

Duarte, K.M.R., Pires, R.M.L., Gomes, L.H., et al. Resposta imunológica de vacas Nelore e Caracu superovuladas com FSHp injetado por via subcutânea. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 39, Art#377, Out1, 2008.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Disponível em: <<https://doi.org/10.31533/pubvet.v02n10a377>>.

Resposta imunológica de vacas Nelore e Caracu superovuladas com FSHp injetado por via subcutânea

Keila Maria Roncato Duarte¹, Rita Maria Ladeira Pires¹, Luiz Humberto Gomes²,
Sálvio Rodolfo Pereira Nogueira³

¹ Pesquisador Científico - Centro de P&D Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia-APTA, Nova Odessa-SP, 13460-000, Brasil.

² Biólogo - Departamento de Genética, ESALQ/USP. Av. Pádua Dias, 11 Piracicaba, SP 13418-900

³ Médico Veterinário - estagiário do Centro de P&D Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia-APTA, Nova Odessa-SP.

Resumo

O uso de biotécnicas para aprimoramento da reprodução em bovinos pode afetar o desempenho da técnica em si quando utiliza hormônios de origem diferente do animal em questão. No caso da superovulação, o uso de FSP de origem porcina pode levar a resposta imunológica dos animais superovulados. Neste trabalho, anticorpos policlonais contra FSHp foram produzidos em coelhas e testados em fêmeas bovinas para quantificação de anticorpos produzidos após esquemas de superovulação. Embora as vacas apresentassem

Duarte, K.M.R., Pires, R.M.L., Gomes, L.H., et al. Resposta imunológica de vacas Nelore e Caracu superovuladas com FSHp injetado por via subcutânea. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 39, Art#377, Out1, 2008.

anticorpos contra FSHp, esta resposta imunológica não interferiu na produção de corpos lúteos e produção de embriões viáveis.

Immunological response of Caracu cows superovulated with pFSH injected by subcutaneous route

Abstract

The use of bio techniques to improve bovine reproduction can affect the technique performance itself when we use hormones extracted from animals different than the animal target. In superovulation procedures, porcine FSH can leads to immunological response by the bovine females. In this work, polyclonal antibodies were raised against pFSH, using rabbits to quantify antibodies produced by the bovine females after superovulation procedure. Although cows did show immunological response to pFSH, such response did not interfere upon corporea lutea production or viable embryos production.

Introdução

Convencionalmente, a indução da superovulação de vacas doadoras de embriões é realizada aplicando por via intramuscular (im) quantidades decrescentes de FSHp, duas vezes ao dia, durante 4 dias. Por outro lado, a injeção única de FSHp, aplicada por via subcutânea (sc) também provoca uma resposta superovulatória próxima à observada com o tratamento im convencional. Considerando que a aplicação sc resulta na absorção lenta do hormônio (de origem suína), a mesma pode induzir uma resposta imunológica que pode tornar refratária a doadora à superovulação subsequente (Martinez et al, 2008). Na área de zootecnia, os imunoensaios podem contribuir, no setor animal, para diagnóstico de doenças, quantificação de proteínas específicas, como calpastatina, leptina, caseína entre outras; marcadores de melhoramento genético, marcadores para qualidade de carne, adulterações em produtos de

Duarte, K.M.R., Pires, R.M.L., Gomes, L.H., et al. Resposta imunológica de vacas Nelore e Caracu superovuladas com FSHp injetado por via subcutânea. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 39, Art#377, Out1, 2008.

origem animal, detecção de mutações, quantificação de hormônios e detecção de contaminantes e substâncias de uso proibido, como anabolizantes, agrotóxicos, antimicrobianos, etc. Na área vegetal, há *kits* disponíveis para a quase totalidade das doenças que afetam as forrageiras e leguminosas, entre outras e uma aplicação cada vez mais crescente no mercado de detecção de transgênicos, onde o sistema imunoenzimático é capaz de verificar a expressão do gene introduzido de forma bastante precoce, antes de ensaios de campo. Outras áreas de aplicação são para averiguar a qualidade de rações, com detecção de todo tipo de contaminante (aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, etc.) e quantificação de aditivos, qualidade da água e solo (resíduos de agroquímicos na cadeia de produção) (DUARTE et al., 2006).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de anticorpos anti-FSHp após duas superovulações consecutivas com FSHp administrado por via sc.

Material e Métodos

Superovulação de Vacas Nelore

Foram utilizadas 07 vacas Nelore apresentando condição corporal uniforme (entre 3 e 4 em uma escala de 5). A sincronização do crescimento folicular foi realizada com progestágeno (CIDR-B, InterAg, New Zealand) e injeção de 2,5 mg benzoato de estradiol (Estrogin, Farmavet). No dia 4, os animais receberam uma injeção sc de 400 UI de FSHp (Pluset, Lab. Calier, Espanha) aplicada atrás da paleta. Na manhã do dia 7 foi aplicada uma injeção im de 150 mcg cloprostenol (Veteglan, Lab. Calier, Espanha) e o CIDR-B foi retirado na tarde. Os animais foram inseminados sistematicamente 48 e 62 horas após a injeção do Veteglan. A resposta ovariana (número de corpos lúteos) e a coleta de embriões foram realizadas sete dias após a inseminação. Esse procedimento foi repetido 60 dias após cada coleta. Amostras de sangue da veia jugular foram coletadas momentos antes de cada superovulação e após

Duarte, K.M.R., Pires, R.M.L., Gomes, L.H., et al. Resposta imunológica de vacas Nelore e Caracu superovuladas com FSHp injetado por via subcutânea. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 39, Art#377, Out1, 2008.

30 dias da segunda superovulação. O soro foi separado por centrifugação e mantido congelado até posterior análise.

Experimento com vacas Caracu

O experimento consistiu na utilização de 4 vacas, 2 com aplicação via IM (Vacas 1 e 2) e 2 com aplicação via SC (Vacas 3 e 4), sendo que os protocolos de superovulação foram segundo metodologia descrita acima. Foi utilizada uma vaca controle, que não recebeu as injeções (vaca 5) Foram coletados soros das vacas superovuladas nos dias 0, 7 e 14.

Produção de anticorpos: anticorpos anti-FSHp foram produzidos com a bioconjugação do FSH segundo Hermanson (1996) com BSA (Albumina bovina, fração V), utilizando o sistema de carbodiimidias. O conjugado foi injetado em fêmeas de coelho Nova Zelândia com 45 dias de idade, com adjuvante Completo de Freund na primeira imunização e com PBS nas imunizações subsequentes, realizadas a cada 15 dias (Duarte et al, 2006). Após 4 imunizações, os coelhos foram sacrificados e o animal que melhor respondeu ao tratamento, teve seu sangue coletado e soro separado por centrifugação. Todos os procedimentos seguiram normas de ética e experimentação animal e protocolos especializados, aprovados pela Comunidade Européia (Duarte, 2007).

Ensaio imunoenzimático: foram utilizados ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA Sanduíche para determinação do soro bovino anti-fsh produzidos pelos animais e PTA-ELISA para quantificação dos soros produzidos nas coelhas. As metodologias estão descritas em Crowther (1995). A curva de calibração foi estabelecida para sensibilidade de 0,1 unidades de FSH por mL de soro, com $R=0,949$. Os dados foram submetidos ao teste F e análise de correlação.

Amostras de soro: Para a detecção dos anticorpos anti-FSH foram coletadas amostras de sangue através da jugular, incubadas durante uma hora a 37 °C para separação do soros e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Os soros foram coletados dos coágulos, aliquotados e armazenados a -20°C. As coletas foram realizadas no dia 0 (zero), início do protocolo de superovulação, dia 7 e dia 15. O período escolhido foi determinado pelo tempo que leva a resposta imune em mamíferos (HARLOW e LANE, 1988).

Resultados e Discussão

Imunização com FSH

As coelhas responderam bem às imunizações com FSH acoplado com BSA. Os soros foram titulados em ELISA-PTA e os resultados podem ser observados na Figura 1.

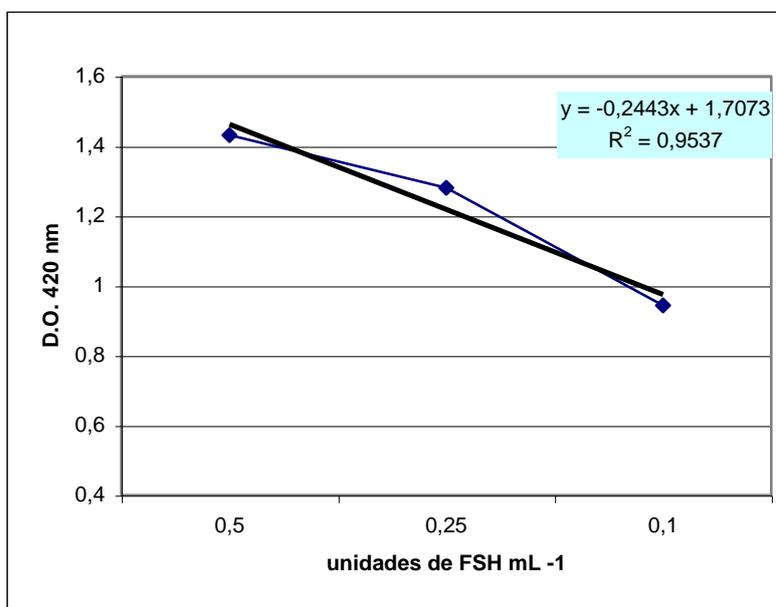


Figura 1 – Titulação de soro anti-FSHp, reconhecendo 0,1 unidade de FSH no ensaio. Gráfico mostra equação da curva e R= 0,9765.

Os soros foram testados quanto à produção de anticorpos em ensaios de ELISA sanduíche, como pode ser observado na Figura 2.

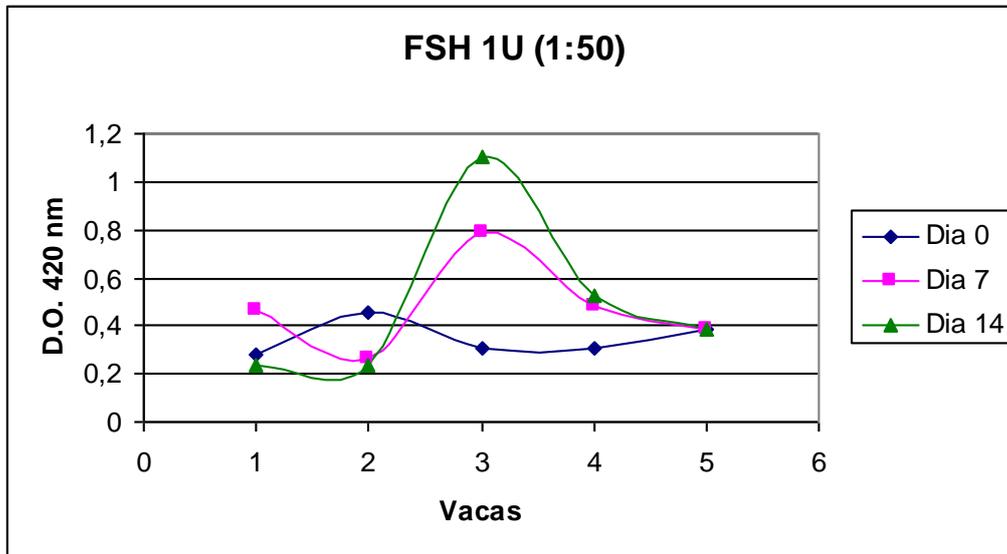


FIGURA 2: TITULAÇÃO DOS SOROS DILUÍDOS A 1:50, EM ENSAIO COM 1U DE FSH-P. RESULTADOS EM D.O.A 420 NM.

Assim, como podemos observar na Figura 2, as vacas 1 e 2, apresentaram menor titulação de anticorpos enquanto as vacas 3 e 4, com uma única injeção subcutânea, apresentaram maior titulação. A vaca 5 foi o controle negativo do ensaio e não recebeu nenhuma injeção de hormônios. Na média, as vacas 1, 2 e 5 apresentaram médias semelhantes de anticorpos produzidos, em ensaios de ELISA sanduíche.

A princípio, conclui-se que a produção de anticorpos anti-FSH-p pela via SC é significativamente maior do que pela via IM, mas a pesquisa deve ser realizada por mais tempo, para avaliar se a resposta imunológica apresentada se mantém ao longo do tempo e se interfere na produção de corpos lúteos e embriões produzidos. No caso de uma resposta imunológica recorrente, as vacas podem deixar de produzir a quantidade desejável de

embriões e deverão ser substituídas no programa de superovulação (Alvarez et al, 1999; Martinez et al., 2008).

Experimentos com superovulação de vacas nelore

Nos ensaios com vacas Nelore, 60 dias após a primeira superovulação, das 7 vacas, 4 vacas apresentaram resposta imunológica, que variou de 0,01 a 0,052 de D.O.; Na segunda superovulação, aos 120 dias, 6 vacas apresentaram resposta, que variou de 0,178 a 0,292 de D.O a 420 nm.



Figura 3 – Número de animais, do total de sete fêmeas, que apresentaram resposta imunológica ao longo das superovulações, a intervalos de 60 dias

Aparentemente, a presença de anticorpos não afetou a resposta ovariana ou a produção de embriões após a segunda superovulação, com correlação entre resposta imunológica dos animais e número de CL em $-0,2445$ e a correlação entre resposta imunológica e número de embriões viáveis em $0,0695$ (. O teste F, a 0,05% de significância, não mostrou diferença nos tratamentos. Conclui-se que a presença de anticorpos ant-FSHp em

Duarte, K.M.R., Pires, R.M.L., Gomes, L.H., et al. Resposta imunológica de vacas Nelore e Caracu superovuladas com FSHp injetado por via subcutânea. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 39, Art#377, Out1, 2008.

concentração inferior a 0,292 de D.O.(420 nm) não interfere na resposta ovariana ao tratamento de superovulação.

Tabela 1 – Dados de produção de anticorpos, número de corpos-lúteo produzidos por animal (V1 ...V7) e número de embriões viáveis, após 120 dias de superovulação.

| | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | V7 | média |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| AC | 0,294 | 0,179 | 0,314 | 0,359 | 0,292 | 0,01 | 0,223 | 0,24 |
| CL | 13 | 6 | 8 | 12 | 9 | 11 | 12 | 10,14 |
| embriões viáveis | 8 | 0 | 5 | 0 | 8 | 8 | 7 | 5,14 |
| embriões totais | 9 | 5 | 6 | 3 | 9 | 11 | 14 | 8,14 |

Conclui-se que a superovulação com FSHp por via sc induz a formação de anticorpos contra esse hormônio. Entretanto, a presença de anticorpos anti-FSHp parece não influenciar a resposta ovariana ou a produção de embriões.

Agradecimentos:

Agradecemos ao Dr. Rafael Herrera Alvarez pelas idéias e pelo soro coletado das vacas Nelore cedido para estes testes e ao Instituto de Zootecnia pelo apoio e financiamento de alguns reagentes utilizados neste experimento.

Referências Bibliográficas

ALVAREZ, R.H.; COELHO, L.A.; PIRES, R.M.L.; MARTINEZ, A.C. Superovulação de vacas nelore com dose única de FSH aplicada por via subcutânea. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia dos Embriões,14. **Anais:**Campos do Jordão, 26 a 29 de agosto, Campos do Jordão, 1999.

CROWTHER, J.R. **ELISA: theory and practice.** Totowa: Humana Press. 1995.

DUARTE, K.M.R Protocolos e normas para uso de animais de laboratório para produção de anticorpos e soros. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 64, n. 2, 167-177, 2007.

Duarte, K.M.R., Pires, R.M.L., Gomes, L.H., et al. Resposta imunológica de vacas Nelore e Caracu superovuladas com FSHp injetado por via subcutânea. PUBVET, Londrina, V. 2, N. 39, Art#377, Out1, 2008.

DUARTE, K. M. R.; PASCHOAL, J. A. R.; GOMES, L. H. Imunoensaios e Zootecnia: Aplicações e Técnicas. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 63, n. 2, p. 121-130, 2006.

HERMANSON, G.T. **Bioconjugate Techniques**. San Diego: Academic Press. 1996, 785p.

MARTINEZ, A.C. Resposta ovariana e perfil de desenvolvimento folicular de novilhas tratadas com injeção subcutânea de FSH e reforço intramuscular após 48 horas. **Boletim de Indústria Animal**, 65(1):15-19, 2008.