

Atividade sérica da enzima paraoxonase (PON-1) em equinos submetidos a administração intramuscular de diferentes adjuvantes vacinais

Activity of the enzyme paraoxonase (PON-1) in horses submitted to intramuscular injection of vaccinal adjuvants

DOI:10.34117/bjdv6n12-242

Recebimento dos originais: 10/11/2020

Aceitação para publicação: 10/12/2020

Inaraã Dias da Luz

Mestrado

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: inadiasmedvet@gmail.com

Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Doutorado

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: cewnogueira@gmail.com

Luciana Araujo Borba

Doutorado

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: luaraujo_sm@hotmail.com

Alice Correa Santos

Doutorado

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CD Tec, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: alice.cs@live.com

Joao Alveiro Alvarado Rincón

Doutorado

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: joaoal13@hotmail.com

Augusto Luiz Postal Dalcin

Graduação veterinária

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: augustopostal@gmail.com

Gabriela Castro da Silva

Graduação em Veterinária

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: gabicastrovini@gmail.com

Bruna da Rosa Curcio

Doutorado

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: curciobruna@hotmail.com

RESUMO

A PON-1 é uma proteína de fase aguda inflamatória e sua atividade plasmática tem sido utilizada para fins de diagnóstico e prognóstico. Objetivou-se avaliar a atividade de PON-1 em equinos submetidos a estímulo inflamatório agudo local através da administração de adjuvantes vacinais. Utilizou-se 12 equinos, 8 machos e 4 fêmeas com idades entre 2-4 anos, divididos em 3 grupos: controle (CONT), xantana (Xa) e hidróxido de alumínio (HA). Nos grupos Xa e HA administrou-se 2 mL do respectivo adjuvante vacinal por via intramuscular, e solução salina no grupo CONT. Amostras de sangue seriadas (1 a 72 horas após administração) foram coletadas para avaliação da atividade da PON-1 no soro por espectrofotometria. Clinicamente os animais dos grupos Xa e HA apresentaram edema e sensibilidade no sítio de aplicação do adjuvante. Os valores plasmáticos de PON-1 mínimos e máximos identificados estavam entre 38,5 a 76,5 U/mL, níveis esses semelhantes ao descrito como intervalo de referência para equinos saudáveis. Comparando os grupos, não foi observada diferença nas concentrações de PON-1, independente do momento avaliado ($p > 0,05$). Conclui-se que a atividade da PON-1 não apresentou diminuição frente a processos inflamatórios agudos locais estimulados através da administração dos adjuvantes vacinais em equinos, não se concretizando um marcador de confiabilidade em alterações inflamatórias localizadas.

Palavras-chave: Proteína de fase aguda, xantana, hidróxido de alumínio.

ABSTRACT

A PON-1 is an inflammatory phase protein and its plasma activity has been used for diagnostic and prognostic purposes. The aim of this study was to evaluate PON-1 activity in horses submitted to acute inflammatory stimulus through the administration of vaccine adjuvants. Twelve horses (8 males and 4 females), aged 2 to 4 years, were divided into 3 groups: control (CONT), xanthan (Xa) and aluminum hydroxide (HA). Vaccine adjuvant (2mL) or saline water was given intramuscularly, respectively in Xa, HA and CONT groups. Blood samples were taken (1 to 72 hours after injections) to evaluate the activity of PON-1 by spectrophotometry. Horses from Xa and HA groups showed edema and pain at the site of adjuvant injection. Values minimum and maximus of PON-1 concentrations were between 38.5 to 76.5 U/mL, which were in according of reference range for healthy horses. It was not observed

difference in the PON-1 levels among treatment groups, regardless of the time evaluated ($p > 0, 05$). In conclusion, activity of PON-1 does not change according the local acute inflammatory process after injection of vaccine adjuvants in horses, so PON-1 was not a reliable marker of local inflammatory damages.

Keywords: Acute phase protein, xanthan, aluminum hydroxide.

1 INTRODUÇÃO

A reação de fase aguda é uma resposta inespecífica que minimiza danos teciduais auxiliando na reparação, restaurando a homeostase pós infecção, trauma ou estresse, estimulada quando as células lesadas liberam metabólitos do ácido araquidônico e produtos do estresse oxidativo, seguido da liberação de citocinas a partir de macrófagos e monócitos (ECKERSALL et al., 2010). Aumentos na circulação destes mediadores pró-inflamatórios estimulam produção de proteínas de fase aguda (PFA) pelos hepatócitos (ECKERSALL et al., 2010).

As PFA compreendem um grande grupo de proteínas que se reduzem ou se elevam em resposta às infecções ou lesões teciduais, e os níveis geralmente refletem o grau e extensão do processo (CHAVATTE et al., 1992). Possuem a finalidade de inibir a continuidade do dano isolando e destruindo o agente agressor, ativando o processo de reparação (CERÓN et al., 2005; CHAVATTE et al., 1992).

A paraoxonase-1 (PON-1) é considerada uma PFA negativa, uma vez que os processos inflamatórios são associados com a diminuição da sua atividade. Sendo utilizada na medicina humana para fins de diagnóstico, em situações de inflamação associada ao estresse oxidativo (FAGGIONI, 2003; LEE et al., 2005), contudo ainda com uso limitado na medicina veterinária (RUGGERONE et al., 2018).

No ano de 2018 foi realizado um estudo com diferentes categorias animais, sendo todos classificados como hígdos, com intuito de padronizar os valores de referência para espécie equina. O qual demonstrou que mesmo apresentando níveis baixos quando comparado a outras espécies domésticas, a atividade da PON-1 apresenta potencial de utilização para o diagnóstico e monitoramento da resposta ao tratamento como descrito em outras espécies (RUGGERONE et al., 2018). Contudo, Ruggione et al., 2018 utilizaram somente animais saudáveis, sendo necessário mais estudos para avaliar sua resposta em diferentes estados patológicos.

O presente estudo objetivou avaliar o comportamento da enzima PON-1 em equinos submetidos ao estímulo de resposta inflamatória aguda local através da administração dos adjuvantes vacinais xantana e hidróxido de alumínio, amplamente utilizados tanto na medicina humana como na veterinária, mas que causam reconhecido estímulo de processo inflamatório (PERRIE et al., 2008; PETROVSKY, 2008.)

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 12 equinos mestiços Crioulos, sendo 8 machos e 4 fêmeas com idades entre 2 e 4 anos, do plantel do Centro de Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma (CEEP), da Universidade Federal de Pelotas, no município do Capão do Leão (31°48'08.2"S; 52°29'51.4"O).

Os equinos foram submetidos a avaliação clínica inicial, sendo classificados como hígidos pro apresentarem os parâmetros dentro dos limites fisiológicos para a espécie. Para avaliar o comportamento da PON-1 em resposta ao processo inflamatório agudo, foi empregada a administração dos adjuvantes vacinais hidróxido de alumínio e xantana.

Os animais foram categorizados em 3 grupos através de delineamento experimental inteiramente casualizado: grupo controle (CONT) composto por 3 machos e 1 fêmea, grupo xantana (Xa) composto por 3 machos e 1 fêmea e grupo hidróxido de alumínio (HA) composto por 2 machos e 2 fêmeas. No grupo Xa administrou-se 2 mL de xantana a 0,4% acrescido de ¼ de montanide, no grupo HA administrou-se 2 mL de hidróxido de alumínio a 10% e no grupo controle administrou-se 2mL de solução fisiológica 0,9%, todos os grupo foram aplicados por via intramuscular na região do músculo peitoral esquerdo.

8 mL de sangue por animal foram coletados por venopunção da jugular em sistema a vácuo em dois tubos de 4mL cada contendo ativador de coágulo, com antissepsia prévia nos momentos 0h (previamente a administração dos adjuvantes) 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h e 72h após a administração dos adjuvantes. As amostras foram centrifugadas a 5.000 g para separação e obtenção do soro que foi acondicionado em dois microtubos por animal para congelamento a -80C e subsequente análise laboratorial. Além das coletas de soro, foi realizada avaliação clínica individual do sítio de aplicação dos adjuvantes para identificação da resposta inflamatória através do aumento de volume e temperatura local, além da presença de sensação dolorosa.

Para determinação da atividade da PON-1 utilizou-se um protocolo previamente descrito (BROWNE et al., 2007). Utilizou-se um tampão Tris/HCl 20mM, contendo 1mM de cloreto de cálcio e 4mM de fenilacetato como solução de trabalho. As amostras foram diluídas (1:4) em Tampão 20Mm Tris/HCL. A leitura foi realizada através de espectrofotômetro UV-VIS (Femto, São Paulo, Brasil) adicionando-se 3,3µL da amostra diluída em 500µL da solução trabalho. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e um tempo de leitura de 30 segundos, sendo a atividade da enzima determinada pela fórmula: Δ absorvância x 115 x 4, sendo expressa em U/mL (BROWNE et al., 2007). As análises

foram realizadas no Laboratório de Metabologia e Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas.

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Todas as análises foram realizadas através do programa Statistix10.0[®]. Foi realizada análise de variância por medidas repetidas para comparação entre os grupos e comparação entre as médias pelo teste de Tukey. Foi utilizado nível de significância de 5%.

Esta pesquisa foi realizada após avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas, com protocolo nº 3992.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação clínica dos animais foi observada resposta inflamatória local em todos os animais submetidos a administração de adjuvantes. Uma vez que todos animais dos grupos xantana (Fig. 1) e hidróxido de alumínio apresentaram edema, sensação dolorosa e aumento de temperatura no local da aplicação dos adjuvantes.

A atividade sérica da PON-1 não apresentou diferença entre os grupos de adjuvantes vacinais utilizados. Os grupos apresentaram média \pm erro padrão da média os seguintes valores: CONT 43,75 \pm 8,17 U/mL, Xa 53,41 \pm 10,07 U/mL e HA 65,29 \pm 14,21 U/mL ($p>0,05$) (Fig. 2).

A atividade sérica da enzima PON-1 não apresentou diminuição nos grupos de equinos em que foi identificada resposta inflamatória local após administração do adjuvante. Sabe-se que a atividade desta enzima é menor em equinos do que nas demais espécies domésticas, em vista de possíveis alterações no metabolismo hepático e lipídico, os quais interferem diretamente na síntese e atividade da PON-1, ou ainda que cada espécie tem suas próprias isoformas para atingir diferentes concentrações séricas (RUGGERONE et al., 2018).

O intervalo de referência (valores mínimos e máximos) da PON-1 encontrado no presente estudo foram 38,5 a 76,5 U/mL, o que está de acordo com o intervalo de referência descrito para animais hípidos da espécie equina em estudo publicado recentemente (RUGGERONE et al., 2018). Dessa maneira, como a atividade enzimática nos animais que apresentaram resposta inflamatória aguda (grupos Xa e HA) e os que não apresentaram essa resposta (CONT) são semelhantes e encontram-se dentro do intervalo de referência descrito para animais saudáveis, sugere-se que a lesão tecidual localizada não seja capaz de desencadear a reação de fase aguda de forma suficiente para alterar a atividade sérica da PON-1.

Em vacas leiteiras, estudos anteriores sugeriram que apesar da enzima PON-1 atuar como uma PFA negativa (SCHNEIDER et al., 2013; BIONAZ et al., 2007), não há evidências experimentais de que a atividade da PON-1 seja modulada durante um desafio inflamatório agudo. O que pode justificar a manutenção dos valores de PON-1 dentro do intervalo de referência para a espécie equina encontrados no presente estudo.

Mais estudos são necessários para caracterizar a relação entre a ocorrência de alterações clínicas sistêmicas em equinos e a ocorrência de redução da atividade da PON-1. Especificamente, a atividade PON-1 poderia ser usada para fins de diagnóstico, como na medicina humana, em situações que podem induzir o estresse oxidativo, como na sepse, alterações cardiovasculares, renais ou hepáticas (RUGGERONE et al., 2018). Além disso, resultados de amostras sequenciais coletadas após a instituição de um tratamento poderiam ser úteis para avaliar o prognóstico clínico do paciente, como utilizado em outras espécies.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a atividade da PON-1 não apresentou diminuição relacionada a presença de uma resposta inflamatória aguda local, estimulada pela administração dos adjuvantes vacinais xantana e hidróxido de alumínio em equinos. Assim, a utilização de PON-1 não se concretiza como marcador adequado para avaliação de resposta inflamatória localizada.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não ter potencial conflitos de interesse com respeito à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

BORBA, L.A, CURCIO, B.R e NOGUEIRA, C.E.W conceberam e projetaram os experimentos. BORBA, L.A e DALCIN, A.L.P realizaram a administração dos adjuvantes vacinais e as coletas de amostras sanguíneas. SANTOS, A.C realizou a manipulação dos adjuvantes vacinais. LUZ, I.D, SILVA, G.C e RINCÓN, J.A.A realizaram as análises laboratoriais. BORBA, L.A, CURCIO, B.R e NOGUEIRA, C.E.W supervisionaram os experimentos com animais e forneceram os dados clínicos. LUZ, I.D e CURCIO, B.R realizaram as análises estatísticas de dados experimentais. LUZ, I.D e CURCIO prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Veterinária da UFPel, sob o n° 4750.

REFERÊNCIAS

BIONAZ, M. et al. Paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *Theriogenology*. v.89, p. 244-249. 2017.

BROWNE, R.W. et al. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. *Clinical Chemistry*. v. 53, n. 2, p. 310–317. 2007.

CERÓN, J.J. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*. v. 34, n. 2, p. 85–99. 2005.

CHAVATTE, P.M. ET AL. Measurement of serum amyloid A protein (SAA) as an aid to differential diagnosis of infection in newborn foals. *Equine Infectious Diseases*. v. 6, p. 33-38, 1992.

ECKERSALL, P.D. et al. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*. v. 185, n. 1, p. 23–27. 2010.

FAGGIONI, T. O efeito do hábito de fumar sobre a atividade da enzima paraoxonase em uma população humana, FIOCRUZ. 2003.

LEE, C.T. et al. Paraoxonase activity in Greek migrants and Anglo–Celtic persons in the Melbourne Collaborative Cohort Study: relationship to dietary markers. *European Journal of Nutrition*. v. 44, n. 4, p. 223–230. 2005.

PERRIE, Y. et al. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 364, n. 2, p. 272–280. 2008.

PETROVSKY, N. Freeing vaccine adjuvants from dangerous immunological dogma. *Expert Review of Vaccines*. v. 7, n. 1, p. 7–10. 2008.

RUGGERONE, B. et al. Validation of a paraoxon-based method for measurement of paraoxonase (PON-1) activity and establishment of RI s in horses. *Veterinary Clinical Pathology*. v. 47, n. 1, p. 69–7. 2018.

SCHNEIDER, A. et al. Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. *Res Vet Sci*. v.95, p.269-271. 2013.

ANEXO

Figura 1. Aumento de volume na região peitoral esquerda de um equino após 72h da administração do adjuvante xantana (Xa).



Figura 2. Atividade sérica da PON-1 (U/mL) em equinos descrita com média e erro padrão da média de acordo com os grupos: Controle, Xantana e Hidróxido de alumínio. Pela análise de variância por medidas repetidas ($p>0,05$).

