



Influência das endometrites nas estruturas ovarianas e qualidade oocitária em tratos reprodutivos post-mortem de vacas

Influence of endometritis on ovarian structures and oocyte quality in post mortem reproductive tract of cows

Larissa Marchiori Sena[‡], Nara Clara Lazaroni e Merchid, Ítalo Câmara de Almeida, Natalia Viana Tamiasso, José de Oliveira Carvalho, Carla Braga Martins

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alegre, ES, Brasil.

[‡]Correspondência: lmsmvvet@gmail.com

Resumo

Objetivou-se no presente estudo estimar o percentual de endometrites clínicas (EC) e subclínicas (ES) em tratos reprodutivos post-mortem de fêmeas bovinas, verificando sua influência sobre as estruturas ovarianas, alterações presentes no ovário, número e qualidade de oócitos recuperados. Foram coletados e avaliados 171 tratos reprodutivos em matadouro frigorífico. As endometrites foram diagnosticadas por meio de citologia endometrial e pela presença e características das secreções uterinas. Os diagnósticos foram confirmados pela análise histopatológica, sendo avaliada a existência de infiltrados de células inflamatórias no endométrio. Os ovários foram avaliados macroscopicamente quanto à estrutura e alterações ovarianas. A qualidade oocitária foi avaliada de acordo com o número de camadas de células do cumulus e aspecto do citoplasma, sendo assim, classificados como: grau I (GI), grau II (GII), grau III (GIII) e grau IV (GIV). Dentre as peças avaliadas, 8,20% (n = 14) apresentaram EC e 4,10% (n = 7) foram diagnosticadas com ES. Observou-se que a presença de endometrites não exerceu efeito sobre as estruturas e alterações ovarianas, assim como não alterou o número de oócitos recuperados. Em relação ao grau de qualidade oocitária, foi encontrado variação entre os diferentes graus de qualidade dentro dos grupos, no entanto, não houve correlação aparente com a presença de infecção uterina.

Palavras-chave: infecção uterina, infertilidade, *post-mortem*.

Abstract

The objective of this study was to estimate the percentage of clinical (CE) and subclinical (SE) endometritis in post mortem bovine reproductive tracts, analyzing their influence on ovarian structures, changes in the ovary, and number and quality of oocytes collected. Endometritis were diagnosed by endometrial cytology, and by the presence and characteristics of uterine secretions. The diagnosis was confirmed through histopathological analysis, by evaluating the presence of infiltrated inflammatory cells in the endometrium. The ovaries were macroscopically evaluated for presence of physiological structures and alterations. The oocyte quality evaluation was performed according to the number of cumulus cells layers and cytoplasmic aspect, being classified as: grade I (GI), grade II (GII), grade III (GIII) and grade IV (GIV). Among the uterus evaluated, 8,20% (n = 14) of the animals presented EC, and 4,10% (n = 7) were diagnosed with ES. It was observed that the presence of endometritis had no effect on ovarian structures and alterations, nor did it influence the number of oocytes collected. Regarding the degree of oocyte quality, a variation was found between the different grades of quality within the groups, however, there was no apparent correlation with the presence of uterine infection.

Keywords: *fertility, post mortem, uterine infection.*

Introdução

A bovinocultura é uma atividade de grande importância econômica no Brasil. Atualmente, o país está entre os maiores produtores mundiais de leite, produzindo cerca de 35 bilhões de litros no ano de 2016. Além disso, o país também encontra-se entre os maiores produtores de carne bovina do mundo, com um rebanho de 218 milhões de bovinos (IBGE, 2018).

Para se manter como um país de destaque mundial, seja na bovinocultura de leite ou corte, é necessário a manutenção de um bom sistema de produção, o que inclui bons índices reprodutivos. Entretanto, alguns indicadores reprodutivos, tais como intervalo entre partos, taxa de serviço e retorno a atividade ovariana no pós parto ainda são considerados baixos no país (Ferreira, 2010).

A diminuição da eficiência reprodutiva bovina pode ser influenciada por diversos fatores, como estresse térmico, deficiências nutricionais, manejo reprodutivo inadequado, e patologias uterinas e ovarianas. Dentre estas, as infecções do trato reprodutivo feminino, são um dos principais fatores que afetam negativamente os índices reprodutivos, gerando perdas econômicas aos sistemas de produção (Giuliodori et al., 2013).



As infecções uterinas podem se apresentar de forma clínica ou subclínica. De acordo com Cheong et al. (2011), infecções uterinas subclínicas estão presentes em 25,90% das vacas entre 40 e 60 dias após o parto, causando atraso no retorno a ciclicidade e aumento no intervalo entre partos. De fato, Fourichon et al. (2000) observaram aumento de 19 dias no intervalo entre partos de vacas com infecção uterina clínica, além da diminuição de 20,00% na taxa de concepção.

Como consequência das infecções do trato reprodutivo, podem ocorrer alterações no ambiente uterino, comprometimento da função ovariana e alterações na composição do fluido folicular, afetando negativamente a qualidade oocitária, gerando casos de subfertilidade ou infertilidade. Isso ocorre devido a resposta do útero ao reconhecimento primário de agentes patogênicos, com liberação de mediadores inflamatórios, que atuam na tentativa de combater o processo infeccioso (Sheldon et al., 2009).

Portanto, devido a grande incidência das infecções uterinas e aos baixos índices reprodutivos do rebanho brasileiro, objetivou-se estimar o percentual de infecções uterinas em tratos reprodutivos post-mortem de fêmeas bovinas, verificando sua influência sobre as estruturas ovarianas, número e qualidade de oócitos recuperados.

Materiais e métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número 76/2015. Durante o trabalho, foram coletados 171 tratos reprodutivos não gravídicos post-mortem de fêmeas bovinas sem histórico reprodutivo, de diferentes idades, raças e/ou cruzamentos desconhecidos, abatidas em matadouro frigorífico localizado na região sul do estado do Espírito Santo, Brasil.

Após o abate e coleta, os úteros foram acondicionados e transportados ao laboratório. Os ovários provenientes de cada trato reprodutivo, foram transportados individualmente em solução salina 0,9% (NaCl) a 37°C, como descrito por Jacomini et al. (2012).

Os úteros foram avaliados individualmente para identificação de ausência ou presença de alterações sugestivas/compatíveis de infecção uterina. Os animais com secreção turva, catarral ou purulenta no interior do útero foram determinados como portadores de lesões compatíveis com endometrites de manifestação clínica (Ferreira e Sá, 1987).

A citologia endometrial (*cytobrush*), descrita por Kasimanickam et al. (2005), foi empregada como um método de triagem para o diagnóstico de alterações compatíveis com endometrites com características subclínicas (ES). Após a confecção da lâmina, a mesma foi corada com corante rápido, tipo panótico e posteriormente realizou-se a avaliação do percentual de neutrófilos a partir da contagem de 200 células em microscópio óptico Olympus[®], aumento de 400x.

Considerou-se suspeitos de ES úteros que apresentaram contagem de neutrófilos >3% (Salasel et al., 2010). Entretanto, esse percentual é utilizado para detecção de infecções em animais vivos e no pós-parto. Dessa forma, por se tratar de úteros de animais provenientes de diferentes fases reprodutivas, as ES foram confirmadas apenas após a análise histopatológica.

Nos tratos reprodutivos com ausência de CL e presença de FD no ovário, e/ou muco translúcido, caracterizando úteros em fase estrogênica, foi considerado como ES o valor superior a 8% de neutrófilos (Galindo et al., 2003).

Para caracterização das endometrites, foram coletados fragmentos do endométrio da região de corpo uterino e porção média dos cornos uterinos direito e esquerdo. As amostras foram fixadas em formol 10%, processadas pelo método de inclusão em parafina, coradas por Hematoxilina e Eosina (HE), e avaliadas em microscópio óptico Olympus[®] em aumento de 400x (Tolosa et al., 2003).

Foi avaliada a presença de infiltrados de células inflamatórias, congestão, edema, necrose e degeneração no endométrio, classificando os tratos reprodutivos como portadores ou não de endometrite (Chapwanya et al., 2010). Tratos reprodutivos que apresentavam alterações que determinavam outros processos patológicos foram excluídos do presente estudo.

Os ovários foram avaliados individualmente quanto a presença de estruturas fisiológicas e alterações ovarianas, sendo: folículos dominantes (FD) (diâmetro entre 12,5 e 15,5 mm), folículos subordinados (FS), corpo lúteo (CL), corpo albicans (CA), corpo hemorrágico (CH), corpo lúteo em regressão (CR), cistos foliculares (CF) e ooforites (OF) (Ferreira, 2010).

Após classificação das estruturas ovarianas, folículos de 2 a 8 mm foram aspirados com auxílio de agulha 40x12 mm e seringa de 5 mL, para avaliação do número de COCs recuperados e qualidade oocitária. O material aspirado foi depositado em tubos de 1,7 mL e colocado em banho Maria à 37°C por 10 min, para sedimentação (Jacomini et al., 2012). Após este período, o *pellet* formado foi retirado e colocado em placa de Petri Sarstedt[®] contendo solução fosfato-salino tamponada (PBS), sendo os complexos cumulus oócito (COCs) rastreados e classificados em estereomicroscópio Nikon[®], aumento de 40x.

A classificação oocitária foi realizada de acordo com Gordon (2003) em grau I (GI), grau II (GII), grau III



(GIII) e grau IV (GIV), com base no aspecto do citoplasma e número de camadas das células do cummulus.

Os dados foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade de variância pelos testes de Shapiro-wilk e Bartlett, respectivamente. Dados que apresentaram distribuição normal e homogênea, foram submetidos a ANOVA paramétrica e comparação de médias pelo teste de Tukey. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-comparação de medianas pelo teste de Dunn, ambos a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico R[®] versão 3.3.2.

Resultados e discussões

Mediante as avaliações macroscópicas e microscópicas, observou-se que 12,30% (n=21) do úteros, apresentaram alterações compatíveis com a existência de endometrites, sendo 8,20% (n=14) caracterizadas como EC e 4,10% (n = 7) como ES.

Das peças de abatedouro suspeitas de EC e ES pela análise macroscópica e citológica, respectivamente, 100% (n=21) tiveram o diagnóstico confirmado pela análise histopatológica.

Ahmadi et al. (2005) em um estudo semelhante ao analisarem úteros recolhidos pós-morte, observaram que endometrites foram as infecções reprodutivas mais comumente encontradas, sendo caracterizadas por congestão, edema, infiltrados de células inflamatórias, necrose e degeneração do endométrio, como observado no presente estudo.

As infecções uterinas podem acometer o rebanho em diferentes fases reprodutivas, sendo sua maior incidência no período pós-parto, devido a contaminação bacteriana ascendente da vagina, favorecida pelo relaxamento da cérvix, dilatação vulvo-vaginal e presença de lóquio (Ferreira, 2010). Entretanto, os úteros avaliados neste estudo procediam de animais em diferentes fases reprodutivas, o que pode ter contribuído para a baixa incidência de infecções.

Na avaliação das alterações ovarianas, devido a interferência reprodutiva dos processos inflamatórios/infeciosos no bom funcionamento do ovário, era esperado diferenças em relação a presença ou ausência de estruturas ovarianas nos tratos reprodutivos portadores de infecções. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$; Tab 1).

Tabela 1. Resultados obtidos na avaliação das estruturas fisiológicas e afecções ovarianas em tratos reprodutivos post-mortem aparentemente saudáveis e apresentando características compatíveis com endometrite clínica (EC) e subclínica (ES), oriundos de matadouro frigorífico.

Estruturas Ovarianas	Tratos reprodutivos com características compatíveis com endometrite (n = 21)	Tratos reprodutivos aparentemente saudáveis (n = 150)
FD	28,57% (n = 6)	30,66% (n = 46)
CL	38,10% (n = 8)	42,66% (n = 64)
Ooforites	4,76% (n = 1)	2,00% (n = 3)
Cistos foliculares	4,76 % (n = 1)	2,00% (n = 3)
Ausência de estruturas	4,76 % (n = 1)	2,66% (n = 4)
FS, CA, CH, CR	19,05 % (n = 4)	20,00% (n = 30)
TOTAL	(100%) (n = 21)	(100%) (n = 150)

Folículos dominantes (FD), corpo lúteo (CL), folículos subordinados (FS), corpo albicans (CA), corpo hemorrágico (CH), corpo lúteo em regressão (CR).

Esses resultados contradizem-se aos obtidos por Herath et al. (2009), os quais observaram que animais com infecção bacteriana apresentaram altas concentrações de lipopolissacarídeos (LPS), e prostaglandina do tipo E (PGE) séricas. O desbalanço dessas substâncias promoveu aumento preferencial de PGE luteotrófica em resposta aos LPS, em vez da PGF luteolítica. Dessa forma, os animais foram predispostos a disfunção na lise de CL e fases lúteas estendidas. Já, Lavon et al. (2008) afirmaram que vacas expostas a endotoxinas durante o estro, apresentam redução e atraso no pico de LH, levando ao decréscimo nas taxas fecundação, além desses animais apresentarem maior possibilidade de desenvolverem cistos ovarianos.

Porém, os trabalhos citados acima mimetizaram o aumento da fase luteal e o atraso no pico de LH, induzindo respostas inflamatórias e consequente aumento drástico nas concentrações de LPS. No entanto, o presente estudo avaliou somente a resposta natural do sistema imunológico, sendo essa uma possível causa, da não observação de dados correspondentes.

Além disso, a ausência de diferença em relação a estas estruturas entre os tratos reprodutivos pode ter sido influenciada pelo não conhecimento do manejo nutricional e escore de condição corporal destes animais, de maneira que o bom aporte nutricional poderia ser um fator relevante para melhoria da atividade reprodutiva.

Ademais, este estudo foi realizado em período de maior oferta de pastagem. Com isto, os animais



possuem maior subsídio nutricional, auxiliando na manutenção da função reprodutiva de maneira adequada, garantindo assim o bom funcionamento sistema reprodutor. Corroborando a estas informações, demonstrando a capacidade reprodutiva satisfatória dos tratos reprodutivos que apresentaram endometrite, 28,57 (n = 6) apresentaram características de fase estrogênica com presença de FD. Desses, 19,05% (n = 4) apresentavam ES e 9,52% (n = 2) EC.

Com relação a taxa de recuperação oocitária, não foi observada diferença entre os grupos EC ($10,3 \pm 7,1$), ES ($15,0 \pm 9,6$) e sadios ($10,6 \pm 8,3$). Ao avaliar o efeito da condição uterina no grau de qualidade oocitária, notou-se maior incidência de oócitos GIII em relação a oócitos GI em animais sem infecção uterina e com EC (Tab. 2). Nos animais com ES, foi encontrado maior número de oócitos Grau IV em relação aos de Grau II. Entretanto, os graus de qualidade oocitária não diferiram entre cada grupo.

Tabela 2. Medianas e desvios interquartílicos referentes a recuperação de oócitos Grau I, Grau II, Grau III, Grau IV em tratos reprodutivos post-mortem aparentemente sadios, com característica de endometrite clínica e endometrite subclínica, oriundos de matadouro frigorífico.

Grau de qualidade oocitária	Tratos reprodutivos aparentemente sadios	Tratos reprodutivos com características compatíveis com endometrite clínica	Tratos reprodutivos com características compatíveis com endometrite subclínica
GI	$1,00 \pm 2,00^c$	$1,00 \pm 6,75^b$	$2,28 \pm 2,87^{ab}$
GII	$1,00 \pm 3,00^b$	$1,50 \pm 2,00^{ab}$	$1,42 \pm 1,51^b$
GIII	$3,00 \pm 4,00^a$	$2,50 \pm 6,25^a$	$4,42 \pm 2,69^{ab}$
GIV	$2,00 \pm 4,00^b$	$2,50 \pm 4,70^{ab}$	$6,85 \pm 4,70^a$

^{a,b,c}Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Dunn a 5% de significância. GI (oócitos grau I); GII (oócitos grau II); GIII (oócitos grau III); Grau IV (oócitos grau IV).

Devido a atuação direta dos LPS no bloqueio do eixo hipófise-hipotálamo-gonadal suprimindo as liberações dos hormônios GnRH, LH e FSH, era esperado menor quantidade e qualidade de COCs recuperados nos animais do grupo EC e ES.

De acordo com Jabbour e Sales (2004), baixas taxas de gonadotrofinas estariam correlacionadas a falhas nos mecanismos de recrutamento e seleção dos folículos para uma nova onda folicular, comprometendo a quantidade de oócitos recuperados em animais com infecção uterina.

Herath et al. (2007) afirmaram que a ligação dos LPS com os receptores *tipo toll like 4* (TLR4) presentes nas células da granulosa é capaz de inibir a expressão da enzima aromatase, reduzindo a conversão de andrógenos em estradiol pelas células da granulosa, alterando toda a dinâmica folicular.

No entanto, a não observação de dados correspondentes, relativos a recuperação, qualidade oocitária, assim como a baixa qualidade oocitária dos animais com infecção e aparentemente sadios, pode ser decorrente da variação individual na resposta imunológica de cada animal, além de condições de estresse e manejo que podem influenciar na capacidade reprodutiva, porém, não avaliadas neste estudo.

Mesmo quando em condições ambientais semelhantes, vacas que apresentam infecção uterina podem ter sido expostas a desafios bacterianos distintos, além de apresentarem diferentes falhas nos mecanismos de defesa locais e/ou sistêmicos relacionados com a limpeza do ambiente uterino e combate ao processo inflamatório.

Além disso, condições de estresse, seja devido ao calor, ou por problemas de manejo, podem ter influenciado os índices de qualidade oocitária dos tratos reprodutivos sem presença de processo inflamatório, levando a ausência de diferenças significativas entre os grupos avaliados.

Conclusões

A presença de lesões indicativas de endometrites em peças de matadouro frigorífico de fêmeas bovinas não exerceu efeito sobre as estruturas ovarianas, assim como não alterou o número de COCs recuperados por animal. Em relação ao grau de qualidade oocitária, foi encontrada variação entre os grupos, sem relação aparente com a presença de infecção uterina.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

Ahmadi MR, Tafti KA, Nazifi, S, Ghaisari, HR. The comparative evaluation of uterine mucosa cytology with endometrial histopathology in cows. *Comp Clin Path*, v.6, p.90-94, 2005.



- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** In: IBGE. Indicadores IBGE – Estatística da produção pecuária. Disponível em: www.ibge.com.br. Acesso em 13 de maio de 2018.
- Chapwanya A, Meade K, Narciandi F, Stanley P, Mee J, Doherty, M.** Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology*, v.73, p.988-994, 2010.
- Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Gilbert, RO.** Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*, v.94, n.2, p.762-70, 2011.
- Ferreira AM.** Reprodução da fêmea bovina: Fisiologia aplicada a problemas mais comuns (causas e tratamentos). 1.ed., Juiz de Fora: Editora Edítar, 2010, 420p.
- Ferreira AM, Sá WF.** Estudo das infecções uterinas em vacas leiteiras. *Pesq Agrop Bras*, v.22, n.3, p.339-344, 1987.
- Fourichon C, Seegers H, Malher X.** Effect of disease on reproduction of the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*, v.53, p.1729-1759, 2000.
- Galindo ASD, Gambarini ML, Oliveira Filho BD, Kunz TL, Da Silva KPC, Mota RA.** Avaliação microbiológica e citológica de úteros de vacas repetidoras de cio. *Ars Vet*, v.19, n.2, p.179-187, 2003.
- Giuliodori MJ, Magnasco RP, Becu-Villalobos D, Lacau-Mendigo IM, Sota RL.** Clinical endometritis in an Argentinean herd of dairy cows: Risk factors and reproductive efficiency. *J Dairy Sci*, v.96, n.1, p.210-218, 2013.
- Gordon L.** Recovering the Bovine Oocyte. Laboratory production of cattle embryo. 2.ed., Dublin: Editora Cabi, 2003, 332p.
- Herath S, Lilly ST, Fischer, DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM.** Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F_{2a} to prostaglandin E₂ in bovine endometrium. *Endocrinology*, v.150, p.1912-1920, 2009.
- Herath S, Williams EJ, Lilly ST, Gilbert RO, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM.** Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction*, v.134, p.683-693, 2007.
- Jabbour HN, Sales KJ.** Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology. *Trends Endoc Met*. v.15, p.398-404, 2004.
- Jacomini JO, Beletti ME, De Lúcio AC, Alves BG.** Roteiro Laboratorial, produção in vitro de Embriões. 1.ed. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2012, 16p.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH.** A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J*, v.46, p.255-259, 2005.
- Lavon Y, Leither G, Goshem T.** Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentration in dairy cows. *Theriogenology*, v.70, n.6, p.956-967, 2008.
- Salasel B, Mokhtari A, Taktaz T.** Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology*, v. 74, n.7, p.1271-1278, 2010.
- Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE.** Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.1-9, 2009.
- Tolosa EMC, Rodrigues, CJ, Behmer, AO, Freitas Neto AG.** Manual de Técnicas para histologia normal e patológica. 2.ed. Editora Manole, 2003.
-