

LIPOPOLISSACARÍDEOS ALTERAM A EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À QUALIDADE UTERINA EM BOVINOS

**GIULIANA DE AVILA FERRONATO^{1,3}; JOAO ALVEIRO ALVARADO RINCÓN¹;
ANDRESSA STEIN MAFFI¹; ANTÔNIO AMARAL BARBOSA¹; BERNARDO
GARZIERA GASPERIN²; MÁRCIO NUNES CORRÊA^{1,4}**

¹*Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), UFPel*

²*Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal (ReproPEL), UFPel*

³*giulianaferronato@hotmail.com;* ⁴*marcio.nunescorrea@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de carne possui extrema importância na economia do Brasil, sendo responsável por R\$ 80 milhões somente no último trimestre de 2019 (IBGE, 2019). Isso ocorre principalmente pelo Brasil possuir o maior rebanho comercial de bovinos e ser o maior exportador de carnes do mundo (CNA, 2018). A lucratividade desse setor, entre outros fatores, está muito relacionada à eficiência reprodutiva do rebanho, ou seja, o índice de terneiros nascidos e desmamados sadios comparado ao número de fêmeas em fase de reprodução (VALLE et al., 2000), sendo o ideal que se alcance uma natalidade de 80% (FOLZ, 2002). Contudo, esse valor pode variar negativamente conforme o manejo da propriedade.

Um dos períodos de maior cuidado e importância para gerar uma nova prenhez é o pós-parto recente (MORAES et al., 2014). No entanto, nesse período as vacas muitas vezes entram em balanço energético negativo (NEWMAN et al, 2016), que somado ao estresse decorrente do parto, diminuem a imunidade (FURKEN et al., 2015) dos animais, os tornando mais susceptíveis à endotoxemia por lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é uma toxina presente na parede celular das bactérias gram-negativas, que é reconhecida pelas células de defesa do animal através do receptor do tipo toll 4 (TLR4) (HERATH et al., 2006) e é capaz de desencadear uma resposta inflamatória, ocasionando aumento da secreção de mediadores inflamatórios (MENCHETTI et al., 2018).

A endotoxemia é um aumento de LPS na corrente sanguínea, que pode ser causado por doenças infecciosas ou metabólicas. Estas enfermidades podem estar presentes nos animais de forma clínica ou subclínica (sem sinais clínicos evidentes), acarretando em perdas econômicas para o setor produtivo (HERAVI MOUSSAVI et al., 2012). Os prejuízos ocorrem principalmente pela relação entre endotoxemias e redução de fertilidade em fêmeas. Além disso, tem sido evidenciado que o LPS possui ação em todo trato reprodutivo dos animais (BIDNE et al., 2018).

O útero é um órgão essencial na prenhez, sendo responsável pela implantação do embrião e o desenvolvimento do feto (MOORE et al., 2016). Direta ou indiretamente, o LPS pode alterar a expressão de genes ligados à inflamação em vários tecidos bovinos, sendo assim, poderia também afetar a expressão gênica no útero (CAMPOS et al., 2018). Tendo isso em vista, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência de duas aplicações de LPS na expressão de genes ligados à inflamação e qualidade uterina em bovinos de corte.

2. METODOLOGIA

O estudo contou com 16 novilhas de corte (raça europeia), clínicamente saudáveis, em torno de 14 meses de idade, manejadas em sistema confinado. Quatorze dias antes de iniciar o experimento (D-14) os animais passaram por um

protocolo hormonal para sincronização da onda folicular, foi aplicada uma dose intramuscular (i.m) de 25 mg de PGF2 α (Lutalyse, Zoetis®, São Paulo, Brasil). No dia zero (D0) foi realizada a colocação intravaginal do dispositivo liberador de progesterona (1g de P4, CIDR, Zoetis®, São Paulo, Brasil), mais uma injeção de 2 mg de Benzoato de estradiol (Gonadiol, Zoetis®, São Paulo, Brasil) e 25 mg de PGF2 α (Lutalyse, Zoetis®, São Paulo, Brasil) via i.m. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos e receberam o tratamento ou controle nos dias 1 e 2. O grupo LPS ($n=8$) recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,5 μ g/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) via i.v., com intervalo de 24 horas, e o grupo controle ($n=8$) recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com o mesmo intervalo. A temperatura corporal dos animais foi aferida nas horas 0, 4, 24 e 28, através de termômetros digitais data logger (Ibutton®, Thermochron, Whitewater, USA), implantados via intravaginal. 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 foram abatidos no dia 5 do experimento, quando foram coletadas amostras do útero, captando todas as camadas do órgão. As amostras foram maceradas em 1mL de trizol (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) e armazenados em nitrogênio líquido. O RNA foi extraído por método de reagentes conforme o protocolo do fabricante do trizol (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) e após foi realizada uma purificação baseado em coluna com o kit comercial RNeasy Cleanup (Qiagen®, Hilden, Alemanha). O cDNA foi realizado utilizando o kit iScript Synthesis (BIORAD®, Hercules, EUA). Foi realizado PCR em tempo real dos genes: *toll like receptor 4 (TLR4)*, *tumor necrosis factor (TNF)*, *interleukin 1 beta (IL1B)*, *cytochrome c oxidase subunit II (COX2)* e *Nanog homeobox (NANOG)*.

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) utilizando o test t. Foi considerado como diferença estatística valores de $P<0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desafio com LPS gerou aumento da temperatura corporal ($>39,6^{\circ}\text{C}$) 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 utilizadas foram suficientes para gerar uma resposta sistêmica, suportado pela presença de febre ($>39,6^{\circ}\text{C}$) (ZEBELI et al. 2013). O desafio, entretanto, não afetou a expressão dos genes relacionados com reconhecimento de LPS e resposta imune, *TLR4*, *TNF* e *IL1B* ($P>0,05$), como demonstrado na figura 1(A), (B) e (C), respectivamente. No entanto, foi observada uma diminuição na expressão dos genes relacionados com qualidade do ambiente uterino, *COX2* ($P=0,024$) e *NANOG* e ($P=0,020$), conforme figura 1 (C) e (D).

A inflamação que é gerada pelo aumento de LPS na corrente sanguínea em doenças subclínicas, sejam elas infecciosas ou metabólicas, foi mimetizada neste experimento através da aplicação de duas doses baixas de LPS. Porém, essas condições não afetaram a expressão de *TLR4*, que é o principal mecanismo de reconhecimento do LPS (HERATH et al., 2006). Experimentos tanto *in vitro* (SWANGCHAN-UTHAI et al., 2012) quanto *in vivo* (BILAL et al., 2016) reportaram aumento na expressão de *TLR4*, frente a desafios com LPS, em células endometriais ou no útero. Além disso, (CRONIN et al., 2012) mostra que quando

é feito *knockdown* do gene do *TLR4* ocorre ao mesmo tempo uma diminuição de mediadores inflamatórios, como *ILB1*, *IL6* e *IL8*, indicando que os receptores *TLR4* estão diretamente relacionados com a indução da inflamação. Isso corrobora nossos resultados, pois o LPS não afetou na expressão de *TLR4* e como consequência disso, os mediadores inflamatórios *TNF* e *IL1B* também não foram alterados. Isto pode ter ocorrido pelo curto tempo de exposição dos animais ao LPS, não sendo o suficiente para ativar esta rota ou pelo tempo entre a última aplicação de LPS e a coleta dos tecidos. Nesse sentido, SWANGCHAN-UTHAI et al. (2012) demonstrou que frente à exposição ao LPS, a expressão de *TNF* aumenta na primeira hora e de *IL6* seis horas após e em 24 horas esses níveis já retornaram ao normal, o que poderia justificar nossos resultados.

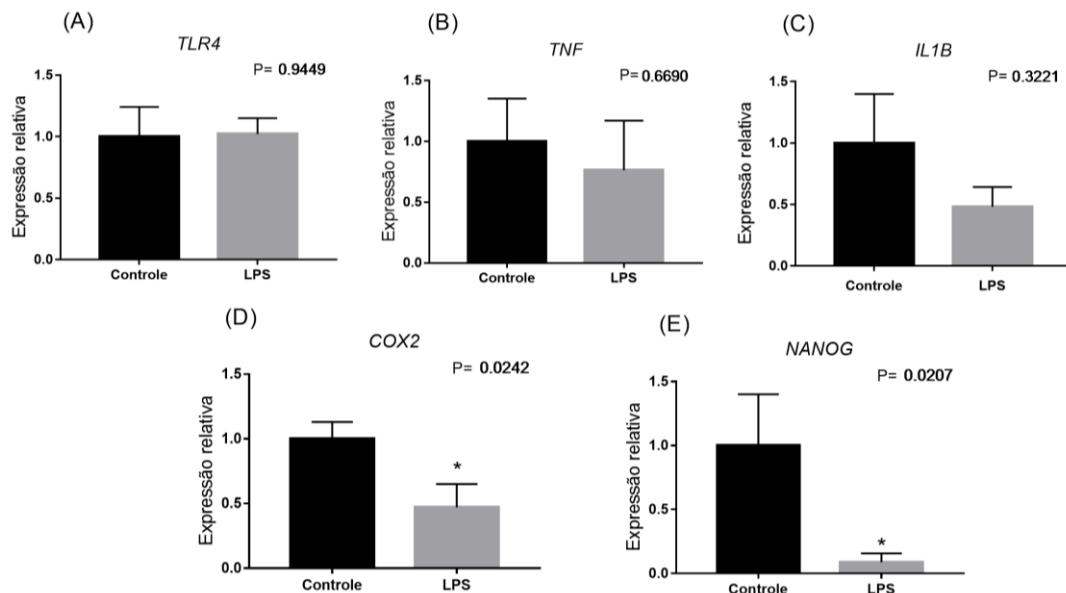


Figura 1 – Expressão relativa dos genes (A) *TLR4*, (B) *TNF*, (C) *IL1B*, (D) *COX2* e (E) *NANOG* em útero de novilhas desafiadas ou não com duas doses de LPS (0,5 µg/kg de peso corporal) com intervalo de 24 h.

Direta ou indiretamente, o desafio com LPS diminuiu pela metade a expressão gênica de *COX2*, quando comparado com o controle. Essa enzima tem a função de sintetizar a prostaglandina E2 (PGE_2), assim, nossos resultados sugerem que o LPS pode gerar uma diminuição de PGE_2 , que é sintetizada pelas células do endométrio, e é essencial para a manutenção da prenhez pela regulação do corpo lúteo (POYSER, 1995). Somado a isso, a expressão de *NANOG* diminuiu 92% com a exposição ao LPS, esse gene está relacionado com a pluripotência das células, sendo importante no processo de regeneração do endométrio frente a injúrias. Em embriões de cabras, um *knockdown* de *NANOG* diminui o número de células do trofoblasto (HABIBI et al., 2018), que atua na implantação do embrião no endométrio. Porém no útero são necessários mais estudos para explicar as problemáticas e os mecanismos pelos quais o LPS diminui a expressão de *NANOG*. Podendo ocorrer um prejuízo na implantação do embrião por uma má regeneração do endométrio, devido a sua função de pluripotência.

4. CONCLUSÕES

O desafio com duas doses de LPS não altera a expressão de *TLR4*, *TNF* e *IL1B* no útero. No entanto, esse é o primeiro estudo em demonstrar que o LPS pode comprometer a qualidade do ambiente uterino através da diminuição da expressão dos genes *COX2* e *NANOG*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIDNE, K.L.; DICKSON, M.J.; ROSS, J.W.; BAUMGARD, L.H.; KEATING, A.F. Disruption of female reproductive function by endotoxins. **Reproduction**, v. 155, n. 4, p. R169-R181, 2018.
- BILAL, M.S.; ABAKER, J.A.; UL AABDIN, Z.; XU, T.; DAI, H.; ZHANG, K.; LIU, X.; SHEN, X. Lipopolysaccharide derived from the digestive tract triggers an inflammatory response in the uterus of mid-lactating dairy cows during SARA. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 284, 2016.
- CAMPOS, C.C.; HARTLING, I.; KAUR, M.; FERNANDES, A.C.C.; SANTOS, R.M.; CERRI, R.L.A. Intramammary infusion of lipopolysaccharide promotes inflammation and alters endometrial gene expression in lactating Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 11, p. 10440-10455, 2018.
- CNA – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **BALANÇO 2018 E PERSPECTIVAS 2019**, 2018
- COSTA, M. L.; DINIZ, L. P.; ZIECIK, A.J. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. **Anim Reprod Sci** 2003;76:143–54. CRONIN, J.G.; TURNER, M.L.; GOETZE, L.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biol Reprod**, v. 86, n. 2, p. 51, 2012.
- FOLZ, M. **Pecuária de Corte no Brasil: atualidades e futuro. Boviplan Consultoria Agropecuária**: curso Boviplan de intensificação da pecuária de corte no Brasil. Piracicaba: Boviplan, 2002. p. 5-16
- FURKEN, C.; NAKAO, T.; HOEDEMAKER, M. Energy balance in transition cows and its association with health, reproduction and milk production. **Tierarztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere**, v. 43, n. 6, p. 341-9, 2015.
- HABIBI, R.; HOSSEINI, S.M.; ZADEGAN, F.G.; HAJIAN, M.; OSTADHOSSEINI, S.; VASH, N.T.; NADDAFPOUR, A.; NASR ESFAHANI, M.H. Functional characterization of NANOG in goat pre-implantation embryonic development. **Theriogenology**, v. 120, p. 33-39, 2018.
- HERATH, S.; FISCHER, D.P.; WERLING, D.; WILLIAMS, E.J.; LILLY, S.T.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562-70, 2006.
- 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.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produto Interno Bruto – PIB**, 2019.
- MENCHETTI, L.; BARBATO, O.; FILIPESCU, I.E.; TRAINA, G.; LEONARDI, L.; POLISCA, A.; TROISI, A.; GUELFI, G.; PIRO, F.; BRECCHIA, G. Effects of local lipopolysaccharide administration on the expression of Toll-like receptor 4 and pro-inflammatory cytokines in uterus and oviduct of rabbit does. **Theriogenology**, v. 107, p. 162-174, 2018.
- MORAES, C.; MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA, F.; OBA, E. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO PÓS-PARTO EM BOVINOS. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, 2014.
- POYSER, N.L. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis
- NEWMAN, A., MANN, S., NYDAM, D. V., OVERTON, T. R. AND BEHLING-KELLY, E., Impact of dietary plane of energy during the dry period on lipoprotein parameters in the transition period in dairy cattle. **J Anim Physiol Anim Nutr**, v. 100, p. 118-126, 2016.
- and menstruation. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 53, n. 3, p. 147-95, 1995.
- SWANGCHAN-UTHAI, T.; LAVENDER, C.R.; CHENG, Z.; FOULADI-NASHTA, A.A.; WATHES, D.C. Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. **Biol Reprod**, v. 87, n. 6, p. 135, 2012.
- VALLE, E. R.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L. R. L. S. Técnicas de Manejo Reprodutivo em Bovinos de Corte. **Embrapa Gado de Corte**, v. 93, Campo Grande, MS, 2000.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- 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.