

ALTERACIONS EN LA FUNCIO OVÀRICA DE LA TRUITA EN RESPOSTA AL LIPOPOLISACÀRID BACTERIÀ

Núria Montserrat,¹ Mario Mas,¹ Laura Acerete,² Lluís Tort,² Simon MacKenzie,² Aleksei Krasnov,³ Frederick W. Goetz,⁴ Josep V. Planas *

¹ Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona. Tel. 934 021 557. Fax 934 110 359. Adreça electrònica: jplanas@ub.edu.

² Unitat de Fisiologia Animal, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, Barcelona. Tel. 935814127.

³ Institute for Applied Biotechnology. University of Kuopio.

Finlàndia. Tel. 35 817 163 742. Fax 35 817 163 752. Adreça electrònica: krasnov@uku.fi.

⁴ Great Lakes Water Institute. University of Wisconsin.

Milwaukee, WI 53204, EUA. Tel. 414-382-1742. Fax 414-382-1705. Adreça electrònica: rick@uwm.edu.

Resum

En mamífers se sap que els processos infecciosos poden provocar alteracions reproductores i fins i tot infertilitat. Nombroses citocines i factors immunològics són produïts durant una infecció bacteriana i actuen sobre el sistema reproductor. Sorprenentment, se sap molt poc de les conseqüències reproductores de l'activació del sistema immunitari per patògens bacterians en peixos. Per tant, hem estudiat els efectes del lipopolisacàrid (LPS) sobre la funció reproductora de truites femelles sexualment madures abans de l'ovulació. El tractament amb LPS no va alterar la producció basal d'esteroides ovàrics *in vitro* però va potenciar lleugerament els efectes esteroïdogenics de la LH *in vitro*. No es van observar efectes de l'LPS *in vivo* sobre la maduració oocitària. Malgrat això, l'LPS va augmentar el nombre de nuclis apoptòtics en cèl·lules de les capes fol·liculars, la qual cosa es correlaciona amb un augment de l'expressió de gens proapoptòtics en l'ovari. Per tant, malgrat que l'LPS no sembla causar importants alteracions esteroïdogeniques ni maduratives, provoca la mort cel·lular en l'ovari, la qual cosa és molt probable que causi alteracions de la funció ovàrica. En aquests moments, no sabem si altres funcions reproductores, com la fecunditat o la fertilitat, estan afectades per l'LPS.

Paraules clau LPS, esteroïdògenesis, apoptosi, ovari, truita.

Abstract

Altered ovarian function in trout by bacterial lipopolysaccharide. In mammals it is well known that infectious processes can lead to alterations in reproductive function and even cause infertility. A number of cytokines and immune factors are known to be produced during a bacterial infection and to act on the reproductive system. Surprisingly, very little is known about the reproductive consequences of the activation of the immune system by bacterial pathogens in fish. Therefore, we have examined the effects of lipopolysaccharide (LPS) on the reproductive function of sexually mature female trout prior to ovulation. LPS treatment *in vivo* did not alter the basal *in vitro* production of steroids but slightly potentiated the *in vitro* steroidogenic effects of LH. No effects of LPS *in vivo* were observed on GVBD. However, LPS administration increased the incidence of apoptotic nuclei in cells of the follicular layers, which correlated with the increased expression of pro-apoptotic genes in the ovary. Therefore, although LPS does not appear to cause significant impairments in ovarian steroid production and oocyte final maturation, LPS triggers ovarian cell death which will most likely cause alterations normal ovarian function. At the present time it is not known whether other reproductive functions, such as fecundity and fertility, are affected.

Key words LPS, steroidogenesis, apoptosis, ovary, trout.

INTRODUCCIÓ

En mamífers se sap que certs processos infecciosos poden provocar alteracions de la funció reproductora i fins i tot infertilitat. L'activació del sistema immunitari com a resultat d'una infecció bacteriana es caracteritza per la producció de citocines, que poden actuar com a moduladors químics d'àmbit local o ser secretades a la circulació i actuar com a hormones. Per exemple, el factor de necrosi tumoral alfa ($TNF\alpha$) es una citocina que es produïda pels macròfags en resposta a l'acció del lipopolisacàrid (LPS), un component actiu de la paret cel·lular de bacteris gramnegatius, durant una infecció bacteriana. El $TNF\alpha$, apart de la seva funció endocrina, desenvolupa una important funció local en els diferents teixits, incloent-hi l'ovari, on s'ha demostrat que té efectes sobre la diferenciació, la proliferació i la inducció de l'apoptosi mitjançant receptors específics. Per tant, el $TNF\alpha$ pot actuar com a mitjancer entre el sistema immunitari i el sistema reproductor.

Els peixos, especialment en aqüicultura, estan exposats a una gran varietat de patògens procedents de bacteris gramnegatius que poden ocasionalment provocar una important mortalitat amb un alt cost econòmic. L'exposició de peixos enfront de patògens bacterians en l'aigua pot també tenir importants conseqüències negatives sobre diversos processos biològics, incloent-hi la reproducció. Malauradament, no se sap gairebé res sobre la possible interacció entre els sistemes immunitari i reproductor en peixos. Malgrat això, han estat identificats diversos dels components del sistema immunitari en peixos que podrien tenir influència sobre el sistema reproductor. Per exemple, s'ha demostrat que els macròfags de peixos poden ser activats mitjançant el tractament amb LPS i que, com a resultat, aquests produeixen $TNF\alpha$ i moltes altres citocines i factors implicats en la resposta immunitària innata

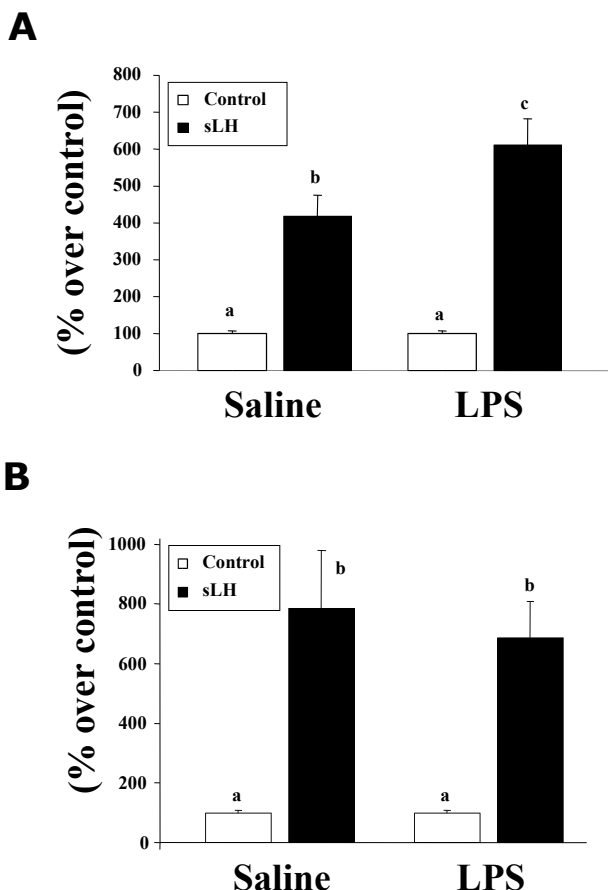


Figura 1 Efectes de l'administració d'LPS *in vivo* sobre la producció basal i estimulada per LH de testosterona (A) i 17α -hidroxiprogesterona (B) en fol·licles ovàrics de truita. Els resultats estan expressats en relació al percentatge sobre el control (100 %).

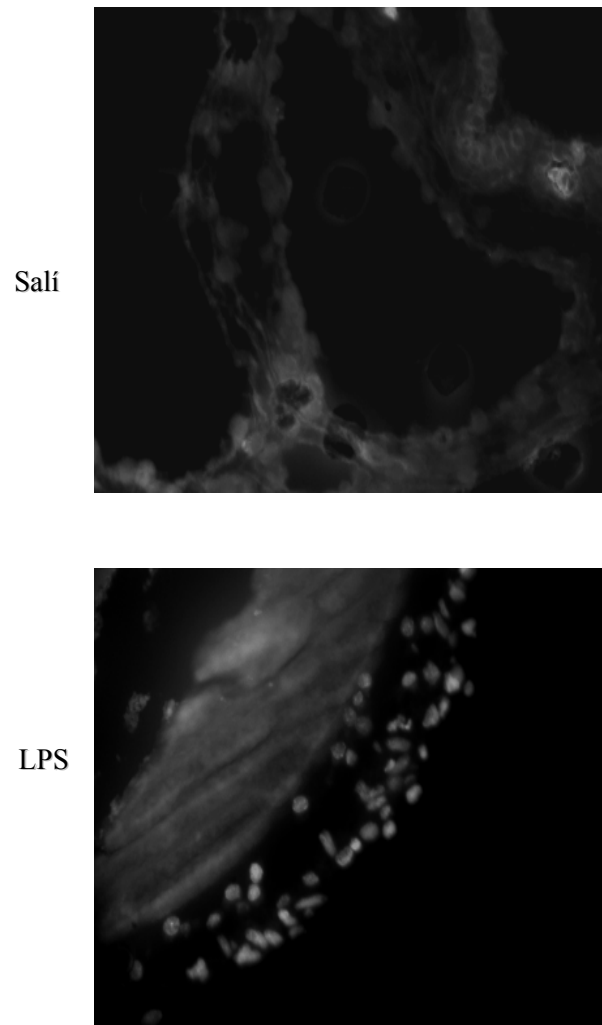


Figura 2 Efectes de l'administració d'LPS *in vivo* sobre l'apoptosi en l'ovari de truita. Imatges representatives d'un ovari d'una femella injectada amb salí i d'un ovari d'una femella injectada amb LPS.

(MacKenzie *et al.*, 2003; Goetz *et al.*, 2004). Recentment, s'ha demostrat que l'ovari dels peixos podria ser un òrgan diana a causa de la presència d'un receptor en l'ovari que podria regular la seva activitat biològica (Bobe *et al.*, 2000). Tanmateix, l'ovari expressa la ciclooxigenasa 2 abans de l'ovulació i és possible que aquest fet estigués més relacionat amb un procés infecciós que amb l'ovulació, la qual cosa suggeriria indirectament l'existència d'un procés d'activació dels macròfags en l'ovari (Roberts *et al.*, 2000). Aquests resultats suggereixen que el TNF α i la ciclooxigenasa 2 i altres marcadors immunitaris podrien emprar-se com a marcadors de l'activació macrofàgica en l'ovari. Per tant, és important establir una relació directa entre causa i efecte entre la inducció d'una resposta immunitària i alteracions en la funció reproductora en peixos. Per això, l'objectiu principal d'aquest estudi ha estat analitzar els efectes de l'administració d'LPS com a via d'inducció d'una resposta immunitària sobre la funció ovàrica en la truita (*Salvelinus fontinalis*).

MATERIALS I MÈTODES

Animals

Truites (*Salvelinus fontinalis*) femelles van mantenir-se a 12,5° C i sota fotoperíode natural a les instal·lacions de la University of Notre Dame (Notre Dame, IN, EUA). Truites en estat preovulatori van ser anestesiades amb àcid 3-aminobenzoic etil ester (0,1 g/l; Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolt en aigua i sacrificades per decapitació abans d'extraure els ovaris.

Administració d'LPS

Un grup de deu femelles van ser injectades intraperitonealment amb LPS d'*Escherichia Coli* (6 mg/kg) un cop cada dia durant quatre dies consecutius. Com a control, es va incloure un grup de deu femelles que van rebre el mateix règim d'injeccions amb salí. Al cinquè dia, els peixos control (salí) i els experimentals (LPS) van ser sacrificats.

Incubacions de teixit ovàric

Immediatament després de la dissecció, els ovaris van ser col·locats en una solució de sals Hank's (HBSS) i es van separar fol·licles ovàrics individualment. Fol·licles intactes (cinc fol·licles/pou/ml) van ser incubats en HBSS amb 0,2 % de BSA (fraction V, Sigma) en absència i presència d'LH durant 18 h a 15° C. Al final de la incubació, es van separar el medi i el teixit ovàric i van ser guardats a -20° C i -80° C, respectivament.

Per a l'assaig de la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), es van incubar deu fol·licles en presència de 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 P; 100 ng/ml) per 72 h a 12° C. Al final de la incubació, els fol·licles van ser examinats per la presència o absència (GVBD) de la vesícula germinal.

Radioimmunoassaig

Els nivells de testosterona (T) i 17 α -hidroxiprogesterona (17P) en el medi d'incubació i en plasma es van mesurar directament utilitzant un radioimmunoassaig comercial (Schering-CIS, Madrid). Per a la mesura dels nivells de cortisol en plasma, es va utilitzar un radioimmunoassaig desenvolupat prèviament.

Tinció de TUNEL

La presència de cèl·lules apoptòtiques es va detectar per la tècnica de TUNEL mitjançant un *kit* comercial (Roche).

Anàlisi d'expressió gènica per microxip

A partir d'RNA total d'ovari de peixos injectats amb salí o LPS, es va analitzar l'expressió gènica amb un microxip de cDNA que conté aproximadament mil quatre-cents gens i que ha estat prèviament desenvolupat i validat (Koskinen *et al.*, 2004; Krasnov *et al.*, 2005).

RESULTATS

L'administració de LPS no va afectar la producció basal de T o 17P però va potenciar lleugerament els efectes estimuladors de la LH sobre la producció de T, però no els de 17P (vegeu la figura 1). Tanmateix, l'administració d'LPS no va afectar els nivells en sang de T (els nivells en sang de 17P i d'estradiol no van ser detectables) però va provocar un important augment en els nivells en sang de cortisol (resultats no presentats). Tampoc no es van detectar diferències significatives entre femelles injectades amb salí o LPS quant a la inducció de la GVBD, la qual cosa indica que l'administració de LPS no afecta la maduració dels oòcits. En canvi, l'administració de LPS va provocar un important increment en el nombre de cèl·lules apoptòtiques en les capes fol·liculars que envolten l'oòcit (vegeu la figura 2). L'anàlisi de l'expressió gènica global amb un microxip de cDNA per a salmònids (Koskinen *et al.*, 2004; Krasnov *et al.*, 2005) va indicar que el tractament amb LPS provoca un augment de l'expressió de

gens proapoptòtics com la ZIP cinasa i una disminució en l'expressió de gens antiapoptòtics com Beclin 1, p21 i CYP11B2 (resultats no presentats). Tanmateix, el tractament amb LPS provoca un augment de l'expressió de gens implicats en la resposta immunitària, com el gen del precursor del col·lagen, la immunoglobulina Mu i antígens d'histocompatibilitat.

DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha estudiat la resposta de l'ovari de la truita a una activació del sistema immunitari provocada per l'administració d'LPS, que és el component actiu de bacteris gramnegatius. L'LPS s'ha demostrat que provoca una important activació del sistema immunitari en truita tant en experiments *in vitro* com *in vivo* i, per tant, constitueix un adient model experimental d'inducció immunitària.

Els nostres resultats indiquen que l'administració d'LPS, almenys en el moment del mostreig, no provoca efectes negatius sobre la resposta hormonal en l'ovari de la truita. En primer lloc, l'administració d'LPS no afecta la capacitat de resposta esteroïdògena de les capes fol·liculars a l'acció de la LH, la qual és el principal factor que regula la producció d'esteroides sexuals per part de l'ovari a la truita (Planas *et al.*, 2000). En segon lloc, l'administració d'LPS no afecta la capacitat dels oòcits a respondre a l'acció de la 17,20P i estimula la inducció de la maduració. Malgrat aquests resultats, el nostre estudi prova, com a resposta a l'acció de l'LPS, l'activació del procés de mort cel·lular programada o apoptosi en cèl·lules de les capes fol·liculars que envolten l'oòcit. En aquest estudi no hem identificat les cèl·lules fol·liculars que han entrat en apoptosi en resposta a l'LPS, però és molt possible que entre aquestes trobem les cèl·lules teca i granulosa, les quals són essencials per a la producció d'esteroides sexuals (Planas *et al.*, 2000) i altres factors necessaris per a la fol·liculogènesi i posterior ovulació. Creiem que la pèrdua d'aquestes cèl·lules i dels factors que produeixen provocarà efectes negatius sobre la funció ovàrica a mitjà o llarg termini. Propers estudis hauran d'examinar els efectes de l'administració d'LPS en les primeres setmanes després del tractament per a determinar les alteracions ovàriques a mitjà o llarg termini.

Utilitzant la tècnica del microxip, hem detectat canvis importants en l'expressió de gens en l'ovari de femelles tractades amb LPS. Malgrat que el nombre de gens ovàrics que responen al tractament no és molt elevat, comparat amb altres teixits (resultats no presentats), s'observa clarament que el tractament amb LPS provoca canvis en l'expressió de gens implicats

en el procés apoptòtic, la qual cosa es correlaciona bé amb els nostres resultats sobre l'increment de cèl·lules apoptòtiques. Tanmateix, s'observa que el tractament amb LPS provoca un augment en l'expressió de gens implicats en la resposta immunitària. En estudis previs també s'han detectat alts nivells de gens implicats en la resposta immunitària al llarg de l'ovulació, com per exemple el receptor *decoy* de l' $TNF\alpha$ i el mateix $TNF\alpha$ (Bobe *et al.*, 2000, 2001). Una qüestió que es desprèn d'aquests resultats és si aquests gens són expressats per les cèl·lules ovàriques o si són expressats per cèl·lules immunitàries (per exemple, macròfags) que han infiltrat l'ovari. Aquesta és una qüestió important que haurà de ser investigada en propers estudis.

Creiem que els efectes observats de l'administració d'LPS no són deguts a l'acció directa de l'LPS sobre les cèl·lules ovàriques, sinó que són deguts als efectes estimuladors de l'LPS sobre cèl·lules immunitàries, ja siguin perifèriques o infiltrades en l'ovari. Com a resposta a l'LPS, les cèl·lules immunitàries produeixen citocines com el $TNF\alpha$, tal com hem demostrat prèviament (MacKenzie *et al.*, 2003; Goetz *et al.*, 2004; MacKenzie *et al.*, 2004), que podrien actuar directament sobre les cèl·lules ovàriques estimulants l'apoptosi. En mamífers, el $TNF\alpha$ té clarament efectes proapoptòtics i és molt probable que en peixos tingui el mateix efecte. Per tant, proposem que els efectes negatius observats com a resultat de l'administració d'LPS són deguts a la secreció de citocines per cèl·lules immunitàries i a l'acció d'aquestes citocines sobre les cèl·lules ovàriques.

AGRAÏMENTS

Aquest estudi ha estat finançat en part per un ajut de la Comisió de Intercambio Cultural, Educativo y Científico entre España y Estados Unidos (Projecte 20055) a J. V. P. i F. W. G.

BIBLIOGRAFIA

- BOBE, J.; GOETZ, F. W. (2001). «Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary». *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 129:475-481.
- BOBE, J.; GOETZ, F. W. (2000). «A tumor necrosis factor decoy receptor homologue is up-regulated in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary at the completion of ovulation». *Biol. Reprod.*, 62:420-426.
- GOETZ, F. W.; ILIEV, D. B.; MCCAULEY, L. A. R.; LIARTE, C. Q.; TORT, L. B.; PLANAS, J. V.; MACKENZIE, S. (2004). «Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-

- stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages». *Mol. Immunol.*, 41:1199-1210.
- KOSKINEN, H.; PEHKONEN, P.; VEHNIAINEN, E.; KRASNOV, A.; REXROAD, C.; AFANASYEV, S.; MOLSA, H.; OIKARI, A. (2004). «Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320:745-753.
- KRASNOV, A.; KOSKINEN, H.; PEHKONEN, P.; REXROAD, C. E.; AFANASYEV, S.; MOLSA, H. (2005). «Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress». *BMC Genomics*, 6:3.
- MACKENZIE, S.; LIARTE, C. Q.; ILIEV, D. B.; PLANAS, J. V.; TORT, L.; GOETZ, F. W. (2004). «Identification and characterization of a highly inducible novel CC chemokine from differentiated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages». *Immunogenetics*, 56:611-615.
- MACKENZIE, S.; PLANAS, J. V.; GOETZ, F. W. (2003). «LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages». *Develop. & Comp. Immunol.*, 27:393-400.
- PLANAS, J. V.; ATHOS, J.; GOETZ, F. W.; SWANSON, P. (2000). «Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish». *Biol. Reprod.*, 62:1262-1269.
- ROBERTS, S. B.; LANGENAU, D. M.; GOETZ, F. W. (2000). «Cloning and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 from the brook trout ovary». *Mol. Cell. Endocrinol.*, 160:89-97.