

Quantificação do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em fêmeas bovinas *Bos taurus indicus*

Mariana Ianello GIASSETTI¹
 Eduardo Oliveira PONTES¹
 Claudia NIEMEYER¹
 Adriano Felipe Perez SIQUEIRA¹
 Filipe FEDOZZI¹
 Marcelo Cardoso LIMA²
 Vanessa Belentani MARQUES²
 Claudia Maria BERTAN³
 Maria Angélica MIGLINO²
 Rubens Paes ARRUDA¹
 Paula Carvalho PAPA²
 Mario BINELLI¹

1 - Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP
 2 - Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP
 3 - Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e do Embrião da Faculdade de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Dracena-SP

Correspondência para:

Av. Duque de Caxias Norte, 225;
 13635-900, Cx Postal 23, Pirassununga-
 SP; binelli@usp.br

Recebido para publicação: 24/07/2007
 Aprovado para publicação: 28/08/2008

Resumo

Durante o período crítico do reconhecimento materno, compreendido entre o 15º e 19º dias da gestação, o conceito deve sintetizar competentemente moléculas capazes de bloquear a síntese de prostaglandina F2 α (PGF2 α) e a luteólise. Em bovinos, a principal macromolécula protéica envolvida em tal bloqueio é o interferon-tau (IFN- τ). Durante o período crítico, falhas neste reconhecimento determinam à mortalidade embrionária em até 40% das fêmeas inseminadas. Informações sobre o IFN- τ em animais *Bos taurus indicus*, ainda são restritas. Este estudo objetivou uma avaliação quantitativa do IFN- τ durante o período crítico do reconhecimento materno, em lavados uterinos obtidos por sonda de Foley (dias 14, 16 e 18 pós-estro) ou *post-mortem* (dia 18 pós-estro). Para tanto, foram utilizadas fêmeas multíparas azebuadas (*Bos taurus indicus*), cíclicas ou prenhes, nos dias 14, 16 e 18 pós-estro. Para a obtenção dos lavados, os úteros foram infundidos com solução de Ringer Simples. Os lavados foram concentrados por ultra-filtração e liofilizados. As macromoléculas protéicas foram separadas por Eletroforese Unidimensional SDS-PAGE, em gel com 15% de poliácridamida. A quantificação do IFN- τ nos lavados uterinos foi realizada por Western-Blotting e densitometria. Tanto nos lavados obtidos por sonda de Foley quanto nos *post-mortem* foi possível observar bandas de proteínas que apresentaram reação cruzada com os anticorpos utilizados no Western-Blotting. O IFN- τ foi detectado apenas nos lavados uterinos *post-mortem* de vacas prenhes (P<0,05). A densidade óptica não foi afetada pelo dia do período crítico, estado (cíclico ou prenhe) ou interação dia x estado. Nos lavados *post-mortem* não houve efeito de peso do conceito ou concentração de progesterona plasmática no dia do lavado na densidade da banda protéica referente ao IFN- τ . Concluiu-se que a detecção e quantificação do IFN- τ no ambiente uterino de vacas azebuadas, nestas condições experimentais, é possível apenas em lavados uterinos obtidos *post-mortem*.

Palavras-chave:

Ambiente Uterino.
 IFN- τ .
 Western-Blotting.
 Prenhez.
 Bovino.

Introdução

Cerca de 40% da mortalidade embrionária em bovinos ocorre entre os dias 8 e 17 da gestação^{1,2,3}, período considerado crítico para a manutenção da gestação. Para

que a prenhez seja mantida, o conceito deve sinalizar competentemente sua presença ao endométrio materno, sintetizando macromoléculas protéicas, que determinam o bloqueio da síntese de PGF2 α e a luteólise. Esta sinalização estabelece o reconhecimento

materno da prenhez⁴. Diversas proteínas são responsáveis por tal sinalização, sendo o interferon-tau (IFN- τ) a principal.⁵

O IFN- τ é uma glicoproteína que apresenta 172 aminoácidos e uma massa molecular que varia entre 22 a 24 KDa, considerando suas múltiplas isoformas.⁴ A expressão de IFN- τ foi aumentada em um curto período, compreendido anteriormente à implantação.^{4,6} Sua expressão protéica tornou-se crescente durante o período crítico, sendo máxima no 17º dia da gestação.⁷ A expressão de RNAm para IFN- τ foi identificada no trofoblasto até o 25º dia de gestação.⁷

Kazemi et al.⁸ utilizaram anticorpo anti interferon-tau ovino (o IFN- τ) para detectarem IFN- τ , em amostras de lavados uterinos de vacas prenhes entre os dias 15 e 25 da gestação, pela técnica de Western-Blotting. Klemann et al.⁹ descreveram a produção e purificação de IFN- τ bovino recombinante (rb IFN- τ) e sua identificação por Western-Blotting utilizando anticorpos anti-rbIFN produzidos em coelhos.

A detecção de IFN- τ em lavados uterinos de vacas *Bos taurus taurus* prenhes, pelo método de lavagem uterina *post-mortem*, foi relatada previamente.⁸ Entretanto, até o momento o mesmo não foi realizado em vacas *Bos taurus indicus*. Em complemento, a utilização do método de lavagem uterina por sonda Foley *in vivo*, para a detecção de b IFN- τ , não foi reportada em fêmeas bovinas.

O presente trabalho objetiva a identificação e quantificação protéica de IFN- τ em lavados uterinos, obtidos *post-mortem* ou através de sonda do tipo Foley *in vivo*, pela técnica de Western-Blotting, durante o período crítico da gestação em fêmeas *Bos taurus indicus*.

Material e Método

Os procedimentos utilizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. No presente

estudo foram utilizadas fêmeas bovinas (n=77) com no mínimo $\frac{3}{4}$ de sangue zebuínio (*Bos taurus indicus*), múltíparas, não lactantes e em dias aleatórios do ciclo estral. As fêmeas foram mantidas em piquetes (*Brachiaria decumbens*) e receberam sal mineral e água *ad libitum*.

No experimento 1, fêmeas tiveram os estros sincronizados (n=49) pela aplicação intramuscular de 530 μ g de Cloprotenol Sódico (Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico - São Paulo, Brasil). A observação dos estros foi realizada duas vezes ao dia, das 6h às 7h e das 18h às 19h. Doze horas após a observação dos estros, as fêmeas foram divididas aleatoriamente em dois grupos, para serem (n=34) ou não (n=15) submetidas à inseminação artificial. Foram utilizadas 34 fêmeas no grupo submetido à inseminação artificial, pelo fato de serem admitidas taxas de concepção em torno de 50%, o que supostamente determinaria um número de fêmeas prenhes semelhante ao número de não prenhes que seriam submetidas à lavagem uterina. Para a inseminação das fêmeas, utilizou-se o sêmen de um touro da raça Simental, descongelado de uma mesma partida, com as características seminais (Motilidade 75%, Vigor 2, Concentração 287,5 x 10⁶ espermatozoides/cm³ e 20% de Alterações Morfológicas Totais). Os lavados uterinos de vacas não inseminadas foram obtidos nos dias 14 (n=4), 16 (n=4) e 18 (n=4) após o estro. Também foram obtidos lavados uterinos de vacas prenhes nos dias 14 (n=4), 16 (n=4) e 18 (n=4) após o estro. Os animais inseminados foram diagnosticados prenhes pela presença do concepto ou de seus fragmentos no lavado uterino. Para a obtenção dos lavados uterinos *in vivo*, os animais foram submetidos a uma anestesia epidural, tendo recebido 2mL de Lidocaína 2% (Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico, São Paulo, Brasil). Em seguida, utilizou-se uma sonda de Foley Siliconizada, no 24, com 8mm de diâmetro (Rush®), via transcervical, alojada no corpo uterino. Utilizou-se um sistema de mangueira Y, para infundir um volume total de 250mL

de Ringer a 37°C. Porções de 50mL de Ringer foram infundidas e recuperadas por gravidade em frascos de vidro (500mL) mantido a 4°C. Este procedimento de infusão e recuperação da solução infundida foi repetido cinco vezes para cada vaca. Os lavados uterinos foram agrupados por vaca e centrifugados a 3000 x g, a 4°C, durante 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante do material foi removido e armazenado a -20°C.

No experimento 2, fêmeas bovinas (n=28) tiveram os estros sincronizados pela aplicação de 2mg de Benzoato de Estradiol (Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico - São Paulo, Brasil) associada à colocação de um implante auricular contendo Progestágeno (Crestar® - Intervet, México). O dia da colocação do implante foi considerado o D0 do protocolo de tratamento. No D8, os animais tiveram os implantes removidos e receberam 530µg de Cloprostenol Sódico (Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico - São Paulo, Brasil). No D9, as vacas receberam 1mg de Benzoato de Estradiol (Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico - São Paulo, Brasil), para a sincronização das ovulações. No D10, as fêmeas foram divididas aleatoriamente para serem (n=22) ou não (n=6) submetidas à inseminação artificial. Foram mantidas no experimento, apenas as fêmeas que ovularam em resposta ao protocolo utilizado. Para a verificação das ovulações, no D9 e D11, todos os animais tiveram os ovários examinados por ultrasonografia (Aloka, Modelo SSD-500, Sonda Transretal 7.5MHz). Considerou-se como fêmeas ovuladas as vacas que apresentaram no D9 ao menos um folículo > 9mm, que desapareceu no D11. As fêmeas inseminadas (n=12) e não inseminadas (n=5) mantidas no experimento, no dia 18 pós-estro, foram abatidas no Matadouro Escola da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga. Após o abate, foi realizada a abertura da cavidade abdominal e do assoalho do acetábulo para a identificação do aparelho reprodutor. Imediatamente após a

localização do útero, a cérvix foi ocluída na porção caudal do corpo do útero, com o auxílio de uma pinça tipo Rochester. O sistema genital foi removido, acondicionado a 4°C e imediatamente transportado ao laboratório. No laboratório, as estruturas ovarianas foram observadas macroscopicamente para a identificação do corno uterino ípso e contra-lateral ao corpo lúteo. Com o auxílio de uma seringa de 20mL acoplada a uma agulha de 18G, foram injetados 20mL de Ringer Simples no lúmen uterino. A agulha foi introduzida na extremidade cranial do corno uterino contra-lateral ao corpo lúteo. Tal extremidade foi seccionada e o lavado uterino e/ou concepto recuperados em Placa de Petri. Foram consideradas prenhes, as vacas das quais se obteve um concepto e/ou seus fragmentos. Os lavados uterinos de cada vaca foram agrupados e centrifugados a 3000 x g, a 4°C, durante 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e armazenado a -20°C.

As macromoléculas presentes nos lavados foram concentradas por ultrafiltração, utilizando-se filtros Centricon Plus-20 (Millipore Corporation - EUA), contendo membranas para exclusão de moléculas com peso molecular inferior a 10kDa. As amostras concentradas foram ressuspensas em água ultrapura e submetidas à nova centrifugação. Em seguida a concentração de proteínas totais, contidas nas amostras obtidas de cada ultracentrifugado, foi determinada pelo Método de Bradford¹⁰. As amostras foram então alíquotadas, de maneira que contivessem 50µg de proteína total em cada microtubo de 1,5mL. Estas amostras foram liofilizadas, com a utilização da Bomba de Vácuo Vacuumtechnick (Marca Vacubrand®) e armazenadas a -20°C.

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em Solução de Laemmli e submetidas à separação por Eletroforese Unidimensional em gel SDS-PAGE com 15% de policriamida e 1mm de espessura. Em cada gel, foi aplicado em um poço 0,001µg de Interferon-tau bovino

recombinante (rbIFN- τ), como controle positivo.

Cada amostra, contendo 50 μ g de proteína total, foi submetida à corrida em duplicata. Em seguida, um dos géis foi corado com Comassie-Blue e o outro teve prosseguida a técnica de Western-Blotting. O gel corado foi digitalizado pelo programa LabScan V 5.0 e as imagens analisadas pelo programa ImageMaster V 4.01. Em cada amostra, a somatória das densidades ópticas de todas as bandas identificadas (Densidade Óptica Total; DOT) foi calculada e utilizada conforme descrito posteriormente. As proteínas contidas no gel não corado foram transferidas para uma membrana de Polivinil Hybond-P (Amersham Biosciences[®]) pelo método semi-seco (Hoefer TE 77, Amersham Biosciences[®]). Ao final da transferência, as membranas foram coradas com Ponceau-S (0.2% em solução de 10% de ácido acético em água) para verificar a presença de proteínas transferidas nas membranas. A seguir, as membranas foram lavadas quatro vezes consecutivas, a primeira lavagem com duração de 15 minutos, e as três lavagens seguintes com duração de 5 minutos/cada. Estas lavagens foram realizadas em solução contendo 0.01M de Tris-Base (Fisher Biotech[®] - EUA), 0.15M de NaCl (Fisher Biotech[®] - Austrália) e 0.001M de Tween-20 (Fisher Biotech[®] - TBST). Em seguida, foi realizado o bloqueio "over-night", por incubação em solução de 5% leite desnatado em pó em TBST, a 4°C. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas com uma solução de anticorpo anti-IFN- τ bovino (Doado pelo Dr. Michael Roberts, University of Missouri), diluído (1:2.000) em solução de 5% de leite em pó desnatado durante 2 horas a 4°C. Após a incubação as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a peroxidase Horseradish em uma diluição de 1:33.000 em TBST por 1 hora a 4°C (ECL Plus Western-Blotting Reagent Pack, GE Healthcare[®]). Após a incubação das membranas com anticorpo secundário, as mesmas foram lavadas quatro vezes em

TBST. Verificou-se a marcação de proteínas por quimiluminescência (ECL Plus Western-Blotting Detection System, GE Healthcare[®]), segundo orientações do fabricante.

As imagens obtidas em filme radiográfico (Kodak[®]) foram digitalizadas em Scanner ImageScanner (Amersham Biosciences[®]) com o auxílio do Programa LabScan V5.0 (Healthcare[®]). As imagens digitalizadas, foram analisadas pelo emprego do Programa ImageMaster 1D V4.1. Estimou-se o peso molecular e a densidade óptica de cada banda (Densidade Absoluta). A densidade relativa de cada banda foi calculada dividindo-se a densidade absoluta pela DOT da amostra respectiva.

Amostras de sangue foram coletadas de todas as fêmeas nos respectivos dias dos lavados, por venopunção da veia sacral mediana, e depositados em tubos de vidro 16 x 100mm, contendo 350 μ l de solução de Citrato de Sódio 30%. Após a coleta as amostras foram mantidas a 4°C e rapidamente centrifugadas a 3000 x g, durante 30 minutos, a 4°C. Após a hemossedimentação, o plasma foi removido, acondicionado em microtubos e armazenado a -20°C. Posteriormente, as concentrações plasmáticas de progesterona foram mensuradas pela técnica de Radioimunoensaio, segundo a técnica descrita por Badinga et al.¹¹ e modificada por Carrière e Lee¹². Para a mensuração das amostras foram necessários dois ensaios. Os coeficientes intra-ensaio para referências com baixa concentração (1,25ng/mL) foram de 6,4 e 2,73%; para média concentração (6,46ng/mL) de 4,27 e 1,8% e para alta concentração (9,68ng/mL) de 2,53 e 5,2%. Para as referências com baixa, média e alta concentração de progesterona os coeficientes inter-ensaios foram 4,6%; 3,05% e 3,9%, respectivamente.

A densidade óptica relativa e absoluta de cada banda protéica foi analisada por análise de variância (ANOVA), utilizando-se o software SAS[®] 9.1. No experimento 1, foram consideradas variáveis independentes o dia pós-estro, estado reprodutivo (animais não inseminados ou prenhes) e da interação

dia x estado. No Experimento 2, considerou-se como variável independente o efeito do estado reprodutivo. Os resultados foram apresentados como média aritmética + erro padrão da média. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Experimento 1. A taxa de presença de conceptos (número de lavados com conceito/número de vacas inseminadas) foi de 47%. A concentração de progesterona plasmática foi superior a 1ng/ml para todos os animais que participaram do experimento. O controle positivo (0,001 μ g de rbIFN- τ) foi visualizado em todas as imagens obtidas por quimiluminescência, sendo sempre observadas duas bandas, que apresentaram respectivamente 19kDa e 15kDa de peso molecular médio. Bandas protéicas de diferentes pesos moleculares apresentaram reação cruzada ao anticorpo anti-bIFN- τ (Figura 1). De acordo com a média de seu peso molecular as bandas protéicas foram denominadas de: PF152, PF158, PF108, PF71, PF52, PF39, PF32, PF28, PF22, PF18, PF16 e PF9. No presente estudo, não houve efeito do dia (14,16 e 18 pós-estro), estado (cíclica e prenhe) ou da interação dia x estado nos lavados obtidos via Foley ($P>0,05$) na

densidade óptica dessas bandas protéicas (Tabela 1).

Experimento 2. A taxa de ovulação (número de animais que ovularam/número de animais submetidos ao protocolo de sincronização da ovulação) foi de 73%. A taxa de presença de conceito (número de animais que continham conceito/número de animais inseminados) foi de 27%. A concentração de progesterona plasmática foi superior a 1ng/ml para todos os animais que participaram do experimento no dia de abate. Nos lavados uterinos *post-mortem* com a prenhez confirmada foi observada a presença de bIFN- τ com um peso molecular médio de 22KDa e uma DOR média de 0,11 + 0,04 (Tabela 2). No presente estudo, verificou-se haver efeito do estado ($P<0,05$), sendo a densidade óptica da banda protéica correspondente ao bIFN- τ maior para lavados de vacas prenhes que de vacas não inseminadas (Figura 2). Em 33,3% (n=2) dos lavados *post-mortem* prenhes analisados não houve a detecção de bIFN- τ . A concentração protéica total, a densidade óptica absoluta do bIFN- τ dos lavados *post-mortem* e a concentração plasmática de progesterona foram descritas na tabela 3. Não houve correlação ($P>0,05$) entre a densidade óptica absoluta do bIFN- τ dos

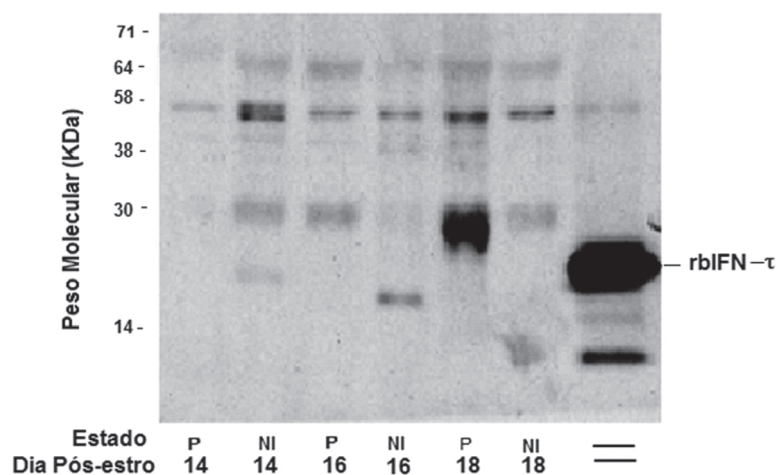


Figura 1 - Imagem digitalizada representativa de Western-Blotting para a detecção de IFN- τ em lavados uterinos obtidos por sonda de Foley nos dias 14, 16 e 18 pós-estro em vacas não inseminadas (NI) e prenhes (P). O rbIFN- τ (0,001 μ g) foi utilizado como controle positivo

Tabela 1 - Médias \pm erro padrão da média e análise de variância das densidades ópticas relativas de proteínas identificadas após Western-Blotting de lavados uterinos obtidos por sonda de Foley nos dias: 14 (D14), 16(D16) e 18 pós-estro (D18) de vacas não inseminadas (NI) ou prenhes (P)

Proteína	D14		D16		D18		P<F		
	NI	P	NI	P	NI	P	Estado	Dia	Estado X Dia
PF152	3,76 10 ⁶ ±1,92 10 ⁶	0,00	6,89 10 ⁻⁶ ± 4,02 10 ⁴	5,18 10 ⁴ ± 2,63 10 ⁴	7,60 10 ⁴ ± 7,27 10 ⁴	7,37 10 ⁴ ± 7,37 10 ⁴	0,67	0,56	0,94
PF158	0,00	0,00	2,885 10 ⁴ ± 2,885 10 ⁴	0,00	3,64 10 ⁴ ± 3,64 10 ⁴	3,39 10 ⁴ ± 3,39 10 ⁴	0,63	0,41	0,84
PF108	0,00	0,00	1,45 10 ⁴ ± 1,45 10 ⁴	0,00	0,00	2,37 10 ⁴ ± 2,37 10 ⁴	0,73	0,55	0,22
PF71	0,00	3,36 10 ⁶ ± 3,36 10 ⁶	1,52 10 ⁴ ± 1,52 10 ⁴	1,16 10 ⁴ ± 1,16 10 ⁴	0,00	3,104 10 ⁴ ± 3,10 10 ⁴	0,21	0,98	0,57
PF52	8,00 10 ⁶ ± 4,94 10 ⁶	3,32 10 ⁶ ± 2,29 10 ⁶	0,11 10 ⁴ ± 4,00 10 ⁴	7,44 10 ⁴ ± 4,56 10 ⁴	1,11 10 ⁴ ± 4,73 10 ⁴	0,10 10 ⁻⁶ ± 5,93 10 ⁻⁶	0,40	0,52	0,90
PF39	0,33 10 ⁻⁶ ± 0,1510 ⁻⁶	0,17 10 ⁶ ± 0,57 10 ⁶	0,31 10 ⁴ ± 6,87 10 ⁴	0,20 10 ⁴ ± 4,32 10 ⁴	0,44 10 ⁻⁶ ± 0,13 10 ⁻⁶	0,27 10 ⁴ ± 0,13 10 ⁴	0,12	0,59	0,96
PF32	4,64 10 ⁶ ± 2,39	4,52 ⁴ ± 2,92 10 ⁴	6,29 10 ⁴ ± 2,64 10 ⁴	3,18 10 ⁴ ± 1,20 10 ⁴	6,19 ± 3,00	8,12 10 ⁴ ± 1,98 10 ⁴	0,84	0,52	0,61
PF28	0,00	0,00	1,52 10 ⁴ ± 5,2 10 ⁴	0,00	0,00	2,69 10 ⁴ ± 2,69 10 ⁴	0,70	0,54	0,23
PF22	0,17 10 ⁶ ± 0,43 10 ⁶	7,55 10 ⁴ ± 4,41 10 ⁴	0,01 10 ⁴ ± 5,26 10 ⁴	0,14 10 ⁻⁶ ± 3,38 10 ⁻⁶	0,17 10 ⁴ ± 5,50 10 ⁴	0,54 10 ⁴ ± 0,43 10 ⁴	0,55	0,34	0,38
PF18	3,07 10 ⁶ ± 1,81 10 ⁶	0,97 10 ⁴ ± 0,97 10 ⁴	0,00	0,00	1,01 10 ⁴ ± 1,01 10 ⁴	8,36 10 ⁴ ± 83,61 10 ⁴	0,35	0,40	0,44
PF16	0,00	0,00	6,07 10 ⁴ ± 6,07 10 ⁴	0,00	1,98 10 ⁴ ± 1,98 10 ⁴	0,00	0,22	0,51	0,51
PF9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26 10 ⁻⁶ ± 1,26 10 ⁻⁶	0,31	0,34	0,34

Tabela 2 - Médias \pm erro padrão da média e análise de variância das densidades ópticas relativas (D.O.R.) de proteínas identificadas após Western-Blotting de lavados uterinos obtidos *post-mortem* no dia 18 pós-estro (D18) de vacas não inseminadas (NI) ou prenhes (P).

Proteína	D.O. R		P<F
	NI	P	
PP135	8,33 10 ³ ± 6,00 10 ³	3,88 10 ³ ± 3,13 10 ³	0,50
PP107	0	26,71 10 ³ ± 19,10 10 ³	0,30
PP87	0	44,85 10 ³ ± 28,69 10 ³	0,24
PP66	5,02 10 ³ ± 5,02 10 ³	35,05 10 ³ ± 16,35 10 ³	0,19
PP55	0	35,05 10 ³ ± 16,35 10 ³	0,24
PP48	13,66 10 ³ ± 8,077 10 ³	7,96 10 ³ ± 4,37 10 ³	0,52
PP38	8,58 10 ³ ± 5,46 10 ³	18,20 10 ³ ± 9,60 10 ³	0,47
PP33	0,21 10 ³ ± 0,21 10 ³	0	0,24
PP27	5,72 10 ³ ± 0,43 10 ³	0,89 10 ³ ± 0,89 10 ³	0,22
PP22	0	115,86 10 ³ ± 41,09 10 ³	0,05
PP17	2,04 10 ³ ± 2,04 10 ³	35,08410 ³ ± 25,86 10 ³	0,34
PP13	2,25 10 ³ ± 2,24 10 ³	0	0,24

lavados *post-mortem* e a concentração plasmática de progesterona. Nos lavados *post-mortem*, as proteínas presentes estavam visualmente em menor intensidade do que nos lavados via Foley, sendo que a presença das proteínas foi maior nos lavados em que bIFN- τ foi identificado (Figura 3). As demais proteínas que apresentaram reação cruzada tiveram seus pesos moleculares determinados sendo, respectivamente, denominadas: PP135, PP107, PP87, PP66; PP55; PP48; PP38; PP33; PP27; PP17 e PP13 (Figura 3). Nos lavados *post-mortem* não houve efeito de estado na densidade óptica das bandas protéicas que apresentaram reação cruzada ($P>0,05$; Tabela 3).

Discussão

Durante o presente estudo, foram detectadas bandas correspondentes ao controle positivo (rbIFN- τ) em todos os géis. As bandas detectadas nas amostras de controle positivo apresentaram um peso molecular médio de 19 e 15KDa, distribuição semelhante à apresentada por Davidson et al.¹³, Ealy et al.⁷ e Michael et al.¹⁴.

Não foi possível a visualização do bIFN- τ em lavados uterinos obtidos por Foley. A presença de bIFN- τ foi determinada apenas em lavados uterinos obtidos de vacas gestantes *post-mortem*, pois as concentrações da proteína foram

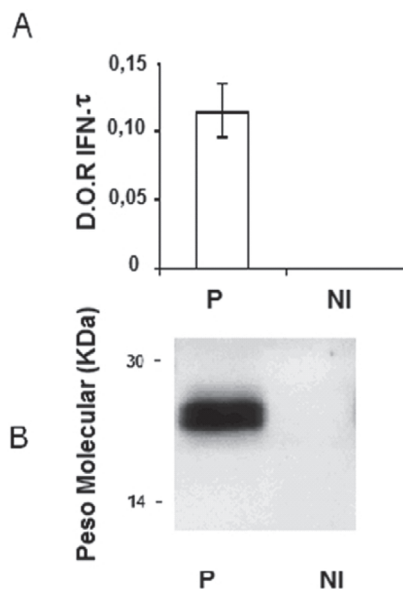


Figura 2 - A) Média e erro padrão das densidades ópticas relativas do IFN- τ (D.O. R. IFN-t) em lavados obtidos de vacas prenhes (P) e não inseminadas (NI) no dia 18 pós-estro por lavagem *post-mortem*. B) Figura representativa da detecção de quimiluminescência em filme radiográfico da presença de bIFN-t em lavados *post-mortem* de vacas prenhes (P) e não inseminadas (NI)

superiores ao limiar de sensibilidade do teste, utilizando as mesmas concentrações de anticorpos primário e secundário, Pontes et al.¹⁵ conseguiram estabelecer o limiar mínimo de 10pg para a detecção do teste. Verificou-se uma alta concentração de bIFN- τ nas amostras, possivelmente pelo fato das

lavagens terem sido realizadas um dia após ter ocorrido a máxima expressão da proteína pelo trofoblasto.⁷ A ausência de bIFN- τ em 33% dos lavados uterinos *post-mortem* analisados, pode ser explicada pela incapacidade do concepto recuperado em expressar bIFN- τ ou pela mortalidade embrionária precoce. A taxa de lavados em que não se verificou a presença de bIFN- τ está dentro dos padrões de mortalidade embrionária.^{1,2,3}

No presente estudo, não foi possível observar bandas protéicas referentes ao bIFN- τ em nenhum dos lavados obtidos por sonda Foley de vacas prenhes com a gestação confirmada pela visualização do concepto. Considerando que a banda referente ao controle positivo, foi evidenciada em todas as reações, sugere-se que o método de detecção utilizado foi eficaz, e exclui-se a possibilidade de falhas técnicas. Dessa forma, a ausência de bIFN- τ pode ser decorrente da degradação da proteína durante o processamento das amostras ou da baixa concentração de bIFN- τ nas amostras, em concentração inferior ao limiar de sensibilidade do teste. Como as amostras de lavados *post-mortem* e por sonda de Foley foram submetidas ao mesmo processamento, a perda de bIFN- τ durante a ultrafiltração e liofilização não é uma hipótese provável. Especula-se que nos

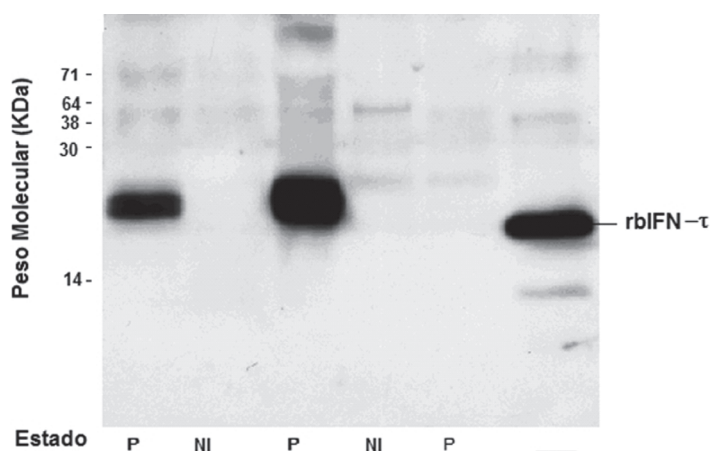


Figura 3 - Imagem digitalizada representativa de Western-Blotting para a detecção de bIFN- τ em lavados uterinos obtidos *post-mortem* no dia 18 pós-estro em vacas não inseminadas (NI) e prenhes. O rblFN- τ (0,001 μ g) foi utilizado como controle positivo

Tabela 3 - Densidade ótica relativa da banda referente ao bIFN- τ (D.O.R. bIFN- τ), o peso do concepto (P.C.) e concentração plasmática de progesterona no dia do lavado (P4) de vacas submetidas a lavagens uterinas *post-mortem*.

Vaca	D.O.R. bIFN- τ (pixels)	P.C.(g)	P4 (ng/ul)
1	0,12	0,596	13,44
2	0,14	0,321	15,01
3	0	0,713	4,24
4	0,25	0,557	*
5	0,17	0,424	14,79
6	0	0,63	2,23

* O sangue coletado referente à vaca 4 foi perdido durante o processo de centrifugação, impossibilitando a mensuração de progesterona plasmática.

lavados obtidos por sonda de Foley tenha sido desencadeada a migração de proteínas séricas para o lúmen uterino, diluindo as proteínas uterinas e do concepto. Dessa forma, a redução da concentração relativa do bIFN- τ para valores menores que o limiar de detecção do ensaio pode ter impedido sua detecção. Não foram detectadas bandas protéicas referentes ao bIFN- τ em dois dos seis lavados obtidos *post-mortem* de vacas gestantes. Tal fato pode refletir a inabilidade daqueles conceptos de produzirem bIFN- τ em quantidades suficientes para a detecção pelo teste aqui utilizado. Ainda, interpreta-se a partir de tal achado que a presença física do concepto não garante que este possua habilidade de secretar bIFN- τ nem de estimular os mecanismos necessários à manutenção da gestação.

Assim como em Davidson et al.¹³, identificaram-se bandas que apresentaram reação cruzada em ambos experimentos. Verificou-se não haver efeito de dia, estado ou da interação dia x estado na densidade ótica dessas proteínas. Dessa forma, essas proteínas devem fazer parte do microambiente uterino tanto de vacas cíclicas como prenhes e, portanto, não serem relacionadas ao bIFN- τ . Essa informação é consistente com dados não publicados¹⁵, obtidos por eletroforese e coloração de proteínas de lavados uterinos obtidos por sonda de Foley e *post-mortem*. De forma análoga, no presente

estudo, não houve efeito de estado reprodutivo ou dia pós-estro na densidade ótica das proteínas presentes nos lavados.

Conclusão

A detecção de bIFN- τ por Western-Blotting ocorreu apenas em lavados uterinos obtidos *post-mortem* no 18º dia da gestação. Não foi possível a detecção e quantificação de bIFN- τ por Western-Blotting em lavados uterinos obtidos pela utilização da sonda de Foley em vacas comprovadamente prenhes durante o período crítico da gestação (dias 14, 16 e 18 pós-estro). Assim, lavados uterinos obtidos por via de Foley não podem substituir lavados uterinos *post-mortem* para a quantificação bIFN- τ por Western-Blotting durante o período crítico da gestação.

Agradecimentos

À FAPESP pelo auxílio financeiro; ao Prof. Dr. R. Michael Roberts da Universidade de Missouri; à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP, em especial ao Hospital Veterinário, à Prefeitura do Campus Administrativo, aos Docentes e Funcionários do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal e aos integrantes do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.

Quantification of interferon-tau during the maternal recognition of pregnancy in *Bos taurus indicus* cows

Abstract

During the critical period of the maternal recognition, which occurs between days 15 and 19 of pregnancy, the conceptus must competently synthesize molecules capable of blocking the synthesis of prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) and luteolysis. In cattle, the major macromolecule involved in suck blockage is the protein interferon-tau (IFN- τ). During the critical period, failures in the recognition of pregnancy determine embryonic mortality on up to 40% of inseminated cows. Data about IFN- τ in *Bos taurus indicus* are still scarce. Objective of this study was to quantitatively evaluate the presence of IFN- τ during the critical period for maternal recognition of pregnancy in uterine flushings obtained *in vivo* by Foley catheter (Days 14, 16 and 18 post estrus) or *post-mortem* (Day 18 post estrus). Multiparous, cyclic or pregnant zebu cows (*Bos taurus indicus*) on days 14, 16 and 18 post estrus were used for *in vivo* or *post mortem* uterine flushing collection. In both cases, a Ringer solution was used to wash the uterus of cows. Uterine flushings were concentrated by ultrafiltration and lyophilized. Proteins were separated by one-dimensional electrophoresis (SDS-PAGE) in a 15% polyacrilamide gel. Interferon-tau quantification in uterine flushings was performed by western blotting and densitometry. Non-specific protein bands were observed in both *in vivo* and *post mortem* uterine flushings. Interferon-tau was detected only in uterine flushings obtained from pregnant cows *post-mortem* (P<0.05). Optical density of protein bands was not affected by the day of the critical period, state (cyclic or pregnant) or interaction day x state. There was no effect of the conceptus weight or progesterone concentration on the day of uterine flushing collection in the optical density of the IFN- τ protein band. It was concluded that the detection and quantification of IFN- τ in the uterine environment of zebu cows, in these experimental conditions, is only possible in uterine flushings obtained *post-mortem*.

Key words:

Uterine environment.
IFN- τ .
Western-Blotting.
Pregnancy.
Bovine.

Referências

- 1 DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 463-468, 1980.
- 2 HUMBLLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1417-1433, 2001.
- 3 THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interaction and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435-1450, 2001.
- 4 DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 41-49, 2001.
- 5 WOLF, E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPANIER, R.; FROHLICH, T.; HERRLER, A.; HINDLEDER, S.; KOLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H-D; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F. Embryo-maternal communication in bovine: strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p.276-289, 2003.
- 6 BARTOL, F. F.; ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W.; LEWIS, G. S.; GODKIN, J. D.; THACHER, W. W. Characterizaion of proteins produced in vitro by periattachment bovine conceptus. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 681-693, 1985.
- 7 EALY, A. D.; LARSON, S. F.; LIU, L.; ALEXENKO, A. P.; WINKELMAN, G. L.; KUBISCH, H. M.; BIXBY, J. A.; ROBERTS, R. M. Polymorphic forms of expressed bovine interferon-tau genes: relative transcript

- abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. **Endocrinology**, v. 142, n. 7, p. 2906-2915, 2001.
- 8 KAZEMI, M.; MALATHY, P. V.; KEISLEIR, D. H.; ROBERTS, R. M. Ovine trophoblast protein-1 and bovine trophoblast protein-1 are present as specific components of uterine flushings of pregnant ewes and cows. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 457-463, 1988.
- 9 KLEMANN, S. W.; LI, J.; IMAKAWA, K.; CROSS, J. C.; FRANCIS, H.; ROBERTS, R. M. The bovine trophoblastic factor I. **Molecular Endocrinology**, v. 4, n. 10, p. 1506-1511, 1990.
- 10 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- 11 BADINGA, L.; DRIANCOURT, M. A.; SAVIO, J. D.; WOLFENSON, D.; DROST, M.; DE LA COSTA, R. L.; THATCHER, W. W. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 5, p. 871-883, 1992.
- 12 CARRIÈRE, P. D.; LEE, B. Direct Radioimmunoassay of progesterone in bovine plasma using danazol (17- α -2,4-pregnadien-20-yno(2,3-d)isoxazol-17-ol) as a displacing agent. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 58, n. 3, p. 230-233, 1994.
- 13 DAVIDSON, J. A.; WRIGHT, D. J.; ARCHBALD, L. F.; KLAPSTEIN, S. L.; GOTTSBALL, S. L.; HANSEN, P. J. Effects of induced pyometra on luteal lifespan and uterine fluid concentration of prostaglandins and interferons on the cow. **Theriogenology**, v. 45, n. 2, p. 459-470, 1995.
- 14 MICHAEL, D. D.; ALVAREZ, I. D.; OCO'N, O. M. POWELL, A. M.; TALBOT, N. C.; JOHNSON, S. E.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor-2 is expressed by the bovine uterus and stimulates interferon- production in bovine trophoderm. **Endocrinology**, v. 147, n. 7, p. 3571-3579, 2006.
- 15 PONTES, E. O. P.; GIASSETTI, M. I.; SIQUEIRA, A. F. P.; NIEMEYER, C.; FEDOZZI, F.; LIMA, M.; MARQUES, V.; BERTAN, C. M.; PAPA, P. C.; MIGLINO, M. A.; BINELLI, M. Detection of bovine interferon-tau in biological fluids. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2007. Submetido.