1b).

Blastocyst rate on D7 for the 150mg/dL HDL-P group was lower than control and 50mg/dL groups ( $P<0.05$ ,  $17.9 \pm 3.0\%$ ,  $29.9 \pm 2.3$  and  $32.9 \pm 3.5\%$ , respectively). Control and 50mg/dL groups were not different (Figure 2a). In addition, 150mg/dL group had lower cellular count/blastocyst on D7 ( $106.5 \pm 9.0$  cells) than 50mg/dL group ( $139.6 \pm 7.8$  cells,  $P<0.05$ ) and was similar to the control group ( $122.9 \pm 7.0$  cells,  $P>0.05$ ). Cellular count of control and 50mg/dL groups was not different (Figure 2b and 2c).

#### 3.2 Metabolites in maturation medium

Total cholesterol, total protein, TAG and ApoAI concentration in maturation medium after 22 hours of IVM increased proportionally to the addition of HDL-P ( $P<0.001$ , Table 2). PON1 activity was not detected in any treatment.

#### 3.3 Reactive oxygen species and endogenous glutathione levels in matured oocytes

The addition of 50 or 150mg/dL HDL-P during IVM did not affect endogenous ROS levels ( $28.74 \pm 2.08$  and  $26.47 \pm 2.36$ , respectively) in comparison with control group ( $27.50 \pm 1.78$ ,  $P>0.05$ , Figure 3a and 3c). In the same way, endogenous GSH levels were not different between control, 50 or 150mg/dL HDL-P groups ( $29.8 \pm 1.6$ ,  $32.6 \pm 1.7$  and  $30.5 \pm 1.2$ , respectively,  $P>0.05$ , Figure 3b and 3c).

#### 3.4 Gene expression of oocytes, cumulus cells and embryos

No changes were observed in relative gene expression of *BAX*, *BMP15*, *GDF9*, *SCARB1* and *ABCA1* in oocytes (Figure 4); *SCARB1*, *AREG*, *SLC2A1*, *LDLR*, *EREG* and *BAX* in cumulus cells (Figure 5); and *SCARB1*, *ABCA1*, *BAX*, *PLAC8*, *SCD*, *LDLR* and *SREBF1* in embryos (Figure 6) derived from oocytes matured in control, 50 or 150mg/dL of HDL-P during 22 hours.

#### 4 DISCUSSION

Previous studies suggested that the anti-inflammatory, antioxidant and cryoprotectant properties attributed to HDL are mainly derived from its lipid composition, and the presence of ApoAI, PON1 and micronutrients (Draganov et al. 2005, Vedhachalam et al. 2007, Fujimoto et al. 2010, Browne et al. 2008). In humans, intrafollicular and blood HDL-C and ApoAI concentration were negatively associated with embryo fragmentation score on Day 3 after IVF (Browne et al. 2008). In the same study, PON1 activity and ApoAI concentration were positively associated with embryo quality (Browne et al. 2008). In addition, Moss et al. (2012) demonstrated that HDL supplementation increases resistance of *in vitro*-produced bovine embryos to thermal shock, which was attributed to the antioxidant effects of compounds associated with the HDL particle, such as ApoAI and PON1. Despite this evidence, we observed in our study that a higher concentration of HDL-P was associated with a decrease in cleavage rate and embryo development on D7 in the absence of PON1 activity in the supplemented media.

Activity of PON1 was not detected after HDL-P supplementation. However, HDL-P supplementation resulted in cholesterol levels similar to those reported in bovine FF (Campos et al. 2017, Schneider et al. 2013). ApoAI concentrations were also similar to the expected in FF, as it reflects the amount of HDL particles, representing 40 to 70% of HDL total mass (Bauchart et al. 1989, Fujimoto et al. 2010). In a previous study, we observed that the addition of rPON1 during IVM significantly increased cleavage and blastocyst rate of bovine embryos, apparently because of its oxidant effect (Rincon et al. 2016). Other studies had associated intrafollicular and blood HDL-C, PON1 and ApoAI concentration with improved human embryo development (Browne et al. 2008). Despite the associations observed in a previous study (Browne et al. 2008) it is difficult to clarify which part of the HDL molecule most contributes to its positive effects on embryo development. The absence of PON1 activity associated to HDL in the current study, suggests that the negative effects of the HDL-ApoAI complex observed are independent of PON1. Previous *in vivo* and *in vitro* studies in humans pointed that the antioxidant capacity of HDL is decreased when the PON1-HDL content is reduced (Van Lenten et al. 2001, Shih et al. 2000, Shih et al. 1998), and the reduction of PON1 content contributes to a dysfunctional HDL particle (Calvo et al. 1997). Hence, our study shows that the positive effects previously observed for HDL *in vivo* are lost in the absence of PON1 activity, even in the presence of increasing concentrations of ApoAI.

It must be emphasized that mimicking the concentration, composition and particle size of *in vivo* intrafollicular HDL is a difficult task, as HDL is a complex particle, able to suffer

remodeling in the intrafollicular environment associated to hormonal synthesis and reverse transport of cholesterol (Jaspard et al. 1997, Fujimoto et al. 2010). The mechanisms responsible for this remodeling have not yet been elucidated, however it includes changes in HDL particle size and composition that could influence its antioxidant potential. In humans, smaller HDL particles exhibit higher antioxidant potential than larger HDL particles (Nobecourt et al. 2005). Additionally, an association between the presence of larger and medium HDL particles in FF with decreased embryo quality was observed (Kim et al. 2017). The source of HDL-P used in this study was human plasma, which would indicate that average particle size may be larger than HDL observed in FF, as only smaller HDL particles (HDL<sub>3</sub>) are present in FF due to the follicular membrane permeability (Shalgi et al. 1973). Furthermore, Kim et al. (2017) found 15 different compounds linked to the HDL particle and 26 different HDL particle sizes, demonstrating the complexity of the HDL particle, which reflects on its complex functionality.

We hypothesized that HDL-P supplementation during IVM could improve oxidative status of oocyte, as previously suggested in women (Browne et al. 2008), decreasing ROS levels and/or activating cellular mechanisms to protect against oxidative damage, such as GSH (de Matos and Furnus 2000). However, the lack of PON1 activity and the variable size and composition of HDL-P particle used in this study, when compared with intrafollicular HDL *in vivo*, could alter antioxidant potential of this particle, as no effects on ROS and GSH levels were observed. In this way, HDL-P supplementation did not affect the number of oocytes that reached metaphase II after IVM. Moreover, relative mRNA expression of genes related to apoptosis (*BAX*), cumulus cells expansion (*AREG* and *EREG*), oocyte quality (*BMP15* and *GDF9*), and ability of embryo implantation (*PLAC8*) in cumulus cells, oocyte and embryos, respectively, were not affected by HDL-P, suggesting no direct effects in these processes. Despite that, the lower cleavage rate observed in the highest-level HDL-P group is an indicator of lower oocyte competence and a damaging effect of HDL-P.

HDL has the ability to remove cholesterol from the cells, through a process named reverse transport of cholesterol. This process is mediated by *SCARB1* and *ABCA1* receptors, allowing HDL and cell to communicate, and facilitates the bidirectional transfer of cholesterol (James et al. 2010, Gelissen et al. 2006). Besides, *SCARB1* allows HDL to acquire some important compounds for its function, as PON1 (James et al. 2010). In this way, Moss et al. (2012) found that embryos treated with bovine HDL had a decreased free cholesterol composition, apparently by reverse transport of cholesterol mediated by *SCARB1*. Therefore, the authors suggest that higher HDL concentrations could decrease the pre-implantation embryo development potential. In the same line, we demonstrated that higher HDL-P concentrations

impaired embryo development. Cholesterol is necessary for oocyte and embryo development, allowing energy production by oxidative pathways and to support membrane synthesis during accelerated cellular proliferation (Sturmeijer et al. 2006). Moreover, there are evidences suggesting that pre-implantation embryos do not have ability to produce cholesterol (Fujimoto et al. 2010). Therefore, the cholesterol necessary for early embryo development will depend on its oocyte intracellular levels after fecundation. This could explain why the higher HDL-P (150mg/dL) supplementation during IVM negatively affected cleavage and blastocyst rate and cellular count on day 7 of embryo development.

The *SREBPs* transcription factor family regulates cholesterol biosynthesis and homeostasis, and its activity depends on cellular nutritional state (Goldstein et al. 2006). *SREBP1* is a potent activator of TAG and cholesterol synthesis (Horton et al. 1998). Vergnes et al. (2016) suggested that lipid homeostasis is crucial to early embryo development, as cholesterol synthesis is necessary to support biogenesis demand from membrane during accelerated cellular proliferation. Although some studies had demonstrated the importance of *SREBP* via during embryogenesis, the role of each protein during embryo development have not yet been completely elucidated. However, intrafollicular HDL-C may play a modulatory role in intracellular cholesterol content in cumulus cells and oocyte, negatively affecting cleavage of embryo cells (Fujimoto et al. 2010). Despite that, relative expression of genes linked to HDL composition and conformation (*SCARB1* and *ABCA1*), lipid metabolism (*SREBF1*, *SCD* and *LDLR*) and energy metabolism of oocytes (*SLC2A1*) was not changed in oocytes, cumulus cells and embryos in our study.

In conclusion, the addition of HDL/ApoAI complex from human plasma during *in vitro* oocyte maturation, in the absence of PON1 activity, decreases initial embryo development.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by FAPERGS, CNPq, CAPES and EMBRAPA. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - (CAPES) - Finance Code 001.

## **CONFLICTS OF INTEREST**

None of the authors of this study has any conflict of interest.

## REFERENCES

- Agarwal, A., Gupta, S. & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 3, 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Bauchart, D., Durand, D., Laplaud, P. M., Forgez, P., Goulinet, S. & Chapman, M. J. (1989). Plasma lipoproteins and apolipoproteins in the preruminant calf, *Bos spp*: density distribution, physicochemical properties, and the in vivo evaluation of the contribution of the liver to lipoprotein homeostasis. *Journal of lipid research*, 30, 1499-1514.
- Bettegowda, A., Patel, O. V., Ireland, J. J. & Smith, G. W. (2006). Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Molecular reproduction and development*, 73, 267-278. <https://doi.org/10.1002/mrd.20333>
- Boruszewska, D., Sinderewicz, E., Kowalczyk-Zieba, I., Grycmacher, K. & Woclawek-Potocka, I. (2015). The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 13, 44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12958-015-0044-x>
- Brantmeier, S. A., Grummer, R. R. & Ax, R. L. (1987). Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *Journal of dairy science*, 70, 2145-2149. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80266-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80266-7)
- Browne, R. W., Shelly, W. B., Bloom, M. S., Ocque, A. J., Sandler, J. R., Huddleston, H. G. & Fujimoto, V. Y. (2008). Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. *Hum reprod*, 23, 1884-1894. <https://doi.org/10.1093/humrep/den183>
- Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M. A. & Vega, M. A. (1997). CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17, 2341-2349.
- 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. (2017). 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*, 89, 244-249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.013>
- de Loos, F., Kastrop, P., Van Maurik, P., Van Beneden, T. H. & Kruij, T. A. (1991). Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Molecular reproduction and development*, 28, 255-259. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080280307>
- de Matos, D. G. & Furnus, C. C. (2000). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, 53, 761-771. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00278-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00278-2)
- di Martino, O., Troiano, A., Addi, L., Guarino, A., Calabro, S., Tudisco, R., Murru, N., Cutrignelli, M. I., Infascelli, F. & Calabro, V. (2015). Regulation of Stearoyl Coenzyme A Desaturase 1 Gene Promoter in Bovine Mammary Cells. *Animal biotechnology*, 26, 251-259. <https://doi.org/10.1080/10495398.2015.1022182>
- Draganov, D. I., Stetson, P. L., Watson, C. E., Billecke, S. S. & La Du, B. N. (2000). Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *The Journal of biological chemistry*, 275, 33435-33442. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004543200>
- Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R. & La Du, B. N. (2005). Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal of lipid research*, 46, 1239-1247. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400511-JLR200>
- Fuhrman, B., Gantman, A. & Aviram, M. (2010). Paraoxonase 1 (PON1) deficiency in mice is associated with reduced expression of macrophage SR-BI and consequently the loss of HDL cytoprotection against apoptosis. *Atherosclerosis*, 211, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.025>
- Fujimoto, V. Y., Kane, J. P., Ishida, B. Y., Bloom, M. S. & Browne, R. W. (2010). High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. *Hum reprod*, 16, 20-38. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp029>
- Gelissen, I. C., Harris, M., Rye, K. A., Quinn, C., Brown, A. J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L. & Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26, 534-540. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000200082.58536.e1>

- Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A. & Brown, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, *124*, 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.022>
- Goulinet, S. & Chapman, M. J. (1997). Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *17*, 786-796.
- Horihata, K., Yoshioka, S., Sano, M., Yamamoto, Y., Kimura, K., Skarzynski, D. J. & Okuda, K. (2016). Expressions of lipoprotein receptors and cholesterol efflux regulatory proteins during luteolysis in bovine corpus luteum. *Reproduction, fertility, and development*. <https://doi.org/10.1071/RD15538>
- Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L. & Shimano, H. (1998). Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *The Journal of clinical investigation*, *101*, 2331-2339. <https://doi.org/10.1172/JCI2961>
- Hosoe, M., Kaneyama, K., Ushizawa, K., Hayashi, K. G. & Takahashi, T. (2011). Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, *9*, 33. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1186%2F1477-7827-9-33>
- James, R. W., Brulhart-Meynet, M. C., Singh, A. K., Riederer, B., Seidler, U., Out, R., Van Berkel, T. J. & Deakin, S. (2010). The scavenger receptor class B, type I is a primary determinant of paraoxonase-1 association with high-density lipoproteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *30*, 2121-2127. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.209122>
- Jaspard, B., Collet, X., Barbaras, R., Manent, J., Vieu, C., Parinaud, J., Chap, H. & Perret, B. (1996). Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. *Biochemistry*, *35*, 1352-1357. <https://doi.org/10.1021/bi950938i>
- Jaspard, B., Fournier, N., Vieitez, G., Atger, V., Barbaras, R., Vieu, C., Manent, J., Chap, H., Perret, B. & Collet, X. (1997). Structural and functional comparison of HDL from homologous human plasma and follicular fluid. A model for extravascular fluid. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *17*, 1605-1613.
- Kim, K., Bloom, M. S., Browne, R. W., Bell, E. M., Yucel, R. M. & Fujimoto, V. Y. (2017). Associations between follicular fluid high density lipoprotein particle components and

- embryo quality among in vitro fertilization patients. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *34*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0826-x>
- Li, X., Li, Y., Yang, W., Xiao, C., Fu, S., Deng, Q., Ding, H., Wang, Z., Liu, G. & Li, X. (2014). SREBP-1c overexpression induces triglycerides accumulation through increasing lipid synthesis and decreasing lipid oxidation and VLDL assembly in bovine hepatocytes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *143*, 174-182. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.009>
- Lund-Katz, S. & Phillips, M. C. (2010). High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Sub-cellular biochemistry*, *51*, 183-227. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8_7)
- Moss, J. I., Garrett, T. J. & Hansen, P. J. (2012). Involvement of free cholesterol and high-density lipoprotein in development and resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock. *Journal of animal science*, *90*, 3762-3769. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4717>
- Nasr-Esfahani, M. H., Aitken, J. R. & Johnson, M. H. (1990). Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development*, *109*, 501-507.
- Nobecourt, E., Jacqueminet, S., Hansel, B., Chantepie, S., Grimaldi, A., Chapman, M. J. & Kontush, A. (2005). Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. *Diabetologia*, *48*, 529-538. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1655-5>
- Parrish, J. J., Krogenaes, A. & Susko-Parrish, J. L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, *44*, 859-869. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00271-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9)
- Rho, G. J., S, B., Kim, D. S., Son, W. J., Cho, S. R., Kim, J. G., B, M. K. & Choe, S. Y. (2007). Influence of in vitro oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer. *Molecular reproduction and development*, *74*, 486-496. <https://doi.org/10.1002/mrd.20502>
- Rincon, J. A. A., Madeira, E. M., Campos, F. T., Mion, B., Silva, J. F., Absalon-Medina, V. A., Butler, W. R., Correa, M. N., Pegoraro, L. & Schneider, A. (2016). Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development in vitro. *Reprod Dom Anim*, *51*, 827-830. <https://doi.org/10.1111/rda.12730>



- Rovani, M. T., Ilha, G. F., Gasperin, B. G., Nobrega, J. E., Jr., Siddappa, D., Glanzner, W. G., Antoniazzi, A. Q., Bordignon, V., Duggavathi, R. & Goncalves, P. B. D. (2017). Prostaglandin F2alpha-induced luteolysis involves activation of Signal transducer and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. *Molecular reproduction and development*, *84*, 486-494. <https://doi.org/10.1002/mrd.22798>
- Santos-Gallego, C. G., Ibanez, B. & Badimon, J. J. (2008). HDL-cholesterol: is it really good? Differences between apoA-I and HDL. *Biochemical pharmacology*, *76*, 443-452. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.04.020>
- Schneider, A., Absalon-Medina, V. A., Esposito, G., Correa, M. N. & Butler, W. R. (2013). Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and PON1 activity in follicular fluid of dairy cows. *Reprod Dom Anim*, *48*, 989-994. <https://doi.org/10.1111/rda.12198>
- Shalgi, R., Kraicer, P., Rimon, A., Pinto, M. & Soferman, N. (1973). Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. *Fertility and sterility*, *24*, 429-434.
- Shih, D. M., Gu, L., Xia, Y. R., Navab, M., Li, W. F., Hama, S., Castellani, L. W., Furlong, C. E., Costa, L. G., Fogelman, A. M. & Lusis, A. J. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, *394*, 284-287. <https://doi.org/10.1038/28406>
- Shih, D. M., Xia, Y. R., Wang, X. P., Miller, E., Castellani, L. W., Subbanagounder, G., Cheroutre, H., Faull, K. F., Berliner, J. A., Witztum, J. L. & Lusis, A. J. (2000). Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *The Journal of biological chemistry*, *275*, 17527-17535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910376199>
- Sturmey, R. G., O'Toole, P. J. & Leese, H. J. (2006). Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*, *132*, 829-837. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0073>
- Van Lenten, B. J., Wagner, A. C., Nayak, D. P., Hama, S., Navab, M. & Fogelman, A. M. (2001). High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. *Circulation*, *103*, 2283-2288.
- Vedhachalam, C., Duong, P. T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., Rothblat, G. H., Lund-Katz, S. & Phillips, M. C. (2007). Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *The Journal of biological chemistry*, *282*, 25123-25130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704590200>

- Vergnes, L., Chin, R. G., de Aguiar Vallim, T., Fong, L. G., Osborne, T. F., Young, S. G. & Reue, K. (2016). SREBP-2-deficient and hypomorphic mice reveal roles for SREBP-2 in embryonic development and SREBP-1c expression. *Journal of lipid research*, 57, 410-421. <https://doi.org/10.1194/jlr.M064022>
- Wang, X., Falcone, T., Attaran, M., Goldberg, J. M., Agarwal, A. & Sharma, R. K. (2002). Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and sterility*, 78, 1272-1277.

## TABLES

**TABLE 1** Primer sequence used for gene expression analysis of cumulus cells, oocyte and embryos by Real Time PCR.

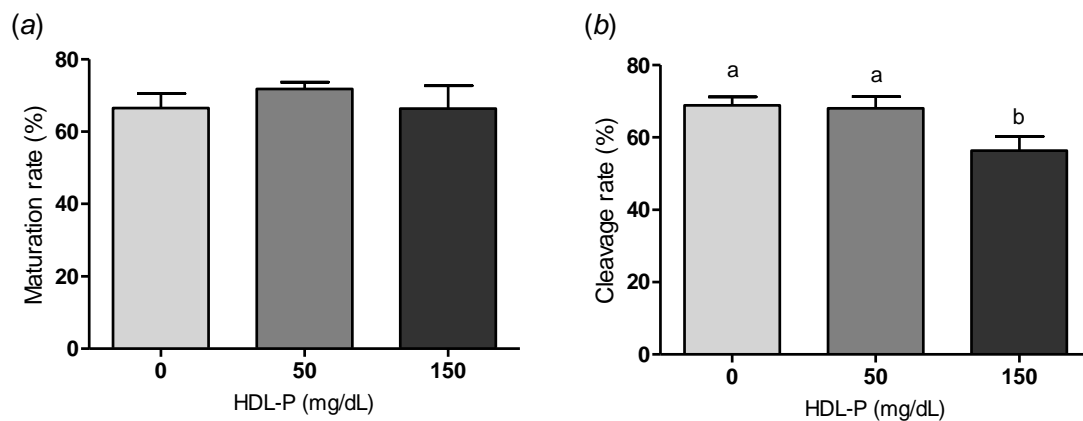
| Gene             | Primer sequence 5' → 3'                                   | Accession no.  | Reference                 |
|------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|---------------------------|
| <i>HIST1H2AC</i> | F: GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG<br>R: TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC      | NM_001205596.1 | (Bettegowda et al. 2006)  |
| <i>RN18S1</i>    | F: CCTTCCGCGAGGATCCATTG<br>R: CGCTCCCAAGATCCAACACTAC      | NR_036642.1    | (Rovani et al. 2017)      |
| <i>BAX</i>       | F: TGCAGAGGATGATCGCAGCTGTG<br>R: CCAATGTCCAGCCATCATGGTC   | NM_173894.1    | (Rho et al. 2007)         |
| <i>AREG</i>      | F: CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT<br>R: CGTTCTTCAGCGACACCTTCA     | NM_001099092.1 | (Boruszewska et al. 2015) |
| <i>EREG</i>      | F: TCACCGCGAGAAGGATGGAG<br>R: GTACTGAAGACCAGGACGAGC       | XM_002688367.3 | (Boruszewska et al. 2015) |
| <i>GDF9</i>      | F: AGCGCCCTCACTGCTTCTATAT<br>R: TTCCTTTTAGGGTGGAGGGAA     | NM_174681.2    | (Hosoe et al. 2011)       |
| <i>BMP15</i>     | F: ATCATGCCATCATCCAGAACC<br>R: TAAGGGACACAGGAAGGCTGA      | NM_001031752.1 | (Hosoe et al. 2011)       |
| <i>SLC2A1</i>    | F: GATCCACAGAGCGCAGCC<br>R: TGTCAGCTTCTTGCTGGTGG          | NM_174602.2    | (Boruszewska et al. 2015) |
| <i>PLAC8</i>     | F: TTTACCGCTCTGTGCCCTTT<br>R: CCATGTGAACTTGACCAAGCAT      | NM_001025325.2 | (Boruszewska et al. 2015) |
| <i>SREBF1</i>    | F: GCAGCCATTTCATCAGCCAGACC<br>R: CGACACCACCAGCATCAACCACG  | NM_001113302.1 | (Li et al. 2014)          |
| <i>SCD</i>       | F: TCCGACCTAAGAGCCGAGAA<br>R: CCCTTTCACCTATTCTTCTATTACCTT | NM_173959.4    | (di Martino et al. 2015)  |
| <i>LDLR</i>      | F: GCAGCTCCCACCTCTAACTG<br>R: TCGACTTTACGCAGTGTTTCG       | NM_001166530.1 | (Horihata et al. 2016)    |
| <i>ABCA1</i>     | F: AGCTGTGTTTGTCTGCATCG<br>R: ATCCTCAGGCGCATCATTAC        | NM_001024693.1 | (Horihata et al. 2016)    |
| <i>SCARB1</i>    | F: TCAGGCACAAGAGCAACATC<br>R: TATCCGGCTGGAAGTGGTAG        | NM_174597.2    | (Horihata et al. 2016)    |

**TABLE 2** Biochemical parameters evaluated in IVM medium supplemented with different concentrations of HDL-P.

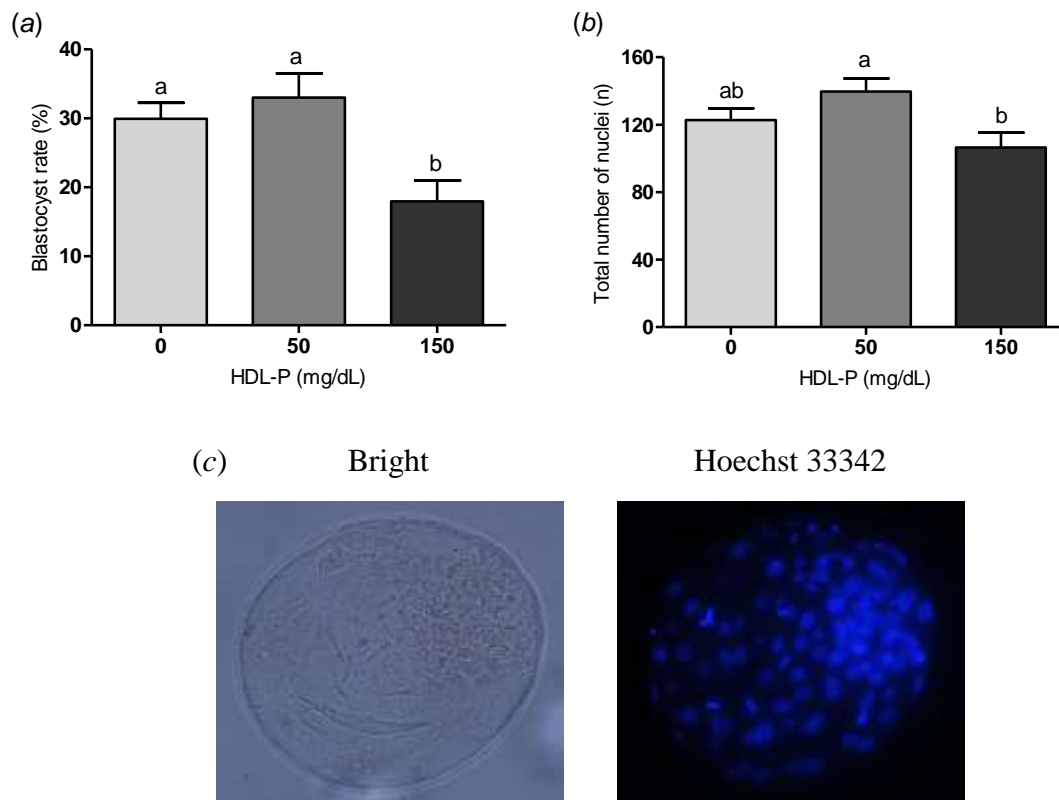
| Metabolite                | HDL-P (mg/dL)            |                           |                           | P       |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|
|                           | 0                        | 50                        | 150                       |         |
| Total cholesterol (mg/dL) | 3.93 ± 0.60 <sup>a</sup> | 13.07 ± 1.61 <sup>b</sup> | 35.16 ± 0.96 <sup>c</sup> | <0.0001 |
| Total protein (g/dL)      | 1.32 ± 0.02 <sup>a</sup> | 1.49 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 1.69 ± 0.03 <sup>c</sup>  | <0.0001 |
| Triglycerides (mg/dL)     | 23.0 ± 1.55 <sup>a</sup> | 30.55 ± 1.31 <sup>b</sup> | 46.25 ± 2.01 <sup>c</sup> | <0.0001 |
| ApoAI (mg/dL)             | < 0.21 <sup>a</sup>      | 45.20 ± 3.99 <sup>b</sup> | 143.6 ± 8.91 <sup>c</sup> | <0.0001 |

Values expressed as means ± standard error. Different letter in line indicates statistical difference.

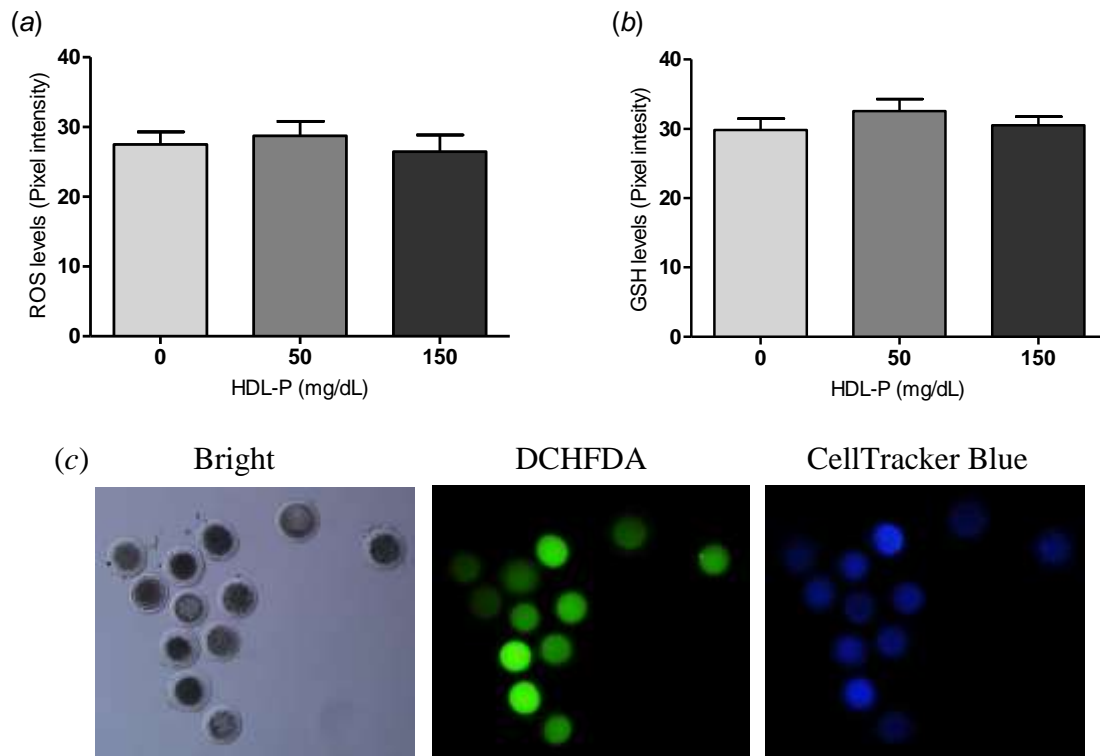
## FIGURES



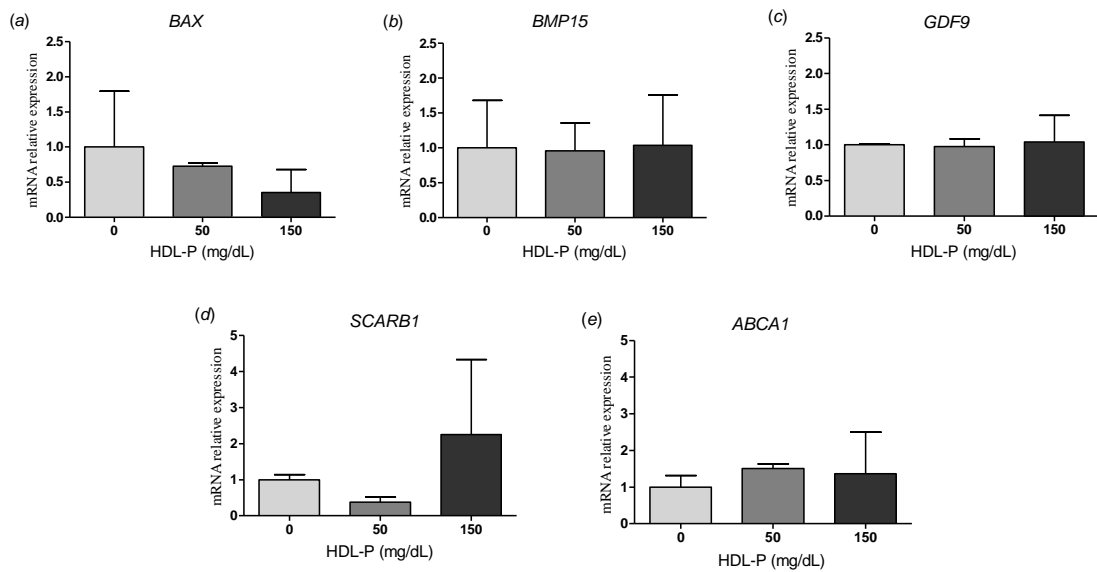
**FIGURE 1** Oocyte maturation and cleavage rates from oocytes without treatment (control) or treated with high density lipoprotein (HDL-P,  $n = 60-75$ ). (a) Oocyte maturation rate is expressed in percentage, as determined by chi-square test and (b) cleavage rate is also expressed in percentage, as determined by ANOVA followed by the Tukey test. Oocytes were *in vitro* matured for 22h with 0, 50 or 150mg/dL HDL-P. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



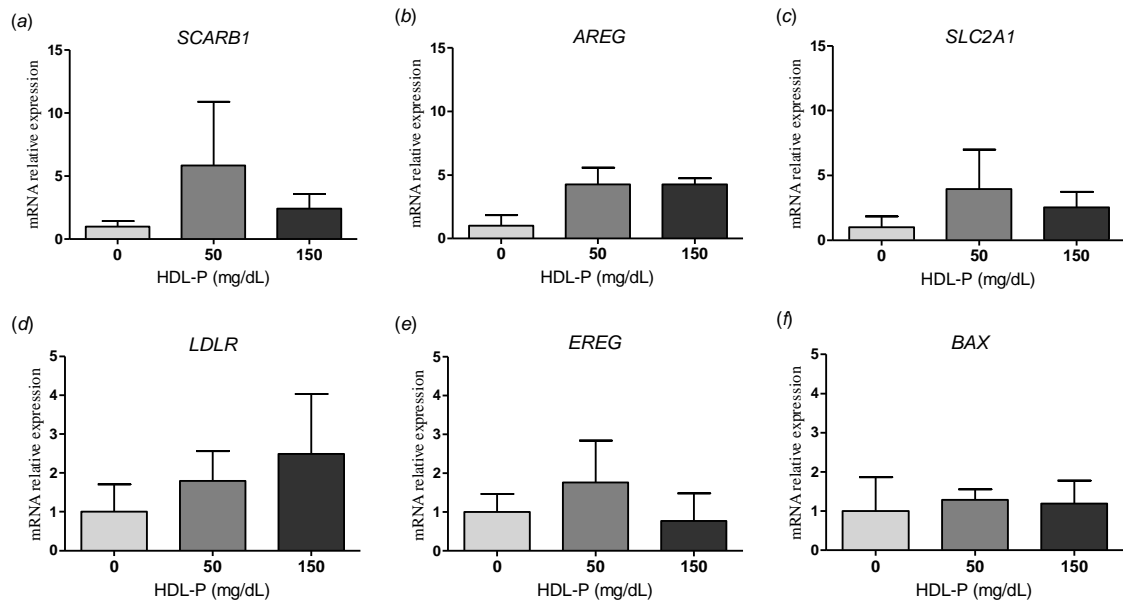
**FIGURE 2** Effect of high density lipoprotein (HDL-P) during *in vitro* oocyte maturation on blastocyst rate and total number of cells/blastocyst of bovine embryos. (a) Blastocyst rate is expressed in percentage at day 7 of embryo culture, derived from oocytes *in vitro* matured with 0, 50 or 150mg/dL HDL-P for 22h ( $n = 400$ ). (b) Number of cells/blastocyst on day 7 embryos, derived from oocytes matured *in vitro* with 0, 50 or 150mg/dL HDL-P for 22h ( $n = 30$ ). (c) Representative epifluorescence photomicrographs of embryos stained with Hoechst 33342 for total cell/blastocyst counts. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), as determined by ANOVA followed by the Tukey test. Scale bar = 100 $\mu$ m.



**FIGURE 3** Effect of high density lipoprotein (HDL-P) in bovine oocytes submitted to *in vitro* maturation (IVM) on reactive oxygen species (ROS) and endogenous glutathione (GSH) levels. (a) ROS intracellular levels, measured by pixel intensity and (b) GSH intracellular levels, measured by pixel intensity of oocytes *in vitro* matured during 22h with 0, 50 or 150mg/dL HDL-P ( $n = 60-75$ ). (c) Representative epifluorescence photomicrographs of *in vitro* matured oocytes stained with 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHFDA) to detect ROS levels and with CellTracker Blue to determine the level of intracellular GSH. The fluorescence intensity (pixel intensity) was not different between the treatments ( $P > 0.05$ ), as determined by ANOVA followed by the Tukey test. Scale bar = 200 μm.

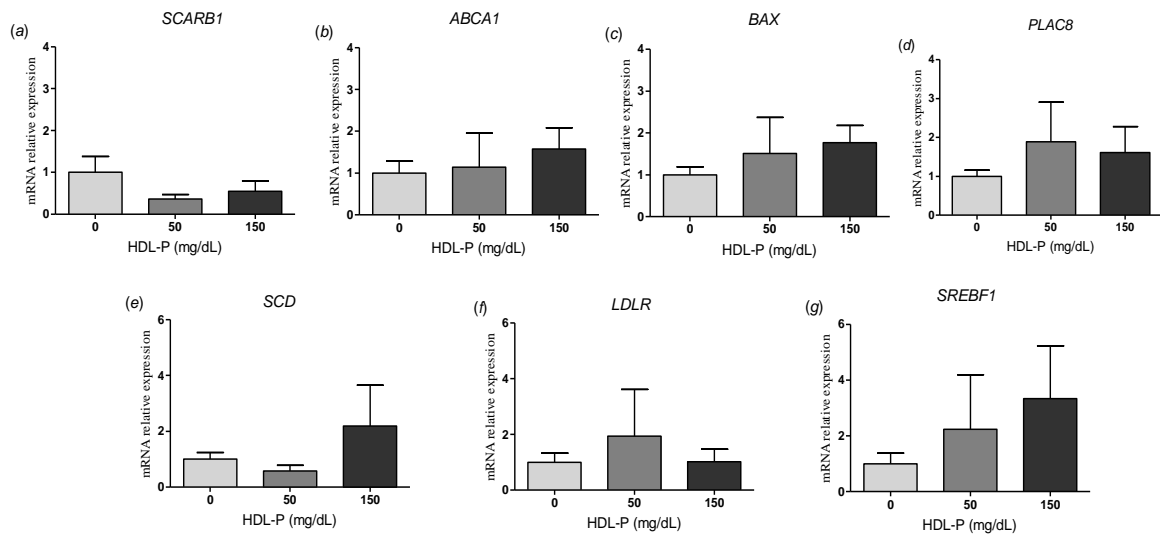


**FIGURE 4** Relative mRNA expression in bovine oocytes *in vitro* matured with 0, 50 or 150mg/dL HDL-P for 22h ( $n = 50$ ). (a) BCL2 associated X (*BAX*), (b) bone morphogenetic protein 15 (*BMP15*), (c) growth differentiation factor 9 (*GDF9*), (d) scavenger receptor B1 (*SCARB1*), and (e) ATP binding cassette subfamily A member 1 (*ABCA1*), as determined by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), as determined by ANOVA followed by the Tukey test.



**FIGURE 5** Relative mRNA expression in bovine cumulus cells derived from oocytes *in vitro* matured with 0, 50 or 150mg/dL HDL-P for 22h ( $n = 50$ ). (a) scavenger receptor B1 (*SCARB1*), (b) amphiregulin (*AREG*), (c) solute carrier family 2 member 1 (*SLC2A1*) (d) low-density lipoprotein receptor (*LDLR*), (e) epiregulin (*EREG*) and (f) BCL2 associated X (*BAX*) mRNA, as determined by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction. Different letters above columns indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), as determined by ANOVA followed by the Tukey test.





**FIGURE 6** Relative mRNA expression in D7 bovine embryos ( $n = 10$ ), derived from oocytes *in vitro* matured with 0, 50 or 150mg/dL HDL-P for 22h. (a) scavenger receptor B1 (*SCARB1*), (b) ATP binding cassette subfamily A member 1 (*ABCA1*), (c) BCL2 associated X (*BAX*), (d) placenta-specific 8 (*PLAC8*), (e) stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) (*SCD*), (f) low density lipoprotein receptor (*LDLR*) and (g) sterol regulatory element binding transcription factor 1 (*SREBF1*) mRNA, as determined by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), as determined by ANOVA followed by the Tukey test.

### 3.2 Artigo 2

#### **Desenvolvimento embrionário inicial de oócitos bovinos desafiados com lipopolissacarídeos *in vitro* ou *in vivo***

Joao Alveiro Alvarado Rincón, Jorgea Pradieé, Patricia Gindri, Bruna Mion, Giuliana de Avila Ferronato, Antônio Amaral Barbosa, Andressa Stein Maffi, Bernardo Garziera Gasperin, Rafael Gianella Mondadori, Marcio Nunes Corrêa, Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro, Augusto Schneider

Será submetido à revista *Reproduction, Fertility and Development*

## Desenvolvimento embrionário inicial de oócitos bovinos desafiados com lipopolissacarídeos *in vitro* ou *in vivo*

Joao Alveiro Alvarado Rincón<sup>A</sup>, Jorgea Pradieé<sup>A</sup>, Patricia Gindri<sup>A</sup>, Bruna Mion<sup>A</sup>, Giuliana de Avila Ferronato<sup>A</sup>, Antônio Amaral Barbosa<sup>A</sup>, Andressa Stein Maffi<sup>A</sup>, Bernardo Garziera Gasperin<sup>A</sup>, Rafael Gianella Mondadori<sup>A</sup>, Marcio Nunes Corrêa<sup>A</sup>, Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro<sup>B</sup>, Augusto Schneider<sup>A,C</sup>

<sup>A</sup> Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96160-000, Brasil.

<sup>B</sup> Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS 96010-971, Brasil.

<sup>C</sup> Autor correspondente. E-mail: augusto.schneider@ufpel.edu.br

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da exposição de oócitos bovinos a lipopolissacarídeos (LPS) *in vitro* e *in vivo*, sobre a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial subsequente. No primeiro experimento utilizaram-se complexos cumulus oócitos (COCs) de ovários provenientes de abatedouros. Os COCs foram desafiados com LPS durante a maturação *in vitro* (MIV), posteriormente foram fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV) durante 7 dias. Separadamente, COCs foram submetidos à MIV sem LPS, depois disso passaram pela FIV e, durante os 7 dias de CIV foram desafiados com LPS. No segundo experimento, 16 novilhas tiveram a onda folicular sincronizada com protocolo hormonal. No dia 1 e 2 em relação ao protocolo hormonal, o grupo controle (n=8) recebeu solução salina i.v. e o grupo LPS (n=8) solução salina i.v. contendo LPS. No quinto dia, todos os animais foram abatidos, os ovários foram coletados e foi realizada a aspiração folicular. Todos os COCs recuperados passaram por MIV, FIV e CIV. Em ambos os experimentos foram avaliadas as taxas de maturação nuclear, clivagem e blastocisto. Além disso, avaliou-se o número de células por embrião e a expressão de genes associados à resposta inflamatória e retomada da meiose nas células do cumulus. A exposição de oócitos bovinos ao LPS *in vitro* durante a MIV diminuiu a taxa de maturação nuclear, mas não foi capaz de afetar o desenvolvimento embrionário inicial. A exposição de zigotos ao LPS durante o CIV não afetou o desenvolvimento embrionário. Já a infusão de LPS *in vivo* em novilhas diminuiu a taxa de clivagem, porém o desenvolvimento embrionário foi semelhante ao do grupo não desafiado com LPS. Assim, conclui-se que o LPS *in vivo* reduz a taxa de clivagem, porém não possui efeitos diretos quando *in vitro*.

**Palavra-chave:** LPS, Endotoxina, Inflamação, Embrião.

## Introdução

Em bovinos leiteiros, 75% das doenças ocorrem no primeiro mês após o parto (LeBlanc *et al.* 2006). Infecções da glândula mamaria ou do útero comumente evoluem para doenças como mastite, metrite e endometrite, que por sua vez, têm sido associadas com a diminuição da fertilidade (Sheldon *et al.* 2004; Sheldon *et al.* 2009). No rebanho leiteiro, de 20 a 50% das vacas podem desenvolver mastite, 40% podem desenvolver metrite e 20% dos casos podem evoluir para endometrite (Opsomer *et al.* 2000; Sheldon *et al.* 2009; Magata *et al.* 2014). Vacas com doenças uterinas ou mamárias apresentam diminuição do crescimento folicular, alterações nas concentrações de hormônios esteróides, extensão da fase lútea e interrupção da atividade ovariana (Sheldon *et al.* 2002; Sheldon *et al.* 2009; Lavon *et al.* 2011a; Lavon *et al.* 2011b; Krause *et al.* 2014).

Um dos principais agentes envolvidos em doenças uterinas e da glândula mamaria é a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) (Sheldon *et al.* 2002), que possui na sua membrana externa lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas que agem como potente estimulador da resposta inflamatória (Mateus *et al.* 2003; Kohchi *et al.* 2006). O principal mecanismo de reconhecimento do LPS é o receptor *Toll like receptor 4* (TLR4), presente em células imunes como neutrófilos e macrófagos (Moresco *et al.* 2011). O TLR4 em conjunto com os co-receptores *cluster of differentiation 14* (CD14) e *myeloid differentiation factor 2* (MD-2) reconhecem o LPS e ativam cascatas de sinalização intracelular, dando início à resposta inflamatória (Takeuchi e Akira 2010). Durante infecções, o LPS liberado pelas bactérias pode entrar na corrente sanguínea e se depositar em locais distantes da infecção. Neste sentido, já foi detectada a presença de LPS no plasma sanguíneo (Mateus *et al.* 2003) e no fluido folicular (Herath *et al.* 2007) de vacas com metrite ou endometrite, e no plasma e leite de vacas com mastite infecciosa (Hakogi *et al.* 1989).

Embora o folículo ovariano careça de células imunes (Bromfield e Sheldon 2011), estudos indicam que células foliculares podem modular a resposta inflamatória tanto *in vitro* como *in vivo* de forma semelhante às células do sistema imune, através do TLR4 (Herath *et al.* 2007; Bromfield e Sheldon 2011; Magata *et al.* 2014; Campos *et al.* 2017), sendo esse o principal mecanismo de reconhecimento do LPS e ativação da resposta imune. Somado a isso, a exposição de células da granulosa ao LPS *in vitro* altera o padrão de expressão e a concentração das interleucinas-1 $\beta$ , 6 e 8, que são citocinas pró-inflamatórias (Price *et al.* 2013), assim como a produção de hormônios esteróides (Herath *et al.* 2007; Magata *et al.* 2014). Dessa forma, o LPS decorrente de infecções como metrite, endometrite e mastite, pode ter efeitos indiretos na fertilidade, especialmente a nível de folículo ovariano.

A exposição ao LPS causa resposta inflamatória sistêmica, aumentando a temperatura corporal e alterando a concentração sérica de proteínas de fase aguda e citocinas (Waldron *et al.* 2003; Campos *et al.* 2017). Considerando a função reprodutiva, estudos *in vivo* e *in vitro* reportam que a exposição ao LPS causa redução do número de folículos primordiais (Bromfield e Sheldon 2013); alteração da concentração de hormônios esteróides (Herath *et al.* 2007; Magata *et al.* 2014); alteração na expressão de genes associados à esteroideogênese nas células foliculares (Sheldon *et al.* 2002; Williams *et al.* 2007; Magata *et al.* 2014; Campos *et al.* 2017); redução do crescimento e função folicular (Sheldon *et al.* 2002; Williams *et al.* 2007); diminuição do desenvolvimento oocitário (Bromfield e Sheldon 2011); diminuição da taxa ovulatória (Sheldon *et al.* 2002; Williams *et al.* 2007; Herath *et al.* 2009); extensão da fase lútea (Suzuki *et al.* 2001; Lavon *et al.* 2011a; Luttgenu *et al.* 2016); aumento de espécies reativas de oxigênio e genes apoptóticos em oócitos (Zhao *et al.* 2017), aumento da taxa de metilação em oócitos (Zhao *et al.* 2017), redução da taxa de maturação meiótica de oócitos (Bromfield e Sheldon 2011; Magata e Shimizu 2017; Zhao *et al.* 2017), menor número de células trofoblásticas em blastocistos (Magata e Shimizu 2017) e menor desenvolvimento embrionário (Soto *et al.* 2003; Magata e Shimizu 2017; Zhao *et al.* 2017).

Entretanto, os mecanismos pelos quais o LPS afeta a fertilidade em bovinos, especialmente a nível de oócito e de embrião e o envolvimento de fatores locais e sistêmicos, ainda não estão bem esclarecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da exposição de oócitos bovinos ao LPS *in vitro* e *in vivo* sobre a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial.

## **Materiais e métodos**

Este estudo foi dividido em dois experimentos, o primeiro visou avaliar os efeitos do LPS durante a maturação oocitária e cultivo embrionário *in vitro* e o segundo, avaliar os efeitos do LPS sobre oócitos *in vivo*, ambos sobre o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos.

### ***Experimento 1 – Efeito do LPS in vitro***

#### ***Meios utilizados na produção de embriões in vitro***

Para a maturação *in vitro* dos oócitos (MIV) foi utilizado meio TCM199B (Gibco®, Grand Island, NY, USA) suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 0,1 µL de FSH, 75 µL/mL amicacina, 0,1 µL/mL de estradiol e 10% de soro fetal bovino (SFB). A fecundação *in vitro* (FIV) ocorreu em meio FIV-TALP suplementado com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 0,2 mM de piruvato de sódio, 30 µg/mL de heparina, 20 µM penicilamina, 10 µM

hipotaurina, 1  $\mu$ M epinefrina e 75  $\mu$ g/mL amicacina. O cultivo *in vitro* (CIV) ocorreu em meio SOFaa suplementado com 2,7 mM de mio-inositol, 0,2 mM piruvato de sódio, 5 mg/mL de BSA e 75  $\mu$ g/mL amicacina (CIV1). No dia 3 (D3) do cultivo embrionário, para substituição do meio antigo por meio fresco foi utilizado o meio de CIV1 suplementado com 2,5 % de SFB (CIV2) e, no dia 5 (D5) foi utilizado meio CIV2 suplementado com de 1  $\mu$ g/mL de glicose (CIV3).

### *Tratamentos*

Para verificar o efeito do LPS durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial, foram utilizadas concentrações de: 0 (controle); 0,1; 1 e 5  $\mu$ g/mL de LPS durante a MIV ou o CIV, separadamente. As concentrações foram baseadas no acúmulo de LPS intrafolicular durante processos infecciosos *in vivo*, como a endometrite subclínica (0-0,04  $\mu$ g/mL) e endometrite clínica (0,043-0,875  $\mu$ g/mL) conforme reportado por Herath *et al.* (2007). Para isso, 1 mg de LPS de *E. coli* (O111:B4, SIGMA®, St. Louis, MO, USA) foi diluído em 1 mL de solução salina (0,9% de NaCl) como indicado pelo fabricante. Após, foram realizadas diluições seriadas no meio de MIV e de CIV respectivamente, até conseguir alíquotas concentradas de 40  $\mu$ L (MIV) e 20  $\mu$ L (CIV) e, que quando adicionadas ao volume total de meio para MIV (400  $\mu$ L) e CIV (200  $\mu$ L) atingissem as concentrações de 0,1, 1 e 5  $\mu$ g/mL de LPS, respectivamente. Após a diluição, as alíquotas foram armazenadas à -20°C até sua utilização.

### *Seleção e maturação de oócitos in vitro com LPS*

Para obtenção dos complexos cumulus oócito (COCs), foram aspirados folículos com diâmetro de 2 a 8 mm de ovários bovinos provenientes de abatedouros locais. Foram selecionados os COCs grau I, II e III (de Loos *et al.* 1991) e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=50 COCs/grupo) de acordo com a concentração de LPS no meio de MIV: 0  $\mu$ g/mL (controle), 0,1  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL e 5  $\mu$ g/mL. A maturação ocorreu à 39°C com 5% CO<sub>2</sub> por 22 horas.

### *Avaliação da maturação nuclear de oócitos desafiados com LPS*

Após a MIV, 50 COCs/grupo em 3 repetições (n=150 COCs/grupo) foram desnudados das células do cumulus utilizando hialuronidase (1mg/mL, SIGMA-ALDRICH®) e sucessivas pipetagens. Os oócitos desnudos foram fixados em PBS suplementado com 0,5% de glutaraldeído por 30 min, corados com Hoechst 33342 (SIGMA-ALDRICH®) por 15 min,

lavados em PBS por 5 min e transferidos a gotas de 10 µL PBS:Glycerol (1:1) acrescido com 0,5 µL/mL de Hoechst e acondicionados em lâminas para microscopia. Os oócitos foram avaliados em microscópio de fluorescência (Eclipse 80i, Nikon®, Melville, NY, USA) utilizando filtros de 330-385 nm. Os oócitos que apresentavam a extrusão do primeiro corpúsculo polar (metáfase II) foram considerados como maduros, e aqueles que não apresentaram essa configuração foram considerados como imaturos.

#### *Análises de expressão gênica nas células do cumulus de oócitos desafiados com LPS*

Após a MIV, aproximadamente 40 COCs/grupo foram desnudados através de sucessivas pipetagens. Os oócitos desnudos foram retirados e o meio de MIV contendo as células do cumulus foi transferido para microtubos, onde foram centrifugados à 1500 g por 5 min. Após, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em cada microtubo, para dissolver o pellet contendo as células do cumulus. As amostras foram homogeneizadas e armazenadas à -70°C até a extração de RNA.

O RNA total das células do cumulus foi extraído utilizando reagente Trizol, conforme as recomendações do fabricante. A concentração de RNA foi mensurada em espectrofotômetro (Nanodrop Lite, Thermo Fischer Scientific Inc., USA) e a pureza foi verificada através da relação de absorvância 260/280 nm. A transcrição reversa foi conduzida utilizando todo o RNA extraído (13 µL) no volume de reação de 20 µL, utilizando kit comercial (iScript Synthesis kit, BIORAD®, Hercules, CA, USA). As amostras foram incubadas à 25 °C por 5 min, 42 °C por 20 min e 95 °C por 1 min. Após, foram adicionados 40 µL de água ultra pura para diluir o cDNA.

A PCR em tempo real foi conduzida usando GoTaq (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega, Madison, WI, USA) no volume de 15 µL em termociclador *StepOnePlus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cada reação foi realizada em duplicata, usando 4 µL do cDNA total, 5 µL de GoTaq, 0,15 µL do DYE, 0,75 µL de cada *primer* (5 µM) e 4,35 µL de água ultra pura. Para cada ensaio foram realizados 45 ciclos (95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min) e no final de cada reação foi realizada uma curva de dissociação (*Melting*) para conferir a amplificação de um único produto de PCR.

Os genes *H2A histone type 1-C (HIST1H2AC)* e *18S ribosomal RNA (RN18S1)* foram usados como controle endógeno e os genes alvo foram associados à resposta inflamatória: *TLR4* e *tumor necrosis factor (TNF)* e; à expansão das células do cumulus e retomada da meiose: *amphiregulin (AREG)* e *epiregulin (EREG)*. As sequências dos *primers* estão descritas na tabela 1. A expressão relativa foi calculada utilizando a equação  $2^{A-B}/2^{C-D}$  como descrito por Rincon

*et al.* (2018), utilizando a média geométrica da expressão dos genes *HIST1H2AC* e *RN18S1* como controle endógeno.

#### *Fecundação e cultivo in vitro de oócitos desafiados com LPS*

Após a MIV, aproximadamente 50 COCs/grupo foram transferidos ao meio de FIV. A seleção espermática foi realizada com gradiente de densidade mini Percoll (Parrish *et al.* 1995), e a inseminação foi conduzida com concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Os COCs com os espermatozoides foram incubados por 20 h à 39°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O dia da inseminação foi considerado como o dia 0 (D0) do cultivo.

Após a FIV, os zigotos foram desnudados das células do cumulus através de sucessivas pipetagens e transferidos para o meio CIV1 sob óleo mineral. As estruturas foram cultivadas à 39°C com 5% de CO<sub>2</sub> por sete dias. No D3 foi avaliada a taxa de clivagem (clivados/COCs inseminados) e 70% do meio de cultivo foi substituído por meio CIV2. No D5, 70% do meio de cultivo foi substituído novamente por meio CIV3. No dia 7 (D7), foi avaliada a taxa de blastocisto (blastocistos/clivados). Para avaliação da taxa de clivagem e taxa de blastocisto foram conduzidas 10 repetições, totalizando 430 COCs inseminados/grupo.

#### *Contagem de células totais em embriões provenientes de oócitos desafiados com LPS*

No D7, os embriões provenientes de 3 repetições foram fixados em PBS acrescido de 0,5% de glutaraldeído por 30 min e após foram corados (PBS suplementado com 1 mg/mL de PVA e 5 µg/mL de Hoechst) por 15 min, lavados em PBS por 5 min e transferidos a lâminas para microscopia contendo PBS-Glicerol (1:1) com 0,5 µg/mL de Hoechst. A contagem total de células foi realizada a partir da identificação e contagem de núcleos em cada um dos embriões, essa etapa foi realizada em microscópio de fluorescência (Eclipse 80i, Nikon®, Melville, NY, USA) utilizando filtros de 330-385 nm. Assim, um total de 30 embriões/grupo foram avaliados.

#### *Cultivo de embriões desafiados com LPS in vitro*

Foram recuperados e selecionados COCs como descrito anteriormente e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos. Aproximadamente 50 COCs/grupo foram maturados *in vitro* sem LPS. Foi conduzida a FIV e 20 horas após, os prováveis zigotos foram desnudados das células do cumulus e transferidos ao meio CIV1 contendo: 0 µg/mL (controle), 0,1 µg/mL, 1 µg/mL ou 5 µg/mL de LPS. Essas concentrações foram mantidas durante os 7 dias de cultivo embrionário. No D3 foi avaliada a taxa de clivagem e 70% do meio de cultivo foi substituído



por meio CIV2. No D5, 70% do meio de cultivo foi substituído por meio CIV3 e, no D7 foi avaliada a taxa de blastocisto. Dessa forma foram conduzidas 4 repetições, totalizando 200 COCs inseminados/grupo. Adicionalmente, para contagem de células nos embriões, no D7 os embriões de 3 repetições foram fixados, corados com Hoechst, e avaliados em microscópio como descrito anteriormente. Dessa forma foram avaliados 30 embriões/grupo.

## ***Experimento 2 – Efeito do LPS in vivo***

### *Tratamento e animais*

Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil (Protocolo 9364-2018).

Foram utilizadas 16 novilhas de corte (*Bos taurus*), hígdas, em torno de 14 meses de idade, manejadas em sistema confinado. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos. O grupo LPS (n=8) recebeu 2 aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,5 µg/Kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich®) via intravenosa, com intervalo de 24 horas. O grupo controle (n=8) recebeu 2 aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com o mesmo intervalo. A primeira aplicação de LPS foi no dia 1 (D1), em relação ao protocolo de sincronização da onda folicular. A temperatura retal foi aferida com termômetro digital às 0, 4, 24 e 48 h em relação ao primeiro desafio com LPS.

### *Sincronização da onda folicular*

Quatorze dias antes de começar o protocolo, foi aplicada uma dose de 25 mg de PGF2α (i.m., Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil). No dia zero do protocolo (D0) foi realizada a colocação intravaginal do dispositivo liberador de progesterona (1g de P4, CIDR®, Zoetis®,) mais injeção de 2 mg de Benzoato de estradiol (Gonadiol, Zoetis®) e 25 mg de PGF2α (Lutalyse®, Zoetis) via i.m.

### *Coleta de ovários e produção de embriões in vitro*

No D5 do protocolo de sincronização todos os animais foram abatidos em frigorífico local. Foram coletados e identificados os ovários de cada animal e transportados ao laboratório em solução salina (NaCl 0,9 %) suplementada com antibiótico e aquecida à 30 °C.

Para obtenção dos COCs, foram aspirados os folículos com diâmetro de 2-8 mm de cada par de ovários por animal. Foi registrado o peso dos ovários, total de COCs recuperados e o número de COCs viáveis (graus I, II e III, de Loos *et al.*, 1991) de cada animal e, somente os

COCs viáveis foram destinados à maturação. A MIV, FIV e CIV foram conduzidas sob as mesmas condições do experimento 1, em gotas individuais para cada animal. A taxa de clivagem foi avaliada no D3 e a taxa de blastocisto no D7. Adicionalmente, ao sétimo dia os embriões obtidos de ambos os grupos (n=35) foram corados com Hoechst e realizada a contagem de células por embrião em microscópio, como descrito anteriormente.

### *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). A taxa de maturação nuclear de ambos experimentos e a taxa de clivagem e taxa de blastocisto do experimento 2 foram analisadas pelo teste de chi-quadrado. A taxa de clivagem, taxa de blastocisto, contagem de células por embrião e expressão gênica do experimento 1 foram analisadas pelo teste ANOVA. A contagem de células por embrião e expressão gênica do experimento 2 foram analisadas pelo teste de t. A temperatura foi analisada pelo teste Two-way ANOVA. Adicionalmente, foi aplicado o procedimento GLMS para observar o efeito linear, quadrático e/ou cúbico da dose de LPS sobre a taxa de clivagem e taxa de blastocisto do experimento 1 (SAS, Cary, NC, USA). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## **Resultados**

### ***Experimento 1 – Efeito do LPS in vitro***

A taxa de maturação nuclear dos oócitos desafiados com 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de LPS durante a MIV foi menor (39,4 e 39,6%, respectivamente) do que no controle (63,6%,  $P < 0,05$ ; Figura 1A). No entanto, a taxa de maturação nuclear do grupo 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS (55,7%) não diferiu do controle ( $P > 0,05$ ; Figura 1A).

A taxa de clivagem dos oócitos desafiados com LPS durante a MIV não diferiu entre grupos, sendo de 72,6, 72,7, 68,6 e 71,5% ( $P > 0,05$ ) para os grupos 0, 0,1, 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de LPS, respectivamente (Figura 1B). Da mesma forma, a taxa de blastocisto (40,1, 33,9, 41,8 e 40,8%) não diferiu entre os grupos 0, 0,1, 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de LPS, respectivamente ( $P > 0,05$ , Figura 2). Adicionalmente, não foi observado efeito linear ou quadrático na taxa de clivagem ou blastocisto, apenas uma tendência de apresentar um efeito cúbico na taxa de blastocisto foi encontrada ( $P = 0,057$ ). O número de células por embrião foi de  $64,2 \pm 4,1$  células/embrião no grupo controle e de  $64,5 \pm 4,7$ ,  $63,1 \pm 4,0$  e  $65,0 \pm 4,7$  células/embrião nos grupos desafiados com 0,1, 1 e 5  $\mu\text{g}$  de LPS durante a MIV e não apresentou diferença entre grupos ( $P > 0,05$ ; Figura 2B).

A expressão relativa dos genes *TLR4*, *TNF*, *AREG* e *EREG* nas células do cumulus foi semelhante entre grupos ( $P>0,05$ , Figura 3).

A taxa de blastocisto (36,4, 34,4, 32,2 e 35,2%, respectivamente) proveniente de zigotos desafiados com 0, 0,1, 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de LPS durante o CIV não diferiu entre grupos ( $P>0,05$ ; Figura 4A e B). Somado a isso, o número de células por embrião em D7, também não apresentou diferença entre os grupos ( $P>0,05$ ), sendo de  $58,5 \pm 4,9$  células/embrião no grupo controle e de  $54,0 \pm 3,9$ ,  $54,8 \pm 4,6$  e  $59,1 \pm 4,1$  células/embrião nos grupos desafiados com 0,1, 1 e 5  $\mu\text{g}$  de LPS durante o CIV (Figura 4C).

### **Experimento 2 – Efeito do LPS *in vivo***

Os animais que receberam LPS apresentaram maior temperatura retal 4 horas após cada desafio ( $P<0,05$ ; Figura 5). Na hora 4 a temperatura do grupo LPS foi de  $39,9 \pm 0,19$  °C e na hora 28 foi de  $40,2 \pm 0,4$  °C, comparado com o grupo controle que apresentou temperaturas de  $39,1 \pm 0,1$  °C ( $P<0,05$ ) e  $39,2 \pm 0,1$  °C ( $P<0,05$ ), respectivamente. Nas horas 0 ( $38,6 \pm 0,1$  e  $38,7 \pm 0,1$  °C), 24 ( $38,6 \pm 0,1$  e  $38,8 \pm 0,2$  °C) e 48 ( $38,7 \pm 0,1$  e  $38,9 \pm 0,1$  °C) as temperaturas não diferiram entre os grupos LPS e controle, respectivamente ( $P>0,05$ ).

Não houve diferença entre grupos no peso dos ovários, estruturas totais aspiradas/animal, oócitos viáveis/animal e oócitos/grupo ( $P>0,05$ , Tabela 2). A taxa de clivagem dos oócitos provenientes das novilhas que receberam LPS foi menor (54,3 %; 38/70) do que no grupo controle (70,2%; 73/104;  $P=0,032$ ; Figura 6A). A taxa de blastocisto proveniente de oócitos de novilhas desafiadas ou não com LPS não diferiu entre grupos, sendo de 31,6 % (12/38) e 31,5 % (23/73), respectivamente ( $P>0,05$ ; Figura 6B). Da mesma forma, o número de células por embrião não diferiu entre grupos ( $P>0,05$ ), sendo de  $48,5 \pm 4,9$  no grupo controle e de  $50,7 \pm 8,9$  células/embrião no grupo desafiado com LPS (Figura 6C).

A expressão relativa dos genes *TLR4*, *TNF*, *AREG* e *EREG* nas células do cumulus de oócitos provenientes de novilhas desafiadas ou não com LPS não diferiu entre grupos ( $P>0,05$ ; Figura 7).

### **Discussão**

No presente estudo buscamos avaliar os efeitos da inflamação através da exposição de oócitos bovinos ao LPS *in vitro* e *in vivo*, sobre a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial.

Os resultados do experimento *in vitro* mostram que as concentrações de 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de LPS durante a MIV diminuíram em ~ 24% o número oócitos que conseguiram retomar a meiose

e atingir a maturação nuclear (Metáfase II), caracterizada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar. De forma semelhante, Magata e Shimizu (2017) encontraram que o LPS (nas doses de 0,01; 0,1; 1, e 10 µg/mL) durante a MIV afetou negativamente a maturação nuclear. Além disso, Bromfield e Sheldon (2011) e Zhao *et al.* (2017) mostraram que 10 µg/mL de LPS diminuíram a taxa de maturação nuclear, porém 1 µg/mL de LPS não teve efeito nenhum. A maturação oocitária é um processo complexo, necessário para que o oócito se torne competente (Combelles *et al.* 2002) e com isso, seja capaz de retomar a meiose, adquira a capacidade de ser fecundado e desenvolver até o estágio de blastocisto e conseqüentemente gerar uma prenhez (Farin *et al.* 2007). Nesse sentido, Zhao *et al.* (2017) mostraram que o LPS é capaz de atrasar a progressão do ciclo celular e interromper a formação do fuso meiótico, o que pode explicar a redução na taxa de maturação nuclear nesse estudo.

Durante a oogênese, as células somáticas que circundam o oócito proliferam-se e diferenciam-se em células do cumulus, formando os COCs (van den Hurk e Zhao 2005). Essas células cumprem um papel importante na aquisição da competência oocitária, permitindo a transferência de nutrientes, hormônios, aminoácidos, fatores de crescimento e sinais estimuladores ou inibidores da meiose (van den Hurk e Zhao 2005). Sendo assim, umas das possíveis rotas de ação do LPS, seria através das células do cumulus, comprometendo a competência oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário. Para comprovar isso, nós avaliamos nas células do cumulus a expressão dos genes: *TLR4*, o receptor responsável pelo reconhecimento do LPS e ativação da resposta inflamatória (Takeuchi e Akira 2010); o *TNF $\alpha$* , uma das citocinas envolvidas na sinalização da resposta inflamatória (Takeuchi e Akira 2010) e; *AREG* e *EREG*, que são proteínas envolvidas nos processos de expansão das células do cumulus e maturação nuclear e citoplasmática (Smitz *et al.* 1998; Richards *et al.* 2002). No entanto, não encontramos nenhum efeito do LPS durante a MIV sobre a expressão desses genes, indicando que as concentrações de LPS utilizadas nesse experimento não foram capazes de gerar uma resposta inflamatória detectável e comprometer as funções das células do cumulus. Em estudos anteriores, foi observada a redução da expressão de *TLR4* e *TNF $\alpha$*  nas células da granulosa do folículo pré-ovulatório (Campos *et al.* 2017), indicando que o efeito pode não ser direto do LPS e sim devido à resposta sistêmica gerada pelo LPS.

Contudo, mesmo que 1 e 5 µg/mL de LPS durante a MIV tenham reduzido a maturação nuclear dos oócitos, isto não foi suficiente para reduzir o desenvolvimento embrionário inicial, suportado pela similaridade entre grupos na taxa de clivagem, taxa de blastocisto e número de células por embrião. Nosso resultado da taxa de clivagem condiz com o reportado por Magata e Shimizu (2017) onde 0,001, 0,01; 0,1; 1 e 10 µg/mL de LPS durante a MIV não afetaram a

taxa de clivagem. Em contrapartida, o mesmo autor encontrou que essas concentrações de LPS diminuíram a taxa de blastocisto, assim como a qualidade dos mesmos. Magata e Shimizu (2017) atribuem esse efeito à perturbação da competência oocitária a nível de maturação nuclear (inibindo a progressão para metáfase II) e citoplasmática (afetando o status mitocondrial). Somado a isso, Zhao *et al.* (2017) evidenciaram que oócitos expostos ao LPS durante a MIV apresentaram aumento de espécies reativas de oxigênio, aumento na expressão da *caspase 3* e *BAX* (genes pró-apoptóticos) e diminuição na expressão do *Bcl-2* e *XIAP* (genes anti-apoptóticos).

Visto que o LPS durante a MIV não afetou o desenvolvimento embrionário, utilizamos as mesmas concentrações de LPS para desafiar zigotos durante os 7 dias de cultivo embrionário, para determinar se o LPS poderia ter algum efeito após a fecundação. Com isso, encontramos que 0,1, 1 ou 5 µg/mL de LPS durante o cultivo de zigotos não afetou o desenvolvimento embrionário inicial, uma vez que a taxa de clivagem, taxa de blastocisto e número de células por embrião não foram afetados pelo tratamento com LPS. Embora não haja estudos anteriores com avaliação dos efeitos diretos da exposição ao LPS durante os 7 dias após fecundação, pode ser observado que o LPS não afetou o desenvolvimento embrionário. Isto pode se dever ao fato de que após a fecundação até a ativação do genoma embrionário, que ocorre no estágio entre 8 e 16 células na espécie bovina, o desenvolvimento embrionário é coordenado pelos transcritos armazenados durante o desenvolvimento e maturação oocitária (Mamo *et al.* 2011). Com isso, se a maturação ocorreu de forma adequada, o LPS não foi capaz de afetar o desenvolvimento embrionário inicial. Embora a taxa de blastocisto e número de células por embrião sejam indicadores de qualidade de desenvolvimento, nós não avaliamos a nível molecular se ocorreram alterações após a ativação do genoma embrionário, o que poderia levar a falhas na implantação do embrião, ou falhas no desenvolvimento embrionário após o sétimo dia. É sugerido que as células do cumulus têm a capacidade de responder ao LPS com uma cascata de reações inflamatórias (Magata e Shimizu 2017), porém ainda não foi relatado que o embrião na fase pré-implantacional possua a capacidade intrínseca de responder a estes estímulos.

Devido a esta controvérsia com os efeitos diretos e indiretos do LPS e sua capacidade de afetar a fertilidade, em nosso segundo experimento foram realizadas duas aplicações de LPS intravenoso em novilhas durante o desenvolvimento de uma nova onda folicular. Os resultados do experimento *in vivo* mostram que a dose utilizada de LPS foi capaz de gerar uma resposta inflamatória sistêmica, suportado pelo aumento de temperatura corporal 4 horas após cada desafio com LPS, conforme esperado (Waldron *et al.* 2003; Carroll *et al.* 2009; Campos *et al.* 2017). Em um estudo anterior, encontramos que uma única aplicação de LPS intravenoso além

de gerar uma resposta inflamatória sistêmica foi capaz de alterar a expressão de genes associados à cascata esteroidogênica e inflamatória nas células da granulosa do folículo dominante (Campos *et al.* 2017). Além disso, o LPS alterou a atividade sérica e folicular da paraoxonase-1 (PON1), uma proteína de fase aguda negativa, que reduz seus níveis circulantes em função das citocinas produzidas durante o processo inflamatório (Campos *et al.* 2017).

Assim, pelo nosso conhecimento este é o primeiro estudo que avalia o efeito de duas infusões de LPS sobre o oócito e desenvolvimento embrionário inicial. Nesse segundo estudo, apesar das alterações sistêmicas desencadeadas pelo LPS, o peso dos ovários, número de estruturas totais por animal e oócitos viáveis por animal, não foram afetados pelo desafio com LPS. Estudos mostram que o LPS é capaz de ter efeitos diretos e indiretos a nível de folículo ovariano. Nesse sentido, Bromfield e Sheldon (2013) mostraram que em camundongos o LPS reduz o número de folículos primordiais, associado à hiperativação desses folículos e aumento da atresia folicular. Além disso o LPS pode alterar a síntese de hormônios esteroides no ovário (Herath *et al.* 2007; Campos *et al.* 2017; Magata e Shimizu 2017), e com isso poderia afetar o desenvolvimento do oócito e subsequente desenvolvimento embrionário. Isto indica, que diferente dos efeitos *in vitro*, que ficam confinados a interação do LPS com as células do cumulus, os efeitos *in vivo* podem derivar de vários mecanismos de interação do LPS com o organismo.

Nesse sentido o desafio com LPS intravenoso reduziu em cerca de 16% a taxa de clivagem. No experimento *in vitro* nós observamos que o LPS pode afetar negativamente a maturação nuclear, além disso outros estudos mostram que o LPS pode interromper a formação do fuso meiótico, dificultar a reorganização e função de mitocôndrias, aumentar o status oxidativo e modificar o padrão de metilação no oócito (Magata e Shimizu 2017; Zhao *et al.* 2017). Isso somado aos efeitos da resposta inflamatória sistêmica pode explicar a diminuição na taxa de clivagem. Assim, observamos que *in vivo* a taxa de clivagem foi diminuída pelo LPS, porém *in vitro* o mesmo não ocorreu. Isto nos sugere que os efeitos do LPS não se dão somente através de interação direta com as células do cumulus, ainda sugerem o envolvimento de mecanismos sistêmicos que irão sim comprometer o processo de maturação e clivagem. Como a resposta inflamatória sistêmica é altamente complexa e mediada por inúmeros fatores, mais estudos detalhados são necessários para entender quais destes podem ser especificamente responsáveis por diminuir a viabilidade oocitária e comprometer a fertilidade. Apesar disso, a taxa de blastocisto de oócitos provenientes de novilhas desafiadas *in vivo* com LPS não foi alterada. Sugerindo que aqueles oócitos que clivaram e passaram este desafio imposto pelo

processo inflamatório sistêmico têm capacidade de desenvolvimento similar ao do grupo controle.

Contudo, fatores como o tempo de exposição, via de administração e dosagem do LPS, podem dificultar a interpretação dos efeitos diretos ou indiretos dessa endotoxina. Alguns estudos utilizam altas doses de LPS para entender melhor os efeitos deste sobre a reprodução e muitas as vezes, essas doses ultrapassam as concentrações de LPS derivadas de processos infecciosos *in vivo*. Por exemplo, as concentrações de LPS que nós utilizamos *in vitro*, foram baseadas no reportado por Herath *et al.* (2007) no fluido folicular de vacas com endometrite subclínica (0-0,04 µg/mL) ou clínica (0,043-0,875 µg/mL). No entanto, Magata *et al.* (2015), encontraram que vacas diagnosticadas com metrite clínica apresentavam concentrações foliculares de 0,0001- 0,001 µg/mL de LPS, evidenciando uma divergência entre os achados *in vivo*. Já em experimentos *in vivo*, estudos têm utilizado doses que variam de 0,5 a 10 µg/Kg de peso corporal de LPS (Bidne *et al.* 2018). Nós utilizamos a menor dose de LPS que demonstrou gerar uma resposta inflamatória em bovinos (Waldron *et al.* 2003). Somado a isso, Guerville e Boudry (2016) sugerem um cuidado especial na interpretação dos resultados da mensuração do LPS sérico e folicular, devido às diferenças e limitações dos testes laboratoriais. Por exemplo, alguns testes medem a atividade biológica da endotoxina, e a maioria destes não diferencia o LPS livre do que encontra-se ligado aos mediadores inflamatórios, como a CD14 e *Lipopolysaccharide binding protein* (LBP). Com isso dificulta-se ainda mais simular de forma experimental os eventos que acontecem *in vivo*.

Em conclusão, a exposição de oócitos bovinos ao LPS durante a maturação oocitária *in vitro* diminui a taxa de maturação nuclear, entretanto, não foi capaz de afetar o desenvolvimento embrionário inicial. Da mesma forma, a exposição de zigotos ao LPS durante o cultivo *in vitro* não afetou o desenvolvimento embrionário. Já a infusão de LPS em novilhas diminuiu a taxa de clivagem, porém o desenvolvimento embrionário foi semelhante ao do grupo não desafiado com LPS. Com isso, os efeitos diretos ou sistêmicos do LPS a nível de oócito e embrião ainda não estão bem claros, fazendo-se necessário realizar mais estudos que permitam esclarecer como o LPS pode afetar a fertilidade bovina. Uma das principais dificuldades na realização dos estudos é mimetizar a nível folicular a interação ou modulação do LPS e a inflamação, similar à o que acontece *in vivo*.

### **Conflitos de interesse**

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

## Agradecimentos

Esse estudo foi financiado pela FAPERGS, CNPq, CAPES e EMBRAPA.

## Referências

- Bettegowda, A., Patel, O.V., Ireland, J.J., and Smith, G.W. (2006) Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Mol Reprod Dev* **73**(3), 267-78
- Bidne, K.L., Dickson, M.J., Ross, J.W., Baumgard, L.H., and Keating, A.F. (2018) Disruption of female reproductive function by endotoxins. *Reproduction* **155**(4), R169-R181
- Bromfield, J.J., and Sheldon, I.M. (2011) Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. *Endocrinology* **152**(12), 5029-40
- Bromfield, J.J., and Sheldon, I.M. (2013) Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. *Biol Reprod* **88**(4), 98
- 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., and Schneider, A. (2017) 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* **89**, 244-249
- Carroll, J.A., Reuter, R.R., Chase, C.C., Jr., Coleman, S.W., Riley, D.G., Spiers, D.E., Arthington, J.D., and Galyean, M.L. (2009) Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. *Innate Immun* **15**(2), 81-9
- Combelles, C.M., Cekleniak, N.A., Racowsky, C., and Albertini, D.F. (2002) Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum. Reprod.* **17**(4), 1006-16
- de Loos, F., Kastrop, P., Van Maurik, P., Van Beneden, T.H., and Kruij, T.A. (1991) Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* **28**(3), 255-9



- Farin, C.E., Rodriguez, K.F., Alexander, J.E., Hockney, J.E., Herrick, J.R., and Kennedy-Stoskopf, S. (2007) The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* **98**(1-2), 97-112
- Guerville, M., and Boudry, G. (2016) Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **311**(1), G1-G15
- Hakogi, E., Tamura, H., Tanaka, S., Kohata, A., Shimada, Y., and Tabuchi, K. (1989) Endotoxin levels in milk and plasma of mastitis-affected cows measured with a chromogenic limulus test. *Vet Microbiol* **20**(3), 267-74
- Herath, S., Lilly, S.T., Santos, N.R., Gilbert, R.O., Goetze, L., Bryant, C.E., White, J.O., Cronin, J., and Sheldon, I.M. (2009) Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod Biol Endocrinol* **7**, 55
- Herath, S., Williams, E.J., Lilly, S.T., Gilbert, R.O., Dobson, H., Bryant, C.E., and Sheldon, I.M. (2007) Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction* **134**(5), 683-93
- Kohchi, C., Inagawa, H., Nishizawa, T., Yamaguchi, T., Nagai, S., and Soma, G. (2006) Applications of lipopolysaccharide derived from *Pantoea agglomerans* (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory. *J Biosci Bioeng* **102**(6), 485-96
- Krause, A.R., Pfeifer, L.F., Montagner, P., Weschenfelder, M.M., Schwegler, E., Lima, M.E., Xavier, E.G., Brauner, C.C., Schmitt, E., Del Pino, F.A., Martins, C.F., Correa, M.N., and Schneider, A. (2014) Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. *Anim Reprod Sci* **145**(1-2), 8-14
- Lavon, Y., Ezra, E., Leitner, G., and Wolfenson, D. (2011a) Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *J Dairy Sci* **94**(9), 4538-45
- Lavon, Y., Leitner, G., Klipper, E., Moallem, U., Meidan, R., and Wolfenson, D. (2011b) Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol* **40**(2), 98-109
- LeBlanc, S.J., Lissemore, K.D., Kelton, D.F., Duffield, T.F., and Leslie, K.E. (2006) Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci* **89**(4), 1267-79
- Luttgenau, J., Lingemann, B., Wellnitz, O., Hankele, A.K., Schmicke, M., Ulbrich, S.E., Bruckmaier, R.M., and Bollwein, H. (2016) Repeated intrauterine infusions of

- lipopolysaccharide alter gene expression and lifespan of the bovine corpus luteum. *J Dairy Sci* **99**(8), 6639-6653
- Magata, F., Horiuchi, M., Echizenya, R., Miura, R., Chiba, S., Matsui, M., Miyamoto, A., Kobayashi, Y., and Shimizu, T. (2014) Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. *Anim Reprod Sci* **144**(1-2), 6-13
- Magata, F., Ishida, Y., Miyamoto, A., Furuoka, H., Inokuma, H., and Shimizu, T. (2015) Comparison of bacterial endotoxin lipopolysaccharide concentrations in the blood, ovarian follicular fluid and uterine fluid: a clinical case of bovine metritis. *J Vet Med Sci* **77**(1), 81-4
- Magata, F., and Shimizu, T. (2017) Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. *Reprod Toxicol* **71**, 1-7
- Mamo, S., Carter, F., Lonergan, P., Leal, C.L., Al Naib, A., McGettigan, P., Mehta, J.P., Evans, A.C., and Fair, T. (2011) Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. *BMC Genomics* **12**, 151
- Mateus, L., Lopes da Costa, L., Diniz, P., and Ziecik, A.J. (2003) Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Anim Reprod Sci* **76**(3-4), 143-54
- Moresco, E.M., LaVine, D., and Beutler, B. (2011) Toll-like receptors. *Curr Biol* **21**(13), R488-93
- Opsomer, G., Grohn, Y.T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H., and de Kruif, A. (2000) Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* **53**(4), 841-57
- Parrish, J.J., Krogenaes, A., and Susko-Parrish, J.L. (1995) Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* **44**(6), 859-69
- Price, J.C., Bromfield, J.J., and Sheldon, I.M. (2013) Pathogen-associated molecular patterns initiate inflammation and perturb the endocrine function of bovine granulosa cells from ovarian dominant follicles via TLR2 and TLR4 pathways. *Endocrinology* **154**(9), 3377-86
- Richards, J.S., Russell, D.L., Ochsner, S., and Espey, L.L. (2002) Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol* **64**, 69-92
- Rincon, J.A.A., Pradiee, J., Remiao, M.H., Collares, T.V., Mion, B., Gasperin, B.G., Tomazele Rovani, M., Correa, M.N., Pegoraro, L.M.C., and Schneider, A. (2018) Effect of high-

- density lipoprotein on oocyte maturation and bovine embryo development in vitro. *Reprod Domest Anim*
- Rovani, M.T., Ilha, G.F., Gasperin, B.G., Nobrega, J.E., Jr., Siddappa, D., Glanzner, W.G., Antoniazzi, A.Q., Bordignon, V., Duggavathi, R., and Goncalves, P.B.D. (2017) Prostaglandin F2alpha-induced luteolysis involves activation of Signal transducer and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. *Mol Reprod Dev* **84**(6), 486-494
- Sheldon, I.M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., and Schuberth, H.J. (2009) Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* **81**(6), 1025-32
- Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A.N., Pfeiffer, D.U., and Dobson, H. (2002) Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* **123**(6), 837-45
- Sheldon, I.M., Rycroft, A.N., and Zhou, C. (2004) Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. *Vet Rec* **154**(10), 289-93
- Smitz, J., Cortvrindt, R., and Hu, Y. (1998) Epidermal growth factor combined with recombinant human chorionic gonadotrophin improves meiotic progression in mouse follicle-enclosed oocyte culture. *Hum Reprod* **13**(3), 664-9
- Soto, P., Natzke, R.P., and Hansen, P.J. (2003) Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2alpha, and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol* **50**(3), 263-72
- Suzuki, C., Yoshioka, K., Iwamura, S., and Hirose, H. (2001) Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. *Domest Anim Endocrinol* **20**(4), 267-78
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**(6), 805-20
- van den Hurk, R., and Zhao, J. (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **63**(6), 1717-51
- Waldron, M.R., Nishida, T., Nonnecke, B.J., and Overton, T.R. (2003) Effect of lipopolysaccharide on indices of peripheral and hepatic metabolism in lactating cows. *J Dairy Sci* **86**(11), 3447-59

- Williams, E.J., Fischer, D.P., Noakes, D.E., England, G.C., Rycroft, A., Dobson, H., and Sheldon, I.M. (2007) The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* **68**(4), 549-59
- Zhao, S.J., Pang, Y.W., Zhao, X.M., Du, W.H., Hao, H.S., and Zhu, H.B. (2017) Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte in vitro and its possible mechanisms. *Oncotarget* **8**(3), 4656-4667

## Tabelas

**Tabela 1.** Genes e respectivas sequências analisadas nesse estudo.

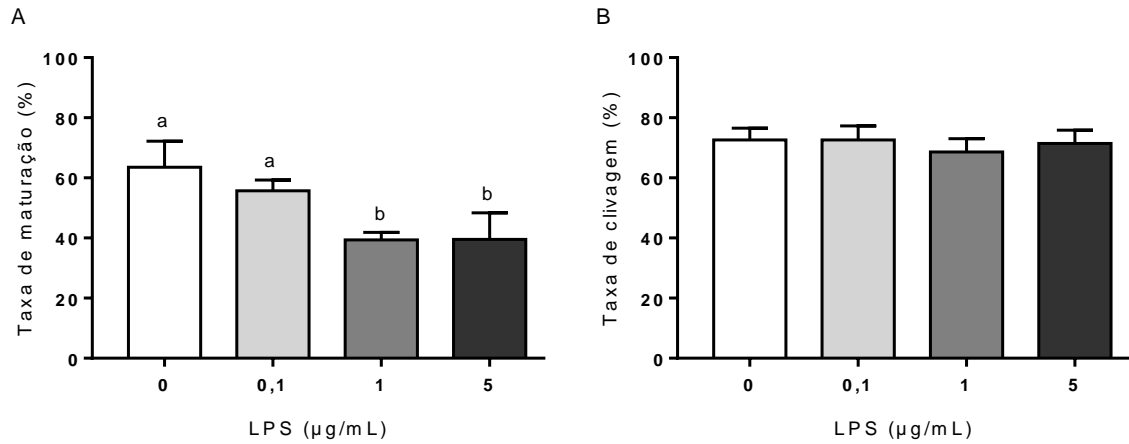
| Gene             | Sequência 5' → 3'                                       | No. Aceso      | Referência                      |
|------------------|---------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------|
| <i>HIST1H2AC</i> | F: GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG<br>R: TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC    | NM_001205596.1 | Bettegowda <i>et al.</i> (2006) |
| <i>RN18S1</i>    | F: CCTTCCGCGAGGATCCATTG<br>R: CGCTCCCAAGATCCAACACTAC    | NR_036642.1    | Rovani <i>et al.</i> (2017)     |
| <i>TLR4</i>      | F: CTTGCGTACAGGTTGTTCTCTAA<br>R: CTGGGAAGCTGGAGAAGTTATG | NM_174198.6    | Campos <i>et al.</i> (2017)     |
| <i>TNF</i>       | F: AGCACAGAAAGCATGATCCG<br>R: CTGATGAGAGGGAGGCCATT      | NM_173966.3    | (Campos <i>et al.</i> (2017))   |

**Tabela 2.** Parâmetros avaliados em ovários de novilhas desafiadas ou não com LPS.

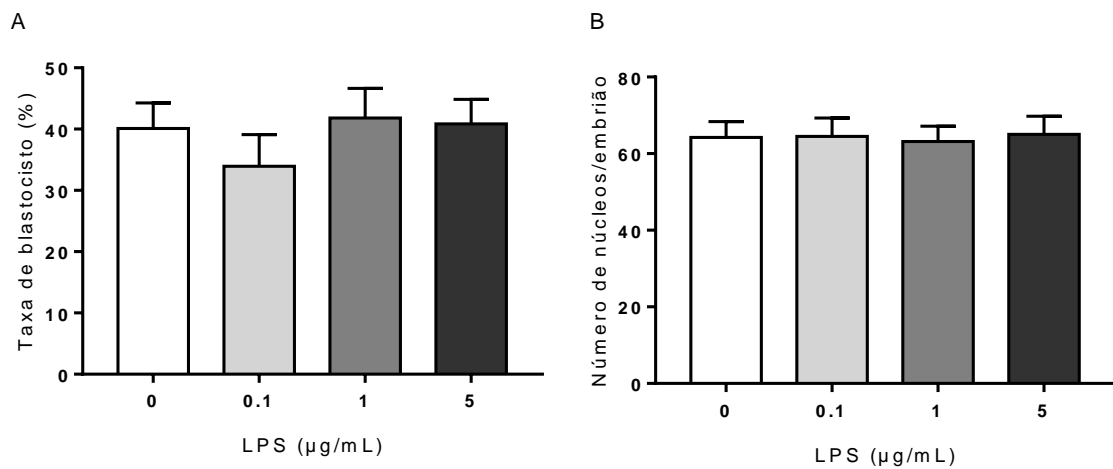
| Parâmetro                 | Controle         | LPS             | Valor de P |
|---------------------------|------------------|-----------------|------------|
| Peso ovários (g)*         | 9,76 ± 1,4       | 8,73 ± 1,0      | 0,56       |
| Estruturas totais/animal* | 20,13 ± 4,6      | 15,88 ± 3,0     | 0,45       |
| Oócitos viáveis/animal*   | 13,5 ± 3,6       | 9,75 ± 2,1      | 0,39       |
| Oócitos viáveis grupo     | 67,1 % (108/161) | 61,4 % (78/127) | 0,76       |

\*Valores expressados como média ± erro padrão.

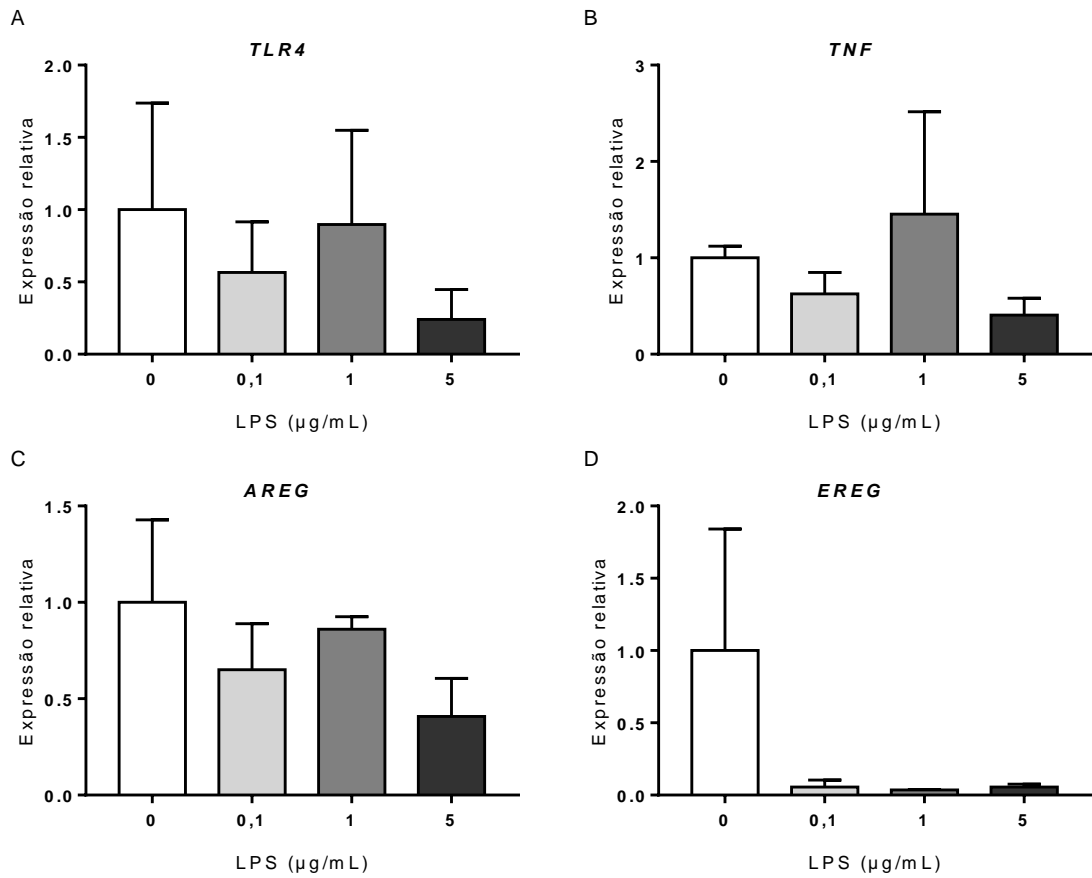
## Figures



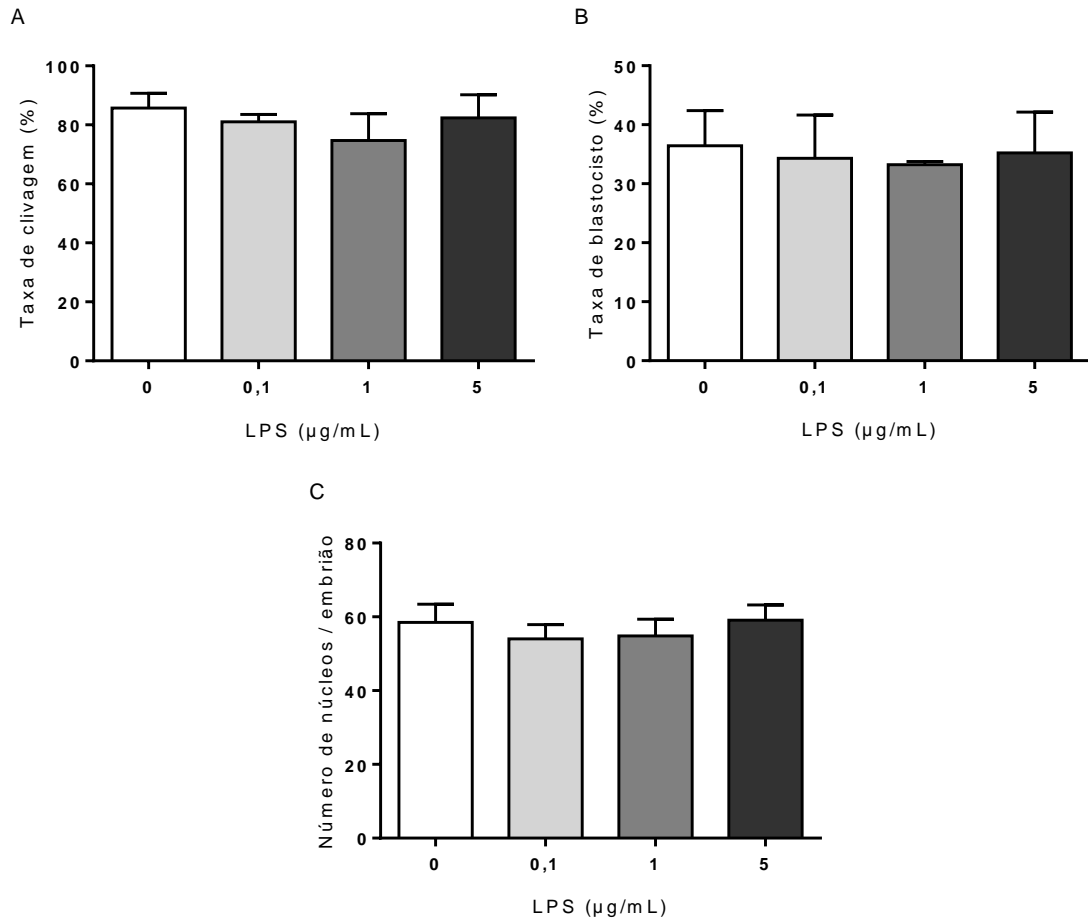
**Fig. 1.** Taxa de maturação nuclear (A) e taxa de clivagem (B) de óocitos bovinos desafiados com lipopolissacarídeos (LPS) durante a maturação oocitária *in vitro* (MIV). Os óocitos foram maturados durante 22 h com 0 (controle), 0,1, 1, ou 5 µg/mL de LPS. A taxa de maturação foi analisada pelo teste de chi-quadrado e a taxa de clivagem pelo teste ANOVA. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).



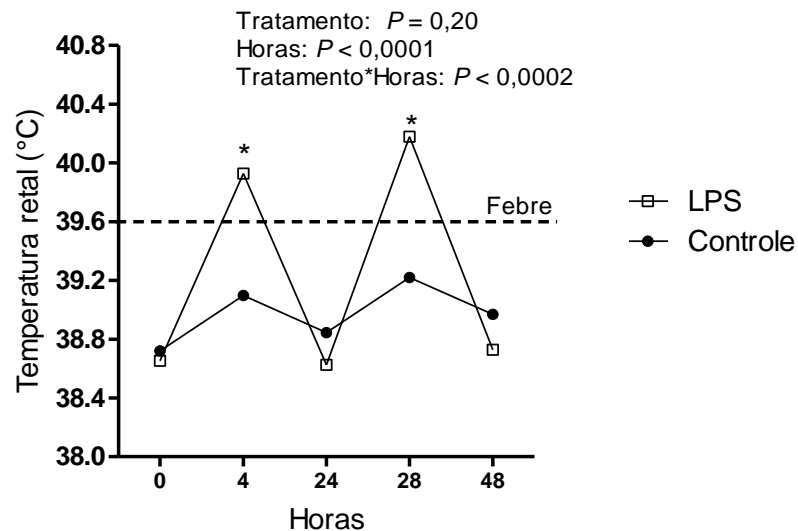
**Fig. 2.** Taxa de blastocisto (A) e número de núcleos/embrião de óocitos bovinos desafiados com lipopolissacarídeos (LPS) durante a maturação oocitária *in vitro* (MIV). Os óocitos foram maturados durante 22 h com 0 (controle), 0,1, 1, ou 5 µg/mL de LPS. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA



**Fig. 3.** Expressão relativa dos genes *TLR4* (A), *TNF* (B), *AREG* (C) e *EREG* (D) nas células do cumulus de oócitos desafiados com lipopolissacarídeos (LPS) durante a maturação oocitária *in vitro*. Os oócitos foram maturados durante 22 h com 0 (controle), 0,1, 1, ou 5 µg/mL de LPS. A análise foi realizada pelo teste ANOVA.

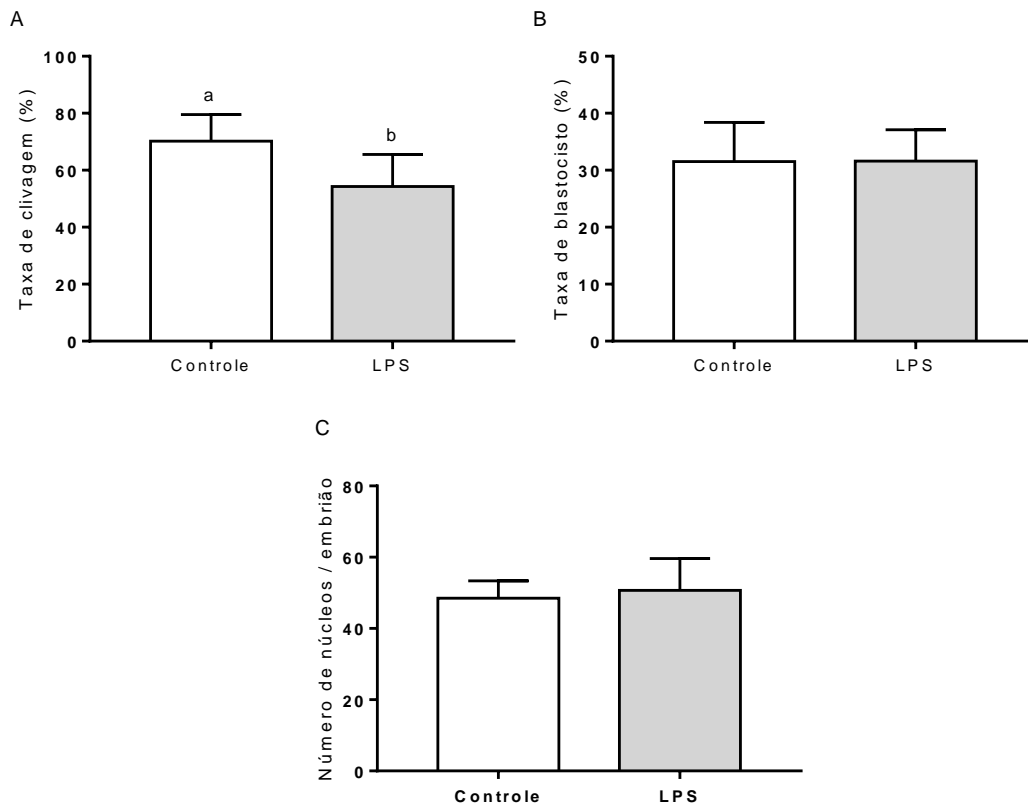


**Fig. 4.** Taxa de clivagem (A), taxa de blastocisto (B) e número de núcleos/embrião de zigotos desafiados com lipopolissacarídeos (LPS) durante o cultivo *in vitro* (CIV). Os zigotos foram cultivados durante 7 dias com 0 (controle), 0,1, 1, ou 5 µg/mL de LPS. OS dados foram analisados pelo teste ANOVA.

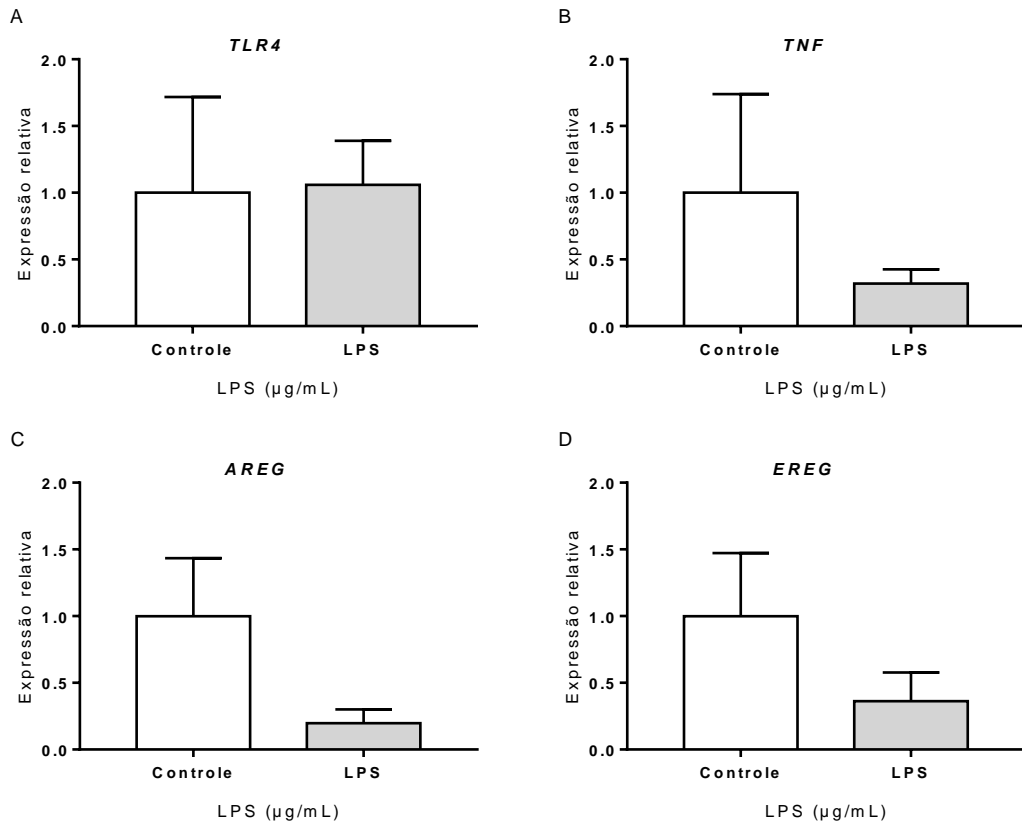


**Fig. 5.** Temperatura retal de novilhas que foram desafiadas ou não com lipopolissacarídeos (LPS) às 0 e 24 horas, analisada pelo teste Two-way ANOVA.





**Fig. 6.** Taxa de clivagem (A), taxa de blastocisto (B) e número de núcleos/embrião (C) de oócitos provenientes de novilhas desafiadas (n=8) ou não (n=8) com lipopolissacarídeos (LPS). As novilhas do grupo controle receberam duas aplicações de 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) via intravenosa, com intervalo de 24 h, o grupo LPS recebeu com o mesmo intervalo duas aplicações de 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) contendo 0,5 µg/Kg de peso corporal de LPS, via intravenosa. A taxa de clivagem e taxa de blastocisto foram analisadas através do teste de chi-quadrado e, o número de núcleos/embrião foi analisado pelo teste de t. Letras diferentes indicam diferença estatística (P<0,05).



**Fig. 7.** Expressão relativa dos genes *TLR4* (A), *TNF* (B), *AREG* (C) e *EREG* (D) nas células do cumulus de oócitos provenientes de novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeos (LPS). As novilhas do grupo controle receberam duas aplicações de 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) via intravenosa, com intervalo de 24 h, o grupo LPS recebeu com o mesmo intervalo duas aplicações de 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%) contendo 0,5 µg/Kg de peso corporal de LPS, via intravenosa. Os dados foram analisados pelo teste de t.

#### 4 Considerações Finais

A resposta inflamatória está envolvida em eventos fisiológicos normais como o parto e ovulação, assim como na defesa do organismo frente a processos infecciosos, dentre outros. No entanto, a resposta inflamatória é um processo complexo que envolve a produção, sinalização e interação de inúmeros mediadores, que por sua vez, podem acarretar efeitos indiretos sobre a fertilidade.

Nesse sentido, nós encontramos que a adição do complexo HDL/ApoAI do plasma humano durante a maturação oocitária *in vitro*, na ausência de atividade da PON1, diminui o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos. Além disso, a exposição de oócitos bovinos ao LPS durante a maturação oocitária *in vitro* diminui a taxa de maturação nuclear, entretanto, não foi capaz de afetar o desenvolvimento embrionário inicial. Da mesma forma, a exposição de zigotos ao LPS durante o cultivo *in vitro* não afetou o desenvolvimento embrionário. Ainda, a infusão de LPS em novilhas diminuiu a taxa de clivagem, porém não afetou o desenvolvimento embrionário. Isso mostra ainda mais a complexidade da resposta inflamatória, os mediadores e mecanismos locais e sistêmicos envolvidos neste processo. Portanto, ainda são necessários mais estudos que permitam elucidar como o complexo HDL/ApoAI/PON1 interage e afeta a fertilidade dos bovinos. Da mesma forma, os efeitos diretos ou sistêmicos do LPS a nível de oócito e embrião ainda não estão bem claros, fazendo-se necessário realizar mais estudos que permitam esclarecer como o LPS pode afetar a fertilidade bovina. Sendo uma das dificuldades, mimetizar a nível folicular a interação ou modulação do LPS e a inflamação, similar à o que acontece *in vivo*.

Contudo, ressalta-se que o LPS poder ter várias origens diferentes, e não somente derivado de processos infecciosos. Por exemplo, em bovinos que apresentam quadros de acidoses ruminal, há liberação de LPS proveniente das bactérias ruminais e, em consequência passagem do LPS para a corrente circulatória. Além disso, mudanças na permeabilidade da parede do intestinal também podem permitir a entrada de LPS à corrente sanguínea, proveniente das bactérias intestinais.

Dessa forma, mudanças drásticas na alimentação ou mesmo fatores estressantes como estresse térmico, podem fazer com que ocorra entrada de LPS à corrente circulatória, promova a resposta inflamatória e liberação dos mediadores inflamatórios que podem afetar a fertilidade. Neste sentido, são necessários mais estudos que permitam esclarecer como diversos fatores exógenos ou endógenos podem afetar o status inflamatório, e desta forma afetar a performance reprodutiva.

Conclui-se que a interação dos componentes do complexo HDL-ApoAI-PON1, podem afetar a fertilidade bovina, a nível de oócito e subsequente desenvolvimento embrionário. Da mesma forma o LPS, pode afetar o oócito e desenvolvimento embrionário, entretanto, os mecanismos pelos quais isso acontecem parecem ser diferentes *in vitro* e *in vivo*, provavelmente pelo envolvimento de mecanismos sistêmicos e locais.

## Referências

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

AGRAWAL, V.; JAISWAL, M.K.; JAISWAL, Y.K. Lipopolysaccharide-induced modulation in the expression of progesterone receptor and estradiol receptor leads to early pregnancy loss in mouse. **Zygote**, v.21, n.4, p.337-344, 2013.

ASAF, S.; LEITNER, G.; FURMAN, O.; LAVON, Y.; KALO, D.; WOLFENSON, D.; ROTH, Z. Effects of Escherichia coli- and Staphylococcus aureus-induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. **Reproduction**, v.147, n.1, p.33-43, 2014.

BAUCHART, D.; DURAND, D.; LAPLAUD, P.M.; FORGEZ, P.; GOULINET, S.; CHAPMAN, M.J. Plasma lipoproteins and apolipoproteins in the preruminant calf, Bos spp: density distribution, physicochemical properties, and the in vivo evaluation of the contribution of the liver to lipoprotein homeostasis. **Journal of lipid research**, v.30, n.10, p.1499-1514, 1989.

BAUMAN, D.E.; CURRIE, W.B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of dairy science**, v.63, n.9, p.1514-1529, 1980.

BEAM, S.W.; BUTLER, W.R. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. **Journal of dairy science**, v.81, n.1, p.121-131, 1998.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O.V.; IRELAND, J.J.; SMITH, G.W. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. **Molecular reproduction and development**, v.73, n.3, p.267-278, 2006.

BEUTLER, B.A. TLRs and innate immunity. **Blood**, v.113, n.7, p.1399-1407, 2009.  
BIANCHI, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of leukocyte biology**, v.81, n.1, p.1-5, 2007.

- BIDNE, K.L.; DICKSON, M.J.; ROSS, J.W.; BAUMGARD, L.H.; KEATING, A.F. Disruption of female reproductive function by endotoxins. **Reproduction**, v.155, n.4, p.169-181, 2018.
- BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of dairy science**, v.90, n.4, p.1740-1750, 2007.
- BORUSZEWSKA, D.; SINDEREWICZ, E.; KOWALCZYK-ZIEBA, I.; GRZYCMACHER, K.; WOCLAWEK-POTOCKA, I. The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. **Reproductive biology and endocrinology**, v.13, n.44, p.1-18, 2015.
- BOSSAERT, P.; TREVISI, E.; OPSOMER, G.; BERTONI, G.; DE VLIEGHER, S.; LEROY, J.L. The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: an observational study. **Veterinary journal**, v.192, n.2, p.222-225, 2012.
- BRANTMEIER, S.A.; GRUMMER, R.R.; AX, R.L. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. **Journal of dairy science**, v.70, n.10, p.2145-2149, 1987.
- BROMFIELD, J.J.; IACOVIDES, S.M. Evaluating lipopolysaccharide-induced oxidative stress in bovine granulosa cells. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v.34, n.12, p.1619-1626, 2017.
- 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.5029-5040, 2011.
- BROMFIELD, J.J.; SHELDON, I.M. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. **Biology of reproduction**, v.88, n.4, p.1-9, 2013.
- 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**, v.23, n.8, p.1884-1894, 2008.

- BURTON, J.L.; KEHRLI, M.E., JR.; KAPIL, S.; HORST, R.L. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. **Journal of leukocyte biology**, v.57, n.2, p.317-325, 1995.
- CALVO, D.; GOMEZ-CORONADO, D.; LASUNCION, M.A.; VEGA, M.A. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.17, n.11, p.2341-2349, 1997.
- 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.
- CARROLL, J.A.; REUTER, R.R.; CHASE, C.C., JR.; COLEMAN, S.W.; RILEY, D.G.; SPIERS, D.E.; ARTHINGTON, J.D.; GALYEAN, M.L. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. **Innate immunity**, v.15, n.2, p.81-89, 2009.
- CECILIANI, F.; CERON, J.J.; ECKERSALL, P.D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of proteomics**, v.75, n.14, p.4207-4231, 2012.
- COMBELLES, C.M.; CEKLENIK, N.A.; RACOWSKY, C.; ALBERTINI, D.F. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. **Human reproduction**, v.17, n.4, p.1006-1016, 2002.
- DE LOOS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIP, T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular reproduction and development**, v.28, n.3, p.255-259, 1991.
- DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v.53, n.3, p.761-771, 2000.
- DI MARTINO, O.; TROIANO, A.; ADDI, L.; GUARINO, A.; CALABRO, S.; TUDISCO, R.; MURRU, N.; CUTRIGNELLI, M.I.; INFASCELLI, F.; CALABRO, V. Regulation of Stearoyl Coenzyme A Desaturase 1 Gene Promoter in Bovine Mammary Cells. **Animal biotechnology**, v.26, n.4, p.251-259, 2015.
- DINARELLO, C.A. Historical insights into cytokines. **European journal of immunology**, v.37(Supl 1), p.34-45, 2007.

DRACKLEY, J.K.; CARDOSO, F.C. Prepartum and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v.8(Supl 1), p.5-14, 2014.

DRAGANOV, D.I.; STETSON, P.L.; WATSON, C.E.; BILLECKE, S.S.; LA DU, B.N. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. **The Journal of biological chemistry**, v.275, n.43, p.33435-33442, 2000.

DRAGANOV, D.I.; TEIBER, J.F.; SPEELMAN, A.; OSAWA, Y.; SUNAHARA, R.; LA DU, B.N. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. **Journal of lipid research**, v.46, n.6, p.1239-1247, 2005.

DROST, M. Prostaglandins in animal reproduction. **Theriogenology**, v.16, n.4, p.373, 1981.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **Veterinary journal**, v.185, n.1, p.23-27, 2010.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. **Animal reproduction science**, v.98, n.1-2, p.97-112, 2007.

FUHRMAN, B.; GANTMAN, A.; AVIRAM, M. Paraoxonase 1 (PON1) deficiency in mice is associated with reduced expression of macrophage SR-BI and consequently the loss of HDL cytoprotection against apoptosis. **Atherosclerosis**, v.211, n.1, p.61-68, 2010.

FUJIMOTO, V.Y.; KANE, J.P.; ISHIDA, B.Y.; BLOOM, M.S.; BROWNE, R.W. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. **Human reproduction update**, v.16, n.1, p.20-38, 2010.

GANDA, E.K.; BISINOTTO, R.S.; DECTER, D.H.; BICALHO, R.C. Evaluation of an On-Farm Culture System (Accumast) for Fast Identification of Milk Pathogens Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows. **PloS one**, v.11, n.5, p.e0155314, 2016.



GAUTAM, G.; NAKAO, T.; KOIKE, K.; LONG, S.T.; YUSUF, M.; RANASINGHE, R.M.; HAYASHI, A. Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows. **Theriogenology**, v.73, n.2, p.168-179, 2010.

GELISSEN, I.C.; HARRIS, M.; RYE, K.A.; QUINN, C.; BROWN, A.J.; KOCKX, M.; CARTLAND, S.; PACKIANATHAN, M.; KRITHARIDES, L.; JESSUP, W. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.26, n.3, p.534-540, 2006.

GOFF, J.P.; HORST, R.L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of dairy science**, v.80, n.7, p.1260-1268, 1997.

GOLDSTEIN, J.L.; DEBOSE-BOYD, R.A.; BROWN, M.S. Protein sensors for membrane sterols. **Cell**, v.124, n.1, p.35-46, 2006.

GOULINET, S.; CHAPMAN, M.J. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.17, n.4, p.786-796, 1997.

GUERVILLE, M.; BOUDRY, G. Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v.311, n.1, p.1-15, 2016.

HAKOGI, E.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; KOHATA, A.; SHIMADA, Y.; TABUCHI, K. Endotoxin levels in milk and plasma of mastitis-affected cows measured with a chromogenic limulus test. **Veterinary microbiology**, v.20, n.3, p.267-274, 1989.

HERATH, S.; LILLY, S.T.; SANTOS, N.R.; GILBERT, R.O.; GOETZE, L.; BRYANT, C.E.; WHITE, J.O.; CRONIN, J.; SHELDON, I.M. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. **Reproductive biology and endocrinology**, v.7, p.55, 2009.

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.683-693, 2007.

HORIHATA, K.; YOSHIOKA, S.; SANO, M.; YAMAMOTO, Y.; KIMURA, K.; SKARZYNSKI, D.J.; OKUDA, K. Expressions of lipoprotein receptors and cholesterol

efflux regulatory proteins during luteolysis in bovine corpus luteum. **Reproduction, fertility, and development**, v.29, n.7, p.1280-1286, 2016.

HORTON, J.D.; SHIMOMURA, I.; BROWN, M.S.; HAMMER, R.E.; GOLDSTEIN, J.L.; SHIMANO, H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. **The Journal of clinical investigation**, v.101, n.11, p.2331-2339, 1998.

HOSOE, M.; KANEYAMA, K.; USHIZAWA, K.; HAYASHI, K.G.; TAKAHASHI, T. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. **Reproductive biology and endocrinology**, v.9, n.33, p.1-8, 2011.

JAMES, R.W.; BRULHART-MEYNET, M.C.; SINGH, A.K.; RIEDERER, B.; SEIDLER, U.; OUT, R.; VAN BERKEL, T.J.; DEAKIN, S. The scavenger receptor class B, type I is a primary determinant of paraoxonase-1 association with high-density lipoproteins. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.30, n.11, p.2121-2127, 2010.

JASPARD, B.; COLLET, X.; BARBARAS, R.; MANENT, J.; VIEU, C.; PARINAUD, J.; CHAP, H.; PERRET, B. Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. **Biochemistry**, v.35, n.5, p.1352-1357, 1996.

JASPARD, B.; FOURNIER, N.; VIEITEZ, G.; ATGER, V.; BARBARAS, R.; VIEU, C.; MANENT, J.; CHAP, H.; PERRET, B.; COLLET, X. Structural and functional comparison of HDL from homologous human plasma and follicular fluid. A model for extravascular fluid. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.17, n.8, p.1605-1613, 1997.

KIM, K.; BLOOM, M.S.; BROWNE, R.W.; BELL, E.M.; YUCEL, R.M.; FUJIMOTO, V.Y. Associations between follicular fluid high density lipoprotein particle components and embryo quality among in vitro fertilization patients. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v.34, n.1, p.1-10, 2017.

KOHCHI, C.; INAGAWA, H.; NISHIZAWA, T.; YAMAGUCHI, T.; NAGAI, S.; SOMA, G. Applications of lipopolysaccharide derived from *Pantoea agglomerans* (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory. **Journal of bioscience and bioengineering**, v.102, n.6, p.485-496, 2006.

KRAUSE, A.R.; PFEIFER, L.F.; MONTAGNER, P.; WESCHENFELDER, M.M.; SCHWEGLER, E.; LIMA, M.E.; XAVIER, E.G.; BRAUNER, C.C.; SCHMITT, E.; DEL PINO, F.A.; 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, n.1-2, p.8-14, 2014.

LAVON, Y.; EZRA, E.; LEITNER, G.; WOLFENSON, D. Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. **Journal of dairy science**, v.94, n.9, p.4538-4545, 2011.

LAVON, Y.; LEITNER, G.; KLIPPER, E.; MOALLEM, U.; MEIDAN, R.; WOLFENSON, D. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. **Domestic animal endocrinology**, v.40, n.2, p.98-109, 2011.

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.1267-1279, 2006.

LI, X.; LI, Y.; YANG, W.; XIAO, C.; FU, S.; DENG, Q.; DING, H.; WANG, Z.; LIU, G.; LI, X. SREBP-1c overexpression induces triglycerides accumulation through increasing lipid synthesis and decreasing lipid oxidation and VLDL assembly in bovine hepatocytes. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v.143, p.174-182, 2014.

LUCY, M.C.; STAPLES, C.R.; MICHEL, F.M.; THATCHER, W.W. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. **Journal of dairy science**, v.74, n.2, p.473-482, 1991.

LUND-KATZ, S.; PHILLIPS, M.C. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. **Sub-cellular biochemistry**, v.51, p.183-227, 2010.

LUTTGENAU, J.; LINGEMANN, B.; WELLNITZ, O.; HANKELE, A.K.; SCHMICKE, M.; ULBRICH, S.E.; BRUCKMAIER, R.M.; BOLLWEIN, H. Repeated intrauterine infusions of lipopolysaccharide alter gene expression and lifespan of the bovine corpus luteum. **Journal of dairy science**, v.99, n.8, p.6639-6653, 2016.

MAGATA, F.; HORIUCHI, M.; ECHIZENYA, R.; MIURA, R.; CHIBA, S.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A.; KOBAYASHI, Y.; SHIMIZU, T. Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. **Animal reproduction science**, v.144, n.1-2, p.6-13, 2014.

MAGATA, F.; ISHIDA, Y.; MIYAMOTO, A.; FURUOKA, H.; INOKUMA, H.; SHIMIZU, T. Comparison of bacterial endotoxin lipopolysaccharide concentrations in the blood, ovarian follicular fluid and uterine fluid: a clinical case of bovine metritis. **The Journal of veterinary medical science**, v.77, n.1, p.81-84, 2015.

MAGATA, F.; SHIMIZU, T. Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. **Reproductive toxicology**, v.71, p.1-7, 2017.

MAMO, S.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; LEAL, C.L.; AL NAIB, A.; MCGETTIGAN, P.; MEHTA, J.P.; EVANS, A.C.; FAIR, T. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC genomics**, v.12, p.151, 2011.

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. **Animal reproduction science**, v.76, n.3-4, p.143-154, 2003.

MORESCO, E.M.; LAVINE, D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. **Current biology** v.21, n.13, p.488-493, 2011.

MOSS, J.I.; GARRETT, T.J.; HANSEN, P.J. Involvement of free cholesterol and high-density lipoprotein in development and resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock. **Journal of animal science**, v.90, n.11, p.3762-3769, 2012.

MOYES, K.M.; DRACKLEY, J.K.; SALAK-JOHNSON, J.L.; MORIN, D.E.; HOPE, J.C.; LOOR, J.J. Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a *Streptococcus uberis* mastitis challenge in dairy cows during midlactation. **Journal of dairy science**, v.92, n.9, p.4301-4316, 2009.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary journal**, v.168, n.1, p.28-40, 2004.

NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. **Development**, v.109, n.2, p.501-507, 1990.

NEBEL, R.L.; MCGILLIARD, M.L. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. **Journal of dairy science**, v.76, n.10, p.3257-3268, 1993.

NIU, Z.; YE, Y.; XIA, L.; FENG, Y.; ZHANG, A. Follicular fluid cytokine composition and oocyte quality of polycystic ovary syndrome patients with metabolic syndrome undergoing in vitro fertilization. **Cytokine**, v.91, p.180-186, 2017.

NOBECOURT, E.; JACQUEMINET, S.; HANSEL, B.; CHANTEPIE, S.; GRIMALDI, A.; CHAPMAN, M.J.; KONTUSH, A. Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. **Diabetologia**, v.48, n.3, p.529-538, 2005.

OPSOMER, G.; GROHN, Y.T.; HERTL, J.; CORYN, M.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, v.53, n.4, p.841-857, 2000.

OSPINA, P.A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. **Journal of dairy science**, v.93, n.2, p.546-554, 2010.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, n.6, p.859-869, 1995.

PRICE, J.C.; BROMFIELD, J.J.; SHELDON, I.M. Pathogen-associated molecular patterns initiate inflammation and perturb the endocrine function of bovine granulosa cells from ovarian dominant follicles via TLR2 and TLR4 pathways. **Endocrinology**, v.154, n.9, p.3377-3386, 2013.

RHO, G.J.; S, B.; KIM, D.S.; SON, W.J.; CHO, S.R.; KIM, J.G.; B, M.K.; CHOE, S.Y. Influence of in vitro oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer. **Molecular reproduction and development**, v.74, n.4, p.486-496, 2007.

RIBEIRO, E.S.; GOMES, G.; GRECO, L.F.; CERRI, R.L.A.; VIEIRA-NETO, A.; MONTEIRO, P.L.J., JR.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v.99, n.3, p.2201-2220, 2016.

RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D.L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L.L. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual review of physiology**, v.64, p.69-92, 2002.

RINCON, J.A.A.; MADEIRA, E.M.; CAMPOS, F.T.; MION, B.; SILVA, J.F.; ABSALON-MEDINA, V.A.; BUTLER, W.R.; CORREA, M.N.; PEGORARO, L.; SCHNEIDER, A. Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development in vitro. **Reproduction in domestic animals**, v.51, n.5, p.827-830, 2016.

RINCON, J.A.A.; PRADIEE, J.; REMIAO, M.H.; COLLARES, T.V.; MION, B.; GASPERIN, B.G.; TOMAZELE ROVANI, M.; CORREA, M.N.; PEGORARO, L.M.C.; SCHNEIDER, A. Effect of high-density lipoprotein on oocyte maturation and bovine embryo development in vitro. **Reproduction in domestic animals**, 2018.

ROVANI, M.T.; ILHA, G.F.; GASPERIN, B.G.; NOBREGA, J.E., JR.; SIDDAPPA, D.; GLANZNER, W.G.; ANTONIAZZI, A.Q.; BORDIGNON, V.; DUGGAVATHI, R.; GONCALVES, P.B.D. Prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteolysis involves activation of Signal transducer and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. **Molecular reproduction and development**, v.84, n.6, p.486-494, 2017.

SANTOS-GALLEGO, C.G.; IBANEZ, B.; BADIMON, J.J. HDL-cholesterol: is it really good? Differences between apoA-I and HDL. **Biochemical pharmacology**, v.76, n.4, p.443-452, 2008.

SCHNEIDER, A.; ABSALON-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 in domestic animals**, v.48, n.6, p.989-994, 2013.

SCHRODL, W.; BUCHLER, R.; WENDLER, S.; REINHOLD, P.; MUCKOVA, P.; REINDL, J.; RHODE, H. Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine. **Proteomics. clinical applications**, v.10, n.11, p.1077-1092, 2016.

SHALGI, R.; KRAICER, P.; RIMON, A.; PINTO, M.; SOFERMAN, N. Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. **Fertility and sterility**, v.24, n.6, p.429-434, 1973.

SHELDON, I.M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SCHUBERTH, H.J. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of reproduction**, v.81, n.6, p.1025-1032, 2009.

SHELDON, I.M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal reproduction science**, v.82-83, p.295-306, 2004.

SHELDON, I.M.; LEWIS, G.S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R.O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v.65, n.8, p.1516-1530, 2006.

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.837-845, 2002.

SHELDON, I.M.; RYCROFT, A.N.; ZHOU, C. Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. v.154, n.10, p.289-293, 2004.  
SHELTON, K.; PARKINSON, T.J.; HUNTER, M.G.; KELLY, R.W.; LAMMING, G.E. Prostaglandin E-2 as a potential luteotrophic agent during early pregnancy in cattle. **Journal of reproduction and fertility**, v.90, n.1, p.11-17, 1990.

SHIH, D.M.; GU, L.; XIA, Y.R.; NAVAB, M.; LI, W.F.; HAMA, S.; CASTELLANI, L.W.; FURLONG, C.E.; COSTA, L.G.; FOGELMAN, A.M.; LUSIS, A.J. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. **Nature**, v.394, n.6690, p.284-287, 1998.

SHIH, D.M.; XIA, Y.R.; WANG, X.P.; MILLER, E.; CASTELLANI, L.W.; SUBBANAGOUNDER, G.; CHEROUTRE, H.; FAULL, K.F.; BERLINER, J.A.; WITZTUM, J.L.; LUSIS, A.J. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. **The Journal of biological chemistry**, v.275, n.23, p.17527-17535, 2000.

SMITZ, J.; CORTVRINDT, R.; HU, Y. Epidermal growth factor combined with recombinant human chorionic gonadotrophin improves meiotic progression in mouse follicle-enclosed oocyte culture. **Human reproduction**, v.13, n.3, p.664-669, 1998.

SOTO, P.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2alpha, and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **American journal of reproductive immunology**, v.50, n.3, p.263-272, 2003.

STER, C.; LOISELLE, M.C.; LACASSE, P. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. **Journal of dairy science**, v.95, n.2, p.708-717, 2012.

STURMEY, R.G.; O'TOOLE, P.J.; LEESE, H.J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. **Reproduction**, v.132, n.6, p.829-837, 2006.

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.267-278, 2001.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v.140, n.6, p.805-820, 2010.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1717-1751, 2005.

VAN LENTEN, B.J.; WAGNER, A.C.; NAYAK, D.P.; HAMA, S.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. **Circulation**, v.103, n.18, p.2283-2288, 2001.

VEDHACHALAM, C.; DUONG, P.T.; NICKEL, M.; NGUYEN, D.; DHANASEKARAN, P.; SAITO, H.; ROTHBLAT, G.H.; LUND-KATZ, S.; PHILLIPS, M.C. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. **The Journal of biological chemistry**, v.282, n.34, p.25123-25130, 2007.

VERGNES, L.; CHIN, R.G.; DE AGUIAR VALLIM, T.; FONG, L.G.; OSBORNE, T.F.; YOUNG, S.G.; REUE, K. SREBP-2-deficient and hypomorphic mice reveal roles for SREBP-2 in embryonic development and SREBP-1c expression. **Journal of lipid research**, v.57, n.3, p.410-421, 2016.

WALDRON, M.R.; NISHIDA, T.; NONNECKE, B.J.; OVERTON, T.R. Effect of lipopolysaccharide on indices of peripheral and hepatic metabolism in lactating cows. **Journal of dairy science**, v.86, n.11, p.3447-3459, 2003.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and sterility**, v.78, n.6, p.1272-1277, 2002.

WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; NOAKES, D.E.; ENGLAND, G.C.; RYCROFT, A.; DOBSON, H.; SHELDON, I.M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v.68, n.4, p.549-559, 2007.



WIRA, C.R.; FAHEY, J.V. The innate immune system: gatekeeper to the female reproductive tract. **Immunology**, v.111, n.1, p.13-15, 2004.

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.

## **Anexos**

## Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

**PARECER Nº** 26/2018/CEEA/REITORIA  
**PROCESSO Nº** 23110.009364/2018-41  
**INTERESSADO:** CASSIO CASSAL BRAUNER

Pelotas, 12 de abril de 2018

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Utilização de um composto a base de butafosfan e cianocobalamina: atuação no sistema reprodutivo**”, processo nº 23110.009364/2018-42, sob a responsabilidade de **Cassio Cassal Brauner** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 09/04/2018.

| Finalidade              | ( X ) Pesquisa ( ) Ensino                                                 |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Vigência da autorização | 01/05/2018 a 21/12/2022                                                   |
| Espécie/linhagem/raça   | Bovina/Angus, Hereford e Holandês                                         |
| Nº de animais           | 72                                                                        |
| Idade                   | 14-16 meses                                                               |
| Sexo                    | Fêmeas                                                                    |
| Origem                  | Fazendas comerciais dos municípios de São Lourenço do Sul e Rio Grande/RS |

**Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.**

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 9364-2018**).

---

**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix**

*Presidente da CEEA*



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 12/04/2018, às 14:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0109124** e o código CRC **4A538880**.

---

Referência: Processo nº 23110.009364/2018-

41

SEI nº 0109124