

AVALIAÇÃO DOS NIVEIS DE PARAOXONASE SERICA E SUA RELAÇÃO COM A TAXA DE CONCEPÇÃO E TRANSFERENCIA PARA O LÍQUIDO FOLICULAR EM OVELHAS

FELIPE TERRES DE CAMPOS¹; LIGIA PRIETSCH²; JOAO A ALVARADO RINCON¹; ARNALDO DINIZ VIEIRA³; LÍGIA M. CANTARELLI PEGORARO⁴; AUGUSTO SCHNEIDER⁵

¹Programa de Pós-graduação em Veterinária – UFPel – felipe.t.campos@hotmail.com

²Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Pelotas – UFPel

³Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – UFPel

⁴ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

⁵Faculdade de Nutrição – UFPel – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A paraoxonase 1 (PON1) é uma enzima antioxidante hidrolítica com uma gama muito grande de substratos (Litvinov et al., 2012). A PON1 plasmática é exclusivamente associada a lipoproteína de alta densidade (HDL) e é responsável pela maior parte da atividade antioxidante de HDL (Razavi et al., 2012). A PON1 associada ao HDL hidrolisa peróxido de hidrogênio e contribui para efeitos de proteção contra a peroxidação lipídica e formação de oxidados das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Aviram et al., 1998). A PON1 tem atividade hidrolítica contra algumas bactérias gram-negativas e é um forte agente anti-inflamatório e anti-oxidante (Furlong et al., 2010).

A PON1 por estar ligada ao HDL que é a lipoproteína dominante no fluido folicular, também é transferida para o interior do folículo em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013), assim como em mulheres (Browne et al. 2008). A presença da enzima PON1 no fluido folicular (FF) é muito importante, pois a atividade de PON1 no FF foi associada positivamente com o desenvolvimento do embrião em mulheres, devido as suas propriedades antioxidantes (Browne et al. 2008).

Browne et al. (2008), indica que a associação da concentração de HDL e atividade de PON1 tem relação com as características morfológicas do embrião e sugerem que a atividade de PON1 é importante para a competência do ovócito e o início desenvolvimento embrionário em mulheres. Em humanos a divisão celular *in vitro* do embrião pode ser dependente do metabolismo de HDL e colesterol no FF e a taxa de clivagem do potencial antioxidante da PON1 (Fujimoto et al., 2010).

Baseado nestas evidências o objetivo do presente estudo foi avaliar o nível sérico de PON1 em ovelhas, algo ainda não descrito na literatura, assim como observar sua relação com a taxa de concepção e o nível intrafolicular de PON1.

2. METODOLOGIA

Para este estudo foram utilizadas 27 ovelhas da raça crioula lanada, com peso médio de 37,5Kg e ECC de 3,5. O ciclo estral das fêmeas foi sincronizado com protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com uma pré sincronização onde foi utilizada duas doses de prostaglandina F 2 α (PGF2 α) no D0 e no D9, e em seguida iniciou a sincronização, 36 horas após a ultima aplicação de PGF2 α foi administrado GnRh, no D11 foi colocado o CIDR e no D17 retirou-se o CIDR e foi aplicada PGF2 α conforme descrito pro Souza et al (1998). A IA foi realizada no dia 19 (considerando D0 como inicio do protocolo). No D19

oito ovelhas foram submetidas ao frigorífico para abate, momento em que o par de ovários foi coletado.

No momento da IA (D 19) e 1 hora antes dos animais entrarem na sala de abate, foi coletado sangue da veia jugular em tubos vacutainer sem anticoagulante. Os tubos foram centrifugados (2500 rpm por 15 min) e foi separado o soro em tubos que foram armazenados até avaliação. Os ovários foram coletados no frigorífico e encaminhados para o Laboratório de Reprodução onde foram aspirados todos os folículos > 4mm com o auxílio de uma seringa de 1 mL.

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 1:7. A leitura foi realizada em espectrofotômetro 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.

O diagnóstico gestacional foi realizado com o auxílio do ultrassom por via retal 30 dias após a IA.

A análise estatística foi realizada usando o software Graphpad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) utilizando o teste de "t" e o teste de "Pearson". Os dados foram analisados, comparando atividade de PON1 no soro das ovelhas que conceberam ou não, comparado a atividade da PON1 no soro e no fluido folicular, e avaliando a atividade da enzima no fluido folicular dos dois maiores folículos presentes nos ovários.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo revisão bibliográfica efetuada este é o primeiro trabalho em que se estuda a atividade de PON1 em relação a reprodução em ovinos. A atividade da PON1 encontrada no presente estudo, em média $307,8 \pm 17,5$ U/mL nas ovelhas prenhes e $327,5 \pm 19,6$ U/mL nas não prenhes, foi 2,5 vezes superior a atividade descrita por SCHNEIDER et al. (2013) em vacas da raça Holandêsa. A atividade da PON1 encontrada foi também consideravelmente superior ao encontrado em mulheres por BROWNE et al. (2008), em ratos por Salam et al. (2014) e em camundongos por WANG et al. (2014). Isto indica que as concentrações em ovelhas são elevadas em relação às demais espécies, por isso é necessário maiores estudos em ovelhas para que possamos determinar a natureza destas diferenças.

Conforme pode ser observado na Figura 1 não houve diferença ($P > 0.05$) na atividade de PON1 no soro de ovelhas não prenhes em comparação com o de ovelhas prenhes. A hipótese era de que as ovelhas prenhes teriam uma atividade superior de PON1 no dia da IA, pois BROWNE et al. (2008) relata a importância da PON1 na competência do ovócito e no desenvolvimento embrionário em mulheres, no entanto, o mesmo não foi observado nesta situação.

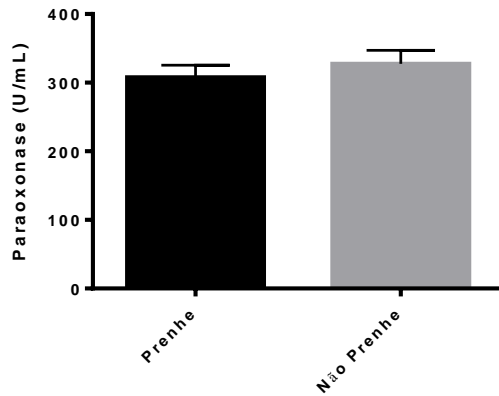


Figura 1 – Atividade de PON1 no dia de IA das ovelhas que foram diagnosticadas prenhes com as que não conceberam.

Conforme observado na Figura 2 a atividade de PON1 no fluido folicular foi metade da observada no soro. Este resultado foi o mesmo encontrado por SCHNEIDER et al.(2013), onde a atividade da PON1 no FF é cerca de 50% do que encontrado no soro. O mesmo foi observado nos ovários de mulheres por BROWNE et al. (2008).

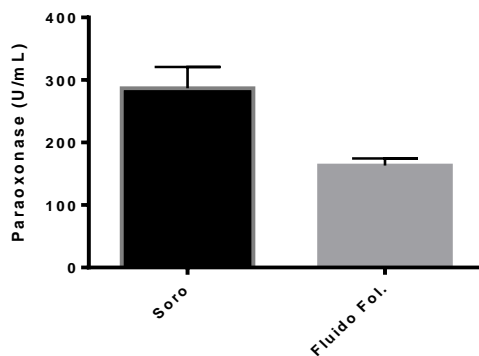


Figura 2 – Atividade de PON1 comparando a atividade da enzima no soro e no FF

Não houve diferença ($P>0.05$) na atividade de PON1 no FF de diferentes folículos do mesmo animal, evidenciando que esta transferência é sistêmica e não influenciada por fatores locais.

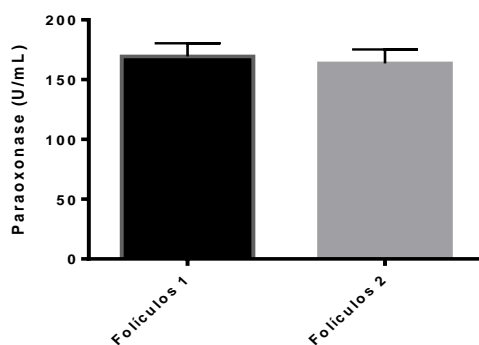


Figura 3 – Atividade de PON1 no FF dos diferentes folículos de ovelhas

Apesar de não haver diferença estatística na atividade de PON1 dos diferentes folículos no mesmo animal foi observada uma correlação entre a

atividade da PON1 do soro e do fluido do maior folículo ($r= 0,74$, $P=0,03$), porém não correlacionou com o fluido do segundo maior folículo ($r=0,32$, $P=0,47$).

4. CONCLUSÕES

Este trabalho indica que a atividade de PON1 nos ovinos é maior em relação às demais espécies já estudadas e que as proporções nos ovários é metade do encontrado no soro sanguíneo concordando com o que foi descrito em mulheres e vacas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVIRAM,M.,ROSENBLAT,M.,BISGAIER,C.L.,NEWTON,R.S.,PRIMO-PARMO,S.L., LADU,B.N .Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase.**J.Clin.Invest.**101(8), p 1581–1590. 1998.

BROWNE RW, SHELLY WB, BLOOM MS, et al, Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. **Hum Reprod** v23, p1884–1894. 2008.

FERRE N, CAMPS J, PRATS E, VILELLA E, PAUL A,FIGUERA L, JOVEN J, 2002: Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. **Clin Chem.** v48, p 261–268. 2002.

FURLONG,C.E.,SUZUKI,S.M.,STEVENS,R.C., et al. Human PON1, a biomarker of risk of disease and exposure. **Chem. Biol.Interact.** v187 n1–3, p 355–361. 2010

LITVINOV, D.,MAHINI,H.,GARELNABI,M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase1:implication in arteriosclerosis diseases.**N.Am.J.Med.Sci.** v4 n11, p 523–532. 2012

RAZAVI,A.E.,ANI,M.,POURFARZAM,M.,NADERI,G.A. Associations between high density lipoprotein mean particle size and serum paraoxonase-1 activity.**J.Res. Med. Sci.** v.17 n11 p 1020–1026. 2012

SALAN M.E.A.O. et al. Citric Acid Effects on Brain and Liver Oxidative Stress in Lipopolysaccharide-Treated Mice. (2014)

SCHNEIDER, A.; ABSALON-MEDINA, V.A.; ESPOSITO, G., et al. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and pon1 activity in follicular fluid of dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, Nova Iorque, v. n/a, p. n/a, 2013.

SOUZA, CJH de, and J. C. F. MORAES. "**Manual de sincronização de cio em ovinos e bovinos.**" Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 1998.

WANG L. et al. Expression and bioactivity of protein transduction domain-paraoxonase 1 fusion protein. **Journal of International Pharmaceutical**, V.41, n.3, p 358-362. 2014.