

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**Enzimas relacionadas ao estresse oxidativo após desafio com endotoxina
exógena**

Luísa Inácio Lourensi

Pelotas, 2020.

Luísa Inácio Lourensi

Enzimas relacionadas ao estresse oxidativo após desafio com endotoxina exógena

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Produção Animal (Área de Concentração: Nutrição Animal).

Orientador: Francisco Augusto Burkert Del Pino
Co-orientador: Joao Alveiro Alvarado Rincón

Pelotas, 2020.

L892e Lourensi, Luísa Inácio

Enzimas relacionadas ao estresse oxidativo após desafio com endotoxina exógena / Luísa Inácio Lourensi ; Francisco Augusto Burkert Del Pino, orientador ; Joao Alveiro Alvarado Rincón, coorientador. — Pelotas, 2020.

55 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

I. Atividade enzimática. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Níveis séricos. 4. Ruminantes. I. Pino, Francisco Augusto Burkert Del, orient. II. Rincón, Joao Alveiro Alvarado, coorient. III. Título.

CDD : 636.2

Luísa Inácio Lourensi

Enzimas relacionadas ao estresse oxidativo após desafio com endotoxina exógena

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Produção Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Dissertação defendida e aprovada em: 10/02/2020.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino
Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Antônio Amaral Barbosa
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Josiane de Oliveira Feijó
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho à minha amada família.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus e ao Universo, pela proteção e por sempre me colocarem no lugar certo, na hora certa. Fazendo com que eu sempre amadureça e evolua.

Aos meus pais, Josemar e Carmem, por todo amor e carinho, mas principalmente, pela educação. Por tratá-la como prioridade e me fazerem defensora dos meus pensamentos e princípios.

Ao meu irmão, por ser meu primeiro amigo e sempre dispor de uma palavra para me arrancar um sorriso.

Ao meu Rodrigo, por ter um coração gigante e uma paciência maior ainda. Por dividir o dia a dia comigo e me entender quando nem eu mesma consigo. Assim como, à sua família, por serem tão carinhosos e compreensivos comigo.

À minha “gêmea” Laura, por todo apoio dado e pela linda amizade que criamos.

À minha querida amiga Nina Vahl, que sem ela este caminho desafiador teria sido bem mais difícil. Agradeço pelo companheirismo e lealdade até o fim.

Ao CNPq pela bolsa ofertada durante estes dois anos de pesquisa.

Ao NUPEEC, seus coordenadores e colaboradores, pelo convívio em grupo e por permitirem ter realizado meu trabalho.

Ao meu coorientador Joao Rincón, que não mediu esforços para que o trabalho apresentado fosse o melhor possível. Obrigada pela disponibilidade e ensinamentos!

“Se você pode sonhar, você pode realizar”.

Walt Disney

Resumo

LOURENSI, Luísa Inácio. **Enzimas relacionadas ao estresse oxidativo após desafio com endotoxina exógena**. 2020. 57f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Apesar dos ruminantes possuírem capacidade de se adaptar às condições impostas, por vezes, o status de estresse se altera e pode apresentar-se da maneira oxidativa. Sendo assim, nosso objetivo foi verificar os níveis séricos de algumas enzimas envolvidas no estresse oxidativo, que foi provocado por duas infusões de lipopolissacarídeo (LPS), afim de ocasionar uma inflamação experimental. Foram acompanhadas 16 novilhas corte de raça europeia, em torno de 14 meses de idade, pesando aproximadamente 330kg, clinicamente saudáveis, manejadas em sistema intensivo e com livre acesso a água. O grupo LPS (n=8) recebeu 2 aplicações via intravenosa (i.v) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich Missouri, EUA) diluídas em 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl), com intervalo de 24 horas, pois se sabe que o pico da resposta inflamatória se dá neste momento. Já o grupo controle (n=8) recebeu as mesmas aplicações e dosagens de solução salina (0,9% de NaCl) via i.v, com o mesmo intervalo. Foi realizado exame clínico geral e sanguínea às 0, 4 e 8 horas após dois desafios com LPS, sendo a hora 0 o momento da infusão do LPS ou solução salina. O sangue foi coletado através do complexo arteriovenoso da coccígea com a utilização de sistema Vacutainer (BD Diagnostics, São Paulo, Brasil). Após a coleta, os tubos foram centrifugados e o soro foi armazenado em eppendorfs para posterior análises. A temperatura corporal do grupo LPS foi superior quatro horas após cada desafio ($P<0,05$). A contagem de leucócitos totais foi inferior no grupo LPS ($P<0,05$). A frequência cardíaca também foi afetada pelo desafio com LPS ($P<0,05$) e a frequência respiratória não diferiu entre grupos. A atividade de total-SH ($P=0,084$) e EROS ($P=0,050$) demonstraram tendência estatística. Verificou-se que, o desafio com duas aplicações de LPS demonstrou alterações na produção séricas de totais-SH e EROS.

Palavras-chave: atividade enzimática; lipopolissacarídeo; níveis séricos; ruminantes.

Abstract

LOURENSI, Luísa Inácio. **Enzymes related to oxidative stress after challenge with exogenous endotoxin**. 2020. 57p. Dissertation (Master in Animal Production) - Postgraduate Program in Animal Science, Faculty of Agronomy, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Ruminants have the ability to adapt to imposed conditions. However, sometimes the stress status changes presenting ruminants oxidative stress. Therefore, the objective of this study was to verify the serum levels of enzymes involved in oxidative stress, which was induced by two infusions of lipopolysaccharide (LPS), in order to cause an experimental inflammation. Sixteen European heifers were accompanied. Their ages were around 14 months, weighing approximately 330 kg, clinically healthy, managed in an intensive system and with free access to water. The LPS group (n = 8) received 2 intravenous applications (iv) containing 0.5 µg/kg of body weight of LPS (Sigma Aldrich Missouri, USA) diluted in 2 mL of saline solution (0.9% NaCl), with an interval of 24 hours (known peak time of the inflammatory response occurrence). The control group (n = 8) received the same applications and dosages of saline solution (0.9% NaCl) via i.v, within the same interval. General clinical and blood tests were performed at 0, 4 and 8 hours after two challenges with LPS, being hour 0 the time of LPS infusion or saline solution. Blood was collected through the coccygeal arteriovenous complex using the Vacutainer system (BD Diagnostics, São Paulo, Brazil). After collection, the tubes were centrifuged and the serum was stored for further analysis. The body temperature of the LPS group was higher four hours after each challenge ($P < 0.05$). The total leukocyte count was lower in the LPS group ($P < 0.05$). Heart rate was also affected by the challenge with LPS ($P < 0.05$) and respiratory rate did not differ between groups. The activity of total-SH ($P = 0.084$) and EROS ($P = 0.050$) showed a statistical trend. It was found that the challenge with two applications of LPS demonstrated changes in the serum production of total-SH and EROS.

Keywords: enzymatic activity; lipopolysaccharide; ruminants; serum levels.

Lista de Figuras

Figura 1. Níveis séricos de leucócitos em novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) às zero e 24 horas	7
Figura 2. Frequência cardíaca de novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) às zero e 24 horas	7
Figura 3. Frequência respiratória de novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) às zero e 24 horas	8
Figura 4. Temperatura retal de novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) às zero e 24 horas	8
Figura 5. Níveis séricos de grupamentos tiólicos (A), espécies reativas de oxigênio (B), nitritos (C) e superóxido desmutase (D) em novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) às zero e 24 horas	8

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição química da dieta total de novilhas submetidas ou não ao desafio com LPS.	4
--	---

Sumário

Hipótese	12
Objetivo geral	12
Objetivos específicos	12
1 Revisão de literatura	16
1.1 Lipopolissacarídeos	16
1.2 Lipopolissacarídeos <i>versus</i> doenças	16
1.3 Estresse oxidativo	16
2 Artigo 1	26
Resumo	1
Abstract	1
Introdução	2
Material e Métodos	3
Avaliações clínicas	4
Coletas de sangue	5
Análises bioquímicas	5
Análise estatística	6
Resultados	6
Discussão	9
Conclusão	13
Referências	13
3 Considerações finais	27
Referências	28
Anexos	38

Hipótese

A indução de uma resposta inflamatória experimental, através de duas infusões com lipopolissacarídeo (LPS), promove alterações na produção de enzimas relacionadas ao dano oxidativo a nível sérico de ruminantes.

Objetivo geral

Verificar a nível sérico o efeito do desafio com LPS na produção de enzimas envolvidas no estresse oxidativo de ruminantes.

Objetivos específicos

- Analisar a contagem de leucócitos nos animais desafiados com LPS ou não;
- Avaliar a temperatura dos animais desafiados ou não com LPS;
- Determinar a frequência respiratória e cardíaca dos animais desafiados com LPS ou não.

1 Revisão de literatura

1.1 Lipopolissacarídeos

Os lipopolissacarídeos são endotoxinas da parede celular de bactérias gram-negativas, responsáveis por sua organização e estabilidade e embora ele esteja firmemente ligado na parede celular bacteriana, ele é continuamente liberado no meio ambiente após seu crescimento, divisão, multiplicação ou lise (PETSCH & ANSPACH, 2000; ANDERSEN, 2003). O LPS é composto de uma porção hidrofílica, chamada de polissacarídeo O, que é covalentemente ligado a porção hidrofóbica, denominada lipídeo A, sendo esta a parte mais conservada da molécula e responsável pela sua toxicidade e estimulação do sistema imune (WYCKOFF et al., 1998; QUINN et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2007). O antígeno O por sua vez, é composto de uma sequência de oligossacarídeos idênticos (de 3 a 8 monossacarídeos cada), que são específicos de cada cepa bacteriana. Estes sequenciamentos são determinantes para a identificação sorológica da bactéria em questão (PETSCH e ANSPACH, 2000; GORBET e SEFTON, 2005; MAGALHÃES et al., 2007) e tanto a variabilidade no núcleo do LPS, quanto no antígeno O pode afetar significativamente a resposta imune, bem como o tipo da via de sinalização (JIANG et al., 2005; ZUGHAIER et al., 2005).

Sobretudo, cerca de 75% da superfície bacteriana é composta pelas endotoxinas, no caso da *Escherichia coli* (*E. coli*), uma única bactéria pode conter aproximadamente 2 milhões de moléculas de LPS (GORBET e SEFTON, 2005; MAGALHÃES et al., 2007). Não são conhecidas cepas bacterianas ou endotoxinas que não possuam o lipídeo A (ALEXANDER e RIETSCHEL, 2001; MAGALHÃES et al., 2007; RAETZ et al., 2007), exceto as espécies do gênero *Sphingomonas*, que são gram-negativas, porém não possuem a parte hidrofóbica da molécula (KAWAHARA et al., 1991). Deste modo, o sistema imunológico inato é capaz de detectar baixíssimas concentrações de LPS para desencadear a resposta celular (GIOANNINI et al., 2004). Para reconhecer os patógenos e distinguí-los necessita-se de componentes específicos, estruturalmente conservados, produzidos por um amplo grupo de micro-organismos potencialmente patogênicos. Estes componentes, que estão ausentes em organismos multicelulares, são popularmente chamados de PAMPs (padrão molecular associado ao patógeno) e são reconhecidos pelo hospedeiro, através de um grupo limitado de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (PASARE e MEDZHITOV, 2004). As principais células envolvidas neste processo são

os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (ADEREM, 2003; KAWAI e AKIRA, 2005).

1.2 Lipopolissacarídeos *versus* doenças

Quando ocorre uma inflamação ou dano tecidual em algum lugar do corpo, o animal responde fabricando novas proteínas e montando uma série de respostas que ajudam a protegê-lo como um todo. Essas respostas incluem o desenvolvimento de febre, neutrofilia, letargia e, eventualmente, emaciação muscular, bem como a produção de novas proteínas. São mediadas pelas citocinas próinflamatórias (interleucinas), TNF- α (fator de necrose tumoral- α), espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERONS) e, os metabólitos do ácido araquidônico, incluindo os leucotrienos e as prostaglandinas (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002). Sob a influência da IL-1 (interleucina-1) e TNF- α , as células hepáticas aumentam a síntese e secreção de proteínas. Sua resposta começa dentro de algumas horas de lesão e declina dentro de 24 a 48 horas. Como essa síntese associa-se com infecções e inflamações agudas, as proteínas, cujas concentrações se elevam muito rapidamente, são conhecidas como proteínas de fase aguda. Muitas delas funcionam na defesa do hospedeiro e são importantes componentes do sistema imune (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002). Um exemplo de proteína de fase aguda importante em ruminantes é a haptoglobina, que se conjuga a moléculas de ferro (Fe) e consequentemente as torna indisponíveis para bactérias invasoras. Dessa maneira, ela inibe a invasão e proliferação bacteriana (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002).

Os ruminantes estão em constante contato com endotoxinas, seja através da alimentação, do ar ou do meio ambiente, até mesmo os saudáveis, já que estas moléculas estão presentes no rúmen, no trato intestinal e nas fezes (SCHAUMBERGER & REISINGER, 2014). Ao entrar no organismo a bactéria defronta-se com fatores de defesa humorais e celulares. A ativação das células endoteliais pelo LPS é caracterizada por uma série de fatores, dentre eles o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS2), que ocasiona um aumento na produção de óxido nítrico (NO) (MORIKAWA et al., 2000), alterações bioquímicas e estruturais, que são iniciadas com a expressão de uma série de genes que estão envolvidos com a síntese de moléculas de adesão (BORREGO, 2009). Estas moléculas são essenciais para a formação do edema e do infiltrado celular massivo observado no choque séptico, elas promovem o recrutamento dos linfócitos,

neutrófilos, monócitos e outras células observadas em grandes áreas da microvasculatura (HUANG et al., 1995; LÓPEZ-BOJÓRQUES et al., 2004). Os fatores humorais compreendem o complemento, anticorpos e proteínas de fase aguda. Na resposta celular, particularmente as células mononucleares ([MNC] monócitos e macrófagos) e os neutrófilos são as células de maior importância, uma vez que elas podem reconhecer direta ou indiretamente constituintes da parede celular bacteriana após a sua ligação a fatores do complemento e anticorpos (VAN AMERSFOORT et al., 2003). Segundo Borrego (2009), estudos já realizados demonstram que as células dendríticas também respondem ao LPS. Interações entre células dendríticas e patógenos microbianos são fundamentais para a geração de uma resposta imune adaptativa. Uma vez estimuladas com bactérias ou componentes bacterianos como o LPS, as células dendríticas imaturas passam pelo processo de maturação que envolve a expressão de moléculas coestimulatórias, moléculas de CPH (complexo principal de histocompatibilidade) e produção de citocinas e quimiocinas que fornecem sinais para o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos (BORREGO, 2009). As células dendríticas são responsáveis por direcionar diferentes tipos de respostas de células T, incluindo geração de células T efetoras e de memória (CAROFF et al., 2002).

Como já supramencionado, em condições fisiológicas, as células do sistema imune são constantemente expostas a pequenas quantidades de LPS provenientes do ambiente ou do próprio organismo animal. Porém, quando o animal é submetido a deficiências energéticas ou desequilíbrios alimentares, a parede do rúmen ou intestino se torna mais permeável, o que permite que a molécula de LPS seja absorvida pela corrente sanguínea (SCHAUMBERGER; REISINGER, 2014). Além disso, enfermidades como mastite, metrite e endometrite, podem ser causadas por bactérias gram-negativas que liberam a endotoxina na corrente sanguínea, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (MCGAVIN & ZACHARY, 2009). Sendo assim, este LPS é reconhecido no organismo pelos macrófagos e é essencial para manter o nível de ativação basal do sistema imune (VAN AMERSFOORT et al., 2003). A bactéria pode ativar as duas vias do sistema complemento: componentes da superfície polissacarídica da *E. coli* (antígeno O, cápsula e LPS) que desencadeiam a via alternativa através da ligação do fator C3 do complemento (QUEZADO et al., 1994), ou o componente C1q liga-se ao lipídeo A e ativa a via clássica do sistema complemento (YING et al., 1993). Esta mesma via é também ativada na presença de anticorpos específicos (IgG e IgM) a constituintes das bactérias gram-negativas. Nos

três casos, o C3b é depositado na molécula ou superfície celular, que irá promover a fagocitose pelos macrófagos, neutrófilos e levar a inserção dos componentes C5-C9 (complexo de ataque à membrana, MAC) levando a lise da bactéria (DE BOER et al., 1993; HAENEY, 1998), chegando a um dos momentos em que o LPS é liberado (ANDERSEN, 2003). Entretanto, longas cadeias do antígeno O em bactérias gram-negativas ou uma espessa camada de peptidoglicanos em bactérias gram-positivas, podem conferir proteção da bactéria à lise mediada pelo sistema complemento (HAENEY, 1998). Além disso, os efeitos do LPS dependem da sua concentração no organismo, quando em níveis elevados pode ser capaz de induzir uma reação inespecífica como febre, aumento da frequência cardíaca e respiratória, redução da ingestão de matéria seca (IMS) e produção de leite (WALDRON et al., 2003) podendo levar ao choque séptico e morte do animal (SIQUEIRA & SCHMIDT, 2003).

Sabendo que quando agentes invasores adentram o organismo, temos quadros infecciosos e posteriormente inflamatórios, Thomson (1983) diz que, inflamação é a resposta vascular e celular dos tecidos vivos à agressão. Já Tizard (2002) relata que, inflamação é resposta dos tecidos à invasão de micro-organismos ou a uma lesão. É um mecanismo protetor vital, já que corresponde ao meio pelo qual as células fagocíticas e as moléculas de defesa, tais como os anticorpos e o complemento, ganham acesso aos locais de invasão microbiana ou de danos teciduais. As células fagocíticas, anticorpos e componentes do complemento são normalmente encontradas no sangue e devem emigrar para o interior dos tecidos para destruir os invasores nos locais de inflamação (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002). Ainda conforme Tizard (2002), a inflamação é classificada de acordo com a sua severidade e duração. Sendo a aguda o quadro recente de inflamação e a crônica o mais prolongado. A inflamação aguda pode se desenvolver em menos de uma hora após o dano tecidual. Em sua forma clássica, a inflamação aguda possui cinco sinais cardeais: calor, vermelhidão, inchaço, dor e perda de função. Em seguida da lesão, ocorre a constrição e logo após, a dilatação dos pequenos vasos sanguíneos na área danificada, o aumento do fluxo sanguíneo para os tecidos lesados, causando edema e inchaço (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002).

O primeiro passo da resposta inflamatória é a emigração dos neutrófilos e a aderência às paredes dos vasos sanguíneos pequenos. Esta ligação ocorre quando as moléculas de aderência são expressas pelas células endoteliais, tal expressão é desencadeada pelo LPS, ou por moléculas produzidas pelos tecidos danificados, tais

como trombina, histamina, fator de necrose tumoral- α TNF- α e IL-1. Essas moléculas fazem com que as células endoteliais expressem uma glicoproteína chamada de selectina P (CD62P). A selectina P pode se ligar às cadeias laterais dos carboidratos em uma proteína de superfície presente nos neutrófilos denominada selectina L (CD62L). Como resultado, os neutrófilos não ligam-se firmemente, mas movem-se gradualmente quase sem velocidade, rolando ao longo das superfícies das células endoteliais perdendo velocidade até parar por completo (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002). Um segundo estágio do aumento da adesão de leucócito-célula endotelial leva várias horas para se desenvolver e é mediado por citocinas. Consequentemente, as células ativadas pela IL-1 ou TNF- α expressam a selectina E (CD62E), que potencializa ainda mais a adesividade dos neutrófilos. A IL-1 também induz à produção da proteína IL-8, a partir das células endoteliais que, por sua vez, atrai mais neutrófilos para a área e o TNF- α estimula as células endoteliais a secretar IL-1. Além disso, promove a vasodilatação, atividade de procoagulantes e trombose e, aumenta a expressão das proteínas de aderência celular e a produção das moléculas quimiotáticas (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002).

Desta maneira, além dos macrófagos, a LBP (proteína ligante ao LPS) é uma das primeiras moléculas a reconhecerem o LPS no organismo. Ela é uma proteína de fase aguda presente no soro e é induzida pela IL-1 e IL-6 (DENTENER et al., 2000) e pode ser produzida no fígado, pulmões, rins ou coração. Os níveis constitutivos da LBP no soro são baixos (1 a 15 $\mu\text{g/ml}$), mas aumentam de 10 a 50 vezes durante a infecção. O mecanismo básico de reconhecimento ocorre quando a LBP liga-se com alta afinidade ao lipídeo A, facilitando o processo de monomerização do LPS e consequente apresentação aos receptores celulares. A LBP catalisa a transferência do LPS ao receptor CD14, aumentando assim a ativação de monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (PMN) (VAN AMERSFOORT et al., 2003; ZWEIGNER et al., 2006). Através da evolução, o sistema imune dos eucariontes tem reconhecido o LPS como um PAMPs, ou seja, uma estrutura constitutiva e conservada da bactéria (MEDZHITOV, 2001). A família de receptores do tipo Toll é um bom exemplo de PRRs, sendo o TLR4, primeiramente descrito como *locus* LPS, um importante gene que regula a resistência inata à infecção e a resposta do hospedeiro a endotoxina. Ele é identificado como um importante componente do sinal de transdução iniciado pelo LPS na célula (JAULT, PICHON, CHLUBA, 2004) em associação a proteína MD-2 (proteína de diferenciação mielóide 2, também conhecido como Ly96), que é uma

glicoproteína que está fisicamente na região extracelular do TLR4 na superfície da célula (MIYAKE, 2003; VISINTIN et al., 2006). O sistema imune inato dos mamíferos utiliza vários PRRs que são expressos constitutivamente na superfície celular em compartimentos intracelulares ou secretados na corrente sanguínea e em fluidos teciduais (BORREGO, 2009). As principais funções destes receptores incluem a opsonização, a ativação do sistema complemento e da cascata de coagulação, fagocitose, mecanismos microbicidas como a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERONS) e de oxigênio, estímulo da produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, que recrutam e ativam outras células que regem o desenvolvimento da imunidade adaptativa (MEDZHITOV, 2001; UNDERHILL e OZINSKI, 2002; UNDERHILL, 2003). Os TLRs reconhecem um amplo espectro de ligantes incluindo lipídeos modificados (LPS e lipoproteínas de bactérias), proteínas e ácidos nucleicos (DNA [ácido desoxirribonucleico] e RNA [ácido ribonucleico] dupla fita) (UNDERHILL, 2003; ELSON et al., 2007) e ativam uma via de sinalização comum que culmina na ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) (QURESHI & MEDZHITOV, 2003; TRINCHIERI e SHER, 2007). Os TLRs através do seu domínio TIR (Toll/Interleucina-1R), conseguem interagir com proteínas adaptadoras como o MyD88 (gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88), TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio TIR, também conhecida como Mal, que é semelhante ao MyD88), TRIF (domínio adaptador contendo TIR indutor de INF- β), TRAM (molécula adaptadora relacionada ao TRIF) e algumas serina/treonina quinases, as IRAKs (quinase associada ao receptor da IL-1). Estas moléculas adaptadoras são capazes de recrutar quinases e substratos para os complexos receptores induzindo a sinalização intracelular causando a ativação do NF- $\kappa\beta$, levando a alterações na expressão gênica, tais como a regulação positiva da expressão de moléculas coestimulatórias de superfície e a secreção de citocinas, como a IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α (MEDZHITOV et al., 1998; THOMAS et al., 2006; GEROLD et al., 2007). De fato, pequenas quantidades de LPS, ou mais propriamente do lipídio A, são detectadas pelo TLR4 e são capazes de induzir os macrófagos a sintetizarem potentes mediadores inflamatórios (RAETZ et al., 2007). Uma vez o LPS liberado da bactéria, este apresenta-se sob forma de agregados devido à estrutura anfifílica de sua molécula. A difusão espontânea de monômeros de LPS destes agregados para o CD14 (receptor celular de alta afinidade para o LPS) ocorre em uma razão muito baixa (HAILMAN et al., 1994). O receptor CD14 é uma glicoproteína, expressa

principalmente em monócitos, macrófagos e granulócitos. Encontra-se presente em duas formas: na membrana plasmática (mCD14) via uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), e na forma solúvel (sCD14) no sangue e fluidos (LU et al., 2008). O mCD14 não apresenta domínio de sinalização intracelular, necessitando assim de moléculas coreceptoras, como o TLR4, para a ativação celular induzida pelo LPS (VIVES-PI et al., 2003; JIANG et al., 2005). Duas funções opostas são atribuídas ao sCD14, ele pode reduzir a atividade induzida pela endotoxina através da competição com o LPS pelo mCD14 e também aumentar a resposta ao LPS em células que não apresentam o receptor em sua superfície, como as células endoteliais, epiteliais e da musculatura lisa (BAS et al., 2004; DAUPHINEE e KARSAN, 2006). A afinidade do CD14 na ligação com fosfolípedeos aniônicos como a fosfatidilserina tem a função de reconhecer e fagocitar células apoptóticas por macrófagos que o expressam em sua superfície (GREGORY & DEVITT, 1999; MIYAKE, 2003). Na luta constante entre bactérias e o sistema imunológico, os patógenos modificam algumas das características conservadas de seus PAMPs. As modificações do LPS incluem a conjugação do grupo fosfato do lipídeo A (GUNN et al., 1998), que diminui a sensibilidade contra peptídeos antimicrobianos catiônicos, bem como o reconhecimento pela LBP, receptores CD14 e MD-2 (BORREGO, 2009).

Sequencialmente, conforme Thomson (1983) e Tizard (2002), o segundo momento da inflamação é dado pela chegada dos monócitos, varias horas após os neutrófilos terem atingido o foco inflamatório, é então que se inicia uma inflamação crônica. Os monócitos são atraídos pelas mesmas moléculas que atraem os neutrófilos: pelo colágeno, elastina e a fibronectina que quebram os produtos e pelas quimiocinas CC. Uma vez tendo atingido os tecidos, os monócitos são ativados e não somente eliminarão quaisquer bactérias invasoras, como também fagocitarão e destruirão as células e os tecidos danificados, incluindo os neutrófilos e os depósitos de fibrina. Ao liberarem IL-1, os macrófagos atraem e ativam os fibroblastos e estimulam a síntese de colágeno exigido no reparo de qualquer dano tecidual. O colágeno é depositado por toda a lesão e é gradualmente remodelado por várias semanas ou meses à medida que a área retorna ao normal. Além disso, a redução da pressão de oxigênio no meio de um ferimento estimula os macrófagos a secretarem as moléculas que promovem o crescimento de novos vasos sanguíneos. Uma vez que o nível de oxigênio seja restaurado ao normal, cessa-se a formação de novos vasos sanguíneos (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002). O resultado final do processo de

cicatrização depende de uma grande efetividade da resposta anti-inflamatória. Se a causa for rápida e completamente removida, a cicatrização prosseguirá rotineiramente. No entanto, se o material ou micro-organismos ofensores não puderem ser destruídos, o processo inflamatório pode persistir. Logo, a inflamação crônica resulta da presença de bactérias, fungos, parasitas ou de material inorgânico (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002). Portanto, as infecções bacterianas por gram-negativas tornam os animais severamente deprimidos e febris. As infecções mais severas causam acidose, febre, hipotensão, liberação de lactato nos tecidos, elevação das catecolaminas plasmáticas, coagulação intravascular disseminadas, trombose capilar e lesões renais, hepáticas e pulmonares, resultando em insuficiência orgânica múltipla (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002). E todos esses fatores podem acabar promovendo um *status* oxidativo nos animais afetados por alguma dessas doenças.

1.3 Estresse oxidativo

Em um sistema de produção de ruminantes, é de fundamental o conhecimento do comportamento normal dos animais em suas diferentes categorias. Para tanto, se faz necessário compreender como se dão às distintas interações dos animais no ambiente onde são criados, pois isso evitará situações negativas que podem resultar em estresse e prejuízos econômicos. O estresse é um efeito ambiental sobre os indivíduos e que impõe uma sobrecarga em seu sistema de controle (homeostase), reduzindo sua capacidade de ajuste frente ao ambiente hostil (BROOM & JOHNSON, 1993). De forma similar ao verificado em outras espécies não domesticadas e criadas em cativeiro pelo homem, os ruminantes também passam a exibir comportamentos incomuns em decorrência da presença de fatores que promovam estresse, principalmente quando associados a erros alimentares. Portanto, assim como os demais animais, os ruminantes exigem um conjunto de fatores ambientais que promovam o seu bem-estar e a falta ou a provisão deficiente de um ou mais dos recursos necessários ao bem-estar desses animais é que dará origem aos diversos transtornos comportamentais verificados neles. Segundo Fraser et al (1997) o bem-estar animal pode ser caracterizado quando o desempenho dos animais for compatível com o propósito deles, quando se sentirem bem e quando viverem em ambiente adequado.

O conceito de estresse foi esboçado na década de 30 (SELYE, 1936) e descrito como um conjunto de reações do organismo comum a diferentes estímulos

agressores, um método de alerta do organismo frente a possíveis ameaças. E, independente da natureza do estímulo agressor, algumas reações permaneciam consistentes, como: taquicardia, hiperglicemia, vasoconstrição visceral e periférica e vasodilatação muscular. Essas repostas foram interpretadas como adaptações evolutivas que permitiram aos animais reconhecer e reagir adequadamente a situações de perigo e assim garantir sua sobrevivência. Muitos anos depois, o termo “estresse” ainda é frequentemente utilizado nos mais diferentes campos da ciência, porém sem uma versão unânime.

A definição de Moberg (2000) é semelhante à de Selye (1936): “uma resposta biológica desencadeada pelo próprio organismo quando este reconhece alguma perturbação (por exemplo, temperaturas extremas, presença de predadores, doenças, traumas, parição e outros) que ameaça a sua homeostase”. Moberg (2000) ainda diferencia os termos estresse e distress, em que o primeiro seria o conjunto de respostas benéficas do estresse, aquelas cuja função é realmente de alerta; já distress é o estado no qual o estresse causa consequências negativas para o organismo, comumente associadas às formas crônicas de estresse. Embora a reação incitada seja semelhante para os diferentes agentes estressores, segundo Carroll & Forsberg (2007) pode-se classificar esses agentes em três categorias no estudo de animais de produção: estresse psicológico: pelo contato com novos animais, mudança para novo ambiente; estresse fisiológico: devido alterações endócrinas e neuroendócrinas por alguma condição, como restrição alimentar ou disfunções glandulares e; estresse físico: por traumas mecânicos, estresse térmico, cansaço.

No estudo de vacas leiteiras, portanto, se justifica a caracterização do período de transição como um momento estressante, pois, em rotinas de fazendas comerciais, elas enfrentam todos os três tipos de agentes estressores (CARROLL & FORSBERG, 2007). A rotina dos ruminantes proporciona em muitos momentos manejos que poderão resultar em estresse. Apesar de possuírem capacidade de se adaptarem às diferentes condições a que são submetidos, os animais podem aumentar o cortisol sérico, predispondo um *status* de estresse, que em muitos casos se apresenta da maneira oxidativa (RAPOSO, 2014). O estresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, que resulta na indução de danos às biomoléculas pelos EROS (DAMASCENO et al., 2002) e ERONS (BARREIROS & DAVID, 2006). Também é caracterizado pelos processos de produção e remoção de radicais livre pelos sistemas de defesa antioxidante (SIES,

1991) ou definido como alterações no equilíbrio entre pró-oxidante e antioxidantes a favor da formação de lesões (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2003). Em organismos aeróbicos, são de suma importância para a homeostase entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Como se sabe, o oxigênio é uma molécula estável que atua nos organismos aceitando elétrons e se reduz em água durante a respiração mitocondrial. Porém, ao longo do procedimento de redução, o oxigênio pode receber apenas um elétron, ao contrário de dois e produzir radicais de oxigênio, que podem causar injúrias às células (NOGUEIRA, 2004) e estas substâncias são produzidas endogenamente como resultado direto deste metabolismo (ROSS, 1991). As EROS podem provocar injúrias teciduais (KINNULA et al., 1995), que em altas concentrações, danificam organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (VALKO et al., 2007). Sendo assim, sabemos que o oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR & ERZURUM, 2002).

O dano ou estresse oxidativo tem sido classificado em três categorias: o leve, quando os tecidos são constantemente expostos; o moderado, ocasionado pelo aumento do estresse de fontes externas, como a radiação, podendo levar a danos no DNA, fazendo muito necessária sua prevenção e; o intenso, que é fruto de um dano permanente (FLOYD, 1997). Sendo assim, as EROS demonstram funções variadas no organismo, podendo desnaturar proteínas e peroxidar lipídeos. Semelhantes às EROS, que são constantemente geradas na respiração celular, os ERONS são geradas ao final do metabolismo de aminoácidos. As principais ERONS incluem o óxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos ($\text{NO}_2^\cdot$), nitratos ($\text{NO}_3^\cdot$) e peroxinitritos ($\text{ONOO}^\cdot$) (BARREIROS & DAVID, 2006). Portanto, para impedir o avanço das lesões decorrentes do estresse oxidativo, se necessita de antioxidantes. Um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas de um substrato oxidável, atrasa ou evita a oxidação deste substrato (DE ZWART et al., 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O sistema antioxidante possui dois sistemas para remover as EROS e ERONS, o enzimático ou não enzimático. O primeiro, atua como detoxificador do agente antes que ele cause lesão e é composto pela superóxido dismutase, catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px), proteínas ligantes de metais e proteínas que protegem biomoléculas contra injúrias de outros mecanismos. Já o sistema não enzimático repara a lesão ocorrida e é formado pela vitamina E (α -tocoferol), vitamina

C, carotenoides, ácido ascórbico, glutathione redutase (GSH-Rd), entre outros. (GATE et al., 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; MATÉS & SANCHEZ-JIMENEZ, 1999). Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (ROSS, 1991; HEBBEL, 1986). O superóxido e o peróxido de hidrogênio, liberados durante a respiração dos neutrófilos, causam danos teciduais e inflamação através da oxidação dos lipídeos da membrana celular. Como esses radicais livres são muito destrutivos, os tecidos devem proteger-se através da sua remoção. As catalases e as peroxidases removem os peróxidos, enquanto a superóxido dismutase, ceruloplasmina e íons de cobre livres removem o superóxido liberado pelos neutrófilos (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002). Os neutrófilos geralmente morrem durante uma resposta inflamatória, no entanto, se eles liberarem suas enzimas lisossomais, poderão causar dano tecidual severo (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002), mas isso normalmente não ocorre. Como os neutrófilos sofrem morte celular programada (apoptose), os seus lipídeos de superfície se alteram e os macrófagos reconhecem essas alterações. Como resultado, os neutrófilos em processo de morte são fagocitados intactos pelos macrófagos e é uma maneira eficiente de remoção de células indesejadas sem liberação de conteúdo celular tóxico (THOMSON, 1983; TIZARD, 2002).

Sobre a SOD, temos que é a primeira enzima na eliminação do ânion superóxido em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e O_2 (oxigênio), na presença do próton H^+ (íons de hidrogênio) (ROSS, 1991; ACHARYA et al., 1991). Ela possui duas apresentações: a isoforma CuZnSOD, ligada aos íons cobre (Cu) e zinco (Zn) e; a isoforma MnSOD, ligada ao íon manganês (Mn). A CuZnSOD está no citoplasma das células e a MnSOD nas mitocôndrias e ambas possuem a mesma função, converter O_2 em H_2O_2 (NOGUEIRA, 2004). Durante o processo hemolítico decorrente de agressão térmica, os glóbulos vermelhos humanos (HATHERILL; TILL; WARD, 1991) e bovinos (BARTOSZ et al., 1978) exibem queda da atividade SOD. A adição desta enzima também protege o DNA de lesões provocadas pela sobrecarga de Fe (ARUOMA et al., 1989). E para finalizar, temos o grupo dos tióis que é formado pelas glutathionas. Os conteúdos tiólicos são capazes de eliminar os radicais livres, porém isso resulta em uma energia muito alta, sugerindo que ele pode promover a oxidação (BUETTNER, 1993). No entanto, como no ascorbato, o estado reduzido de ácido tiótico, ácido di-hidrolipóico e cisteína (BAST, 1988) podem ser pró-oxidativos, devido

ao seu forte potencial redutor e, sendo assim, sua capacidade de estimular a oxidação catalisada por metais (DECKER et al., 2010).

2 Artigo 1

ENZIMAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS DESAFIO COM ENDOTOXINA EXÓGÉNA

Luísa Inácio Lourensi, Joao Alveiro Alvarado Rincón, Andressa Stein Maffi, Antônio
Amaral Barbosa, Jenifer Vahl, Francisco Augusto Burkert Del Pino

O artigo será submetido à revista Agricultural Research in the Tropics

Enzimas relacionadas ao estresse oxidativo após desafio com endotoxina exógena

Enzymes related to oxidative stress after challenge with exogenous endotoxin

LOURENSI, L. I.^{1,7}; RINCÓN, J. A. A.²; MAFFI, A. S.³, BARBOSA, A. A.⁴; VAHL, J.⁵; DEL PINO, F. A. B.⁶.

^{1 e 5} Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, FAEM, UFPel, Pelotas, RS

^{2, 3 e 4} Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel, Pelotas, RS

⁶ Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária, UFPel, Pelotas, RS

⁷ Bolsista do CNPq

*e-mail: luisalourensi@gmail.com

Resumo

O objetivo foi verificar a produção sérica de algumas enzimas envolvidas no estresse oxidativo, através da mimetização de uma inflamação experimental provocada por duas infusões de lipopolissacarídeo (LPS). Foram acompanhadas 16 novilhas corte, com 14 meses de idade, pesando aproximadamente 330kg, clinicamente saudáveis, manejadas em sistema intensivo e com livre acesso a água. O grupo LPS (n=8) recebeu 2 aplicações via intravenosa (i.v) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich Missouri, EUA) diluídas em 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl), com intervalo de 24 horas. Já o grupo controle (n=8) recebeu as mesmas aplicações e dosagens de solução salina (0,9% de NaCl) via i.v, com o mesmo intervalo. As coletas de sangue foram realizadas através do complexo arteriovenoso da coccígea com a utilização de sistema Vacutainer (BD Diagnostics, São Paulo, Brasil). A temperatura corporal do grupo LPS foi superior quatro horas após cada desafio ($P<0,05$). A contagem de leucócitos totais foi inferior no grupo LPS ($P<0,05$). A atividade de total-SH ($P=0,084$) e EROS ($P=0,050$) demonstraram tendência estatística. Verificou-se que, o desafio com duas aplicações de LPS com intervalo de 24 horas demonstrou alterações na produção séricas de totais-SH e EROS.

Palavras-chave: atividade enzimática, lipopolissacarídeo, níveis séricos, ruminantes.

Abstract

The objective of this study was to verify the serum production of enzymes involved in oxidative stress, by mimicking an experimental inflammation caused by two infusions of

lipopolysaccharide (LPS). Sixteen 14-month-old heifers, weighing approximately 330 kg, clinically healthy, managed in an intensive system and with free access to water. The LPS group (n= 8) received two intravenous applications (iv) containing 0.5 µg/kg body weight of LPS diluted in 2 mL of saline solution (0.9% NaCl), with an interval of 24 hours. The control group (n = 8) received the same applications and dosages of saline solution (0.9% NaCl) via i.v, with the same interval. Blood samples were collected through the coccygeal arteriovenous complex using the Vacutainer system. The body temperature of the LPS group was higher four hours after each challenge ($P < 0.05$). The total leukocyte count was lower in the LPS group ($P < 0.05$). The activity of total-SH ($P = 0.084$) and EROS ($P = 0.050$) showed a statistical trend. It was found that the challenge with two LPS applications with a 24 hour interval demonstrated changes in the serum production of total-SH and EROS.

Keywords: enzymatic activity; lipopolysaccharide; ruminants; serum levels.

Introdução

Os lipopolissacarídeos (LPS) são endotoxinas da parede celular de bactérias gram-negativas, responsáveis por sua organização e estabilidade e são continuamente liberados no meio ambiente após seu crescimento, divisão, multiplicação ou lise (Petsch e Anspach, 2000; Andersen, 2003). O LPS é composto de uma porção hidrofílica, chamada de polissacarídeo O, que é covalentemente ligado a porção hidrofóbica, denominada lipídeo A, sendo esta a parte mais conservada da molécula e responsável pela sua toxicidade e estimulação do sistema imune (Wyckoff *et al.*, 1998; Quinn *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2007). O antígeno O por sua vez, é composto de uma sequência de oligossacarídeos idênticos, que são específicos de cada cepa bacteriana. Estes sequenciamentos são determinantes para a identificação sorológica da bactéria em questão (Petsch e Anspach, 2000; Gorbet e Sefton, 2005; Magalhães *et al.*, 2007) e tanto a variabilidade no núcleo do LPS, quanto no antígeno O podem afetar significativamente a resposta imune, bem como o tipo da via de sinalização (Jiang *et al.*, 2005; Zughaier *et al.*, 2005).

No entanto, os ruminantes estão em contante contato com endotoxinas, seja através da alimentação, do ar ou do meio ambiente, até mesmo os saudáveis, já que estas

moléculas estão presentes no rúmen, no trato intestinal e nas fezes (Schaumberger e Reisinger, 2014). Conforme Schaumberger e Reisinger (2014), quando o animal é submetido a deficiências energéticas ou desequilíbrios alimentares, a parede do rúmen ou intestino se torna mais permeável, o que permite que essa molécula seja absorvida pela corrente sanguínea (Schaumberger e Reisinger, 2014). Além disso, enfermidades como acidose, mastite, metrite e endometrite, podem ser causadas por bactérias gram-negativas, as quais o LPS está presente na membrana externa e, então tal endotoxina é liberada na corrente sanguínea promovendo produção de mediadores inflamatórios e proteínas de fase aguda, que atuam diretamente sobre o metabolismo animal (Gozho *et al.*, 2005; McGavin e Zachary, 2009). Os efeitos do LPS dependem da sua concentração no organismo, quando em níveis elevados pode ser capaz de induzir uma reação inespecífica como febre, aumento de frequência cardíaca e respiratória, redução da ingestão de matéria seca e produção de leite (Waldron *et al.*, 2003) podendo levar ao choque séptico e morte do animal (Siqueira e Schmidt, 2003).

Sendo assim, resolvemos realizar o presente estudo, visto a confirmação do contato dos animais com o LPS no dia a dia e suas consequências, para verificar a se há relação da endotoxina com a produção das enzimas envolvidas no estresse oxidativo. Os marcadores selecionados foram: totais-SH (grupamentos tiólicos), EROS (espécies reativas de oxigênio), nitritos e SOD (superóxido desmutase). Desta forma, buscou-se analisar a nível sérico o efeito do desafio com LPS na produção de enzimas envolvidas no estresse oxidativo de ruminantes.

Material e Métodos

O estudo avaliou o efeito a curto prazo do desafio com LPS sobre metabolismo e suas possíveis consequências a nível sérico sobre a produção de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo. O modelo experimental escolhido foram novilhas, pois estas tiveram menos exposição ao LPS durante sua vida, quando comparada a uma vaca multípara e também pela possibilidade de coleta dos tecidos *post mortem*. A dose utilizada se baseou em um estudo prévio realizado por (Waldron *et al.* 2003) e um teste piloto que realizamos. Foram utilizadas 16 novilhas de corte de raça europeia (Hereford/Angus), com em torno de 14 meses de idade, pesando aproximadamente 330kg, clinicamente saudáveis, manejadas em sistema intensivo, com livre acesso a água. Os animais permaneceram

alocados em um galpão coberto, com aberturas laterais, ficando divididos por baias, em um total de 8 animais/baia. No período do estudo, que durou do dia -14 (para fins de adaptação) até os dia 5 (refereindo-se como dia zero [D0] quando foi realizada a primeira aplicação de LPS), os animais receberam uma dieta *total mixed* a base de silagem de milho, milho moído e suplemento mineral, contendo 60 % de matéria seca, 65 % de NDT, 26,8% de FDN e 12,6% de proteína bruta. Optou-se pela utilização de uma dieta com uma proporção de 60% volumoso e 40% concentrado para evitar quadros de acidose e alterações nos resultados (NRC 1996). O grupo LPS (n=8) recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich Missouri, EUA) via intravenosa (i. v.), com intervalo de 24 horas e, o grupo controle (n=8) que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com o mesmo intervalo de tempo. Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil (Protocolo 9364).

Tabela 1. Composição química da dieta total de novilhas submetidas ou não ao desafio com LPS.

Nutrientes	% MS
FDA ¹	25,74
FDN ²	44,70
Lignina	4,40
PB ³	10,26
PD ⁴	9,57
EE ⁵	5,35
CINZAS	3,82
Cálcio	0,22
Fósforo	0,27

¹Fibra em detergente ácido; ²Fibra em detergente Neutro; ³Proteína bruta; ⁴Proteína disponível; ⁵Extrato etéreo

Avaliações clínicas

Para a realização do exame clínico os animais foram contidos em um brete e foram realizadas as avaliações de temperatura retal, frequência cardíaca (FC), frequência

respiratória (FR) e movimentos ruminais (MR). Nos dias das aplicações do LPS (D1 e D2) os animais foram avaliados antes do tratamento e 4 e 8 horas pós desafio. Nos demais dias, os animais foram avaliados 1 vez ao dia com intervalos de 24 horas. A temperatura dos animais foi registrada a cada 30 minutos durante todo o período experimental, considerando a hora 0 como o momento da primeira aplicação de LPS, assim, a segunda aplicação foi realizada na hora 24. Para isso, foi utilizado termômetro Data Logger (Ibutton, Thermochron, Whitewater, USA). Além disso, fez-se a avaliação da temperatura nas horas 0, 4 e 8 dos dias D1 e D2 através de termômetro digital.

Coletas de sangue

As coletas de sangue foram realizadas através do complexo arteriovenoso da coccígea com a utilização de sistema Vacutainer (BD Diagnostics, São Paulo, Brasil). As coletas foram realizadas concomitantemente às avaliações clínicas e, após a coleta, os tubos foram centrifugados e o soro foi armazenado em eppendorfs para análises futuras.

Análises bioquímicas

A produção de EROS foi avaliada de acordo com Ali *et al.* (1992) com pequenas alterações. A oxidação de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) em 2', 7'-diclorofluoresceína fluorescente (DCF) foi medida para detectar a produção de EROS. A emissão de intensidade de fluorescência DCF foi registrada nos comprimentos de onda de excitação de 525 e 488 nm 30 minutos após a adição de DCFH-DA ao meio contendo a amostra. EROS foi expresso em $\mu\text{mol DCF/mg}$ de proteína. Os níveis de nitrito foram medidos segundo o método de Stuehr e Nathan (1989). As amostras foram incubadas com 1% de sulfanilamida e 0,3% de dicloridrato de N-1-naftiletilenodiamina. O nitrito de sódio foi usado como padrão e os resultados foram expressos em nitrito $\mu\text{M/mg}$ de proteína.

Para a quantificação total do teor de sulfidrilas, o soro foi adicionado ao tampão salino tamponado com fosfato (pH 7,4) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A reação foi iniciada pela adição de 5,50-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico). A redução do DTNB (reagente de Ellman) pelos tióis devido à oxidação (dissulfeto) gerou uma derivada amarela (ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (TNB) que foi medida à 412 nm. Os resultados foram reportados como nmol TNB/mg de proteína. A atividade do SOD

baseou-se na inibição da auto-oxidação da adrenalina dependente de superóxido ao adenocromo. A atividade da SOD foi medida de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972) e foi relatada como U/mg de proteína.

Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando ANOVA de Medidas Repetidas no software NCSS 2004 (NCSS Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah) e se considerou como diferença estatística valores de $P < 0,05$ e tendência $P < 0,1$.

Resultados

Os animais desafiados (LPS) apresentaram uma contagem de leucócitos totais inferior ao grupo controle (LPS: $12884,64 \pm 1129,17$; controle: $17029,54 \pm 1129,17$; $P = 0,02$). Além disso, ao avaliar a proporção de leucócitos totais no decorrer das horas após as infusões de LPS (Fig. 1), observou-se a redução leucométrica na hora quatro ($P = 0,00005$) nos animais desafiados. O grupo LPS apresentou FC aumentada durante todo o período quando comparado com o grupo controle (Fig. 2). Não houve diferença na frequência FR entre grupos (Figura 3). A temperatura retal dos animais desafiados com LPS foi maior ($P < 0,05$) 4 horas após cada um dos desafios (Fig. 4), caracterizando a resposta sistêmica. Além disso, a atividade sérica de total-SH ($P = 0,084$) e EROS ($P = 0,050$) demonstraram tendência estatística, já os níveis séricos de nitritos ($P < 0,053$) e SOD ($P = 0,089$) não demonstraram diferença estatística (Fig. 5).

Figura 1. Níveis séricos de leucócitos em novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) às zero e 24 horas

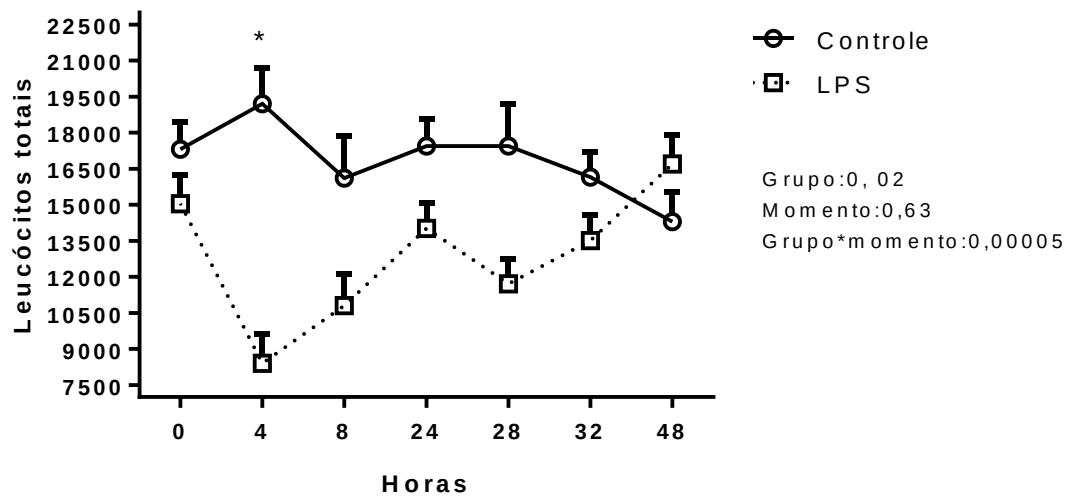
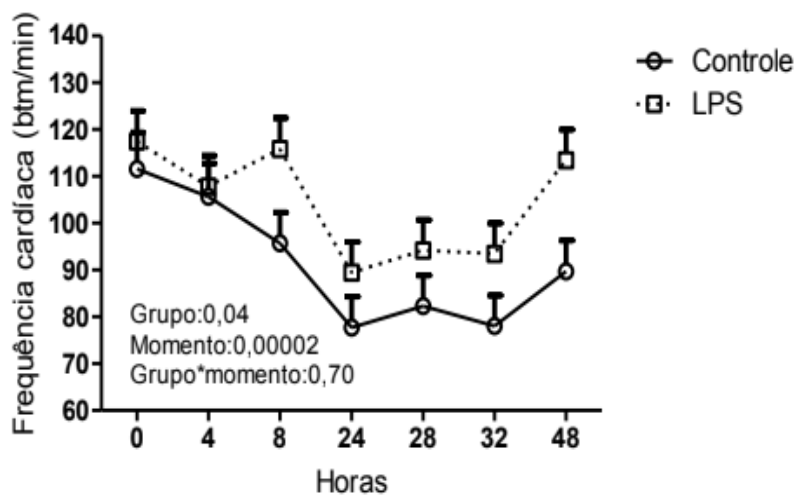
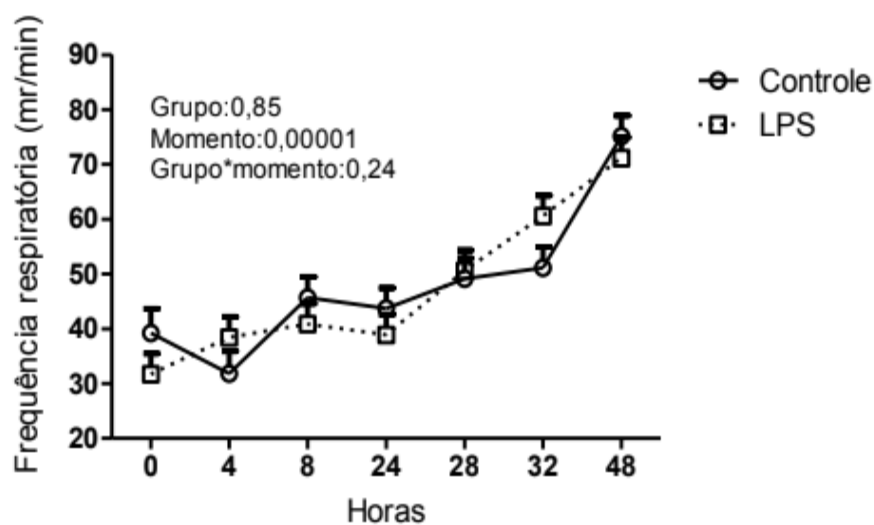


Figura 2. Frequência cardíaca de novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) às zero e 24 horas

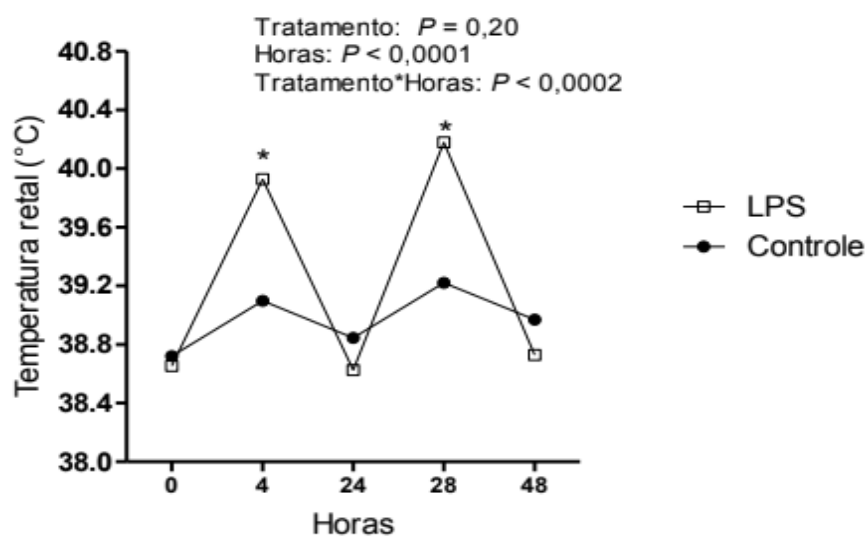


180 Figura 3. Frequência respiratória de novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo
 181 (LPS) às zero e 24 horas



182

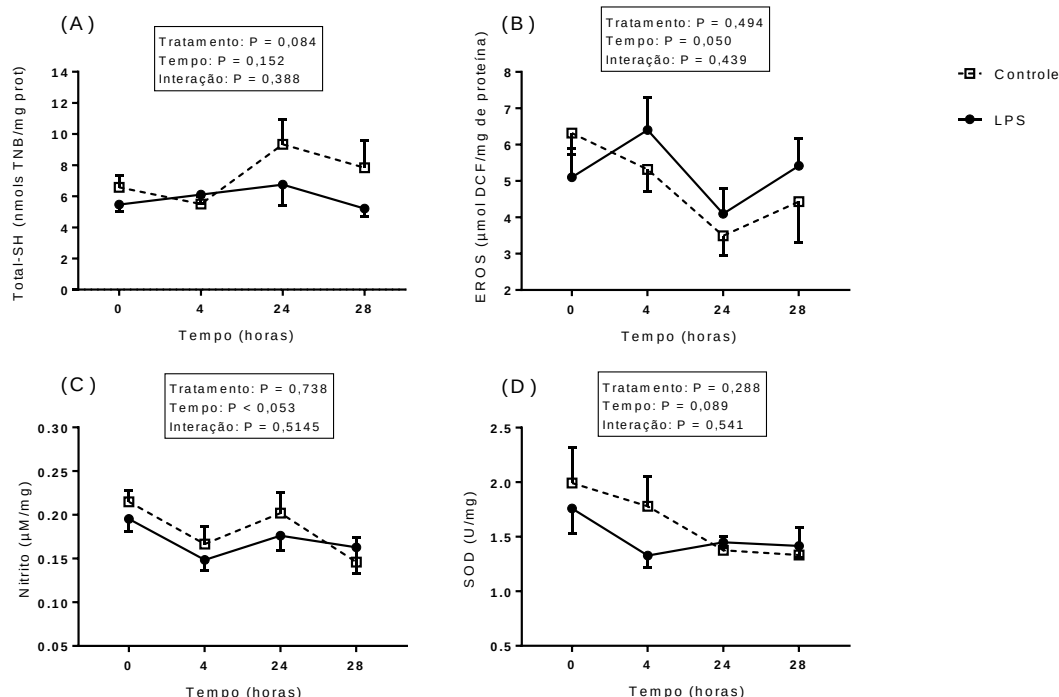
183 Figura 4. Temperatura retal de novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo (LPS)
 184 às zero e 24 horas



185

186

Figura 5. Níveis séricos de grupamentos tiólicos (A), espécies reativas de oxigênio (B), nitritos (C) e superóxido desmutase (D) em novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) às zero e 24 horas



Discussão

Neste estudo, mimetizamos uma inflamação através da aplicação de duas doses de LPS, onde buscamos avaliar os níveis de leucócitos, a frequência cardíaca, a frequência respiratória, a temperatura, bem como a produção de enzimas ligadas ao estresse oxidativo. Ao analisar as concentrações de leucócitos totais ao longo das horas após as infusões dos desafios, notamos a redução da proporção leucométrica na hora quatro nos animais do grupo LPS (Fig. 1). Avaliando os efeitos nos subgrupos leucocitários, Diez-Fraile *et al.* (2003) concluíram que existe uma diminuição sérica das células polimorfonucleadas (PMN) em vacas leiteiras devido alterações nas moléculas de adesão (L-selectina e $\beta 2$ -integrinas). Além disto, Periasamy *et al.* (2018) notaram haver apoptose de neutrófilos bovinos entre as três e seis horas após as infusões de LPS, sendo consequência da disfunção mitocondrial. Naime (2014) em um estudo realizado com ratos desafiados com LPS, notou-se aumento de 75% na contagem de leucócitos totais nos animais que receberam a endotoxina. Em um experimento realizado com coelhos por Peñailillo *et al.* (2016), cuja administração de LPS também foi via intravenosa, na hora

quatro houve diminuição de linfócitos, em consequência do sequestro rápido dos mesmos pelas células responsivas à invasões. Desta forma, também observou-se alterações de menor intensidade nas horas subsequentes à segunda aplicação, sugerindo o desenvolvimento de tolerância ao LPS. Um padrão semelhante pode ser observado no presente estudo, onde a redução nos níveis de leucócitos totais foi mais marcada após a primeira aplicação, demonstrando claramente uma resposta inerente à infusão de LPS, havendo um retorno gradual aos níveis iniciais, porém somente equilibrando-se novamente após 48 horas do desafio. Isso indica o potencial imunossupressor do LPS (mesmo que de forma artificial/induzida) no organismo animal. Assim, pressupõe-se um maior impacto na contagem de leucócitos totais em situações de infecções mais agudas e/ou prolongadas.

Os resultados clínicos e hematológicos, acima descritos, comprovam que a simulação com doses baixas de LPS simularam de forma efetiva uma inflamação sistêmica com mesma etiologia, quando comparadas às reações fisiologicamente apresentadas por animais sob as mesmas circunstâncias em situações patológicas espontâneas. Perante os resultados de temperatura corporal observamos que as dosagens de LPS utilizadas foram suficientes para gerar uma resposta imunológica sistêmica nos animais, visto que houve aumento da temperatura na hora quatro após cada aplicação do desafio, como demonstrado em outras pesquisas que fizeram uso do LPS para simulação de uma inflamação, no entanto com diferentes dosagens (Campos *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2019). Nos momentos referidos anteriormente, quatro horas após cada desafio, a temperatura do grupo desafiado indicando quadro febril, sendo maior que 39,6°C (Zebeli *et al.*, 2013). Todavia, comparado ao início experimental (D0) a temperatura do grupo controle também se elevou, demonstrando estresse desses animais, possivelmente pelo manejo. Contudo, a temperatura média mais alta do grupo controle não passou dos 39,5°C, estando ainda dentro dos valores fisiológicos, enquanto que a do grupo LPS foi de 40,4°C, indicando febre elevada. A contraponto disto, o grupo LPS indicou maior temperatura após a aplicação do segundo desafio, o que sugere desenvolvimento de sensibilização ao LPS, oriunda da presença de pequenas dosagens da molécula devido a aplicação do desafio anterior, ocasionando uma resposta mais intensa, de acordo com o que é relatado por Fernandes *et al.* (2016).

Os resultados apresentados referentes a produção de grupamentos tiólicos aumentaram após a hora 24 nos dois grupos avaliados, tendo decréscimo na hora 28 em ambos tratamentos. Os compostos tiólicos são antioxidantes que contêm em sua estrutura o grupamento-SH (Fernandes, 2012). Esses compostos estão envolvidos no sequestro de radicais livres e são capazes de quelar íons metálicos danosos, desempenhando assim um papel crucial na defesa antioxidante dos eritrócitos e no plasma (Wlodek *et al.*, 2010). A dosagem dos grupamentos tiólicos totais são usadas como parâmetro de medida de dano oxidativo as proteínas plasmáticas. Os tióis, como também são chamados, estão presentes no plasma em substâncias de baixo peso molecular, tais como cisteína e glutathione e, como resíduo de proteínas maiores, como a albumina. Em geral, 80% dos tióis livres do plasma estão contidos na albumina (RADI *et al.*, 1991). Sendo assim, acreditamos que se nosso período experimental fosse mais longo, os resultados da produção de grupamentos tiólicos seriam mais expressivos, visto que com apenas duas aplicações as suas concentrações séricas demonstraram que houve atividade antioxidante dos compostos tiólicos.

Conforme os resultados obtidos para as concentrações de EROS, observamos que o grupo desafiado demonstrou elevação dos níveis de EROS na hora 4 após o desafio, tendo decréscimo na hora 24 e posterior aumento na hora 28. Enquanto que o grupo controle apresentou queda na hora quatro, que se manteve até a hora 24, subindo apenas na hora 28. Conforme alguns autores relatam (Bianchi e Antunes, 1999; Shami e Moreira, 2004), a produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culmina no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes. O sistema de defesa antioxidante tem o objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem, culminados em danos sistêmicos irreparáveis (Barbosa *et al.*, 2010). As EROS manifestam-se no organismo quando o mesmo está sob invasão de agentes infecciosos ou sob condições estressantes. Sendo assim, de acordo com os resultados apresentados sugerimos que os animais estavam previamente estressados, talvez por sua reatividade ou por estarem alocados em baias coletivas, onde poderiam encontrar-se mais de um líder. Para Barbosa *et al.* (2010), a geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções

biológicas relevantes. A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção destes (Barbosa *et al.*, 2010). Que segundo Halliwell e Whiteman (2004), tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, sobretudo, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma (Barbosa *et al.*, 2010). Entretanto, eleva-se o papel benéfico da produção de EROS, sendo que inicialmente os resultados já demonstravam sua produção, havendo aumento no caso do grupo LPS quatro horas após cada aplicação do desafio, ou seja, na hora quatro e na hora 28. Demonstrando que a atividade maior se deu quase que imediatamente ao reconhecimento de micro-organismos invasores no sangue, porém logo em seguida obteve-se um decréscimo nos níveis de EROS. O que nos leva a acreditar que foi devido a captação das EROS pelas células responsivas a inflamação, conforme o que foi relatado por Peñailillo *et al.* (2016), quando desafiaram coelhos com LPS e observaram diminuição leucocitária devido ao mesmo mecanismo.

Os resultados ilustrados para nitritos não obtiveram diferença estatística, sendo um bom resultado, já que quando em concentrações maiores que os antioxidantes provocam dano oxidativo, devido a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERONS). Bouchard *et al.* (1999), avaliando vacas com mastite induzida experimentalmente observaram que a infusão intramamária de LPS foi associada a um aumento acentuado na concentração de nitritos no leite. Os resultados para SOD também não demonstraram significância estatística. Ambos os grupos iniciaram com atividade alta de SOD, porém ao longo do período experimental esta apenas diminuiu. Zhao e Lacasse (2008) relataram que estudos *in vitro* e *in vivo* sugeriram o uso da SOD para diminuir a quantidade de radicais livres no citosol, auxiliando no alívio dos danos às células secretoras e reduzindo a perda na produção de leite. Usamos os biomarcadores sanguíneos para refletir os danos causados pelas EROS e a eficiência das defesas antioxidantes do organismo (Fernandes, 2012). A SOD é um das enzimas da defesa antioxidante e constitui a primeira defesa endógena na neutralização das EROS (Halliwell e Gutteridge, 2015). Nossos resultados, em ambos os grupos, apresentaram

níveis altos antes do primeiro desafio e que continuaram em decréscimo, mesmo após o segundo desafio. Lunardelli (2013) identificou em camundongos desafiados com LPS, aumento da produção sérica de SOD no grupo desafiado em relação ao controle. Para Galley (2011) vários sistemas antioxidantes endógenos interagem dentro da mitocôndria para proteger contra danos causados por EROS, como é o caso da SOD. No geral, os sistemas de defesa antioxidantes endógenos proporcionam homeostase eficaz no que diz respeito aos níveis de EROS dentro da célula supressora, bem como dentro da mitocôndria (Muravchick e Levy, 2006). A SOD não se demonstrou em altas concentrações, pressupõe-se que, devido a rápida diminuição de produção de EROS. Sendo que, quando não há necessidade de equilibrar os pró-oxidantes, não tem motivos para produzir antioxidantes, como SOD e conteúdos tiólicos. Desta forma, nosso estudo elucidou mais sobre o que infusões com LPS acarretam no organismo após duas dosagens, afim de produção de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo.

Conclusão

Verificou-se que, o desafio com duas aplicações de LPS com intervalo de 24 horas demonstrou alterações na produção sérica de totais-SH e EROS, que talvez em exposição maior que dois dias de aplicação de endotoxina, levasse um quadro de dano oxidativo.

Referências

- ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*, v. 13, n. 3, p. 637-648, 1992.
- ANDERSEN, P. H. Bovine endotoxemia—some aspects of relevance to production diseases. A review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 44, n. 1, p. S141, 2003.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de nutrição*, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BOUCHARD, L. et al. Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 12, p. 2574-2581, 1999.

- 333 DE CAMPOS, F. T. et al. The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on
334 serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the
335 bovine dominant follicle. *Theriogenology*, v. 89, p. 244-249, 2017.
- 336 DIEZ-FRAILE, A. et al. L-selectin and β 2-integrin expression on circulating bovine
337 polymorphonuclear leukocytes during endotoxin mastitis. *Journal of dairy science*, v. 86,
338 n. 7, p. 2334-2342, 2003.
- 339 FERNANDES, A. C. C. et al. Effect of repeated intravenous lipopolysaccharide infusions
340 on systemic inflammatory response and endometrium gene expression in Holstein heifers.
341 *Journal of dairy science*, v. 102, n. 4, p. 3531-3543, 2019.
- 342 FERNANDES, A. C. C. *Efeito de infusões intravenosas e intramamárias de*
343 *lipopolissacarídeo (LPS) sobre parâmetros inflamatórios, reprodutivos e metabólicos em*
344 *novilhas e vacas da raça holandesa*. 2016. 149 f. Tese (Programa de Pós Graduação em
345 Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.
- 346 FERNANDES, M. S. (2012). Determinação de Parâmetros Oxidativos e Bioquímicos em
347 Indivíduos Multitransfundidos.
- 348 GALLEY, H. F. (2011). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British*
349 *journal of anaesthesia*, 107(1), 57-64.
- 350 GORBET, Maud B.; SEFTON, Michael V. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials*,
351 v. 26, n. 34, p. 6811-6817, 2005.
- 352 GOZHO, G. N. et al. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide
353 endotoxin release and triggers an inflammatory response. *Journal of Dairy Science*,
354 Champaign, v. 88, n. 4, p. 1399-1403, 2005.
- 355 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*.
356 Oxford University Press, USA.
- 357 HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M.. Measuring reactive species and oxidative damage
358 in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British*
359 *journal of pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.
- 360 JIANG, Z. et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nature*
361 *immunology*, v. 6, n. 6, p. 565-570, 2005.
- 362 LUNARDELLI, A. (2013). Efeitos da inflamação no período neonatal sobre o perfil
363 inflamatório e oxidativo na sepse experimental na vida adulta.

- 364 MAGALHÃES, P. O. et al. Methods of Endotoxin Removal from Biological
365 Preparations: A Review. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, v. 10, p. 388-404, 2007.
- 366 MCGAVIN, D. *Bases da patologia em veterinária*. 4a edição. Elsevier Brasil, 2009.
- 367 MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of
368 epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological*
369 *chemistry*, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.
- 370 MURAVCHICK, S.; LEVY, R. J. (2006). Clinical implications of mitochondrial
371 dysfunction. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*,
372 105(4), 819-837.
- 373 NAIME, A. C. A. et al. Efeito da pravastatina na agregação e número de plaquetas
374 circulante em ratos tratados e não tratados com LPS. 2014.
- 375 NRC. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. Washington, DC: Academy Press, 1996.
376 494p.
- 377 PEÑAILILLO, A. K. et al. Haematological and blood biochemical changes induced by
378 the administration of low doses of Escherichia coli lipopolysaccharide in rabbits.
379 *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 48, n. 3, p. 315-320, 2016.
- 380 PERIASAMY, S.; PRAVEENA, P. E.; SINGH, N. Effects of Pasteurella multocida
381 lipopolysaccharides on bovine leukocytes. *Microbial pathogenesis*, v. 119, p. 225-232,
382 2018.
- 383 PETSCH, D.; ANSPACH, F. B. Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of*
384 *biotechnology*, v. 76, n. 2-3, p. 97-119, 2000.
- 385 QUINN, P. J. et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Artmed Editora,
386 2005.
- 387 RADI, R.; BUSH, K. M.; COSGROVE, T. P.; FREEMAN, B. A. (1991). Reaction of
388 xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. *Archives of*
389 *biochemistry and biophysics*, 286(1), 117-125.
- 390 SCHAUMBERGER, S.; REISINGER, N. Endotoxins in cows An underestimated risk?
391 *Science & Solutions*. Áustria, 09 junho 2014. Vol. 45, Issue 09. p. 2-5.
- 392 SHAMI, Najua Juma Ismail Esh; MOREIRA, Emília Addison Machado. Licopeno como
393 agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.
- 394 SIQUEIRA, B. G.; SCHMIDT, A. Choque circulatório: definição, classificação,
395 diagnóstico e tratamento. In: SIMPÓSIO: URGÊNCIAS E EMERGÊNCIAS

- 396 CARDIOLÓGICAS. Ribeirão Preto: *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão*
397 *Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP*, v. 36, n. 2/4, p. 145-150, 2003.
- 398 STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for
399 cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *Journal of Experimental*
400 *Medicine*, v. 169, n. 5, p. 1543-1555, 1989.
- 401 WALDRON, M. R. et al. Effect of lipopolysaccharide infusion on serum macromineral
402 and vitamin D concentrations in dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 86, n. 11, p.
403 3440-3446, 2003.
- 404 WŁODEK, P. et al. (2010). Thiol levels, protein carbonylation and anaerobic sulfur
405 metabolism in erythrocytes of peritoneal dialysis and predialysis patients. *Nephrology*,
406 15(8), 755-761.
- 407 WYCKOFF, T. J. O.; RAETZ, C. R. H; JACKMAN, J. E. Antibacterial and anti-
408 inflammatory agents that target endotoxin. *Trends in microbiology*, v. 6, n. 4, p. 154-159,
409 1998.
- 410 ZEBELI, Q. et al. Intermittently-induced endotoxaemia has no effect on post-challenge
411 plasma metabolites, but increases body temperature and cortisol concentrations in
412 periparturient dairy cows. *Research in veterinary science*, v. 95, n. 3, p. 1155-1162, 2013.
- 413 ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and
414 control. *Journal of animal science*, v. 86, n. suppl_13, p. 57-65, 2008.
- 415 ZUGHAIER, S. M. et al. Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-
416 dependent and-independent signaling pathways by endotoxins. *Infection and immunity*,
417 v. 73, n. 5, p. 2940-2950, 2005.

3 Considerações finais

Portanto, ficamos satisfeitos com os resultados obtidos, já que não demonstraram estresse oxidativo quando utilizadas duas aplicações de LPS, intervaladas por 24 horas, demonstrando apenas alterações na produção sérica de totais-SH e EROS. Com isso, aponta-se a necessidade de mais estudos na área, objetivando a elucidação do período e das dosagens limites para os animais se manterem saudáveis e na ausência de dano oxidativo.

Referências

ACHARYA, J. et al. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. **European journal of haematology**, v. 47, n. 4, p. 287-291, 1991.

ADEREM, A. Phagocytosis and the inflammatory response. **The Journal of infectious diseases**, v. 187, n. Supplement_2, p. S340-5, 2003.

ALEXANDER, C.; RIETSCHEL, E. Th. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.*, v. 7, p.167-202, 2001.

ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, p. 637-648, 1992.

ANDERSEN, P. H. Bovine endotoxycosis—some aspects of relevance to production diseases. A review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, n. 1, p. S141, 2003.

ARUOMA, O. I. et al. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 34, p. 20509-20512, 1989.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BARTOSZ, G. et al. Superoxide dismutase activity decreases during erythrocyte aging. **Experientia**, v. 34, n. 11, p. 1464-1464, 1978.

BAS, S. et al. CD14 is an acute-phase protein. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 7, p. 4470-4479, 2004.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 963, n. 3, p. 558-561, 1988.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BORREGO, A. **Estudo do envolvimento dos loci reguladores da reação inflamatória aguda na determinação da sensibilidade ou resistência ao choque endotóxico induzido por lipopolissacarídeo**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BOUCHARD, L. et al. Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2574-2581, 1999.

BROOM, D. M.; JOHNSON, Ken G.; BROOM, Donald M. **Stress and animal welfare**. London: Chapman & hall, 1993.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.

CAROFF, M. et al. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. **Microbes and infection**, v. 4, n. 9, p. 915-926, 2002.

CARROLL, J. A.; FORSBERG, N. E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 1, p. 105-149, 2007.

COMHAIR, S. A. A; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246-L255, 2002.

DAMASCENO, D. C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. **Diabetes Clínica**, v. 5, n. 5, p. 355-361, 2002.

DAUPHINEE, S. M.; KARSAN, Aly. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Laboratory investigation**, v. 86, n. 1, p. 9-22, 2006.

DE BOER, J. P. et al. Activation of the complement system in baboons challenged with live Escherichia coli: correlation with mortality and evidence for a biphasic activation pattern. **Infection and immunity**, v. 61, n. 10, p. 4293-4301, 1993.

DE CAMPOS, F. T. et al. 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.

DE ZWART, L. L. et al. Biomarcadores de danos por radicais livres: aplicações em animais experimentais e em humanos. **Biologia e Medicina Radical Livre**, v. 26, n. 1-2, p. 202-226, 1999.

DECKER, E. A. et al. Understanding antioxidant mechanisms in preventing oxidation in foods. In: **Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications**. Woodhead Publishing, 2010. p. 225-248.

DENTENER, M. A. et al. Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: implications for local defense to bacterial endotoxins. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 23, n. 2, p. 146-153, 2000.

DIEZ-FRAILE, A. et al. L-selectin and $\beta 2$ -integrin expression on circulating bovine polymorphonuclear leukocytes during endotoxin mastitis. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 7, p. 2334-2342, 2003.

ELSON, G. et al. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1574-1583, 2007.

FERNANDES, A. C. C. **Efeito de infusões intravenosas e intramamárias de lipopolissacarídeo (LPS) sobre parâmetros inflamatórios, reprodutivos e metabólicos em novilhas e vacas da raça holandesa**. 2016. 149 f. Tese (Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

FERNANDES, A. C. C. et al. Effect of repeated intravenous lipopolysaccharide infusions on systemic inflammatory response and endometrium gene expression in Holstein heifers. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 4, p. 3531-3543, 2019.

FERNANDES, M. S. (2012). Determinação de Parâmetros Oxidativos e Bioquímicos em Indivíduos Multitransfundidos.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLOYD, ROBERT A. The effect of peroxides and free radicals on body tissues. **The Journal of the American Dental Association**, v. 128, p. 37S-40S, 1997.

FRASER, David et al. A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. 1997.

GALLEY, H. F. (2011). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **British journal of anaesthesia**, 107(1), 57-64.

GATE, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, n. 4, p. 169-180, 1999.

GEROLD, G.; ZYCHLINSKY, A.; JUANA, L. What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections?. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2007. p. 41-47.

GIOANNINI, T. L. et al. Isolation of an endotoxin–MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 12, p. 4186-4191, 2004.

GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. Endotoxin: the uninvited guest. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6811-6817, 2005.

GOZHO, G. N. et al. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 4, p. 1399-1403, 2005.

GREGORY, C. D.; DEVITT, A. CD14 and apoptosis. **Apoptosis**, v. 4, n. 1, p. 11-20, 1999.

GUNN, J. S. et al. PmrA–PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. **Molecular microbiology**, v. 27, n. 6, p. 1171-1182, 1998.

HAENEY, M. R. The role of the complement cascade in sepsis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 41, n. suppl_1, p. 41-46, 1998.

HAILMAN, E. et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 1, p. 269-277, 1994.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3rd ed. New York: Oxford Science Publications; 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. (2015). **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine: Oxford University Press. **Inc, New York**, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M.. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HATHERILL, J. R.; TILL, G. O.; WARD, P. A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents and Actions**, v. 32, n. 3-4, p. 351-358, 1991.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, n. 5, p. 401-404, 1986.

HUANG, K. et al. Lipopolysaccharide-induced E-selectin expression requires continuous presence of LPS and is inhibited by bactericidal/permeability-increasing protein. **Inflammation**, v. 19, n. 3, p. 389-404, 1995.

JAULT, C.; PICHON, L.; CHLUBA, J. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. **Molecular immunology**, v. 40, n. 11, p. 759-771, 2004.

JIANG, Z. et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. **Nature immunology**, v. 6, n. 6, p. 565-570, 2005.

KAWAHARA, K. et al. Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. **FEBS letters**, v. 292, n. 1-2, p. 107-110, 1991.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 17, p. 338–344, 2005.

KINNULA, V. L.; CRAPO, J. D.; RAIVIO, K. O. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 73, n. 1, p. 3-19, 1995.

LÓPEZ-BOJÓRQUES, L. N.; DEHESA, A. Z.; REYES-TÉRRAN, G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. **Arch. Med. Res.**, v.35, p.465-479, 2004.

LU, Y.; YEH, W.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-151, 2008.

LUNARDELLI, A. (2013). Efeitos da inflamação no período neonatal sobre o perfil inflamatório e oxidativo na sepse experimental na vida adulta.

MAGALHÃES, P. O. et al. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: A Review. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v. 10, p. 388-404, 2007.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Front Biosci**, v. 4, n. 4, p. 0339-345, 1999.

MCGAVIN, D. **Bases da patologia em veterinária 4a edição**. Elsevier Brasil, 2009.

MEDZHITOV, R. et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Molecular cell**, v. 2, n. 2, p. 253-258, 1998.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135-145, 2001.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. **International immunopharmacology**, v. 3, n. 1, p. 119-128, 2003.

MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. (Ed.). **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. CABI, 2000.

MORIKAWA, A. et al. Augmentation of nitric oxide production by gamma interferon in a mouse vascular endothelial cell line and its modulation by tumor necrosis factor

alpha and lipopolysaccharide. **Infection and immunity**, v. 68, n. 11, p. 6209-6214, 2000.

MURAVCHICK, S.; LEVY, R. J. (2006). Clinical implications of mitochondrial dysfunction. **Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, 105(4), 819-837.

NAIME, A. C. A. et al. Efeito da pravastatina na agregação e número de plaquetas circulante em ratos tratados e não tratados com LPS. 2014.

NOGUEIRA, F. N. **Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glândulas salivares de ratos diabético**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NRC. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. Washington, DC: Academy Press, 1996. 494p.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. In: **Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation X**. Springer, Boston, MA, 2005. p. 11-18.

PEÑAILILLO, A. K. et al. Haematological and blood biochemical changes induced by the administration of low doses of Escherichia coli lipopolysaccharide in rabbits. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 48, n. 3, p. 315-320, 2016.

PERIASAMY, S.; PRAVEENA, P. E.; SINGH, N. Effects of Pasteurella multocida lipopolysaccharides on bovine leukocytes. **Microbial pathogenesis**, v. 119, p. 225-232, 2018.

PETSCH, D.; ANSPACH, F. B. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal of biotechnology**, v. 76, n. 2-3, p. 97-119, 2000.

QUEZADO, Z. M. et al. The third component of complement protects against Escherichia coli endotoxin-induced shock and multiple organ failure. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 2, p. 569-578, 1994.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005.

QURESHI, S. T.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and their role in experimental models of microbial infection. **Genes & Immunity**, v. 4, n. 2, p. 87-94, 2003.

RADI, R.; BUSH, K. M.; COSGROVE, T. P.; FREEMAN, B. A. (1991). Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. **Archives of biochemistry and biophysics**, 286(1), 117-125.

RAETZ, C. R. H. et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 295-329, 2007.

RAPOSO, S. **Beef Point**. Comportamento do bovino e sua relação com o manejo. 2014. Disponível em: <http://sites.beefpoint.com.br/sergioraposo/2014/06/05/como-o-boi-funciona-comportamento-do-bovino-e-sua-relacao-com-o-manejo/>. Acesso em: 20/08/2019.

ROSS, D. Antioxidant defence systems and oxydative stress. **Membrane Lipid Oxidation 2**, p. 151-170, 1991.

SCHAUMBERGER, S.; REISINGER, N. Endotoxins in cows An underestimated risk? **Science & Solutions**. Áustria, 09 junho 2014. Vol. 45, Issue 09. p. 2-5.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 32-32, 1936.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SIES, H. Estresse oxidativo: da pesquisa básica à aplicação clínica. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. S31-S38, 1991.

SIQUEIRA, B. G.; SCHMIDT, A. Choque circulatório: definição, classificação, diagnóstico e tratamento. In: SIMPÓSIO: URGÊNCIAS E EMERGÊNCIAS CARDIOLÓGICAS. Ribeirão Preto: **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP**, v. 36, n. 2/4, p. 145-150, 2003.

THOMAS, K. E. et al. Contribution of interferon- β to the murine macrophage response to the Toll-like receptor 4 agonist, lipopolysaccharide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 31119-31130, 2006.

THOMSON, R. G. **Patologia geral veterinária**. Guanabara Koogan, 1983.

TIZARD, Ian R. **Imunologia veterinária-uma introdução**. Editora Roca, 2002.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 179-190, 2007.

UNDERHILL, D. M. Mini-review Toll-like receptors: networking for success. **European journal of immunology**, v. 33, n. 7, p. 1767-1775, 2003.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. **Current opinion in immunology**, v. 14, n. 1, p. 103-110, 2002.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN AMERSFOORT, E. S.; VAN BERKEL, T. J. C.; KUIPER, J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 3, p. 379-414, 2003.

VISINTIN, A. et al. MD-2. **Immunobiology**, v. 211, n. 6-8, p. 437-447, 2006.

VIVES-PI, M. et al. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 133, n. 2, p. 208-218, 2003.

WALDRON, M. R. et al. Effect of lipopolysaccharide infusion on serum macromineral and vitamin D concentrations in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 11, p. 3440-3446, 2003.

WŁODEK, P. et al. (2010). Thiol levels, protein carbonylation and anaerobic sulfur metabolism in erythrocytes of peritoneal dialysis and predialysis patients. **Nephrology**, 15(8), 755-761.

WYCKOFF, T. J. O.; RAETZ, C. R. H; JACKMAN, J. E. Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin. **Trends in microbiology**, v. 6, n. 4, p. 154-159, 1998.

YING, S. C. et al. Clq peptides bind endotoxin and inhibit endotoxin-initiated activation of the classical complement pathway. In: **Journal of Immunology**. 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814: Amer Assoc Immunologists, 1993. p. A304-A304.

ZEBELI, Q. et al. Intermittently-induced endotoxaemia has no effect on post-challenge plasma metabolites, but increases body temperature and cortisol concentrations in periparturient dairy cows. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 3, p. 1155-1162, 2013.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. **Journal of animal science**, v. 86, n. suppl_13, p. 57-65, 2008.

ZUGHAIER, S. M. et al. Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and-independent signaling pathways by endotoxins. **Infection and immunity**, v. 73, n. 5, p. 2940-2950, 2005.

ZWEIGNER, J.; SCHUMANN, R. R.; WEBER, J. R. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. **Microbes and infection**, v. 8, n. 3, p. 946-952, 2006.

Anexos

**Anexo I – Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal referente ao
artigo 1**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PARECER Nº 26/2018/CEEA/REITORIA
PROCESSO Nº 23110.009364/2018-41
INTERESSADO: CASSIO CASSAL BRAUNER

Pelotas, 12 de abril de 2018

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Utilização de um composto a base de butafosfan e cianocobalamina: atuação no sistema reprodutivo**”, processo nº 23110.009364/2018-42, sob a responsabilidade de **Cassio Cassal Brauner** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 09/04/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	01/05/2018 a 21/12/2022
Espécie/linhagem/raça	Bovina/Angus, Hereford e Holandês
Nº de animais	72
Idade	14-16 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazendas comerciais dos municípios de São Lourenço do Sul e Rio Grande/RS

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 9364-2018**).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**, **Médico Veterinário**, em 12/04/2018, às 14:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0109124** e o código CRC **4A538880**.

Referência: Processo nº 23110.009364/2018-41