

COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS NO LÍQUIDO AMNIÓTICOS DE BEZERROS NELORE CONCEBIDOS POR MEIO DE DIFERENTES BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO

COMPARISON OF THE CYTOKINES CONCENTRATION IN AMNIOTIC FLUID OF THE NELORE CALVES CONCEIVED BY REPRODUCTION BIOTECHNOLOGIES

C. F. MOYA-ARAUJO¹, N. C. PRESTES¹, M. PIAGENTINI¹, G. H. M. ARAUJO¹,
C. MARCONI², M. G. SILVA²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar as concentrações de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-8 no fluido amniótico de bezerros concebidos por meio de PIV, TE e IA no momento do parto. Utilizaram-se sessenta animais divididos em grupos: 1- vinte vacas gestando bezerros Nelore de inovulações de embriões provenientes de doadoras superovuladas (TE); 2- vinte vacas gestando bezerros Nelore de inovulações de embriões provenientes de PIV; 3- vinte vacas Nelore gestando bezerros de IA. Durante a fase de expulsão, realizou-se a colheita do líquido amniótico que foi depositado em tubo plástico e congelado em freezer. Realizou-se ELISA para a dosagem das citocinas, cujas concentrações foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$. Para TNF- α verificou-se que o grupo TE não apresentou diferença na concentração em relação ao grupo PIV e IA ($p > 0,05$). Contudo no grupo IA, a concentração de TNF- α foi inferior ao do grupo PIV ($p < 0,05$). Para IFN- γ não foi observada diferença significativa entre as concentrações nos diferentes grupos ($p > 0,05$). Apenas duas amostras do grupo PIV apresentaram concentração detectável de IL-6 e para IL-8 apenas uma amostra do mesmo grupo. Os resultados desse experimento podem ser adotados como padrões para gestação normal de bovinos. Entretanto novas pesquisas na área da imunologia da gestação são necessárias para melhor descrever o papel das citocinas na manutenção da gestação e no desencadeamento do trabalho de parto em bovinos.

PALAVRAS-CHAVE: Bezerros Nelore. Líquido amniótico. Citocinas. Biotecnologias

SUMMARY

This study aimed to determine the levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-8 in amniotic fluid of calves from IVP compared with those obtained by conventional embryo transfer and artificial insemination at the delivery. Sixty animals used were divided into groups: 1 - Twenty Nelore cross-breed cows pregnant with Nelore calves of embryos transfer conventional method (ET); 2 - Twenty Nelore cross-breed cows pregnant with Nelore calves obtained by in vitro production after follicular aspiration; 3 - Twenty pregnant Nelore cows bearing calves obtained by artificial insemination (AI). All births of the animals of the experiment were observed. During the expulsion phase the amnion was punctured and 15mL of fluid were collected using a needle and syringes compatible. The material was deposited on plastic tube and frozen in freezer for later analysis. The cytokines levels were measured by immunoenzymatic assay. The Kruskal-Wallis Test was used for statistical analysis with 5% of significance. The TNF- α levels in the animals of the ET group showed no significant difference the concentration of this cytokine in the group AI and IVP. However for group AI were statistically lower than the IVP group ($p < 0.05$). Furthermore, the median of the INF wasn't different significantly between the groups ($p > 0.05$). Only samples 15 and 18 of the IVP group had detectable concentrations of IL-6 and to IL-8 only 15 of the sample the same group. The results of this experiment can be adopted as standards for normal pregnancy in cattle, since there is no report of such literature. However new researches in immunology of pregnancy are necessary to describe the role of cytokines in both the maintenance of pregnancy and in the delivery labor for the bovine specie.

KEY-WORDS: Nelore Calves. Amniotic fluid. Cytokines. Biotechnologies

¹Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária;

²Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - Faculdade de Medicina de Botucatu- FMB Departamento de Patologia.

INTRODUÇÃO

A tecnologia aplicada à pecuária de corte brasileira em resposta a globalização e ao aumento da competitividade buscou o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva, por meio da biotecnologia. Sendo assim, o ganho genético nos últimos 20 anos deve-se, basicamente, ao aumento da intensidade e eficiência da seleção das raças. O impulso inicial para a seleção em bovinos foi dado pela inseminação artificial (IA) e pelos programas de teste de progênie e posteriormente, pela transferência de embriões (TE). Incremento ainda maior pôde ser obtido com o desenvolvimento da técnica de produção *in vitro* (PIV) e sua incorporação ao setor produtivo. Contudo o uso comercial em larga escala da técnica de PIV em bovinos vem apresentando alguns problemas observados no final da gestação, como bezerros com maior peso ao nascimento (Síndrome do bezerro gigante), período de gestação prolongado, aumento na incidência de abortamentos, aumento da mortalidade perinatal e aumento da ocorrência anormalidades congênicas (LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1999, WAGTENDONK-DELEEUW et al., 2000, PRESTES, 2005).

O fluido amniótico é uma fonte importante para a avaliação fetal. Uma variedade de métodos bioquímicos, citológicos, biofísicos e imunológicos permite determinar o grau de maturação pulmonar, renal e epidérmica fetal, além de anormalidades genéticas e outras patologias (KJELDSBERG & KNIGHT, 1993). O presente estudo teve por objetivo determinar os níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-8 no fluido amniótico de bezerros concebidos por meio de produção *in vitro* comparando-os com os de transferência de embriões e de inseminação artificial no momento do parto.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas quarenta receptoras de embriões e vinte vacas Nelore PO com idade variando de 3 a 8 anos, sendo divididas em: grupo 1- vinte vacas gestando bezerros Nelore PO originados de inovulações de embriões oriundos de doadoras superovuladas (TE), grupo 2- vinte vacas gestando bezerros Nelore PO originados de inovulações de embriões oriundos de produção *in vitro* (PIV), grupo 3- vinte vacas Nelore PO gestando bezerros oriundos de inseminação artificial (IA) - controle.

Os animais com vermifugação e vacinação em dia foram mantidos a pasto com suplementação mineral, além de água *ad libitum*. Próximo ao parto, os animais foram transferidos para piquetes maternidade. Todos os partos dos animais do experimento foram observados. Durante a fase de expulsão e após a ruptura do alantocóron, foi realizada a punção do âmnion para a

colheita de um volume de 15mL de líquido utilizando-se agulha (40x12mm) e seringa (20mL) descartáveis. O material colhido foi depositado em tubo plástico e congelado em freezer (-20°C) para posterior análise em duplicata das seguintes citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-8. O acompanhamento do padrão de desenvolvimento dos bezerros durante o periparto foi realizado para avaliar a presença de sinais de septicemia ou morte do animal durante o período de avaliação.

Após a descongelação das amostras, as dosagens de TNF- α , IFN- γ e IL-6 foram realizadas por meio de ELISA com emprego do Kit comercial: ESS0011 - Bovine TNF Alpha, ESS0026B - Bovine IFN- γ e ESS0029 Bovine IL-6 (Pierce Biotechnology®), respectivamente. Para a dosagem de IL-8 empregou-se kit Human CXCL8/IL-8 Quantikine: D8000C (R & D Systems) previamente provado para bovinos por Shuster et al. (1997). As concentrações de citocinas (pg/mL) nos diferentes grupos de estudo foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5%. O software empregado foi o Sigma Stat 9.0 (Jandel Corporation®).

RESULTADOS

Os níveis de TNF- α e IFN- γ no líquido amniótico das vacas dos grupos TE, PIV IA estão representados nas Figuras 1 e 2. Em relação às dosagens de TNF- α , 100% das amostras analisadas apresentaram concentração acima do limite de detecção do teste (11,7pg/mL). Na análise estatística verificou-se que os animais do grupo TE não apresentaram diferença significativa na concentração desta citocina em relação ao grupo PIV e IA. Contudo para o grupo IA, os níveis de TNF- α foram estatisticamente inferiores ao do grupo PIV ($p < 0,05$). Para o ensaio de IFN- γ 55% (11/20) das amostras do grupo TE, 40% (8/20) do grupo PIV e 50% (10/20) das amostras do grupo IA analisadas apresentaram concentração desta citocina abaixo do limite de detecção do teste (4,7pg/mL).

Realizou-se a análise estatística e não foi observada diferença significativa entre a concentração do IFN- γ , nos diferentes grupos estudados ($p > 0,05$). Para o ensaio de IL-6 a amostra 15 e a amostra 18 do grupo PIV apresentaram uma concentração de 2227,47pg/mL e 2686,30pg/mL, respectivamente. As demais amostras de líquido amniótico analisadas apresentaram concentração desta citocina abaixo do limite de detecção do teste (8,6pg/mL). No ensaio de IL-8 a amostra 15 do grupo PIV apresentou uma concentração de 577,6pg/mL. As demais amostras de líquido amniótico analisadas apresentaram concentração desta citocina abaixo do limite de detecção do teste (3,5pg/mL).

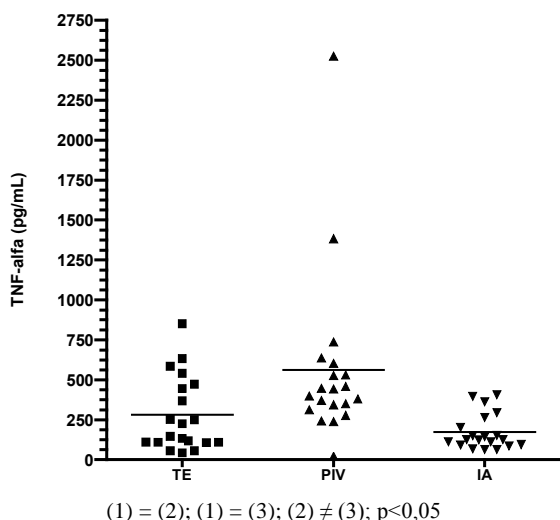


Figura 1 - Dot plot da concentração de TNF- α (pg/mL) no líquido amniótico de bezeros Nelore colhido no momento do parto do grupo 1 (TE), grupo 2 (PIV) e grupo 3 (IA).

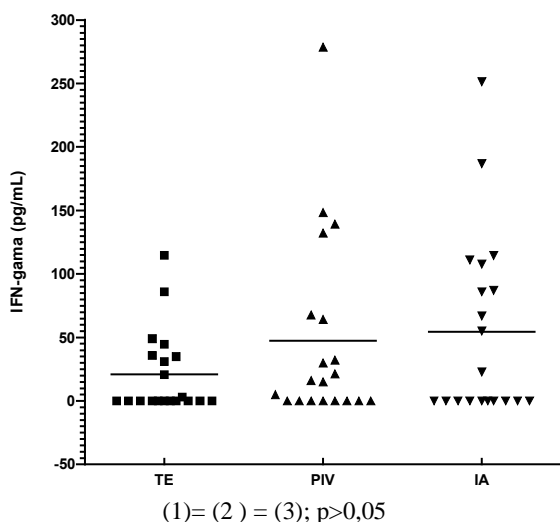


Figura 2 - Dot plot da concentração de IFN- γ (pg/mL) no líquido amniótico de bezeros Nelore colhido no momento do parto do grupo 1 (TE), grupo 2 (PIV) e grupo 3 (IA).

DISCUSSÃO

Os resultados foram discutidos considerando o grupo IA como controle, uma vez que os embriões de produção *in vitro* e os da técnica de transferência convencional passam por um manuseio antes da inovulação para as receptoras, fato que não ocorre na IA.

O TNF- α foi detectado em todos os animais desse experimento. A exemplo da espécie humana, essa

citocina, em concentração adequada, participa do mecanismo do desencadeamento do parto normal. Contudo, segundo a literatura consultada a elevada concentração de TNF- α , no líquido amniótico de humanos, é descrita como sendo o melhor indicador para o desenvolvimento de septicemia neonatal. Nesse estudo as concentrações de TNF- α no grupo PIV e TE foram semelhantes, porém muito superiores ao do grupo IA. Apesar disso, esse aumento significativo não foi condizente com o desenvolvimento de septicemia neonatal, uma vez que todos os bezeros foram acompanhados durante o periparto e nenhum animal apresentou sintomatologia clínica de septicemia ou veio a óbito no período de avaliação. Contudo, em humanos BAUD et al. (1999) e PARK et al. (2004) relataram um aumento significativo nas concentrações dessa citocina no líquido amniótico de recém-nascidos que desenvolveram septicemia pós-parto quando comparadas com as crianças saudáveis. Uma provável explicação para o fato é que por não haver relato na literatura de valores padrão para TNF- α no líquido amniótico de gestação normal em bovinos e os valores descritos nesse experimento para o grupo PIV podem ser significativamente superiores ao do grupo IA, porém ainda dentro de uma faixa aceitável durante o trabalho de parto.

O IFN- γ é uma citocina Th1 que quando associado ao TNF- α provoca a inibição do desenvolvimento embrionário e fetal, além de ser citotóxico para células embrionárias, em roedores (SUFFYS et al., 1989). Pretendia-se realizar uma comparação entre os níveis de IFN- γ com os de TNF- α no líquido amniótico dos bezeros para avaliar esse sinergismo citado na literatura, porém apenas 45% das amostras do grupo TE 60% do grupo PIV e 50% das amostras do grupo IA analisadas apresentaram concentração desta citocina acima do limite de detecção do teste e na análise estatística não foi verificada diferença significativa. Esse fato indica que todos os animais estavam em situação semelhante em relação ao IFN- γ não exibindo esse sinergismo com o TNF- α para os bovinos estudados.

A IL-6 pertencente ao grupo das citocinas Th2 que na maioria das vezes antagonizam as ações das Th1, só foi detectada em duas amostras do grupo PIV, sem uma explicação plausível, pois essas amostras não apresentavam as maiores concentrações de TNF- α (441,60 e 343,10pg/mL) nem de IFN- γ (21,25 e 32,20pg/mL) dentre as amostras analisadas.

A ausência de IL-8 no líquido amniótico dos bezeros é mais aceitável, pois essa citocina é quimiotática e uma das últimas a serem acionadas na cascata, uma vez que só são liberadas na persistência do antígeno.

Os resultados desse experimento podem ser adotados como padrões para gestação normal de bovinos, uma vez que, não há relato desses na literatura. Entretanto novas pesquisas na área da imunologia da gestação se fazem necessárias para descrever o papel das citocinas tanto na manutenção da gestação como no desencadeamento do trabalho de parto para espécie bovina.

AGRADECIMENTOS

FAPESP pelo suporte financeiro (05/59793-3)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUD. O., EMILIE, D., PELLETIER, E., LACAZE-MASMONTEIL, T., VILLE, Y. Amniotic fluid concentrations of interleukin-1 beta, interleukin-6 and TNF alpha in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation histological associations and neonatal outcome. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v.106, p.72-77, 1999.
- KJELDSBERG, C., KNIGHT, J. **Body fluids: laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, serous and synovial fluids.** American Society of Clinical Pathologist. 3rd ed. Chicago: Theid, 1993, 387p.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. **Theriogenology**, v.51, p.473-485, 1999.
- PARK, K. H., YOON, B. H., SHIM, S., JUN, J. K., SYN, H. C. Amniotic fluid tumor necrosis factor-alpha is a marker for the prediction of early-onset neonatal sepsis in preterm labor. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v.58, p.84-90, 2004.
- PRESTES, N. C. Patologias da gestação e sobrevivência pós-parto de produtos oriundos de PIV em bovinos. **Acta Veterinae Scientiae**, v.35, p.119-124, 2005.
- SHUSTER, D. E., KEHRLI, JR M. E., RAINARD, P., PAAPE, M. Complement fragment c5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.65, p.3286-3292, 1997.
- SUFFYS, P., BEYAERT, R., VAN ROY, F., FIERS, W. TNF in combination with interferon-gamma is cytotoxic to normal, untransformed mouse and rat embryo fibroblast-like cells. **Anticancer Research**, v.9, n.1, p.167-171, 1989.
- WAGTENDONK-DELEEUW, A. E., MULLAART, A. P., ROOS, W. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. In: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Maastricht, The Netherlands, 2000. **Proceedings...**, v. 53, n.1, p.575-597.