

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Veterinária



Dissertação

**Efeito do lipopolissacarideo na expressão gênica de células da granulosa do
folículo dominante em bovinos**

Felipe Terres de Campos

Pelotas, 2016

Felipe Terres de Campos

**Efeito do lipopolissacarideo na expressão gênica de células da granulosa do
folículo dominante em bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção de do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal)

Orientador: Augusto Schneider

Co-orientadora: Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C198e Campos, Felipe Terres de
Efeito do lipopolissacarídeo na expressão gênica de células da granulosa do folículo dominante em bovinos / Felipe Terres de Campos. – 32f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2016. – Orientador Augusto Schneider; co-orientador Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro.

1.Veterinária. 2. Reprodução. 3.Resposta inflamatória.
4.PON1. I.Schneider, Augusto. II. Pegoraro, Ligia Margareth Cantarelli. III. Título.

CDD: 636.2

Felipe Terres de Campos

Efeito do lipopolissacarídeo na expressão gênica de células da granulosa do folículo dominante em bovinos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 15/03/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Augusto Schneider (orientador).
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin
Doutor em Medicina Veterinária (UFSM)

Dra. Jorga Pradieé
Doutora em Veterinária (UFPEL)

Dr. Joabel Tonello dos Santos
Doutor em Medicina Veterinária (UFSM)

Dedico esse trabalho a Deus, aos meus pais, Francisco Delaine Campos de Campos e Indira Terres de Campos por terem me dado o apoio e suporte necessário, e ao meu filho Gonçalo Oliveira de Campos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Dr. Augusto Schneider meu orientador, pela oportunidade, paciência e ajuda durante o desenvolvimento deste projeto, grande pessoa e excelente professor e pesquisador.

Agradeço à Dra. Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro que foi a pessoa que me ajudou muito depois da conclusão da graduação, e foi parte importante na minha formação como profissional e como pessoa.

Agradeço à Universidade Federal de Pelotas e à EMBRAPA Clima Temperado, por disponibilizar a estrutura física e humana, parte essencial no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos membros do Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA Clima Temperado, não vou citar nomes pois posso cometer a injustiça de esquecer alguém pois foram todos muito importante durante esse processo.

Agradeço aos Grupos de Pesquisa da UFPel, Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) e ReproPEL – Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal por estarem sempre de portas abertas para ajudar durante o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos colegas e amigos, pela ajuda e parceria durante esta caminhada.

Resumo

DE CAMPOS, Felipe Terres. **Efeito do lipopolissacarídeo na expressão genica de células da granulosa do folículo dominante em bovinos**. 2016. 32f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Este estudo teve como objetivo avaliar a resposta inflamatória no soro e fluido folicular perante ao desafio com lipopolissacarídeo (LPS) por via Intra venosa(IV) na dose de 2,5µg/kg, correlacionando com a produção de estradiol, atividade da enzima PON1 e haptoglobina no soro sanguíneo e no fluido folicular, expressão dos genes ligados a resposta inflamatória e esteroidogênese nas células da granulosa do folículo dominante. Foram utilizadas 20 Vacas Jersey divididos em dois grupos, LPS e Controle. O grupo que recebeu LPS teve uma temperatura retal maior ($P < 0,05$; $40,42 \pm 0,11$) em relação ao grupo controle ($38,84 \pm 0,10$), comprovando a efetividade do tratamento com LPS. A atividade de PON1 no soro (controle: $130,2 \pm 5,13$ U/mL, LPS: $99,62 \pm 7,10$ U/mL) e fluido folicular (controle: $47,25 \pm 4,40$ U/mL, LPS: $30,57 \pm 3,07$ U/mL) foi maior no grupo controle em relação ao grupo LPS ($P < 0,05$), como um reflexo da resposta inflamatória. Importante salientar que no fluido folicular a atividade da PON1 foi 50% menor ($P < 0,05$) em comparação ao soro. A expressão gênica nas células da granulosa de genes relacionados a síntese de hormônios esteróides também foram avaliados durante o nosso experimento, sendo observado que a expressão de StAR foi significativamente reduzida no grupo desafiado com LPS (~90% de redução, $P < 0,05$). A expressão de genes ligados ao processo inflamatório também foram avaliados nas células da granulosa, sendo observada diferença expressiva para TLR4 e TNF α (~90% de redução, $P < 0,05$). O nível de estradiol intrafollicular não foi diferente entre os grupos controle e LPS ($P = 0,24$). Conforme os resultados deste estudo, o desafio com LPS induz uma resposta inflamatória nas células da granulosa de folículos dominantes, mediada pela via do TLR4 e resultando em redução da expressão de TNF α . Além disso, esta resposta pode alterar a produção de hormônios esteróides em longo prazo visto que a expressão de enzimas chave neste processo (StAR) foi drasticamente reduzida, e, desta maneira pode comprometer o crescimento folicular final.

Palavras-chave: Reprodução; Resposta inflamatória; PON1

Abstract

DE CAMPOS, Felipe Terres. **Lipopolysaccharide effect on gene expression in granulosa cells the dominant follicle in cattle**. 2016. 32f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

This study aimed to evaluate the inflammatory response in serum and follicular fluid before the challenge with lipopolysaccharide (LPS), correlating with estradiol production, PON1 enzyme activity and haptoglobin in blood serum and follicular fluid, expression of genes related to response inflammatory and steroidogenesis in granulosa cells of the dominant follicle. The group receiving LPS had increased rectal temperature ($P < 0.05$; 40.42 ± 0.11) compared to the control group (38.84 ± 0.10), proving the effectiveness of treatment with LPS. The PON1 activity in serum (control: 130.2 ± 5.13 U / ml LPS: 99.62 ± 7.10 U / mL) and follicular fluid (control: 47.25 ± 4.40 U / mL, LPS: 30.57 ± 3.07 U / ml) was higher in the control group compared to LPS group ($P < 0.05$), as a reflection of the inflammatory response. Importantly, PON1 activity in the follicular fluid was 50% lower ($P < 0.05$) compared to serum. Gene expression in granulosa cells of genes related to the synthesis of steroid hormones were also evaluated during our experiment and it was observed that the StAR expression was significantly reduced in the group challenged with LPS (~ 90% reduction; $P < 0.05$). The expression of the inflammatory process related genes were also evaluated in granulosa cells and there was a difference regarding TLR4 and TNF (~ 90% reduction, $P < 0.05$). The level of estradiol intrafollicular was not different between the control group and LPS ($P = 0.24$). In conclusion, LPS challenge induces an inflammatory response in the dominant follicle granulosa cells, mediated via TLR4 and resulting in reduction of TNF expression. In addition, this response can change the production of steroid hormones in the long term as the expression of key enzymes in this process (StAR) was drastically reduced, and thereby may compromise the subsequent oocyte maturation and ovulation.

Keywords: Reproduction; Inflammatory Response; PON1

Lista de Figuras

Figura 1	Temperatura corporal, paraoxanase soro, paraoxanase fluido folicular 6 horas após a injeção intravenosa de 2,5 ug/kg de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) ou solução salina (Control).....	19
Figura 2	Expressão de genes nas células da granulosa coletadas 6 horas após a injeção intravenosa de 2,5 ug/kg de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) ou solução salina (Control).....	20
Figura 3	Expressão de genes nas células da granulosa coletadas 6 horas após a injeção intravenosa de 2,5 ug/kg de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) ou solução salina (Control).....	20
Figura 4	Nível de estradiol intrafollicular do folículo dominante em vacas 6 horas após a injeção intravenosa de 2,5 ug/kg de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) ou solução salina (Control).....	21

Lista de Tabelas

Tabela 1	Primers usados no RT-PCR.....	17
----------	-------------------------------	----

Sumário

1	Introdução.....	10
2	Objetivos.....	14
3	Metodologia.....	15
3.1	Animais e tratamentos.....	15
3.2	Análise da expressão gênica.....	16
3.3	Coleta de sangue e avaliações bioquímicas.....	17
3.4	Análise estatística.....	18
4	Resultados.....	19
5	Discussão.....	22
6	Conclusões.....	25
	Referências.....	26
	Anexos.....	31

1 Introdução

A reprodução é um dos principais pilares da produção de leite (LEBLANC, 2008). Doenças uterinas são reconhecidas por causarem altas perdas econômicas devido à queda na produção de leite, às menores taxas de concepção, aumento no intervalo parto concepção ou primeiro serviço, aumento no intervalo entre partos e aumento no descarte de vacas por falhas reprodutivas (HUSZENICZA et al., 1999; LEBLANC et al., 2002a; SHELDON et al., 2009a). Neste sentido, a incidência de metrite varia entre 10 a 20%, de endometrite clínica ou secreção vaginal purulenta é de aproximadamente 15%, e de endometrite subclínica ou citológica de 15% (LEBLANC et al., 2011).

Alguns estudos indicam que existe uma associação entre desempenho reprodutivo e mastite (SCHRICK et al., 2001; HANSEN et al., 2004; SANTOS et al., 2004; MOORE et al., 2005;). Chebel et al. (2004) relataram que vacas que apresentaram mastite entre o momento da inseminação artificial (IA) e a confirmação da gestação (45 d) tiveram 2,8 vezes mais chances de perder a gestação entre 31 e 45 dias. A mastite subclínica ou contagem de células somáticas (CCS) elevada sem sinais clínicos também tem impacto negativo na performance reprodutiva (HUDSON et al., 2012). Vacas apresentando CCS maior que 300.000 células/ml no último teste antes da IA apresentaram maior perda embrionária (30% vs. 12,5%) entre 28 e 40 dias que vacas com CCS menor que 300.000 células/ml (MOORE et al., 2005). Segundo Philpot & Nickerson (1991), para cada caso clínico de mastite podem existir de 15 a 40 casos subclínicos. Os mecanismos pelos quais a mastite subclínica pode afetar a fertilidade de vacas leiteiras ainda não estão bem elucidados.

Além da forma de manifestação (clínica ou subclínica), outro fator discutido é se o impacto na fertilidade é gerado em decorrência da mastite causada por agentes gram-positivos ou agentes gram-negativos. Alguns autores (SOTO et al., 2003; HANSEN et al., 2004) relatam que os distúrbios na fertilidade são desencadeados principalmente pelo lipopolissacarídeo (LPS), desta maneira, a mastite causada por bactérias gram-negativas seria a mais importante já que o LPS é exclusivo destes

agentes. Hertl et al., (2010) observaram que os dois tipos de bactérias impactam a fertilidade, porém quando se tem a presença de bactérias gram-negativas, os efeitos são mais pronunciados. Hockett et al., (2000, 2005) trabalhando com bactérias gram-positivas para induzir mastite em vacas leiteiras, observaram menor manifestação de estro, menor pulsatilidade de LH e menor produção de estradiol 17β . Baker et al. (1998), Schrinck et al. (2001) e Santos et al. (2004) observaram que independentemente do tipo de bactéria isolada a mastite gerou redução da fertilidade. Desta maneira, observa-se que as duas classes de bactérias são capazes de causar distúrbios fisiológicos que podem gerar falhas reprodutivas em vacas leiteiras.

O LPS, também conhecido como endotoxina, é uma molécula altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas. Sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa (TUIN et al., 2006). Atualmente o LPS é considerado o principal fator responsável pelas manifestações tóxicas de infecções por bactérias gram-negativas bem como por inflamação sistêmica (RIETSCHEL et al., 1994). Sua estrutura é composta por duas camadas de glicose e uma camada lipídica, uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, respectivamente. A porção lipídica é considerada a responsável pela maior ação antigênica do LPS (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

Em vacas com mastite podem ser encontrados níveis aumentados de vários marcadores inflamatórios, dentre eles interleucina (IL) 1a e b, IL 10 e 12, fator de necrose tumoral- α (TNF α) (RIOLLET et al., 2001), óxido nítrico (ON) (BLUM et al., 2000) e prostaglandina F 2α (PGF 2α) (GIRI et al., 1984). Dentre estas moléculas o TNF α , o ON e a PGF 2α podem afetar a fertilidade, tendo como alvo o ovócito ou o embrião (HANSEN et al., 2004). Soto et al. (2003) demonstraram que a adição de LPS ou PGF 2α ao meio de maturação oocitária reduziu a proporção de oócitos que se tornaram blastocistos. Quando adicionado após a fecundação estes efeitos não foram observados. Ao contrário, quando se adicionou um precursor de ON, nitroprussiato de sódio, não houve efeito durante maturação oocitária e sim após a fecundação. Estas moléculas causam danos tanto no oócito (LPS e PGF 2α) quanto no desenvolvimento embrionário (SOTO et al., 2003). Neste estudo a concentração de LPS que gerou efeitos negativos durante a maturação oocitária foi de 1 ng/ml ou mais. Estas concentrações são muito mais altas que as encontradas em vacas com

mastite induzida por *E. coli* (55 a 134 pg/ml) (Dosogne et al., 2002). Por outro lado, o LPS induz a produção de diversas citocinas (IL-1 β , IL-8 e TNF α) e pode ter seus efeitos mediados por estas (HANSEN et al., 2004). Sendo assim, o efeito do LPS sobre a fertilidade de vacas leiteiras ainda precisa ser investigado. Essa endotoxina desencadeia vias de sinalização intracelular através de sua ligação a receptores próprios. Os principais estão localizados na membrana celular, denominados receptores Toll-like 4 (TLR4). Desde sua descoberta, no final da década de 1990, os receptores Toll-like têm sido identificados como sensores primários de infecções microbianas e permitido avanços significativos na compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e adquirida (POLTORAK et al., 1998). O reconhecimento do LPS é mediado ainda por outras moléculas como LBP, a proteína ligante de LPS (do inglês, *Lipopolysaccharide Binding Protein*).

Os efeitos do LPS sobre a fertilidade foram descritos acima, porém este é um polissacarídeo exclusivo da membrana de bactérias gram-negativas (HANSEN et al., 2004). As bactérias gram-positivas possuem outro componente de membrana, o ácido lipoteicóico ou ácido teicóico (ALT), que pode afetar a fertilidade de maneira semelhante (KAJIKAWA et al., 1998). A mastite pode afetar a produção e liberação de hormônios reprodutivos. Bataglia et al., (1997) relataram menor secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em ovelhas. Menor manifestação de estro (HOCKETT et al., 2000), interrupção do crescimento folicular (HERATH et al., 2007) menor pulsatilidade de hormônio luteinizante (LH) e produção de estradiol 17 β (HOCKETT et al., 2005) foram observados em vacas com mastite clínica. Vacas com mastite na forma aguda não apresentaram pico de LH e conseqüentemente não houve ovulação (HOCKETT et al., 2005), infusão intra uterina de LPS também resultou em baixa taxa de ovulação (WILLIAMS et al., 2008). No mesmo sentido, Herath et al., (2007) associaram LPS proveniente da *E. coli* a mudança na produção de PGF2 α para PGE2 α , resultando em uma fase luteal prolongada que potencialmente diminui a probabilidade de ovulação e concepção. Por outro lado, a mastite pode desencadear uma cascata inflamatória e conseqüente aumento na produção de PGF2 α , que pela lise do corpo lúteo (CL) pode impedir a manutenção da gestação (HANSEN et al., 2004). Além disso, Bromfield et al 2011 encontrou alterações na expressão genica de TLR4 nas células da granulosa de bovinos desafiadas com LPS *in vitro* em relação ao grupo controle.

A resposta inflamatória gerada pelo LPS inclui a modificação de várias proteínas em nível sistêmico, conhecidas como proteínas de fase aguda. Dentre elas podemos citar a haptoglobina, a ceruloplasmina e a paraoxonase-1 (PON1). A PON1 encontra-se diretamente ligada a membrana da partícula de lipoproteína de alta densidade (HDL). Devido à permeabilidade da membrana basal do folículo ovariano, o HDL é a única lipoproteína presente no fluido folicular (JASPARD et al., 1996), apresentando uma correlação positiva entre os níveis séricos e intrafoliculares. Da mesma maneira, a PON1 é transferida do soro ao fluido folicular em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013) e em humanos (BROWNE et al., 2008), sugerindo que sua transferência a partir do sangue ocorre junto com o HDL, visto que estão correlacionados nos dois compartimentos (BROWNE et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2013). Desta maneira, alterações nos níveis sanguíneos de PON1 alteram consequentemente sua atividade no fluido folicular, podendo afetar a qualidade do oócito e a fertilidade, em mulheres submetidas a processo de fecundação *in vitro* (FIV) a maior atividade sérica e intrafolicular de PON1 e maior concentração de apolipoproteína A tipo I (APoAI) estão relacionadas a melhor qualidade embrionária e com maior número de blastômeros (BROWNE et al., 2008), indicando que o HDL e principalmente a PON1 podem desempenhar um papel de proteção na saúde do oócito e no desenvolvimento embrionário inicial (FUJIMOTO et al., 2010).

Por fim, a hipótese do presente trabalho é que vacas submetidas ao processo inflamatório pelo desafio com LPS (mastite, Metrite) irão sofrer alterações no desenvolvimento folicular, que podem ser avaliadas por modificações na expressão gênica e marcadores intrafoliculares.

2 Objetivos

Avaliar a resposta inflamatória no soro e fluido folicular perante ao desafio com LPS, correlacionando com a produção de estradiol, atividade da enzima PON1 no soro sanguíneo e no fluido folicular, expressão dos genes ligados a resposta inflamatória e esteroidogênese nas células da granulosa do folículo dominante.

3 Metodologia

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pelotas protocolo CEEA 4006-2015. Todos os reagentes são originários da Sigma-Aldrich® Chemical Company (St. Louis, MI, EUA), a menos quando discriminada outra origem.

3.1 Animais e tratamentos

Vinte vacas da raça Jersey secas com média de escore corporal(EC) 3 (em uma escala de 1 a 5) com peso médio de 380kg, foram mantidas em sistema extensivo na EMBRAPA Clima Temperado na Central de Manejo Reprodutivo e divididas 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, Zoetis) e 2 mg de benzoato de estradiol (Benzoato HC) no dia 0. Doze horas antes da remoção do CIDR (dia 8) foram aplicados 500 µg de dinoprost (Lutalyse, Zoetis). No grupo LPS, duas horas após a remoção do CIDR foi administrada uma dose única de LPS (2,5 µg/kg de peso vivo; SIGMA-ALDRICH® Inc., Missouri, EUA) intravenoso de acordo com Carrol et al. (1995) e uma solução placebo (2 mL de NaCl 0,9%) no grupo controle.

A temperatura corporal dos animais dos dois grupos foi aferida com termômetro veterinário com escala interna, cinco horas após a aplicação de LPS. Após 6 horas da aplicação do LPS foi avaliado o par de ovários e identificado o folículo dominante com auxílio de ultrassom (Mindray DP2200). Anteriormente a coleta das células da granulosa do folículo dominante era realizada a anestesia epidural baixa e limpeza da vulva, seguido da inserção da guia de aspiração para coleta das células da granulosa do folículo previamente identificado com auxílio de ultrassom. As amostras foram aspiradas 6 horas após a aplicação do LPS, com uma seringa de 10 mL em tubos falcon, sendo separados fluido folicular e células da granulosa mediante centrifugação 7.000 rpm por 10 minutos (Centrifuga 16-RV, Presvac). O sedimento (células da granulosa) foi então transferido a criotubos

contendo 500 µL de Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), homogeneizados e armazenados em nitrogênio até avaliação, assim como as amostras de fluido folicular.

3.2 Análise da expressão gênica

A expressão Genica foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do NUPEEC. Para análise da expressão gênica, foi extraído o RNA mediante o método do Trizol® seguindo as recomendações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando iScript™ Synthesis Kit (BIORAD®, Hercules, CA, EUA) em volume de 10 µL, incubados 5min à 25°C, 30min à 42 °C e 5min à 85 °C em termociclador (MyCycler™ ThermalCycler, BIO RAD®). A Reação de PCR em tempo real foi conduzida em duplicata utilizando SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) no sistema ECO™ Real-Time PCR System (iLLumina®, San Diego, CA, EUA). Para cada ensaio foram corridos 45 ciclos (95°C durante 3s e 60°C durante 30s) e uma curva de dissociação foi incluída no final da reação para verificar a amplificação de um único produto de PCR. Cada placa de ensaio incluiu um controle negativo (água ultrapura) e o gene Histona H2A foi utilizado como controle interno. O coeficiente de variação foi inferior à 5% para todos os pares de iniciadores utilizados. A expressão relativa foi calculada a partir da equação $2^{A-B}/2^{C-D}$ e desta maneira, foi comparada a expressão dos genes alvo (TLR4, 3β-HSD, CYP19A1, StAR, NF-κB, TNF, LHr, P450scc e P450C17; Tabela 1) do grupo LPS em relação ao grupo controle.

A expressão de CYP17A1, gene exclusivamente expresso na células da teca interna, foi usada como indicador da contaminação das amostras de células da granulosa obtida. Desta maneira foram excluídas amostras que apresentaram Ct menor do que 30 para este gene.

Tabela 1 - Primers usados no RT-PCR

Gene	Forward primer 5' to 3'	Reverse primer 5' to 3'	Reference
LHr	TGACTATGGTTTCTG CTTACCCAA	CCATAATGTCTTCAC AGGGATTGA	<i>Spicer et al 2008</i>
STAR	TCGCGGCTCTCTCCT AGGT	CTGCCGGCTCTCCT TCTTC	<i>Tajima et al 2005</i>
P450c17	TCAGAGAAGTGCTCC GAATCC	TGCCACTCCTTCTCA CTGTGA	<i>Tijima et al 2005</i>
P450scc	CTTCATCCCACTGCT GAATCC	GGTGATGGACTCAA AGGCAAA	<i>Tajima et al 2005</i>
CYP19A1	TGCCAAGAATGTTCC TTACAGGTA	CACCATGGCGATGT ACTTTCC	<i>Spicer et al 2008</i>
3B-HSD	CCAAGCAGAAAACCA AGGAG	ATGTCCACGTTCCC ATCATT	<i>Nishimura et al 2006</i>
TLR4	CTTGCGTACAGGTTG TTCCTAA	CTGGGAAGCTGGAG AAGTTATG	<i>Borji H et al 2015</i>
TNF- α	AGCACAGAAAGCATG ATCCG	CTGATGAGAGGGA GGCCATT	<i>Feng j et al 2014</i>

3.3 Coleta de sangue e avaliações bioquímicas

No momento da aspiração folicular foi coletado sangue (veia coccígea) em tubos Vacutainer® sem anti coagulante para posterior avaliação de PON1 e Haptoglobina no soro. O soro sanguíneo foi separado por centrifugação por 5 minutos a 10.000 rpm (Centrifuga Presvac 16-RV).

A atividade da enzima PON1 no soro e no fluido folicular foi determinada utilizando a solução de trabalho que é composta de tampão 20mM Tris/HCl, 1mM cloreto de cálcio e 4mM fenilacetato. As amostras foram diluídas na solução tampão na proporção de 1:3. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Cirrux 80ST) usando 3,3 µl da amostra diluída em 500 µl da solução de trabalho por um período de 60 segundos no comprimento de onda de 270 nm. A atividade da enzima foi expressa em U/mL (BROWNE et al 2007).

A haptoglobina foi mensurada através do teste adaptado de ELISA no método colorimétrico, pela reação de peróxido de hidrogênio com a hemoglobina que oxida o guaiacol produzindo coloração captada por absorbância na faixa de 450 nm, segundo protocolo de Jones & Mould (1959).

O estradiol foi analisado em laboratório comercial (Pasin em Santa Maria, Rio Grande do Sul) a análise foi realizada pelo método de quimiluminescência. Foram excluídas das análises 3 amostras de células da granulosa baseadas na concentração intrafollicular de estradiol menor que 20 ng/mL, todas as outras amostras apresentam valores acima de 80 ng/mL.

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) utilizando o teste de t para a PON1 e estradiol e o teste de Mann-Whitney para a expressão gênica.

4 Resultados

O grupo que recebeu LPS teve uma temperatura retal maior ($P < 0,05$; $40,42 \pm 0,11$ °C) em relação ao grupo controle ($38,84 \pm 0,10$ °C), comprovando a efetividade do tratamento com LPS (Figura 1). O diâmetro folicular não diferiu no momento prévio a aspiração entre os dois grupos, sendo de $10,5 \pm 1,2$ e $8,8 \pm 0,7$ mm para os grupos controle e LPS, respectivamente.

A atividade de PON1 no soro (controle: $130,2 \pm 5,13$ U/mL, LPS: $99,62 \pm 7,10$ U/mL) e fluido folicular (controle: $47,25 \pm 4,40$ U/mL, LPS: $30,57 \pm 3,07$ U/mL) foi maior no grupo controle em relação ao grupo LPS ($P < 0,05$), como um reflexo da resposta inflamatória. Importante salientar que no fluido folicular a atividade da PON1 foi 50% menor ($P < 0,05$) em comparação ao soro ($115,7 \pm 5,5$ no soro vs $40,4 \pm 3,5$ U/mL no fluido folicular).

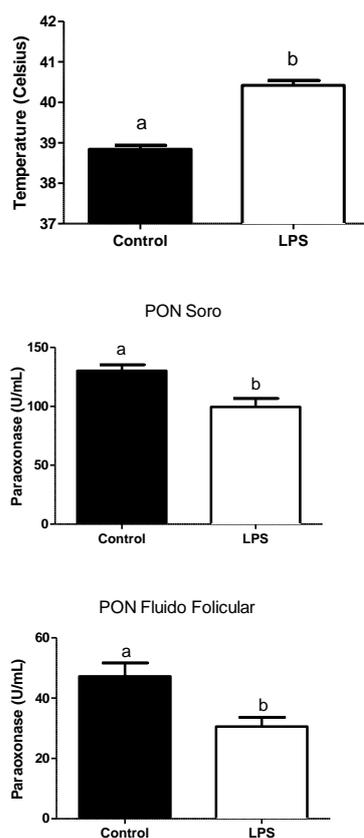


Figura 1 - Temperatura corporal, paraoxanase soro, paraoxanase fluido folicular 6 horas após a injeção intravenosa de 2,5 ug/kg de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) ou solução salina (Control).

Foram excluídos das análises os folículos com expressão detectável do gene exclusivo de células da teca CYP17a1. Além disso foram excluídos amostras com níveis muito baixo de estadiol indicando a atresia do folículo. Dos folículos restantes a expressão do controle interno H2a foi 25.6 ± 0.7 (22.1 – 29.4), indicando uma homogeneidade das amostras coletadas. A expressão gênica nas células da granulosa de genes relacionados a síntese de hormônios esteróides também foram avaliados durante o nosso experimento (Figura 2), sendo observado que a expressão de StAR foi significativamente reduzida no grupo desafiado com LPS.

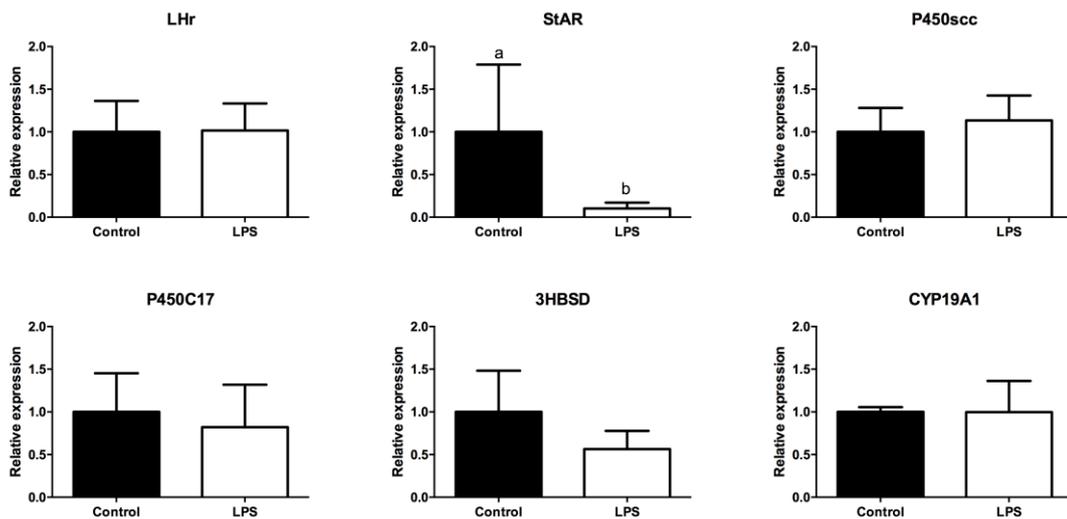


Figura 2 - Expressão de genes nas células da granulosa coletadas 6 horas após a injeção intravenosa de 2,5 µg/kg de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) ou solução salina (Control).

A expressão de genes ligados ao processo inflamatório também foram avaliados nas células da granulosa, sendo observada diferença expressiva para TLR4 e TNF α (Figura 3).

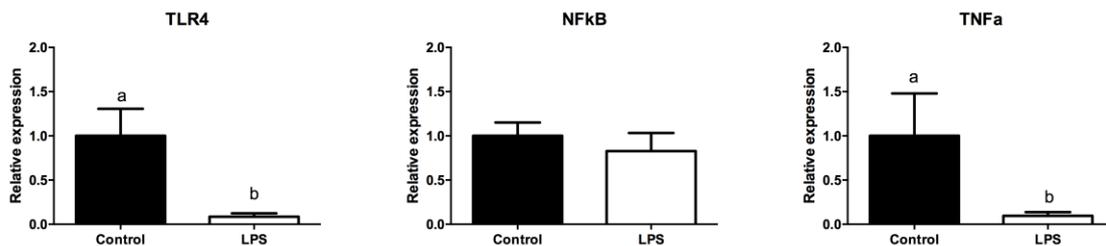


Figura 3 - Expressão de genes nas células da granulosa coletadas 6 horas após a injeção intravenosa de 2,5 µg/kg de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) ou solução salina (Control).

O nível de estradiol intrafollicular não foi diferente entre os grupos controle e LPS ($P=0,24$; Figure 4).

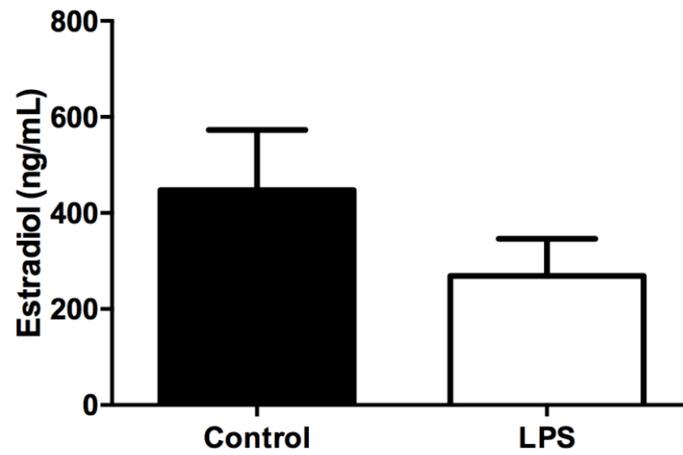


Figura 4 - Nível de estradiol intrafollicular do folículo dominante em vacas 6 horas após a injeção intravenosa de 2,5 ug/kg de peso vivo de lipopolissacarídeo (LPS) ou solução salina (Control).

5 Discussão

No presente trabalho foi observado que o desafio com LPS levou a uma resposta inflamatória sistêmica, evidenciada pelo aumento da temperatura corporal e redução dos níveis séricos de PON1. Esta resposta inflamatória foi acompanhada de uma redução na expressão RNA para StAR, um importante regulador da esteroidogênese folicular, e TLR4 e TNFa, importantes reguladores da resposta inflamatória. Estes resultados indicam que uma resposta inflamatória sistêmica e de curto prazo é capaz de alterar a expressão de enzimas intrafoliculares essenciais para esteroidogênese e pode ter um efeito no desenvolvimento folicular e taxa ovulatória.

Neste trabalho evidenciou-se uma diminuição de 93% na expressão do gene STAR no grupo desafiado com LPS. O gene STAR codifica para a proteína reguladora aguda da esteroidogênese, que é responsável pelo transporte do colesterol para o interior da mitocôndria, onde encontram-se a maioria das enzimas envolvidas na cascata da esteroidegênese (BALASUBRAMANIAN et al., 1998). Desta maneira, alterações na transcrição da STAR acarretariam alterações na produção de hormônios esteroides no folículo dominante, importantes na maturação oocitária e posterior ovulação. Esses resultados indicam que a resposta inflamatória ocasionada pela presença de LPS pode afetar negativamente à esteroidegênese no folículo dominante. No entanto não foi observado uma diferença significativa no nível intrafollicular de estradiol entre as vacas tratadas com LPS ou solução salina. Um dos motivos para esta ausência de diferença pode ser o tempo de tratamento, visto que a coleta do líquido folicular ocorreu seis horas após a injeção. Sendo tempo suficiente para alterar a expressão das enzimas, porém não há tempo suficiente para que diferenças na produção de estradiol se acumulassem no líquido folicular. Portanto, no caso de uma resposta inflamatória de maior duração, como ocorre em diversas doenças citadas anteriormente, pode ser esperado um efeito mais significativo na esteroidogênese. Neste sentido estudos anteriores mostram uma redução na secreção de estradiol pelas células da granulosa bovina em resposta ao LPS em sistemas de cultivo in vitro (HERATH et al., 2007; PRICE et al., 2013).

Nestes estudos foi observado uma redução da expressão de CYP19A1 nas células da granulosa (HERATH et al., 2007; PRICE et al., 2013).

No nosso trabalho encontramos uma redução na expressão do TLR4 e TNF α nas células da granulosa do grupo tratado com LPS. Estudos anteriores (BROMFIELD et al., 2011) indicam que as células da granulosa são livres de infiltração por células inflamatórias, porém tem a capacidade de responder ao LPS através da via do TLR4, resultando em maior produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Como observado em outros trabalhos, o TLR4 foi expresso na células da granulosa de folículos dominantes em bovinos (PRICE et al., 2013). No estudo observou-se uma diminuição de 91% na expressão do TLR4, enquanto que Price et al. (2013) encontrou uma redução de 50% no grupo LPS em comparação ao grupo controle em cultivos *in vitro* das células da granulosa. Indicando que existe uma resposta inflamatória das células da granulosa frente à presença do LPS. Porém mesmo que o tratamento com LPS induziu a expressão de vários genes pró-inflamatórios, o mesmo não foi observado para o TNF α (PRICE et al., 2013), o que está de acordo com os resultados encontrados no nosso estudo, que mostram inclusive uma redução na expressão de TNF α . Estes dados nos levam a entender que apesar de as células da granulosa terem capacidade de resposta imune, frente ao desafio com LPS há uma redução da produção do mediador TLR4 e do efector pró-inflamatório TNF α . Além do mais, nossos estudos confirmam que *in vivo*, com o efeito da resposta sistêmica, estes efeitos são mantidos de uma maneira muito similar ao observado por outros pesquisadores com estudo *in vitro* (PRICE et al., 2013; HERATH et al., 2007).

Outro ponto importante a ser considerado além da resposta ovariana ao processo inflamatório é resposta sistêmica. Estudos anteriores sugerem que a enzima PON1 atua como uma proteína de fase aguda negativa (SCHNEIDER et al., 2013; BIONAZ et al., 2007), apesar de não termos nenhuma evidência experimental e apenas indicadores de que a PON1 pode atuar como um marcador de doenças em nível sistêmico. Desta maneira, em nosso estudo podemos demonstrar que o tratamento agudo com LPS levou a uma redução da atividade de PON1 no soro de maneira aguda, comprovando a relação da PON1 com a resposta inflamatória de maneira bem clara. Além disso, estudos anteriores sugerem que a PON1 sérica é transferida para o líquido folicular tanto em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013) quanto humanos (BROWNE et al., 2008). Neste sentido, nosso modelo indica que

mudanças no nível sérico de PON1 são diretamente refletidas na composição do líquido folicular, visto que no presente estudo as mudanças no nível sérico de PON1 foram acompanhadas por uma mudança na mesma proporção do nível de PON1 no líquido folicular do folículo pré-ovulatório. Desta forma, também devemos considerar que mudanças inflamatórias sistêmicas podem se refletir na composição do líquido folicular e podem afetar diretamente a expressão gênica nas células da granulosa como observado em nosso estudo. No entanto, mais estudos são necessários, especialmente comparando a injeção intrafollicular com a injeção sistêmica e seus efeitos no desenvolvimento folicular.

6 Conclusões

Conforme os resultados deste estudo, o desafio com LPS induz uma resposta inflamatória nas células da granulosa de folículos dominantes, mediada pela via do TLR4 e resultando em redução da expressão de TNF α . Além disso, esta resposta pode alterar a produção de hormônios esteroides em longo prazo visto que a expressão de enzimas chave neste processo (StAR) foi drasticamente reduzida, e, desta maneira pode comprometer a fase final da foliculogênese e posterior ovulação.

Estes resultados indicam que o modelo de aplicação de LPS sistêmico e coleta de células ovarianas é um bom modelo de estudo e pode refletir de maneira adequada como alterações inflamatórias sistêmicas podem afetar o ovário de maneira local. Desta maneira podemos observar que este modelo pode trazer mais benefícios a estudos deste tipo e ser mais completo do somente estudos com cultivo celular onde o efeito das alterações em nível sistêmico não podem ser consideradas.

Referências

BALASUBRAMANIAN, K.; HOLLY, A. L.; JAMES, C. G.; DOUGLAS, M. S.; JOHANNES, D. V. Regulation of Porcine Granulosa Cell Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) by Insulin-Like Growth Factor I: Synergism with Follicle-Stimulating Hormone or Protein Kinase A Agonist. **Endocrinology**, v.138, p.3893-3992, 1998.

BARKER, A. R.; SCHRICK, F. N.; LEWIS, M. J.; DOWLEN, H. H.; OLIVER, S. P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1285-1290, 1998.

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.1740-1750, 2007.

BORJI, H.; HAGHPARAST, A.; SOLEIMANI, N.; AZIZZADEH, M.; NAZEMSHIRAZI, M. H. The effects of *Ostertagia occidentalis* somatic antigens on ovine TLR2 and TLR4 expression. **Iranian Journal of Parasitology**, v.10, n.3, p.498-504, 2015.

BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression *in vitro*. **Endocrinology**, v.152, n.12, p.5029-5040, 2011.

BROWNE, R. W.; KOURY, S. T.; MARION, S.; WILDING, G.; MUTI, P.; TREVISAN, M. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase1 activity and polymorfism (Q192R) by kinetic enzyme assay. **Clin Chem**, v.53, p.310-317, 2007.

DOHMENMJ, J. 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, p.1019-1032, 2000.

EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2899-2905, 1993.

FENG, J.; GUO, C.; ZHU, Y. et al. Baicalin down regulates the expression of TLR4 and NFkB-p65 in colon tissue in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v.7, n.11, p.4063-4072, 2014.

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, p.683-693, 2007.

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, p.683-693, 2007.

HERTL, J. A.; GROHN, Y. T.; LEACH, J. D. G.; BAR, D.; BENNETT, G. J.; GONZALEZ, R. N.; RAUCH, B. J.; WELCOME, F. L.; TAUER, L. W.; SCHUKKEN, Y. H. Effects of clinical mastitis caused by grampositive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1551-1560, 2010.

HOCKETT, M. E.; HOPKINS, F. M.; LEWIS, M. J.; SAXTON, A. M.; DOWLEN, H. H.; OLIVER, S. P.; SCHRICK, F. N. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.241-251, 2000.

HOCKETT, M. E.; ALMEIDA, R. A.; ROHRBACH, N. R.; OLIVER, S. P.; DOWLEN, H. H.; SCHRICK, F. N. Effects of induced clinical mastitis during preovulation on endocrine and follicular function. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.2422-2431, 2005.

HUSZENICZA, G. Y.; FODOR, M.; GACS, M.; KULCSAR, M.; DOHMEN, M. J. W.; VAMOS, M. et al. Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. **Reprod Domest Anim**, v.34, p.237-245, 1999.

JASPARD, B.; COLLET, X.; BARBARAS, R.; MANENT, J.; VIEU, C.; PARINAUD, J.; CHAP, H.; PERRET, B. 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, p.1352-1357, 1996.

JONES, G. E.; MOULD, D. L. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtritation plate system. **Research in Veterinary Science**, v.37, p.87-92, 1984.

KAJIKAWA, S.; KAGA, N.; FUTAMURA, Y.; KAKINUMA, C.; SHIBUTANI, Y. Lipoteichoic acid induces preterm delivery in mice. **Journal of Pharmacological Toxicological Methods**, v.39, p.147-154, 1998.

LEBLANC, S. J. Special Issue: Production diseases of the transition cow. Postpartum uterine diseases and dairy herd reproductive performance: A review. **Vet J**, v.176, p.102-114, 2008.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis, and its impact on reproductive performance in dairy cows. **J Dairy Sci**, v.85, p.2223-2236, 2002.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S. et al. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. **J Dairy Sci**, v.85, p.2237-2249, 2002.

MOORE, D. A.; OVERTON, M. W.; CHEBEL, R. C.; TRUSCOTT, M. L.; BONDURANT, R. H. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.226, p.1112-1118, 2005.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M.Y.; VAN HUFFEL, C.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in tlr4 gene. **Science**, v.282, p.2085-2088, 1998.

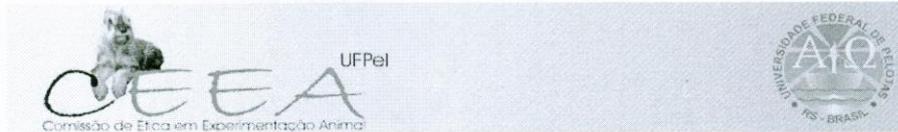
PRICE, J. C.; BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Pathogen-associated molecular patterns initiate inflammation and perturb the endocrine function of bovine granulosa cells from ovarian dominant follicles via TLR2 and TLR4 pathways. **Endocrinology**, v.154, n.9, p.3377-3386, 2013.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem.**, v.71, p.635-700, 2002.

- RIETSCHER, E. T.; KIRIKAE, T.; SHCADE, F. U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZHRINGER, U.; SEYDEL, U.; PADOVA, F. D.; SCHREIER, M.; BRADE, H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J.**, v.8, p.217-225,1994.
- SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; BALLOU, M. A.; HIGGINBOTHAM, G. E.; KIRK, J. H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.80, p.31-45, 2004.
- SCHRICK, F. N.; HOCKETT, M. E.; SAXTON, A. M.; LEWIS, M. J.; DOWLEN, H. H.; OLIVER, S. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1407-1412, 2001.
- SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SCHUBERTH, H. J. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biol Reprod**, v.81, p.1025-1032, 2009.
- SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SHUBERTH, H. J. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. **Biol Reprod**, v.81, p.1025-1032, 2009.
- SHELDON, I. M.; RYCROFT, A. N.; DOGAN, B.; CRAVEN, M.; BROMFIELD, J. J.; CHANDLER, R. M. H.; PRICE, S. B.; GILBERT, R. O.; SIMPSON, K. W. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. **PLoS One**, v.5, e9192, 2010.
- SOTO, P.; NATZKE, R. P.; HANSEN, P. J. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: Actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F₂ α 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.
- TUIN, A.; VLAG, A. H. V. D.; VOENEN-WEEMAES, A. M. M. A. V.; MEIJER, D. K. F.; POELSTRA, K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.290, p.377-385, 2006.
- WILLIAMS, E. J.; SIBLEY, K.; MILLER, A. N.; LANE, E. A.; FISHWICK, J.; NASH, D. M.; HERATH, S.; ENGLAND, G. C.; DOBSON, H.; SHELDON, I. M. The effect of

Escherichia coli lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.60, p.462-473, 2008.

Anexos



Pelotas, 14 de setembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Dr. Augusto Schneider

Departamento de Nutrição - Faculdade de Nutrição

Senhor Professor:

A CEEA analisou a solicitação o projeto intitulado: **“Efeito do desafio com LPS na atividade sérica e intrafolicular da paraoxanase e mieloperoxidase em bovinos”**, processo nº23110.004006/2015-07, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4006-2015).

Vigência do Projeto: 15/09/2015 a 01/08/2016

Espécie/Linhagem: Bovinos/Jersey

Nº de animais: 20

Idade: Acima de 15 meses

Sexo: Fêmeas

Origem: EMBRAPA Clima Temperado

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável: Ciente em: 28 / 09 / 2015