

ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1 NA FRAÇÃO HDL NO SORO E NO FLUIDO FOLICULAR DE VACAS JERSEY DESAFIADAS COM LIPOPOLISACARÍDEOS

JANAÍNA F. DA SILVA¹; JOAO A.A. RINCÓN²; FELIPE T. DE CAMPOS²; DIEGO A.V. ACOSTA³; LIGIA M.C. PEGORARO⁴; AUGUSTO SCHNEIDER⁵

¹Faculdade de Veterinária – UFPel – nanafadrique@yahoo.com.br

²Programa de Pós-graduação em Veterinária – UFPel

³Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Bogotá, DC – Colômbia

⁴Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil

⁵Faculdade de Nutrição – UFPel – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os lipopolissacarídeos (LPS) são endotoxinas provenientes de bactérias gram negativas que provocam uma forte resposta por parte do sistema imunitário, promovendo a resposta inflamatória (MATEUS et al., 2003). A presença de LPS tem sido detectada no plasma sanguíneo (MATEUS et al., 2003) e no fluido folicular (HERATH et al., 2007) de vacas com metrite e no plasma de vacas com mastite infecciosa (HAKOGI et al., 1989). Os LPS atuam no hipotálamo ou na hipófise, inibindo a liberação de gonadotrofinas e consequentemente alterando o desenvolvimento folicular (SUZUKI et al., 2001). No entanto, recentes estudos indicam que os LPS podem ter um efeito direto no ovário (HERATH et al., 2007).

A paraoxonase-1 (PON1) é uma enzima sintetizada no fígado e liberada na corrente sanguínea, onde se encontra ligada exclusivamente à lipoproteína de alta densidade (HDL) (DRAGANOV et al., 2000). A PON1 desempenha um papel fundamental na capacidade anti-inflamatória e antiaterogênica do HDL, protegendo o HDL, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as células e os lipídeos de danos oxidativos e peroxidativos (DRAGANOV et al., 2005). Em bovinos, a PON1 tem sido caracterizada principalmente como uma proteína de fase aguda, reduzindo seus níveis circulantes em resposta às citocinas liberadas durante a inflamação (BIONAZ et al., 2007).

O HDL é a única lipoproteína presente no fluido folicular (JASPARD et al., 1996). Neste sentido, estudos sugerem que em humanos (BROWNE et al., 2008) e em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013), a transferência da PON1 do sangue ao fluido folicular ocorre junto ao HDL, visto que estão correlacionados nos dois compartimentos (BROWNE et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2013). Sendo assim, alterações na atividade sanguínea da PON1 refletiriam em sua atividade intrafolicular, podendo afetar a qualidade do oócito e a fertilidade. Além disso, já foi observada diferença na atividade intrafolicular de PON1 de folículos estrogênio ativos e folículos atresícos, indicando variações na atividade da PON1 de acordo com a atividade folicular (SCHNEIDER et al., 2013).

Estudos em humanos *in vivo* (BROWNE et al., 2008) e em bovinos *in vitro* (RINCON et al., 2016) sugerem que a ação da PON1 está relacionada com sua capacidade antioxidante nas membranas celulares, o que pode melhorar a competência do oócito e o desenvolvimento embrionário inicial, principalmente por reduzir o estresse oxidativo, dentre outros diversos fatores presentes no fluido folicular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da enzima PON1 sanguínea e intrafolicular na fração total e não fração HDL de vacas desafiadas com LPS.

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas sob o protocolo 4006.

Para este trabalho foram utilizadas vinte vacas da raça Jersey, mantidas em sistema extensivo na EMBRAPA Clima Temperado sob as mesmas condições de manejo e alimentação. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: grupo controle (n=10) e grupo LPS (n=10). Ambos os grupos tiveram a onda folicular sincronizada utilizando dispositivo intravaginal liberador de progesterona CIDR (Eazi-Breed CIDR®, Zoetis Saúde Animal, USA) e 2 mg de benzoato de estradiol (Hertape Calier, Brasil) no dia 0, doze horas antes da remoção do CIDR (dia 8) foram aplicados 500 µg de Prostaglandina (25 mg de dinoprost-trometamina; 5 mL de Lutalyse, Zoetis Saúde animal). Duas horas após a remoção do CIDR foi administrada uma dose única de LPS (2,5 ug/kg de peso vivo; SIGMA-ALDRICH® Inc., EUA) intravenoso no grupo LPS e uma solução placebo (2 mL de NaCl 0,9%) no grupo controle. Após 6 horas da aplicação do LPS foi avaliado o par de ovários e identificado o folículo dominante com auxílio de ultrassom. Logo após, foi realizada anestesia epidural e limpeza da vulva, seguido da inserção da guia de aspiração para coleta do fluido folicular do folículo dominante previamente identificado. As amostras foram aspiradas com seringa descartável de 10 mL e transferidas a microtubos, após, foram armazenadas a -20°C para posterior análise. A temperatura retal foi aferida cinco horas após a aplicação do LPS.

Para determinação da atividade de PON1 foi utilizado um protocolo previamente descrito (BROWNE et al., 2007). Resumidamente, foi utilizado um tampão Tris/HCl 20 mM, contendo 1 mM de cloreto de cálcio e 4mM de fenilacetato como solução de trabalho. As amostras foram diluídas (1:3) em Tampão 20mM Tris/HCl. A leitura foi realizada durante um minuto em espectrofotômetro (270nm), adicionando-se 3,3 µL da amostra diluída em 500 µL da solução de trabalho. A atividade da enzima foi determinada pela seguinte fórmula: $\Delta \text{Absorbância} \times 115 \times 3$. A atividade de PON1 foi expressa em U/mL.

As concentrações de colesterol e proteínas totais foram avaliadas no analisador Labmax Plenno (Labtest® Diagnóstica S.A., Brasil) através do método colorimétrico usando kits comerciais conforme as recomendações do fabricante (Labtest®). No soro e no fluido folicular foi separada a fração HDL mediante precipitação e centrifugação usando kit comercial (Labtest®). Na fração HDL foi analisada a atividade de PON1 e concentrações de colesterol e proteínas totais como mencionado anteriormente.

Adicionalmente, foram avaliadas as concentrações intrafoliculares de estradiol (E2) e progesterona (P4) em laboratório comercial mediante quimiluminescência (Laboratório Pasin®, Brasil).

Os resultados foram analisados através do “teste de t” no software GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism®, EUA), sendo considerados significantes valores de $P > 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo observamos que a injeção de LPS estimulou a resposta inflamatória sistêmica, suportado pela maior temperatura retal dos animais desafiados com LPS ($40,4 \pm 0,1$ °C) em comparação ao controle ($38,8 \pm 0,1$ °C; $P < 0,0001$). O diâmetro do maior folículo não foi diferente entre o grupo LPS e o

grupo controle ($9,8 \pm 0,8\text{mm}$; $P=0,27$). Da mesma forma, as concentrações intrafoliculares de E2, P4 e a taxa de E2:P4 não diferiram entre grupos ($P>0,05$).

O LPS reduziu a atividade sérica e intrafolicular de PON1, como observado na tabela 1. Além disso, observamos que a atividade de PON1 no fluido folicular foi 34% da atividade encontrada no soro ($P<0,0001$). Estudos anteriores sugerem que a PON1 é transferida do soro para o fluido folicular ligada ao HDL em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013) e em humanos (BROWNE et al., 2008). Apesar disso, não há nenhuma evidência experimental de que a atividade de PON1 seja modulada durante um desafio inflamatório agudo. Neste sentido, o nosso modelo indica que alterações na PON1 sérica em resposta a um desafio inflamatório agudo são refletidas rapidamente na composição do fluido folicular do folículo pré-ovulatório.

Tabela 1. Atividade de PON1 (U/mL), concentrações de colesterol (mg/dL) e de proteína (g/dL) na fração total e na fração HDL no soro e no fluido folicular (FF) de vacas desafiadas com LPS.

Parâmetro	Controle	LPS	P	Controle	LPS	P
	Soro			FF		
PON1	$130,2 \pm 5,1$	$99,6 \pm 3,3$	0,001	$47,2 \pm 4,4$	$30,6 \pm 3,1$	0,01
Colesterol	$119,9 \pm 5,9$	$107,3 \pm 6,5$	0,17	$38,5 \pm 4$	$36,5 \pm 5,1$	0,76
Proteína	$8,1 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,2$	0,02	$4,7 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,1$	0,23
	Fração de HDL no soro			Fração HDL no FF		
PON1	$44,8 \pm 4,9$	$32,0 \pm 1,9$	0,03	$16,5 \pm 4,2$	$11,5 \pm 2,3$	0,37
Colesterol	$70,3 \pm 5,3$	$50,1 \pm 6,2$	0,03	$25,8 \pm 3,4$	$19,4 \pm 3,3$	0,21
Proteína	$3,9 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	0,07	$2,5 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,3$	0,27

Dados apresentados como Média $\pm$ Erro padrão.

O HDL tem propriedades anti-inflamatórias em estado basal e pró-inflamatórias durante uma resposta de fase aguda (NAVAB et al., 2001). Além disso, o HDL é a única lipoproteína presente no fluido folicular devido à permeabilidade específica da membrana basal do folículo ovariano (JASPARD et al., 1996). Portanto, o HDL é a principal fonte de colesterol para a esteroidogênese. Durante a resposta inflamatória aguda, aumenta a fosfolipase A₂ secretada (sPLA₂) (NEVALAINEN 1993), aumentando o catabolismo de ésteres de HDL-colesterol, resultando na redução dos níveis séricos de HDL-colesterol (TIETGE et al., 2000). Isto está de acordo com observado neste estudo, onde os níveis séricos de HDL-colesterol foram reduzidos pela injeção LPS (Tabela 1). No entanto, também observamos que as alterações nos níveis de HDL-colesterol no soro não refletiram nos níveis intrafoliculares de HDL-colesterol (Tabela 1), pelo menos em curto prazo, ou seja, entre a aplicação de LPS e aspiração do folículo pré-ovulatório.

A presença do complexo HDL-PON1 no fluido folicular é importante, uma vez que a atividade sérica e intrafolicular de PON1 têm sido associadas positivamente com a qualidade do embrião em mulheres submetidas a procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) (BROWNE et al., 2008). Além disso, estudos da nossa equipe demonstram que a adição de PON1 durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos é capaz de aumentar as taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (RINCON et al., 2016).

4. CONCLUSÕES

A resposta inflamatória sistêmica aguda levou à redução da atividade de PON1 e da concentração de HDL-colesterol no soro, que refletiu rapidamente na atividade intrafolicular de PON1, mas não na concentração de colesterol intrafolicular, podendo afetar a qualidade ovocitária em bovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIONAZ, M., et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **J Dairy Sci**, v.90, n.4, p.1740-50, 2007.

BROWNE, R.W., et al. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. **Clin Chem**, v.53, n.2, p.310-7, 2007.

BROWNE, R.W., et al. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. **Hum Reprod**, v.23, n.8, p.1884-94, 2008.

DRAGANOV, D.I., et al. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. **J Biol Chem**, v.275, n.43, p.33435-42, 2000.

DRAGANOV, D.I., et al. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. **J Lipid Res**, v.46, n.6, p.1239-47, 2005.

HAKOGI, E., et al. Endotoxin levels in milk and plasma of mastitis-affected cows measured with a chromogenic limulus test. **Vet Microbiol**, v.20, n.3, p.267-74, 1989.

HERATH, S., et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. **Reproduction**, v.134, n.5, p.683-93, 2007.

JASPARD, B., et al. 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.1352-7, 1996.

MATEUS, L., et al. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. **Anim Reprod Sci**, v.76, n.3-4, p.143-54, 2003.

NAVAB, M., et al. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.21, n.4, p.481-8, 2001.

NEVALAINEN, T.J. Serum phospholipases A2 in inflammatory diseases. **Clin Chem**, v.39, n.12, p.2453-9, 1993.

RINCON, J.A.A., et al. Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development in vitro. **Reprod Domest Anim**, v., 2016.

SCHNEIDER, A., et al. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and PON1 activity in follicular fluid of dairy cows. **Reprod Domest Anim**, v.48, n.6, p.989-94, 2013.

SUZUKI, C., et al. Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. **Domest Anim Endocrinol**, v.20, n.4, p.267-78, 2001.

TIETGE, U.J., et al. Overexpression of secretory phospholipase A(2) causes rapid catabolism and altered tissue uptake of high density lipoprotein cholesterol ester and apolipoprotein A-I. **J Biol Chem**, v.275, n.14, p.10077-84, 2000.