

DESAFIO COM LIPOPOLISSACARÍDEO: ATUAÇÃO SOBRE ATIVIDADE DE PARAOXONASE SANGUÍNEA E FOLICULAR

ANDRESSA STEIN MAFFI¹; JENIFFER VAHL¹; JOAO ALVARADO RINCÓN¹;
GABRIELA BUENO LUZ¹; ANTONIO BARBOSA¹; CASSIO CASSAL BRAUNER²

¹Núcleo de Pesquisa Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), UFPEL – andressamaffi@gmail.com

²Professor adjunto Departamento de Zootecnia (UFPEL) – cassiocb@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As doenças do trato reprodutivo estão entre as principais enfermidades da cadeia produtiva. A infertilidade é causada principalmente por infecção uterina logo após o parto em bovinos (SHELDON et al., 2002), onde em torno de 40% dos animais desenvolvem uma infecção que persiste até 3 semanas pós-parto e desses, em torno de 15% tem uma infecção além das 3 semanas, caracterizando a endometrite (SHELDON; DOBSON, 2004). Dentre os microorganismos envolvidos na patogênese dessas enfermidades, a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* é a primeira a ser isolada e a mais comum (SHELDON et al., 2002).

A multiplicação e divisão dessas bactérias, provoca a liberação do lipopolissacarídeo (LPS), um constituinte da parede celular externa de bactérias gram negativas (CARROLL et al., 2009). O LPS atua como uma endotoxina e pode ser detectado no fluido uterino, soro e fluido folicular (MATEUS et al., 2003), sendo que a migração dessa endotoxina para a corrente circulatória e fluido folicular desencadeia diversas alterações metabólicas e reprodutivas (WALDRON et al., 2003, JACOBSEN et al., 2005; HERARTH et al., 2007, MAGATA et al., 2014, BROMFIELD; SHELDON, 2013). No tecido ovariano, trabalhos já têm relatado redução na produção de estradiol, prolongamento da fase luteal, aumento do intervalo cio-ovulação e menor expressão de genes relacionados a esteroidogênese (HERARTH et al., 2007, MAGATA et al., 2014, LUTTGENAU et al., 2016).

Além disso, mais recentemente um estudo demonstrou que o desafio com uma única dose de LPS reduziu os níveis de Paraoxonase 1 (PON 1) intrafolicular (CAMPOS et al., 2017). A PON 1 é uma enzima produzida no fígado (FERRÉ 2002) e sua principal função é proteger a membrana celular e os lipídios circundantes contra danos oxidativos, aumentando assim a citoproteção contra a apoptose (FUHRMAN, GANTMAN, AVIRAM, 2010). Adicionalmente, a PON1 tem sido caracterizada como uma proteína de fase aguda negativa, reduzindo sua atividade sérica em função das citocinas produzidas durante processos inflamatórios, sendo assim um importante marcador inflamatório. Porém, ainda são escassos os estudos que buscaram avaliar a atividade dessa enzima em animais desafiados. Com isso o objetivo desse estudo foi avaliar os níveis de PON sanguínea e folicular em vacas desafiadas com LPS.

2. METODOLOGIA

Esse estudo foi realizado em uma fazenda comercial, no município de São Lourenço do Sul, RS. Foram avaliadas 10 novilhas de corte, de raça europeia, saudáveis, com idade média de 14 meses, manejadas dentro de um sistema de confinamento, 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 coleta de sangue foi realizada através do complexo arteriovenoso da coccígea 48 horas em relação ao primeiro desafio e a coleta do fluido folicular ocorreu 96 horas em relação ao primeiro desafio. Para determinação da atividade de PON1 no soro e no fluido folicular foi utilizado um protocolo previamente utilizado em bovinos (CAMPOS et al., 2017). 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: $\Delta \text{Absorbância} \times 115 \times 3$. A atividade da PON1 foi expressa em U/mL. Os resultados da atividade sérica e intrafolicular de PON1 nos animais desafiados com LPS e controle, foram analisados através do teste de t e depois verificada a correlação da atividade da enzima no soro e no fluido folicular através do teste de correlação de Pearson no Graphpad Prism 5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliarmos a figura 1 podemos observar que a aplicação de LPS não alterou a atividade de PON 1 no soro às 48 horas e fluido folicular às 96 horas em relação ao primeiro desafio com LPS.

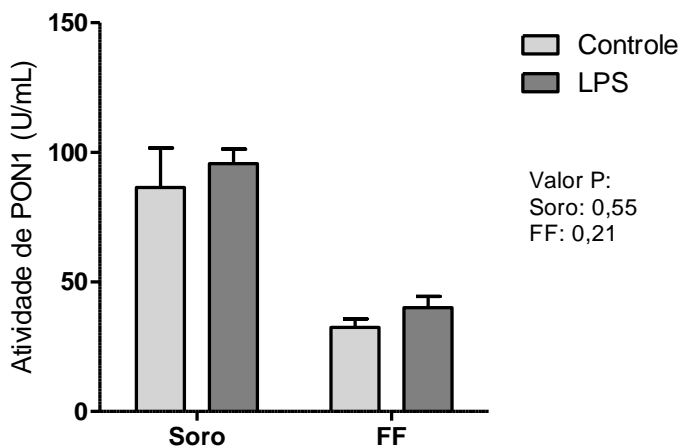


Figura 1. Atividade de Paraoxonase 1 no soro e fluido folicular de animais desafiados com 2 aplicações de 0,5 µg/Kg de LPS (LPS) ou NaCl 0,9% (Controle) em um intervalo de 24 horas.

Apesar de não ter sofrido alteração na sua atividade, foi possível observar uma correlação alta e positiva entre a atividade de PON1 no soro e no fluido folicular ($r=0,73$; $P<0,01$). Essa correlação entre soro e fluido folicular também foi evidenciada em mulheres submetidas a fertilização *in vitro* no estudo de BROWNE et al., 2008.

A manutenção de níveis adequados dessa enzima é importante, visto que sua presença no fluido folicular está relacionada a melhora no número de células do embrião, indicando desempenhar um papel protetor do oócito e desenvolvimento embrionário precoce (BROWE et al., 2008). Além disso, em bovinos foi reportado que

ao adicionar PON1 durante a maturação oocitária *in vitro*, houve um aumento da taxa de blastocistos (RINCÓN et al., 2016).

No entanto, nos casos onde os animais passam por doenças do trato reprodutivo, tem-se relatado uma redução da atividade dessa enzima (SCHNEIDER et al., 2013, KRAUSE et al., 2014). A PON1 é uma proteína de fase aguda negativa produzida pelo fígado e tem seus níveis reduzidos frente ao desafio com LPS (FEINGOLD et al., 1998, CAMPOS et al., 2017). Essa redução ocorre devido ao processo inflamatório desencadeado por essa endotoxina, a qual leva a ocorrência de febre, aumento nos níveis de cortisol, fator de necrose tumoral e interleucinas 1, 6 e 8 (WALDRON et al., 2003).

Em contrapartida aos resultados de Feingold et al., (1998), e Campos et al., (2017), em nosso estudo não foi evidenciado alteração nos níveis de PON1 sanguínea e folicular. Acreditamos que parte dessa resposta se deve ao intervalo entre o desafio com LPS e a avaliação desse marcador, e a dose utilizada para o desafio. A partir de estudos prévios, é possível observar que as citocinas inflamatórias apresentam elevação uma hora pós desafio e retorno aos seus valores fisiológicos entre 4 e 6 horas (WALDRON et al., 2003). O estudo de Feingold et al., (1998) realizou o desafio em hamster, e o intervalo entre o desafio e a avaliação de PON1 foi de 24 horas, já o estudo de Campos et al., (2017) foi realizado em vacas leiteiras não lactantes e o intervalo entre o desafio e a análise foi de 6 horas.

Ainda são limitados os estudos que demonstrem o perfil de alteração nos níveis de PON1, Carrol et al., (2009) ao avaliar outras proteínas de fase aguda, demonstrou que os níveis de amiloide A, uma proteína de fase aguda positiva, teve seus níveis aumentados a partir das 3 horas pós desafio, permanecendo elevado além das 8 horas. Enquanto a ceruloplasmina, uma proteína de fase aguda negativa, teve redução dos seus níveis somente nas duas e três horas pós desafio.

4. CONCLUSÕES

Os níveis sanguíneos e foliculares de paraoxanase não são alterados pelo desafio com LPS em intervalos de 24 horas em bovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L. 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.
- 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, p. 1-9, 2013.
- BROWNE, R. W.; SHELLY, W. B.; BLOOM, M.S., et al. 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, p.1884-1894, 2008.
- CAMPOS, F.T.; RINCON, JOAO, A.A.; ACOSTA, D.A.V. et al. The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on sérum 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, J.R. et al. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. **Innate Immun**, v.15, n. 2, p.81-9, 2009.
- FEINGOLD, K.R.; MEMON, R.A.; MOSER, A.H., et al. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. **Atherosclerosis**, v.139, p.307–315, 1998.
- FERRÉ, N.; CAMPS, J.; PRATS, E. et al. Serum paraoxonase activity: A new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. **Clinical Chemistry**, v. 48, p. 26-268, 2002.
- 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, p. 61-68, 2010.
- HERATH, S.; WILLIAMS, E.J; LILLY, S.T. et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. **Reproduction**, v. 134, p. 683-693, 2007.
- JACOBSEN, S.; TOELBOELL, T.; ANDERSEN, P. Dose dependency and individual variability in selected clinical, haematological and blood biochemical responses after systemic lipopolysaccharide challenge in cattle. **Vet. Res**, v. 36, p. 167–178, 2005.
- KRAUSE, A.R.T.; PFEIFER, L.F.M.; MONTAGNER, P. 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, p. 8-14, 2014.
- LUTTGENAU, J.; HERZOG, K.; STRUVE, K. et al. LPS-mediated effects and spatio-temporal expression of TLR2 and TLR4 in the bovine corpus luteum. **Reproduction**, v. 151, n. 4, p. 391-399.
- MAGATA, F.; HORIUCHI, M.; ECHIZENYA, R. et al. Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.144, p. 6-13, 2014.
- MATEUS, L.; LOPES, C.L.; DINIZ, P. et al. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 143–154, 2003.
- RINCÓN, J.A.A.; MADEIRA, E.M.; CAMPO, F.T. et al. Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development in vitro. **Reprod Dom Anim**, v. 51, p. 827–830, 2016.
- SCHNEIDER, A.; CORREA, M.N.; BUTLER, W.R. Short communication: acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Res Vet Sci**, v.95, n.1, p.269-271, 2013.
- SHELDON, I.M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.295-306, 2004.
- SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E.; RYCROFT, A.N. et al. 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.
- WALDRON, M.R.; NISHIDA, T.; NONNECKE, B.J. et al. Effect of Lipopolysaccharide on Indices of Peripheral and Hepatic Metabolism in Lactating Cows. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 3447–3459, 2003.