

## **EFEITO DO LPS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS DA GRANULOSA DO FOLÍCULO DOMINANTE DE BOVINOS**

**JOAO A. A. RINCÓN<sup>1</sup>; FELIPE T. DE CAMPOS<sup>1</sup>; DIEGO A. V. ACOSTA<sup>1</sup>; PEDRO A. SILVEIRA<sup>1</sup>; LIGIA M. C. PEGORARO<sup>2</sup>; AUGUSTO SCHNEIDER<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Veterinária – UFPel- RS, Brasil

<sup>2</sup>Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Nutrição – UFPel – augustoschneider@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

A maior incidência de doenças em vacas ocorre no primeiro mês após o parto, consequentemente a metrite e mastite estão relacionadas negativamente com o desempenho reprodutivo. Cerca de 40% do rebanho pode desenvolver metrite, enquanto de 20-50% pode desenvolver mastite (Opsomer et al., 2000). Animais acometidos por estas doenças apresentam um crescimento mais lento do folículo dominante da primeira onda pós-parto, atraso na ovulação, redução da fecundidade, aumento do descarte de animais por incapacidade de concepção (Bromfield e Sheldon 2011), concentração de estradiol (E2) reduzida (Williams et al., 2007) e extensão da fase lútea (Dohmen et al., 2000), assim como alterações nas concentrações dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (Sheldon et al., 2002).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são endotoxinas provenientes de bactérias gram negativas que provocam uma forte resposta por parte do sistema imunitário, promovendo a resposta inflamatória (Mateus et al., 2003; Kohchi et al., 2006). A presença de LPS tem sido detectada no fluido uterino, no plasma sanguíneo (Mateus et al., 2003) e no fluido folicular (Herath et al., 2007) de vacas com metrite e no plasma e leite de vacas com mastite infecciosa por *E. coli* (Hakogi et al., 1989). Os LPS atuam no hipotálamo ou na hipófise, inibindo a liberação de gonadotrofinas e consequentemente alterando o desenvolvimento folicular (Suzuki et al., 2001). No entanto, recentes estudos indicam que os LPS podem ter um efeito direto no ovário e, principalmente nas células da teca e da granulosa, alterando desta maneira a esteroidogênese e consequentemente a atividade ovariana (Herath et al., 2007).

O receptor tipo Toll 4 (TLR4: “*Toll-like receptors*”) possui um papel importante no reconhecimento de LPS de bactérias gram negativas e ativação da resposta imune inata (Takeuchi e Akira 2010). O TLR4 é expresso tanto em células da teca (Herath et al., 2007; Shimizu et al., 2012) quanto da granulosa (Magata et al., 2014) de folículos bovinos, sugerindo que células foliculares são capazes de responder aos LPS. Neste contexto, algumas enzimas envolvidas na esteroidogênese (3B-HSD: 3-beta-hidroxiesteróide-desidrogenase; CYP19A1: citocromo P450 aromatase; P450scc: citocromo P450 “*side-chain cleavage*”; STAR: proteína reguladora aguda da esteroidogênese) (Bao e Garverick 1998), proteínas relacionadas com inflamação (TNF: Fator de necrose tumoral), resposta imune (NF-κB: fator nuclear kappa B) e receptores (LHR: receptor do LH) podem ser alteradas pela presença de LPS, afetando a esteroidogênese e consequentemente o desenvolvimento folicular. Baseado no anteriormente exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos LPS sobre a expressão dos genes TLR4, 3B-HSD, CYP19A1, STAR, NF-κB, TNF, LHR, P450scc e P450C17 nas células da granulosa do folículo dominante em bovinos.

## 2. METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pelotas. Vinte vacas da raça Jersey mantidas em sistema extensivo na EMBRAPA Clima Temperado e foram 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) e 2 mg de benzoato de estradiol no dia 0, doze horas antes da remoção do CIDR (dia 8) foram aplicados 500 µg de Prostaglandina. Duas horas após a remoção do CIDR foi administrada uma dose única de LPS (2,5 ug/kg de peso vivo; SIGMA-ALDRICH® Inc., Missouri, EUA) intravenoso no grupo LPS e uma solução placebo (2 mL de NaCl 0,9%) no grupo controle. Após 6 horas da aplicação do LPS foi avaliado o par de ovários e identificado o folículo dominante com auxílio de ultrassom. Seguidamente, foi realizada anestesia epidural 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 com uma seringa de 10 mL em tubos falcon, sendo separados fluido folicular e células da granulosa mediante centrifugação. O sedimento (células da granulosa) foi então transferido a microtubos contendo 500 µL de Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), homogeneizados e armazenados em nitrogênio até avaliação.

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 o kit iScript™ Synthesis (BIORAD®, Hercules, CA, EUA) no volume de 20 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 50 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 (*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, 3B-HSD, CYP19A1, StAR, NF-κB, TNF, LHR, P450scc e P450C17) do grupo LPS em relação ao grupo controle.

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) utilizando o teste de Mann-Whitney.

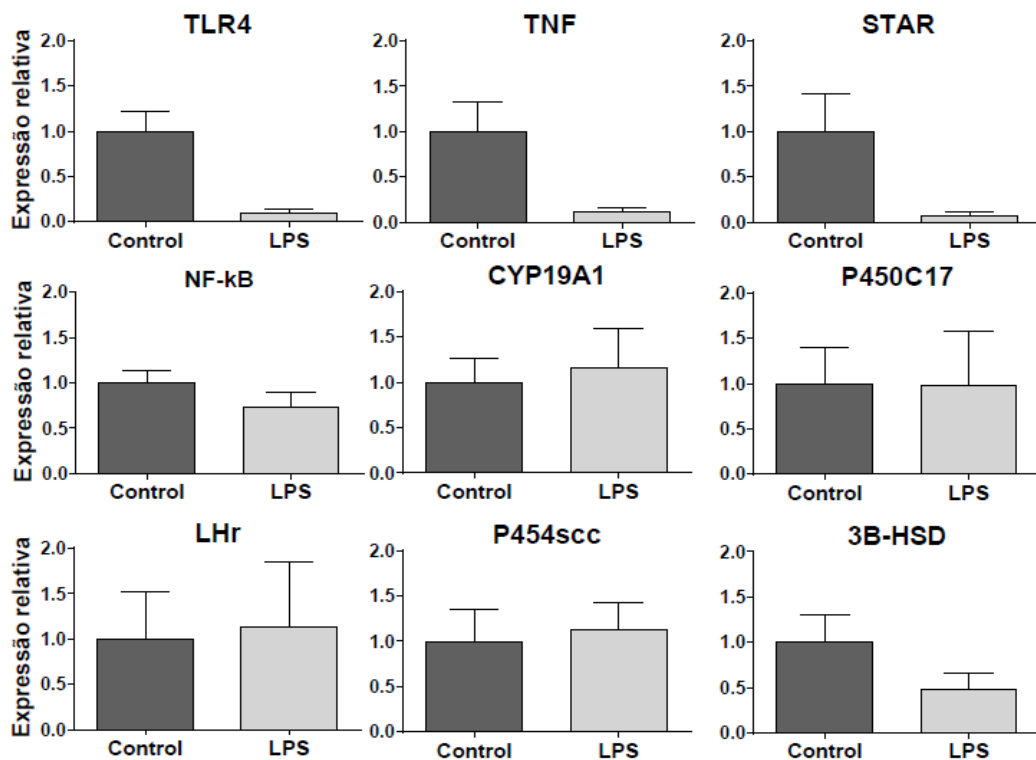
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como observado em outros trabalhos, o TLR4 foi expresso na células da granulosa de folículos dominantes em bovinos (Price et al., 2013). Esta proteína tem um papel importante no reconhecimento de LPS de bactérias gram negativas, sendo um dos responsáveis pela ativação da resposta imune, induzindo a transcrição do TNF. No entanto, neste estudo observou-se uma diminuição do 91% na expressão do TLR4 (P=0,002) e de 89% na expressão do TNF (P=0,001) no grupo LPS em comparação ao grupo controle, como observado na Figura 1A e 1B. Ainda assim, a redução na expressão do TLR4 concorda com o encontrado por outros autores, que suplementaram com LPS células da granulosa cultivadas *in vitro* (Price et al., 2013).

Isto indica que existe uma resposta inflamatória das células da granulosa frente à presença do LPS, porém, mediante mecanismos que devem ser melhor esclarecidos.

Além disso, evidenciou-se uma diminuição de 93% na expressão do gene STAR (P=0,01) no grupo LPS (Figura 1C). 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 esteroidogênese. Desta maneira, mudanças 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 esteroidogênese no folículo dominante.

**Figura 1.** Expressão relativa dos genes relacionados com resposta inflamatória e esteroidogênese nas células da granulosa de folículos dominantes de bovinos.



Em contra partida, não observou-se diferença estatística na expressão dos genes NF-kB, CYP19A1, P450C17, LHR, P454scc e 3B-HSD entre os grupos, como se evidencia nas Figura 1D, E, F, G, H e I, respectivamente. Estes resultados sugerem que a pesar de ter observado efeitos do LPS sobre a expressão de alguns genes envolvidos com resposta inflamatória e esteroidogênese, mais estudos devem ser conduzidos para determinar os mecanismos específicos que agem quando há presença de LPS.

#### 4. CONCLUSÕES

Conforme os resultados deste estudo, a presença de LPS induz uma resposta inflamatória nas células da granulosa de folículos dominantes, mediada pela via do TLR4. Além disso, esta resposta pode alterar a produção de hormônios esteroides visto que a expressão de enzimas chave neste processo foi drasticamente reduzida, e, desta maneira pode comprometer a maturação oocitária e posterior ovulação.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bao, B.; Garverick, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **J Anim Sci**, v.76, n.7, p.1903-21, 1998.

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.5029-40, 2011.

Dohmen, M.J.; Joop, K.; Sturk, A., et al. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. **Theriogenology**, v.54, n.7, p.1019-32, 2000.

Hakogi, E.; Tamura, H.; Tanaka, S., et al. Endotoxin levels in milk and plasma of mastitis-affected cows measured with a chromogenic limulus test. **Vet Microbiol**, v.20, n.3, p.267-74, 1989.

Herath, S.; Williams, E.J.; Lilly, S.T., et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. **Reproduction**, v.134, n.5, p.683-93, 2007.

Kohchi, C.; Inagawa, H.; Nishizawa, T., et al. Applications of lipopolysaccharide derived from *Pantoea agglomerans* (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory. **J Biosci Bioeng**, v.102, n.6, p.485-96, 2006.

Magata, F.; Horiuchi, M.; Echizenya, R., et al. Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. **Anim Reprod Sci**, v.144, n.1-2, p.6-13, 2014.

Mateus, L.; Lopes da Costa, L.; Diniz, P., et al. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. **Anim Reprod Sci**, v.76, n.3-4, p.143-54, 2003.

Opsomer, G.; Grohn, Y.T.; Hertl, J., et al. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, v.53, n.4, p.841-57, 2000.

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.3377-86, 2013.

Sheldon, I.M.; Noakes, D.E.; Rycroft, A.N., et al. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. **Reproduction**, v.123, n.6, p.837-45, 2002.

Shimizu, T.; Miyauchi, K.; Shirasuna, K., et al. Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol production in bovine granulosa cells from small and large follicles. **Toxicol In Vitro**, v.26, n.7, p.1134-42, 2012.

Suzuki, C.; Yoshioka, K.; Iwamura, S., et al. Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. **Domest Anim Endocrinol**, v.20, n.4, p.267-78, 2001.

Takeuchi, O.; Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v.140, n.6, p.805-20, 2010.

Williams, E.J.; Fischer, D.P.; Noakes, D.E., et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v.68, n.4, p.549-59, 2007.