

ATIVIDADE SÉRICA DE PARAOXONASE-1 EM BOVINOS DESAFIADOS COM LPS

GIULIANA DE AVILA FERRONATO¹; JOAO ALVEIRO ALVARADO RINCÓN¹;
ANDRESSA STEIN MAFFI¹; ANTONIO AMARAL BARBOSA¹; RAFAEL
GIANELLA MONDADORI²; CÁSSIO CASSAL BRAUNER³

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), UFPel–
giulianaferronato@hotmail.com

²Faculdade de Veterinária, UFPel

³Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel - cassiocb@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os bovinos podem ser expostos a diversas doenças durante sua vida produtiva, principalmente em períodos de maior susceptibilidade, como o pós-parto recente, que é caracterizado por apresentar altos índices de doenças infecciosas, como mastite e metrite (MAHNANI et al., 2015). A ocorrência dessas doenças tem sido associada à presença de transtornos reprodutivos, que acabam acarretando grandes perdas econômicas para o setor produtivo (BRUUN et al., 2002; HERAVI MOUSSAVI et al., 2012). Esse tipo de doenças pode estar presente nos animais de forma clínica ou subclínica (sem sinais clínicos evidentes), podendo passar despercebidas nos rebanhos quando na sua forma subclínica. Essas infecções são causadas principalmente por bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli*, que possuem na sua estrutura uma molécula denominada lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina capaz de desencadear uma resposta de fase aguda no organismo (KEMPER et al., 2013).

Durante essa resposta, diversos intermediários inflamatórios alteram seus níveis circulantes em função de sinalizar, ativar células imunes e combater o agente infeccioso. Dentre eles, destaca-se a paraoxonase-1 (PON1), uma enzima sintetizada no fígado que circula na corrente sanguínea ligada à lipoproteína de alta densidade (HDL) (MACKNESS et al., 1996). Em bovinos, a PON1 tem sido caracterizada principalmente como uma proteína de fase aguda negativa (BIONAZ et al., 2007), diminuindo seus níveis circulantes em função das citocinas produzidas durante o processo inflamatório, assim, a resposta eficiente aos processos inflamatórios e a recuperação dos animais doentes gera um restabelecimento dos níveis normais de PON1 após o período de estresse (BOSSAERT et al., 2012). Nesse sentido, PEZZULO et al. (2012) sugere que a PON1 pode desempenhar um papel importante na susceptibilidade a várias doenças e deficiências imunológicas quando seus níveis apresentam-se muito baixos.

Por outro lado, redução da PON1 sérica pode refletir sua concentração no fluido folicular, visto que apresenta correlação positiva nos dois compartimentos (SCHNEIDER et al., 2013a). Onde maior atividade de PON1 folicular têm sido associada com maior qualidade e desenvolvimento embrionário em bovinos (RINCON et al., 2016) e em humanos (BROWNE et al., 2008), principalmente atribuído ao seu efeito antioxidante. Assim, a determinação sérica de PON1 vem sendo utilizada para auxiliar o diagnóstico de algumas doenças e distúrbios metabólicos em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013b). Nesse sentido, objetivou-se avaliar o efeito de duas aplicações de LPS intravenoso sobre a atividade de PON1 sérica em bovinos.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 16 novilhas de corte (raça europeia), clinicamente saudáveis, em torno de 14 meses de idade, manejadas em sistema confinado. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: o grupo LPS (n=8) que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) via intravenosa, com intervalo de 24 horas; e o grupo controle (n=8) que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com o mesmo intervalo de tempo. Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil (Protocolo 9364).

Os animais tiveram a temperatura corporal aferida nas horas 0, 4, 24 e 28, sendo que as aplicações de LPS foram nas horas 0 e 24. Foram coletadas amostras de sangue através do complexo arteriovenoso da coccígea com a utilização de tubos Vacutainer (BD Diagnostics, São Paulo, Brasil), nas horas -24, 0, 4, 8, 24, 28, 32 e 48. Os tubos foram centrifugados a 1000 x g e o soro separado, colocado em microtubos e armazenado a -20 °C até serem analisados. Para determinação da atividade de PON1 foi utilizado um protocolo previamente descrito por BROWNE et al. (2007). Brevemente, 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 em espectrofotômetro, adicionando-se 3,3 µL da amostra diluída em 500 µL da solução de trabalho. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e um tempo de leitura de 1 minuto. A atividade da enzima foi determinada pela seguinte fórmula: Δ Absorbância x 115 x 3. A atividade da PON1 foi expressa em U/mL.

A análise estatística foi realizada no programa NCSS 2005, através do teste ANOVA de medidas repetidas. Foi considerado como diferença estatística valores de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desafio com LPS gerou aumento da temperatura corporal (>39,6°C) quatro horas após cada desafio, em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). A temperatura corporal do grupo controle variou de 38,8 a 39,2 °C durante o experimento. Isso confirma que as doses de LPS foram suficientes para gerar uma resposta sistêmica, suportado pela presença de febre (>39,6°C), semelhante ao demonstrado por ZEBELI et al. (2013) quem relataram que a temperatura corporal dos animais aumenta conforme o aumento das doses de LPS.

Entretanto, as doses utilizadas de LPS não afetaram a atividade sérica de PON1 durante o período estudado ($P = 0,20$), quando comparado ao grupo controle (Figura1), diferente do reportado por CAMPOS et al. (2017), que observou uma diminuição da atividade sérica e intrafolicular de PON1 decorrente do desafio com uma única dose de LPS (2,5 µg/kg de peso corporal). Isso ocorreu provavelmente, porque antes do primeiro desafio com LPS (-24 horas) o grupo controle já apresentava menor atividade de PON1 (82,56 u/mL) do que o grupo LPS (104,4 U/mL; $P < 0,05$). Alguns fatores podem interferir na atividade sérica da PON1 em bovinos, como idade e estado de saúde dos animais (FOLNOZIC et al., 2015), porém um fator muito importante é variabilidade genética, como no caso dos SNP'S (Polimorfismos de nucleotídeo único) relatados por SILVEIRA et al. (2015), que reportou vários genótipos da enzima em bovinos, e sua associação com a atividade sérica da PON1. Em nosso estudo os animais eram provenientes

da mesma propriedade, mesma raça e dieta. Sendo o efeito genético e a ocorrência de SNP'S uma possível causa dessa variação inicial. Assim, pode ter acontecido que maior número de animais que possuíam genótipo para maior atividade de PON1 ficaram no grupo desafiado com LPS e maior número de animais que possuíam genótipo de menor atividade de PON1 no grupo controle. No entanto, seria necessário realizar análises genéticas para confirmar essa hipótese.

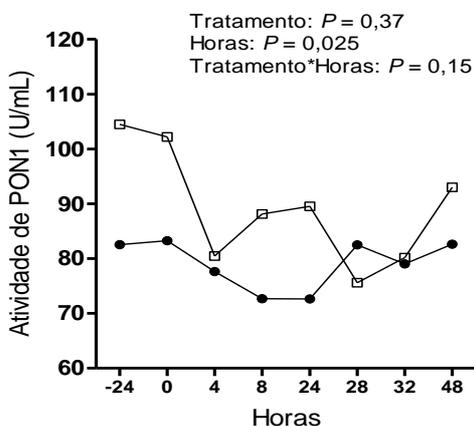


Figura 1: Atividade da paraoxanase-1 sérica de novilhas desafiadas ou não com duas doses de LPS (0,5 µg/kg de peso corporal) às 0 e 24 horas.

Embora o desafio com LPS não tenha apresentado efeito estatístico na atividade sérica de PON1, fisiologicamente comportou-se como uma proteína de fase aguda negativa, diminuindo sua atividade sérica de 102,19 U/mL para 80,46 U/mL no primeiro desafio e de 89,54 U/mL para 75,60 U/mL no segundo desafio, 4 horas após a aplicação do LPS. Ao contrário do grupo controle, onde a atividade de PON1 não apresentou variações relevantes, mantendo sua atividade sérica entre 82,56 U/mL e 72,66 U/mL durante todo o experimento. Apesar de não apresentar diferenças estatísticas esses resultados sugerem que as doses de LPS utilizadas podem alterar a atividade sérica da PON1, o que na prática indica que infecções onde há liberação de pequenas quantidades de LPS na corrente sanguínea podem alterar a atividade dessa enzima. Isso pode ser prejudicial para o desempenho reprodutivo do animal, visto que a atividade da PON1 sérica reflete na atividade intrafolicular e, maior atividade intrafolicular de PON1 tem sido associada com melhor qualidade e desenvolvimento embrionário em bovinos (RINCON et al., 2016) e em humanos (BROWNE et al., 2008), principalmente pelo seu efeito antioxidante.

4. CONCLUSÕES

A atividade de paraoxanase-1 sérica pode sofrer alterações quando os animais são desafiados com lipopolissacarídeos. Entretanto, é necessário conhecer a atividade fisiológica da enzima de cada animal para poder comparar com maior acurácia, visto que fatores como a variação genética podem afetar sua atividade sérica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. 1740-50, 2007.

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. 222-5, 2012.

BROWNE, R.W.; KOURY, S.T.; MARION, S.; WILDING, G.; MUTI, P.; TREVISAN, M. 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.; 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. **Hum reprod**, v. 23, n. 8, p. 1884-94, 2008.

BRUUN, J.; ERSBØLL, A.K.; ALBAN, L. Risk factors for metritis in Danish dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 54, n. 2, p. 179-190, 2002.

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.

FOLNOZIC, I.; TURK, R.; DURICIC, D.; VINCE, S.; PLEADIN, J.; FLEGAR-MESTRIC, Z.; VALPOTIC, H.; DOBRANIC, T.; GRACNER, D.; SAMARDZIJA, M. Influence of Body Condition on Serum Metabolic Indicators of Lipid Mobilization and Oxidative Stress in Dairy Cows During the Transition Period. **Reprod Domest Anim**, v. 50, n. 6, p. 910-7, 2015.

HERAVI MOUSSAVI, A.; MESGARAN, M.D.; GILBERT, R.O. Effect of mastitis during the first lactation on production and reproduction performance of Holstein cows. **Trop Anim Health Prod**, v. 44, n. 7, p. 1567-73, 2012.

KEMPER, N.; BARDEHLE, D.; LEHMANN, J.; GERJETS, I.; LOOFT, H.; PREIßLER, R. **The role of bacterial pathogens in coliform mastitis in sows.** 2013. 130-6.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B.; N. DURRINGTON, P.; CONNELLY, P.; HEGELE, R. **Paraoxonase: Biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins.** 1996. 69-76.

MAHNANI, A.; SADEGHI-SEFIDMAZGI, A.; CABRERA, V.E. Consequences and economics of metritis in Iranian Holstein dairy farms. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 9, p. 6048-6057, 2015.

PEZZULO, A.A.; HORNICK, E.E.; RECTOR, M.V.; ESTIN, M.; REISETTER, A.C.; TAFT, P.J.; BUTCHER, S.C.; CARTER, A.B.; MANAK, J.R.; STOLTZ, D.A.; ZABNER, J. Expression of human paraoxonase 1 decreases superoxide levels and alters bacterial colonization in the gut of *Drosophila melanogaster*. **PLoS one**, v. 7, n. 8, p. e43777, 2012.

RINCON, J.; 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. **Reprod Domest Anim**, v. 51, n. 5, p. 827-30, 2016.

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. **Reprod Dom Anim**, v. 48, n. 6, p. 989-94, 2013a.

SCHNEIDER, A.; CORREA, M.N.; BUTLER, W.R. Short communication: acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 1, p. 269-71, 2013b.

SILVEIRA, P.A.; SCHWEGLER, E.; MONTAGNER, P.; KRAUSE, A.R.; ACOSTA, D.A.; HALFEN, J.; GARLET, T.; BARROS, C.C.; CORREA, M.N.; SCHNEIDER, A. Characterization of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the bovine paraoxonase 1 (PON1) gene affecting serum enzyme activity in dairy cows. **Vet J**, v. 205, n. 1, p. 101-3, 2015.

ZEBELI, Q.; SIVARAMAN, S.; DUNN, S.M.; AMETAJ, B.N. Intermittently-induced endotoxaemia has no effect on post-challenge plasma metabolites, but increases body temperature and cortisol concentrations in periparturient dairy cows. **Res Vet Sci**, v. 95, n. 3, p. 1155-62, 2013.