

EFEITOS DO LIPOPOLISSACARÍDEO NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À REPRODUÇÃO E FERTILIDADE EM BOVINOS DE CORTE

LETÍCIA ALVES MARTINS DUARTE¹; ANDRESSA STEIN MAFFI²;
GABRIELA BUENO LUZ²; JOAO ALVEIRO ALVARADO RINCÓN²; ANTONIO
AMARAL BARBOSA²; CÁSSIO CASSAL BRAUNER³

¹Universidade Federal de Pelotas, Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária
(NUPEEC) – leticiaalvesmd@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária
(NUPEEC)

³Universidade Federal de Pelotas, Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária
(NUPEEC) - cassiocb@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os lipopolissacarídeos (LPS) são endotoxinas que estão presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas (AKIRA et al., 2006). Segundo DICKSON et al. (2019), o LPS atua por meio do receptor do tipo Toll 4 (*TLR4*), gerando uma cascata de sinalizações e produz citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda, promovendo a inflamação. Em bovinos, conforme descrito por GINDRI et al. (2019), doenças infecciosas como metrite, endometrite e mastite são causadas por bactérias gram-negativas, além de distúrbios como a acidose ruminal (SCHAUMBERGER; REISINGER, 2014), com potenciais efeitos sistêmicos que podem ocasionar febre, desidratação, dificuldade respiratória e diminuição da motilidade do rúmen (CAMPOS, 2017).

No âmbito reprodutivo, as principais doenças que acometem os bovinos são a metrite e endometrite, que podem diminuir a atividade uterina e ovariana, prejudicando a fertilidade (SHELDON et al., 2009). Segundo MAGATA & SHIMIZU (2017), a endotoxina pode retardar o crescimento do primeiro folículo pós-parto, reduzir os níveis de estradiol (E2) e as concentrações de progesterona (P4). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias podem desencadear liberação indesejada de hormônio luteinizante (LH), P4 das adrenais e de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), reduzindo a eficiência reprodutiva dos animais (BERTONI et al., 2008).

Além dos efeitos hormonais ocasionados pela endotoxina, também são relatados efeitos na expressão de genes relacionados a reprodução. O receptor *TLR4* está expresso nas células da granulosa e da teca, indicando que o LPS pode afetar a função folicular dos animais (MAGATA et al., 2014). Junto a isso, a endotoxina pode migrar para o ovário e oviduto, aumentando a expressão do Fator de Necrose Tumoral (*TNFα*), que é um mediador de inflamação, e diminuindo a expressão de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 2 (*IGF-2*) que está associado ao desenvolvimento embrionário (IBRAHIM et al., 2015).

Desse modo, o objetivo do estudo foi avaliar a expressão dos genes *TLR4*, *TNF* e *IGF2* no oviduto de novilhas desafiadas com duas doses de LPS.

2. METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética e Experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o número 9364. Foram utilizadas dezesseis novilhas Aberdeen Angus saudáveis, com aproximadamente 14 meses de idade, confinadas e recebendo uma dieta total mixed. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, o grupo LPS (n = 8), que recebeu duas aplicações intravenosas de 0,5 µg / kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich®) diluído em

2 mL de solução salina (0,9% de NaCl); e o grupo controle (n = 8), que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl). Ambos os grupos tiveram intervalo de 24 horas entre as aplicações.

Os animais foram submetidos a um protocolo de sincronização da onda folicular e quatorze dias antes do início do protocolo, as novilhas receberam 25 mg de PGF2 α (i.m., Lutalyse®; Zoetis, São Paulo, Brasil). No dia zero do protocolo (D0), foi inserido um dispositivo intravaginal de liberação lenta de P4 (1 g, CIDR®, Zoetis®), 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol, Zoetis®) i.m. e 25 mg de PGF2 α (Lutalyse®, Zoetis) i.m. No D1 houve a primeira aplicação de LPS e no D5 foi retirado o implante de P4 e realizado o abate dos animais.

Foram implantados, via intravaginal, termômetros digitais data logger (Ibutton®, Thermochron, Whitewater, USA), desde a hora 0 até 12 horas após o segundo desafio com LPS para o acompanhamento da temperatura, e sua mensuração foi realizada com intervalos de 30 minutos.

Após o abate, foi coletado um fragmento de oviduto em criotubos, homogeneizados em um mixer em 0,5mL de trizol (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) e armazenados em nitrogênio líquido até serem transferidos para o freezer em uma temperatura de -80°C, onde permaneceram até a extração de RNA para análises de expressão gênica, que foram realizadas utilizando genes relacionados à resposta inflamatória e ao reconhecimento do LPS no oviduto: *TNF*, *TLR4* e *IGF2*.

As análises estatísticas da expressão gênica foram analisadas através do test t no GraphPad Prism 7 e para os resultados de temperatura, ANOVA medidas repetidas no software NCSS 2004. Foram considerados como diferença estatística valores de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desafio com duas doses de LPS em novilhas não apresentou efeito na expressão dos genes *TLR4*, *TNF* e *IGF2* ($P > 0,05$) no oviduto (Figura 1).

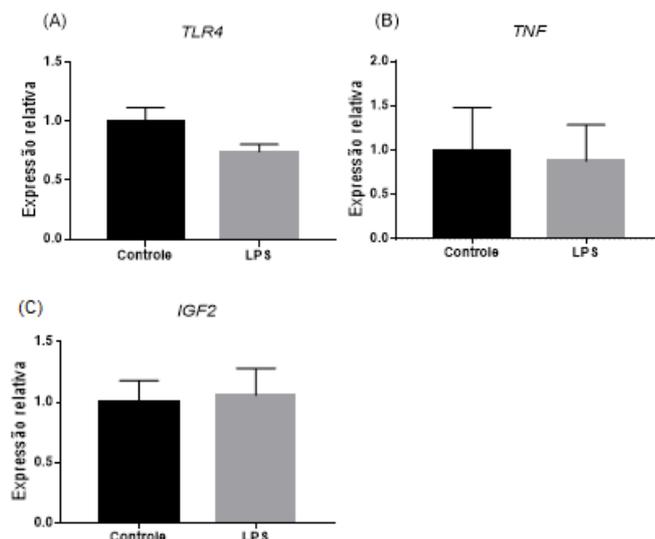


Figura 1. Expressão relativa dos genes (A) *TLR4* e (B) *TNF* e (C) *IGF2* no oviduto de novilhas desafiadas ou não com duas doses de LPS (0,5 μ g/kg de peso corporal) com intervalo de 24h.

As doenças causadas por bactérias gram-negativas, afetam o crescimento folicular e a ovulação, prejudicando a fertilidade dos animais (GINDRI et al., 2019).

Isto se deve a presença do receptor de LPS, o TLR4, nas células da granulosa e da teca, que irão desencadear a resposta inflamatória (MAGATA; SHIMIZU, 2017). Dessa forma, era esperado um aumento nos níveis de TLR4 no presente estudo, porém não houve alteração na expressão desses genes, no oviduto, em animais desafiados com LPS. Esse resultado corrobora com o encontrado por DICKSON et al. (2019), onde a administração de LPS também não alterou os níveis de TLR4. CRONIN et al. (2012), encontraram um aumento de TLR4 no endométrio, com uma consequente diminuição dos marcadores inflamatórios. Isso vem ao encontro do presente estudo, aonde não houve aumento de TLR4 e, dessa forma, o TNF α também não foi alterado.

As citocinas desencadeadas pelo LPS, como o TNF α , atuam como marcadores inflamatórios e possuem efeitos na produção e secreção do leite, bem como podem causar efeitos endócrinos, metabólicos e imunológicos após sua ativação (WALDRON et al. 2013). Segundo CHANROT et al. (2017), animais expostos à LPS possuem a expressão de TNF α aumentada, o que diverge do encontrado no presente estudo, onde a expressão de TNF α não foi afetada pelo desafio.

O IGF2 é um importante marcador de desenvolvimento embrionário e está relacionado com a maior taxa de nascimento de animais saudáveis (NEIRA et al., 2010). Nesse estudo, seus níveis não apresentaram aumento com a aplicação de LPS. Porém, já foi relatada anteriormente uma diminuição nos valores de IGF2 em animais desafiados com LPS, demonstrando que a endotoxina pode reduzir a qualidade do ambiente para o desenvolvimento do embrião (IBRAHIM et al., 2015).

Apesar de não ter ocorrido alterações nesses genes, 4 horas após a primeira aplicação e 4 horas após a segunda, a temperatura corporal dos animais do grupo LPS ($39.9\pm 0.2^{\circ}\text{C}$, $40.4\pm 0,3^{\circ}\text{C}$) foi superior aos do grupo controle ($39.1\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, $39.3\pm 0,1^{\circ}\text{C}$), afirmando que a dose utilizada foi capaz de gerar uma resposta sistêmica (CAMPOS, 2017), o que nos leva a crer que o curto tempo de exposição ao LPS foi determinante para não ter causado alterações na expressão gênica.

4. CONCLUSÕES

O desafio com duas doses de LPS em um intervalo de 24 horas não alterou a expressão dos genes avaliados no oviduto de bovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, Cambridge, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.

BERTONI, G.; TREVISI, E.; HAN, X.; BIONAZ, M. Effects of inflammatory Conditions on Liver Activity in Puerperium Period and Consequences for Performance in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 9, p. 3300-3310, 2008.

CAMPOS, C. C. Desempenho reprodutivo de vacas leiteiras lactantes acometidas pela mastite clínica de ocorrência espontânea ou induzida por LPS de *Esterichia coli*. 2017. 121f. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia.

CHANROT, M.; GUO, Y.; DALIN, A.M.; PERSSON, E.; BAGE, R.; SVENSSON, A.; GUSTAFSSON, H.; HUMBLLOT, P. Dose related effects of LPS on endometrial

epithelial cell populations from dioestrus cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 177, p. 12-24, 2017.

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. **Biology of Reproduction**, New York, v. 86, n. 2, p. 51, 2012

DICKSON, M. J.; KVIDERA, S. K.; HORST, E.A.; WILEY, C. E.; MAYORGA, E. J.; YDSTIE, J.; PERRY, G. A.; BAUMGARD, L. H.; KEATING, A. F. Impacts of chronic and increasing lipopolysaccharide exposure on production and reproductive parameters in lactating Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 102, n. 4, p. 3569-3583, 2019.

GINDRI, P.; CASTRO, N. A.; MION, B.; GASPERIN, B. G.; PEGORARO, L. M. C.; RINCÓN, J. A. A.; VIEIRA, A. D.; PRADIEÉ, J.; PFEIFER, L. F. M.; CORRÊA, M. N.; SCHNEIDER, A. Intrafollicular lipopolysaccharide injection delays ovulation in cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 211, p. 106-226, 2019.

IBRAHIM, S.; SALILEU-WONDIM, D.; RINGS, F.; HOELKER, M.; NEUHOFF, C.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Expression pattern of inflammatory response genes and their regulatory MicroRNAs in bovine oviductal cells in response to lipopolysaccharide: Implication for early embryonic development. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1-21, 2015.

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**, Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 6-13, 2014.

MAGATA, F.; SHIMIZU, T. Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. **Reproductive Toxicology**, Netherlands, v. 71, p. 1-7, 2017.

NEIRA, J.A.; TAINTURIER, D.; PENA, M.A.; MARTAL, J. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, n. 5, p. 595-604, 2010.

SCHAUMBERGER, S.; REISINGER, N. Endotoxins in cows an underestimated risk? **Science & Solutions**, Áustria, v. 45, n. 9. p. 2-5, 2014.

SCHELDON, 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. **Biology of Reproduction**, New York, v. 81, n. 6, p. 1025-1032, 2009.

WALDRON, M. R.; NISHIDA, T.; NONNECKE, B. J.; OVERTON, T.R. Effect of Lipopolysaccharide on Indices of Peripheral and Hepatic Metabolism in Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 11, p. 3447-3459, 2003.