

ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE PARAOXONASE 1 (PON 1) E RETORNO À CICLICIDADE PÓS PARTO EM VACAS DA RAÇA HOLANDESA

JOSÉ VICTOR VIEIRA ISOLA¹; DIEGO ANDRES VELASCO ACOSTA²;
CAROLINA BESPALHOK JACOMETO²; JOAO ALVARADO RINCON²; MARCIO
NUNES CORREA²; AUGUSTO SCHNEIDER²

¹Universidade Federal de Pelotas – jvvisola@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O balanço energético negativo (BEN) é comum em vacas leiteiras durante a fase pós-parto e está altamente associado ao tempo até a primeira ovulação (BUTLER, 2003). Além dos eventos metabólicos no periparto, as infecções uterinas também têm impacto negativo na ovulação e na taxa de concepção precoce (FURICHON, et al, 2000). A presença de bactérias patogênicas no útero causa inflamação endometrial, quando há um aumento na quantidade de células imunes no endométrio e liberação de mediadores imunológicos (KRAUSE, et al, 2014). Esses eventos retardam a primeira onda folicular e, consequentemente, aumentam o intervalo parto concepção. Vacas com intenso BEN e altos níveis de inflamação tendem a ter menores concentrações de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1) e maiores concentrações de ácidos graxos não esterificados (NEFA), bem como crescimento folicular mais lento e menores concentrações séricas e foliculares de estradiol (E2; SHELDON, et al, 2002).

Mecanismos de defesa do corpo contra infecções incluem a resposta de fase aguda que envolve a síntese e secreção de proteínas de fase aguda (PFA) pelo fígado (WIRA E FAHEY, 2004). A Paraoxonase-1 (PON1) está entre as PFAs, sendo considerada uma PFA negativa. Sua atividade diminui quando há um processo inflamatório ativo (CAMPOS, et al, 2017). É por isso que a baixa atividade plasmática da PON1 no período periparto está associada à incidência de metrite em vacas leiteiras (BIONAZ et al., 2007). A PON1 é uma enzima sintetizada no fígado, que é liberada na corrente sanguínea, circulando associada à lipoproteína de alta densidade (HDL; DRAGANOV et al., 2005). Esta enzima possui propriedades antioxidantes que inibem a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e das membranas celulares (DEAKIN et al., 2011). Acredita-se que a PON1 auxilie na proteção do oócito contra estresse oxidativo.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação da atividade sérica da PON1 com as concentrações de E2, NEFA e IGF1 e a expressão de genes relacionados ao retorno da ciclicidade pós-parto de novilhas Holandesas.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 18 novilhas da raça Holandesa provenientes de uma fazenda comercial no Rio Grande do Sul. As novilhas estavam em final de gestação e apresentaram um escore de condição corporal (ECC) de $2,9 \pm 0,3$ no início do experimento. Todos os partos ocorreram em um intervalo de 40 dias. Era realizada ultrassonografia dos ovários a cada 3 dias, de 8 dias pós-parto até o dia em que o maior folículo alcançava um diâmetro próximo a 16 mm. Estes folículos eram aspirados por punção transvaginal guiada por ultrassonografia. O fluido folicular era centrifugado e o sobrenadante congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise. O pellet resultante de células foliculares era imediatamente transferido

para um novo tubo e homogeneizado com reagente Trizol®, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C .

Amostras de sangue foram coletadas semanalmente de 28 ± 1 dias antes do dia esperado do parto, no dia do parto e nos dias 3, 6, 14 e 28 ± 1 pós-parto via punção da veia ou artéria coccígea em um tubo sem anticoagulante para avaliar concentrações de NEFA e IGF-1. Para as análises de E2, amostras de sangue foram coletadas no dia que o folículo atingiu 16 mm de diâmetro (D0, dia previsto da ovulação), dois (D2) e quatro (D4) dias prévios à ovulação. Todas as amostras de sangue foram coletadas no intervalo após a ordenha e antes da alimentação, centrifugadas em 2 h da coleta, a 4°C por 15 min a $1000 \times g$. Após a centrifugação, alíquotas de soro foram mantidas a -80°C .

As concentrações de NEFA no soro como no fluido folicular foram mensuradas através de um kit colorimétrico enzimático comercialmente disponível, pelo micro-método. As concentrações foliculares de IGF-I e E2 foram determinadas através do procedimento de radioimunoensaio.

Foi medida atividade sérica da PON1 utilizando-se um kit comercial (Zeptometrix Corporation, Buffalo, USA). As novilhas foram divididas em dois grupos com base na atividade da PON1 pós-parto: Alta (A; $n=10$; $49,72 \pm 10,07$ U/ml) e Baixa (B; $n=08$; $6,40 \pm 7,42$ U/ml).

O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol®, tratado com DNase para remover a contaminação do DNA gênico e convertido para cDNA de cadeia simples. As amplificações por PCR e a detecção de fluorescência foram realizadas em duplicata no sistema ECO Real Time PCR, usando SYBR Green para detecção. A expressão de cada gene alvo de interesse foi calculada em relação à expressão de H2AFZ. Apenas folículos estrogênicos ativos, selecionados com base na razão E2:P4 foram utilizados, vacas que apresentaram razão E2:P4 menor que 1 ($n=4$) foram excluídas do experimento.

A expressão genica nas células foliculares foi avaliada para 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD-3B1), Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1 (CYP19A1), Steroidogenic acute regulatory protein (STAR), Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor (LHCGR), Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1 (P450scc), (P450c17) insulin like growth factor 1 receptor (IGFr), Transportador de glicose tipo 4 (GLUT 4), Fator de necrose tumoral (TNF), Substrato do receptor de insulina (IRS1), Fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) e Receptor toll like 4 (TLR4).

Para a análise estatística foi usado o software Graphpad Prism 6.0. Realizou-se teste t para comparar os valores de expressão gênica, NEFA e IGF-1 entre os grupos de Alta e Baixa PON1. Para comparar as concentrações de E2 dos 3 dias medidos entre os grupos utilizou-se o procedimento ANOVA de medidas repetidas com comparações múltiplas ajustadas pelo teste de Tukey. Foi considerado significativo um $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para nenhum dos genes avaliados foi encontrada diferença na expressão gênica nas células foliculares entre os grupos de Alta e Baixa PON1 (Tabela 1).

Tabela 1: Expressão gênica nas células foliculares de vacas com alta e baixa PON1 sérica

Gene	ALTA PON1	BAIXA PON1	p
Esteroidogenese			
HSD-3B1	1.00 ± 0.58	0.41 ± 0.09	0.3396

CYP19A1	1.00 ± 0.50	0.98 ± 0.46	0.9821
STAR	1.00 ± 0.35	1.06 ± 0.59	0.2364
LHCGR	1.00 ± 0.46	0.72 ± 0.43	0.8767
P450scc	1.00 ± 0.41	1.72 ± 0.55	0.4906
P450c17	1.00 ± 0.42	4.46 ± 3.34	0.2881
Metabolismo e Energia			
IGFr	1.00 ± 0.41	0.62 ± 0.36	0.9119
GLUT4	1.00 ± 0.43	1.00 ± 0.52	0.9999
IRS1	1.00 ± 0.27	0.57 ± 0.26	0.2980
Inflamação			
TNF	1.00 ± 0.86	0.10 ± 0.09	0.3321
NFKB	1.00 ± 0.40	0.30 ± 0.14	0.1913
TLR4	1.00 ± 0.58	0.36 ± 0.34	0.4196

Não foi encontrada diferença significativa dentre os grupos na concentração sérica de NEFA ($p = 0.2069$) e folicular de NEFA ($p = 0.3421$) e IGF1 ($p = 0.1295$), o que sugere que não há relação entre atividade da PON e concentrações de NEFA e IGF1. KRAUSE et al (2014) não observaram diferença nos níveis de NEFA de vacas que retornaram à ciclicidade e aquelas que permaneceram anovulatórias, indicando que este metabolito não é essencial para o retorno da função ovariana.

As concentrações séricas de E2 apresentaram tendência ($p = 0.062$) a serem maiores nas vacas do grupo Alta PON1 (Figura 1). Maiores concentrações de E2 implicam em maiores chances de retorno à ovulação, que resultam em um menor intervalo parto-concepção.

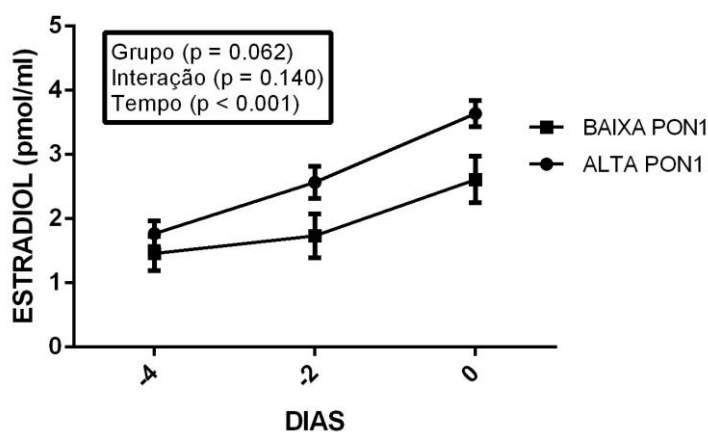


Figura 1: Concentrações séricas de E2 dos grupos Alta e Baixa PON no dia da aspiração folicular (D0, folículos com 16mm), 2 e 4 dias prévios à aspiração.

Trabalhos anteriores, como o desenvolvido por BURKE et al, (2010), indicaram associação entre PFAs, saúde uterina e retorno à atividade ovariana pós-parto. KRAUSE, et al (2014) encontraram menor contagem de células inflamatórias no útero e uma tendência a menores concentrações de PON em vacas que apresentaram atraso no retorno à ciclicidade pós-parto. Isto vem ao encontro dos nossos dados atuais que indicam que vacas com menor nível de PON1 tem menor produção de E2, o que acarreta num atraso da primeira ovulação, possivelmente ligado a alguma condição inflamatória.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo observou-se uma tendência das vacas com altos níveis de PON1 terem maiores concentrações séricas de E2, o que poderá ter um efeito positivo na taxa de ovulação. No entanto, não foi encontrada diferença na expressão de genes das células foliculares, concentrações de NEFA e IGF1 de vacas com nível alto e baixo de atividade sérica da PON1. No entanto,

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURKE, C.R.; MEIER, S.; MCDUGALL, S.; COMPTON, C.; MITCHELL, M.; ROCHE, J.R.; Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5363–5373.

BUTLER, W.R.; Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v.83, p.211–218, 2003.

DEAKIN, S.P.; BIOLETTI, S.; BOCHATON-PIALLAT, M.L.; JAMES, R.W.; HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.50, p.102–109, 2011.

DRAGANOV, D.I., ET AL., 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. **Journal of Lipid Research**, v.46, n.6, p.1239–1247.

CAMPOS, F.T.; RINCON, J.A.A.; ACOSTA, D.V.; SILVEIRA, P.A.S.; PRADIEE, J.; CORRÊA, M.N.; GASPERIN, B.G.; PFEIFER, L.F.M.; BARROS, C.C.; EGORARO, L.M.C.; SCHNEIDER, A.; The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. **Theriogenology**, v.89, p.244–249, 2017.

FOURICHON, C.; SEEGER, H.; MALHER, X.; Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. **Theriogenology**, v.53, p.1729–1759, 2000.

KRAUSE, A.R.T.; PFEIFER, L.F.M.; MONTAGNER, P.; WESCHNFELDER, M.M.; SCHWEGLER, E.; LIMA, M.E.; XAVIER, E.G.; BRAUNER, C.C.; SCHMITT, E.; DEL PINO, F.A.B.; MARTINS, C.F.; CORREA, M.N.; SCHNEIDER, A.; 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.

SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E.; RYCROFT, A.N.; PFEIFFER, D.U.; DOBSON, H.; Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. **Reproduction**, Cambridge, v.123, p.837–845, 2002.

WIRA, C.R.; FAHEY, J.V.; The innate immune system: gatekeeper to the female reproductive tract. **Immunology**, v.111, p.13–15, 2004.