

BAIXAS DOSES DE LIPOPOLISSACARÍDEOS GERAM RESPOSTA SISTÊMICA EM BOVINOS

BRUNA EMANUELE DA SILVA VELASQUEZ¹; JOAO ALVEIRO ALVARADO RINCÓN²; ANDRESSA STEIN MAFFI²; EDUARDO SCHMITT²; CHARLES FERREIRA MARTINS²; MARCIO NUNES CORRÉA³

¹Universidade Federal de Pelotas – velasquezbruna95@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nupeec@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – marcio.nunescorrea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Diversas enfermidades acometem os bovinos, causando um importante prejuízo econômico ao sistema produtivo, dentre elas destacam-se metrite, endometrite, mastite e acidose ruminal (SHELDON et al., 2002; KRAUSE, 2006). Animais acometidos por estas doenças apresentam redução do crescimento folicular, atraso na ovulação, extensão da fase lútea (DOHMEN et al., 2000), alterações nas concentrações dos hormônios gonadotróficos (SHELDON et al., 2002) e esteroides (WILLIAMS et al., 2007) e, aumento do descarte de animais por incapacidade de concepção, causando uma diminuição da fertilidade. Quando ocorrem essas enfermidades há liberação na corrente sanguínea de lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas provenientes da parede celular de bactérias Gram-negativas (RIET-CORREA, 2007), capazes de gerar uma forte resposta inflamatória e imune no animal (KOHCHI et al., 2006). O reconhecimento do LPS se dá a partir dos receptores tipo *Toll* (TLRs), principalmente do TLR4, que em conjunto com as proteínas MD-2 (fator de diferenciação mieloide 2), proteína ligante de LPS (LBP) e CD14 (Grupamento de diferenciação 14), são responsáveis pela sinalização e produção de citocinas e quimiocinas que consequentemente vão ativar e recrutar células imunes como macrófagos, estimulando a resposta inflamatória (TIZARD et al., 2014).

O fenômeno inflamatório tem como função auxiliar a combater o agente patogênico e pode ser classificada como local, caracterizado por dor, rubor, calor, tumor e perca da função, mas apenas no local da lesão, ou sistêmica, quando a capacidade homeostática local é superada, ou pela magnitude do estímulo agressor ou pela insuficiência dos mecanismos reguladores (VOLTARELLI, 1994). Decorrente principalmente de infecções bacterianas, o estímulo com LPS causa uma resposta sistêmica, caracterizada por um aumento da temperatura corporal acima dos níveis fisiológicos (38,5 °C a 39,5 °C) (DIRKSEN, 1993). O desenvolvimento da febre favorece a recuperação do organismo, aumentando a proliferação de linfócitos, ativando neutrófilos envolvidos na destruição de bactérias, auxiliando a síntese de anticorpos e diminuindo a multiplicação de agentes termossensíveis (ZAVAN 2011).

Embora vários estudos tenham relatado os possíveis efeitos do LPS sobre a reprodução de bovinos, a maioria utilizaram doses de LPS $\geq 1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal numa única dose (SHIMIZU et al., 2012; MAGATA et al., 2014; CAMPOS et al., 2017). Essas doses de LPS visam mimetizar a endotoxemia em casos de doenças clínicas ou até doses de LPS maiores do que fisiologicamente possível. Entretanto, acredita-se que quando ocorre a infecção *in vivo*, quantidades pequenas de LPS sejam liberadas na corrente sanguínea por períodos mais longos, dependendo do quadro clínico. Além disso, tem sido observado que mesmo em casos de doenças subclínicas há liberação de LPS (HERATH et al.,

2007). Baseado nisso, objetivou-se avaliar se baixas doses de LPS intravenoso são capazes de gerar uma resposta sistêmica, utilizando a temperatura corporal como indicador.

2. METODOLOGIA

Esse estudo foi realizado em uma fazenda comercial, no município de São Lourenço, RS. Para tal, foram utilizadas 10 novilhas de corte, de raça europeia, saudáveis, com idade média de 14 meses, manejadas dentro de um sistema de confinamento intensivo, recebendo alimentação (60% de volumoso e 40% de concentrado) duas vezes ao dia (manhã e tarde) e água à vontade.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em dois grupos: o grupo LPS ($n=5$) 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®, Saint Louis, Missouri, EUA) via intravenosa, com intervalo de 24 horas; o grupo controle ($n=5$) recebeu 2 aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com o mesmo intervalo.

A temperatura dos animais foi registrada a cada 2 horas durante 48 horas, considerando a hora 0 como o momento da primeira aplicação de LPS, assim, a segunda aplicação foi realizada na hora 24. Para isso, foi utilizado termômetro *data logger* (Ibutton®, Thermochron, Whitewater, USA) acoplado a um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona, que permaneceu nos animais durante todo o período experimental. Os resultados da temperatura foram analisados através do teste estatístico *Two-Way ANOVA*, no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desafio com baixas doses de LPS provocou um aumento de temperatura na hora 26 ($P < 0,05$), caracterizando o estado febril, ou seja, 2 horas após a segunda aplicação de LPS (Figura 1). Das 2 às 6 horas, o grupo LPS também apresentou febre (Figura 1), porém não diferiu estatisticamente do grupo controle, que permaneceu dentro dos valores fisiológicos. A falta de diferença estatística pode ser explicada devido que o grupo controle ter apresentado leve aumento de temperatura às 6 e às 28 horas, sem ser caracterizado como febre. Essa elevação no grupo controle ocorreu, em torno de 4 a 6 horas após a aplicação de solução salina intravenosa, podendo estar relacionada a um estresse nos animais. Em situações de estresse ocorre a liberação do cortisol pelo eixo hipotalâmico-hipofisário (DONIN, 2007), esse hormônio atua a nível de hipotálamo, provocando feedback negativo, e consequente aumento de temperatura. Esse efeito se dá em função da aceleração do metabolismo, estimulando à gliconeogênese, à mobilização de ácidos graxos livres e o catabolismo proteico gerando energia e consequentemente o calor (Yehuda, et al., 2006).

No segundo desafio com LPS (24 h) a temperatura aumentou mais rápido e foi mais elevada do que no primeiro, provavelmente porque o organismo já se encontrava pré-sensibilizado e com uma pequena concentração de LPS na circulação, assim, a nova dose de LPS estimulou uma resposta febril mais acentuada, conforme sugerido por FERNANDEZ (2006).

Constatou-se também que os animais do grupo LPS, visualmente apresentaram temperaturas médias inferiores em relação ao controle cerca da

hora 44. Isto provavelmente ocorreu por uma resposta compensatória do organismo, segundo GIUSTI-PAIVA (2003), uma infecção leva o hospedeiro a desenvolver uma resposta que pode ser resumida em dois mecanismos, o primeiro inflamatório envolvendo citocinas que estimularão a febre e o segundo compensatório, representado pela participação endócrina e antipirética envolvendo o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal com liberação de vasopressinas e outras moléculas que limitam a febre, em alguns casos este mecanismo pode até causar uma hipotermia.

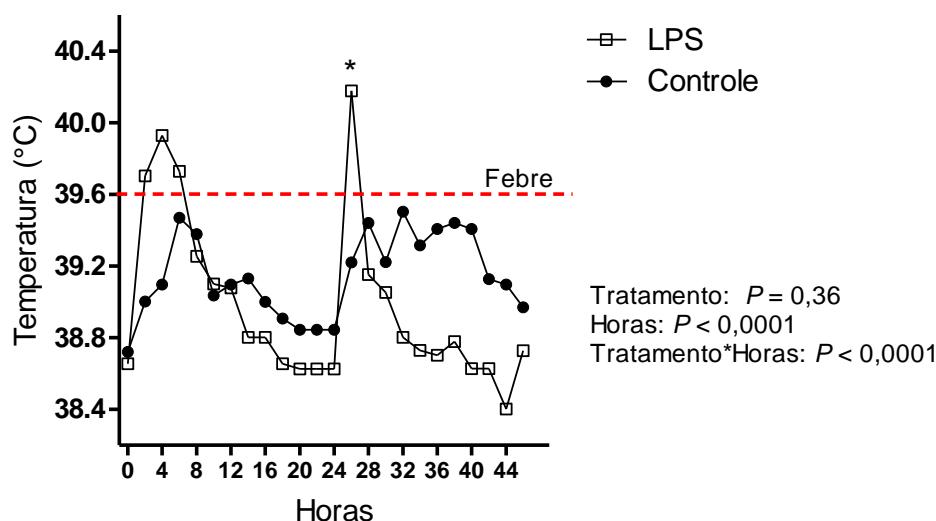


Figura 1: Temperatura intravaginal (°C) em novilhas de corte desafiadas ou não com LPS às 0 e 24 horas.

4. CONCLUSÕES

O desafio com baixas doses de LPS intravenoso gera uma resposta sistêmica duas horas após o desafio, caracterizada pelo aumento da temperatura corporal, permanecendo acima do fisiológico até 6 horas. Além disso, uma segunda exposição ao LPS, gera uma resposta distinta demonstrando possíveis adaptações do organismo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

DIRKSEN, G.; GRUENDER, H.; STOEGER, M.: Rosenberger - **Exame clínico dos bovinos**, 3ed., Guanabara Koogan, 1993.

DOHMEN, M.J.; JOOP, K.; STURK, A.; BOLS, P.E.; LOHUIS, J.A. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology*, v. 54, n. 7, p. 1019-32, 2000.

DONIN, D.S.; HEINEMANN, R.; MOREIRA, N. Estresse térmico e suas consequências sobre as características do sêmen de machos suíños. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.31, n.4, p. 456-461, 2007.

FERNANDES, A.C.C. Efeito de infusões intravenosas e intramamárias de lipopolissacárido (LPS) sobre parâmetros inflamatórios, reprodutivos e metabólicos em novilhas e vacas da raça holandesa. 2016. 149 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária) - **Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.**

GIUSTI-PAIVA, A et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, Ribeirão Preto, v. 447, p. 175–180, 2003.

HANSEN, P. J.; SOTO, P.; NATZKE, R.P. Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in pregnancy mortality. **American Journal Reproductive Immunology**, v.51, p.294-301, 2004.

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. 683-93, 2007.

KRAUSE, K. M.; OETZEL, G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 126, n. 3-4, p. 215-236, 2006.

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. **J Biosci Bioeng**, v. 102, n. 6, p. 485-96, 2006.

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.

RIET-CORREA, F. SCHILD, L., LEMOS, R.; BORGES, J.; **Doenças de Rumíneos e Equinos 1 e 2**, ed. 3. Editora Pallotti 2007. v.1, p.708.

RIOLLET C, RAINARD P. AND POUTREL B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. **J Dairy Sci** 84:1077-1084, 2001.

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. 837-45, 2002.

SHIMIZU, T.; MIYAUCHI, K.; SHIRASUNA, K.; BOLLWEIN, H.; MAGATA, F.; MURAYAMA, C.; MIYAMOTO, A. Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol production in bovine granulosa cells from small and large follicles. **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 7, p. 1134-42, 2012.

SOTO, P.; NATZKE, R. P.; HANSEN, P. J. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: Actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F_{2α} and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **American Journal Reproductive Immunology**, v.50, p.263-272, 2003.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9 ed. Cap 2. Imunidade Inata: O Reconhecimento de Invasores. Pagina 237-238, Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

YEHUDA, R., TISCHLER, L., GOLIER, J., GROSSMAN, R., BRAND, S., KAUFMAN, S. Longitudinal assessment of cognitive performance in Holocaust survivors with and without PTSD. **Biological Psychiatry**, 60, 714 – 72, 2006.

ZAVAN,B. **Aspectos morfológicos e comportamentais após Inflamação induzida por Ips durante a gestação de Camundongos**. 2011. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal de Alfenas.