



## PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA LÍQUIDO FOLICULAR DE ORIGEM ZEBUÍNA NAS ESPÉCIES *Bos taurus taurus* E *Ovis aries*<sup>A</sup>

RAFAEL HERRERA ALVAREZ<sup>1</sup>, JOÃO E. CASTELO BRANCO IAPICHINI<sup>2</sup> E ROSA MARIA PIATTI<sup>3</sup>

**RESUMO** - O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de anticorpos contra líquido folicular (LF) de origem zebuína (*Bos taurus* var. *indicus*) nas espécies *Bos taurus* var. *taurus* e *Ovis aries*. Seis novilhos castrados e 6 ovelhas ovariectomizadas foram imunizadas por via subcutânea com 3 ml de LF emulsionado em 2 ml de adjuvante de Freund. Dois animais de cada espécie, tratados unicamente com adjuvante e albumina sérica bovina, serviram como controle. Cinco injeções de reforço foram administradas com intervalo de 15 dias, substituindo o adjuvante completo de Freund pelo incompleto. Amostras de sangue foram coletadas periodicamente para avaliar a atividade imunológica (teste de Ouchterlony) e biológica (inibição da ovulação em camundongos). O soro recuperado dos novilhos não mostrou reação aos testes imunológicos ou biológicos. Por sua vez, cinco das seis ovelhas imunizadas apresentaram uma reação de precipitação característica a partir do segundo reforço. O soro obtido das ovelhas que apresentaram a reação imunológica foi eficaz em bloquear a inibição da ovulação em camundongos. Esses resultados indicam que, diferentemente da espécie *Bos taurus* var. *taurus*, a espécie *Ovis aries* pode ser utilizada para produzir anticorpos contra o LF proveniente da espécie *Bos taurus* var. *indicus*.

Termos para indexação: líquido folicular, imunização, auto-antígeno, bovinos, ovinos.

PRODUCTION OF ANTIBODIES TO *Bos taurus indicus* FOLLICULAR FLUID IN *Bos taurus taurus* AND *Ovis aries*

**SUMMARY** - The aim of this study was to produce antibodies against steroid-free *Bos taurus* var. *indicus* follicular fluid (FF) in *Bos taurus* var. *taurus* and *Ovis aries*. Six steers and six ovariectomized ewes were immunized subcutaneously with 3 ml FF emulsified in 2 ml of Freund's adjuvant. Two control animals from each species were injected with the adjuvant associated to bovine serum albumin. Five booster injections were given at 15 days interval replacing the complete by the incomplete Freund's adjuvant. Blood samples were taken regularly to test the immunological and biological reaction using the Ouchterlony test and a mice model of inhibition of ovulation, respectively. Serum of steers did not show immunological nor biological reaction. Five out of the 6 immunized ewes showed the development of typical antigen-antibody reaction after the second booster. The anti-bFF was capable of inhibiting the block of ovulation in the mice model. These data showed that antibodies against *Bos taurus* var. *indicus* FF can be raised in *Ovis aries* but not in *Bos taurus* var. *taurus*.

Index terms: follicular fluid, immunization, self antigen, bovine, ovine.

<sup>A</sup> - Projeto IZ 026/96. Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

<sup>1</sup> - Seção de Reprodução e Inseminação Artificial, Instituto de Zootecnia.

<sup>2</sup> - Zootecnista da ETAESG "Prof. Edson Galvão", Itapetininga.

<sup>3</sup> - Seção de Imunogenética, Instituto Biológico.



## INTRODUÇÃO

Nos animais domésticos, a taxa de ovulação está regulada por mecanismos precisos, os quais modulam o número de oócitos liberados a cada ciclo estral, obedecendo regras evolutivas específicas para cada espécie. Em espécies como a ovina, essa taxa ovulatória, estabelecida durante o processo de seleção natural, pode ser aumentada pelo acasalamento de indivíduos portadores do gene (gene F) que controla essa característica (DAVIS et al., 1982). Contrariamente, em bovinos, as tentativas de selecionar animais que possuam uma taxa de ovulação superior à natural, por métodos convencionais de genética quantitativa, não têm tido sucesso (ECHTERNKAMP et al., 1990). Dessa forma, outros métodos têm sido utilizados para induzir gestações gemelares em bovinos. A aplicação de hormônios com atividade folículo-estimulante e a transferência de um embrião em fêmeas previamente inseminadas (ou mais de um embrião em fêmeas não inseminadas) são métodos empregados com relativo sucesso. Contudo, a inconstância da resposta ovariana, no primeiro caso, e o custo elevado, no segundo, constituem duas das principais limitações de aplicação prática dessas técnicas.

Recentemente, foi proposta uma alternativa imunológica para controlar a taxa de ovulação, empregando como antígeno substâncias específicas (inibina, folistatina) produzidas pelo ovário (REEVES et al., 1989; TERQUI et al., 1995; CROWE et al., 1995; TAKEDOMI et al., 1995). Contudo, o alto custo dessas substâncias e a dificuldade de purificação em laboratórios convencionais limitam seu uso. Por outro lado, o líquido folicular, de fácil obtenção em frigoríficos, tem se mostrado eficiente na modulação da taxa de ovulação (CUMMINS et al., 1986a; ALVAREZ, 1995).

O líquido folicular (LF) é composto da secreção do folículo ovariano e do exudado do plasma sanguíneo (EDWARDS, 1974; ANDERSEN et al., 1976). Possui importante função na fisiologia ovariana, incluindo a esteroidogênese, crescimento folicular, ovulação, maturação do oócito e transporte do oócito no oviduto (EDWARDS, 1974).

A imunização de ovelhas com LF bovino puro ou parcialmente purificado resultou em um aumento na taxa de ovulação e no número de gestações (HENDERSON et al., 1984; CUMMINS et al., 1986a; AL-OBAIDI et al., 1987). Em bovinos, a imunização contra LF ovino parcialmente purificado igualmente aumentou a taxa de ovulação (CUMMINS et al., 1986b; PRICE et al., 1987; BINDON et al., 1988).

Nos estudos acima mencionados, os anticorpos foram produzidos pela exposição dos animais a pequenas quantidades do antígeno (imunização ativa). Uma característica da imunização ativa é a constante produção de anticorpos, com o conseqüente efeito biológico, durante longos períodos após a vacinação.

Por outro lado, um efeito biológico temporário pode ser conseguido pela administração de anticorpos exógenos produzidos em outro animal (imunização passiva). Para evitar o risco de anafilaxia, quando essa via de imunização é empregada, é desejável que os anticorpos utilizados sejam provenientes de animais da mesma espécie ou de espécies geneticamente próximas. Entretanto, estudos prévios mostraram que o LF bovino não é antigênico quando utilizado na mesma espécie e variedade (ALVAREZ, 1995).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo determinar se o LF obtido de fêmeas zebuínas pode ser utilizado como antígeno na produção de anticorpos nas espécies *Bos taurus* var. *taurus* e *Ovis aries*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção do antígeno

O líquido folicular foi obtido por aspiração dos folículos visíveis de ovários de vacas nelore (*Bos taurus* var. *indicus*) coletados em seis ocasiões em um frigorífico local. Os folículos maiores que 22 mm foram excluídos por serem considerados císticos. Após centrifugação (700 g durante 15 minutos a 4°C) para remover os debris celulares, o líquido foi congelado a -15°C. Após um período de 2 meses, o líquido foi incubado (2 horas a 4°C) com 3 mg/ml de carvão ativado (Norit A, Lab. Sigma) e em seguida filtrado utilizando filtro Withman nº 3. Trabalhos prévios mostraram que esse tratamento remove mais de 99% dos esteróides, sem



afetar a capacidade de inibir as concentrações plasmáticas de FSH (ALVAREZ, 1995). O LF tratado apresentou um conteúdo de proteína de 80 mg/ml no espectrofotômetro.

#### **Animais e protocolos de imunização**

Dois meses após castração, seis novilhos Mantiqueira (*Bos taurus* var. *taurus*) e seis ovelhas Ideal, ambas as espécies com idade média aproximada de 8 meses, foram imunizados com 3 ml de LF emulsificado em 2 ml de adjuvante completo de Freund (Lab. Sigma). Cada ovelha ou novilho tratado recebeu quatro injeções por via subcutânea (sc) em diferentes partes do dorso. Outros dois animais de cada espécie (controle) receberam uma mistura de albumina sérica bovina e adjuvante completo de Freund. Os reforços foram efetuados a cada 15 dias durante 3 meses, substituindo o adjuvante completo pelo incompleto.

#### **Coletas de sangue e testes dos anticorpos**

Amostras de sangue via jugular foram coletadas em intervalos regulares de 15 dias, durante 4 meses, iniciando no dia da primeira imunização. O sangue coletado em tubos de 10 ml sem anticoagulante (Vacutainer; Beckton Dickinson, Crowley) foi deixado em repouso durante 2 horas a 25° C. Embora todas as amostras tenham coagulado normalmente, em algumas delas foi necessário realizar uma centrifugação (700 g/10 minutos) para a obtenção do soro, que foi, em seguida, armazenado a -20° C até posterior uso.

A precipitação antígeno-anticorpo dos dois grupos de animais foi examinada pela técnica de Ouchterlony usando agar ácida sódica com 2% de NaCl, colocando o soro para reagir contra BSA e LF, conforme descrito por ALVAREZ (1995). As linhas de precipitação foram observadas após um período de incubação (4° C em atmosfera úmida) de 72 horas.

A seguir, as placas foram coradas pela imersão em solução de negro de amido ao 0,5% durante 10 minutos.

#### **Teste da inibição da ovulação em camundongos**

A atividade biológica do LF foi avaliada pelo teste de inibição da ovulação em camundongos (CUMMINS et al., 1986a).

Fêmeas camundongo da linhagem CBA receberam 200 µl de LF injetado por via sc às 9 horas do quinto dia após detecção do tampão copulatório (dia 1). A ovulação foi induzida com 10 u.i. de hCG (Pregnil, Lab. Organon), administradas às 18 horas do dia 5. O número de ovulações foi estimado considerando os oócitos recuperados da ampola ovariana, após sacrifício dos animais entre as 10 e 13 horas do dia 6.

#### **Análise dos dados**

Os dados relativos ao teste da inibição da ovulação em camundongos foram analisados pelo teste de Duncan usando o sistema computacional Statistica versão 4,5 (StatSoft, Inc. 1993).

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nenhum dos novilhos apresentou reação ao teste de precipitação antígeno-anticorpo. Esses resultados indicam que a variedade na classificação zoológica da espécie bovina não é suficiente para reconhecer como estrangeiro o LF produzido na mesma espécie. Em trabalhos prévios, FAHMI et al. (1985) mostraram uma ação imunossupressiva do LF nos linfócitos T, o que poderia explicar a ausência de resposta imunológica. Contudo, essa característica de não antigenicidade do LF não é específica de outros líquidos orgânicos, visto que novilhas imunizadas com sêmen de touro associado ao adjuvante completo de Freund, produziram uma resposta imune que resultou na produção de anticorpos e infertilidade (MENGE, 1969).

Por sua vez, a imunização de ovelhas com LF bovino resultou no desenvolvimento de linhas de precipitação antígeno-anticorpo no gel de agar. Quando as amostras de soro do segundo reforço foram testadas, foi evidenciada, em 5 de 6 ovelhas, uma ampla zona de precipitação formada por várias linhas (Figura 1).

Não foram identificadas as proteínas que causaram a reação de precipitação nas ovelhas. Sabe-se, contudo, que o LF contém um mínimo de 40 proteínas séricas de elevado peso molecular (ANDERSEN et al., 1976), bem



como outras proteínas específicas da família das inibinas, conhecidas por exercer uma ação biológica no desenvolvimento do folículo e na modulação da liberação de FSH (FINDLAY, 1993). Estudos prévios mostraram que a inibina (Mr 32000) presente no LF bovino é imunogênica em ovelhas quando associada a um adjuvante (McNEILLY et al., 1991). Conseqüentemente, pode ser considerada a possibilidade de uma ou mais das linhas precipitantes corresponderem à inibina ou às moléculas precursoras da mesma.

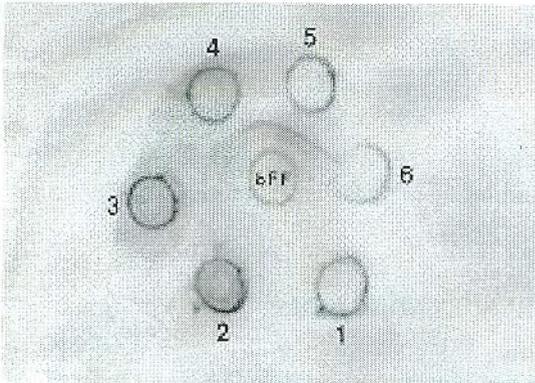


Fig. 1. Precipitação antígeno-anticorpo em agar ácido sódica. O poço central contém líquido folicular bovino (LF). Os poços 1 e 2 contêm soro de ovelhas imunizadas contra albumina sérica bovina (BSA). O poço 3 contém soro de ovelhas imunizadas contra LF, previamente incubado (2h, 25°C) com LF. Os poços 4 e 5 contêm soro de ovelhas imunizadas contra LF e o poço 6 contém solução salina fosfatada (PBS).

Por outro lado, o LF puro ou associado ao soro de ovelhas não imunizadas resultou em uma taxa de ovulação significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que a observada em fêmeas de camundongo injetadas com LF associado ao soro de ovelhas imunizadas (quadro 1).

O fato do soro de ovelhas imunizadas com LF poder neutralizar o efeito do LF na indução da ovulação em camundongos confirma que os anticorpos são direcionados contra fatores envolvidos na produção e/ou liberação dos oócitos. A inibina, presente no LF, é uma forte candidata a ser responsável pelo bloqueio ou atraso da ovulação. Com efeito, trabalhos prévios de imunização ativa contra inibina semi-pura extraída

do LF bovino fracionado provocaram o atraso do cio e da ovulação em ovelhas (WALLACE e McNEILLY, 1985) e ratas (RUSH et al., 1981). Igualmente, não pode ser descartada a possibilidade de outro componente não esteroide, diferente da inibina e presente no LF, ser também responsável por esses efeitos (CAMPBELL et al., 1991; LAW et al., 1992).

**Quadro 1. Atividade biológica do soro de ovelhas ou novilhos imunizados contra líquido folicular bovino (LF). Bloqueio da ovulação em camundongos (12 fêmeas por grupo)**

Tratamento	Taxa de ovulação (média $\pm$ e.p.m.)
BSA (0,4 ml)	6,5 $\pm$ 0,9a
LF (0,2 ml) + BSA (0,2 ml)	2,6 $\pm$ 0,8b
LF (0,2 ml) + soro de ovelha imunizada (0,2 ml)	6,2 $\pm$ 1,6a
LF (0,2 ml) + soro de novilho imunizado (0,2 ml)	3,4 $\pm$ 1,2b

Médias com letra diferente são significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

## CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que, diferentemente da espécie *Bos taurus* var. *taurus*, a espécie *Ovis aries* pode ser utilizada para produzir anticorpos contra o LF proveniente da espécie *Bos taurus* var. *indicus*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem sinceramente ao Dr. Eduardo B. Oliveira (Departamento de Bioquímica, Faculdade de Medicina, USP - Ribeirão Preto, SP), pela



Faculdade de Medicina, USP - Ribeirão Preto, SP), pela ajuda na preparação dos antígenos e pela análise dos resultados.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-OBAIDI, S.A.R. et al. T. Reproductive characteristics of lambs actively immunized early in life with inhibin-enriched preparations from follicular fluid of cows. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, v.81, n.2, p.403-14, 1987.
- ALVAREZ, R.H. Efeito da imunização passiva contra líquido folicular bovino na taxa de ovulação e produção de embriões de vacas superovuladas e não superovuladas. Jaboticabal, 1995. 197p. Tese de Doutorado, FCAVJ-UNESP.
- ANDERSEN, M.M. et al. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, v.48, n.1, p.109-18, 1976.
- BINDON, B.M. et al. Superovulation in pubertal heifers immunized against ovine inhibin purified by monoclonal antibody affinity chromatography. *Proceedings of the Australian Society of Reproductive Biology* v.20, Abstr. No. 28, 1988.
- CAMPBELL, B.K. et al. Effect of steroid - and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, v.93, n.1, p.81-86, 1991.
- CROWE, M.A. et al. Immunization of heifers against prostaglandin F2 $\alpha$ . *Livest. Prod. Sci.*, Amsterdam, v.42, p.213-21, 1995.
- CUMMINS, L.J. et al. Increase in ovulation rate after immunization of Merino ewes with a fraction of bovine follicular fluid containing inhibin activity. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, v.77, n.2, p.365-72, 1986a.
- CUMMINS, L.J. et al. Increased ovulation rates in cattle vaccinated with a partially purified fraction of ovine follicular fluid. *Proceedings of the Australian Society of Reproductive Biology* v.18, Abstr. N $^{\circ}$  39, 1986b.
- DAVIS, G.H. et al. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *NZ J. Agric. Res.*, Wellington, v.37, n.4, p.523-30, 1982.
- ECHTERNKAMP, S.E. et al. Twinning in cattle: II. Genetic and environmental effects on ovulation rate in pubertal heifers and postpartum cows and the effects of ovulation rate on embryonic survival. *J. Anim. Sci.*, Champaign, v.68, n.7, p.1877-88, 1990.
- EDWARDS, R.J. Follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, v.37, n.1, p.189-219, 1974.
- FAHMI, H.A. et al. Immunosuppressive activity of bovine follicular fluid on bovine T lymphocytes in vitro. *J. Dairy Sci.*, Lancaster, v.68, n.12, p.3312-17, 1985.
- FINDLAY, J.K. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.*, v.48, n.1, p.15-23, 1993.
- HENDERSON, K.M. et al. Increase in ovulation rate after active immunization of sheep with inhibin partially purified from bovine follicular fluid. *J. Endocrinol.*, v.102, p.305-9, 1984.
- LAW, A.S. et al. Evidence for the action of bovine follicular fluid factor(s) other than inhibin in suppressing follicular development and delaying estrous in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, v.96, n.1, p.603-16, 1992.
- McNEILLY, A.S. et al. Effect of follicular fluid and inhibin immunoneutralization on FSH-induced



- preovulatory follicle growth in the ewe. *J. Endocrinol.*, v.131, p.401-409, 1991.
- MENGE, A.C. Early embryo mortality in heifers isoimmunized with semen and conceptus. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, v.18, n.1, p.67-74, 1969.
- PRICE, C.A. et al. Active immunization of cattle against partly purified follicular fluid from sheep. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, v.81, n.1p.161-8, 1987.
- REEVES, J.J. et al. Vaccines against endogenous hormones: a possible future tool in animal production. *J. Dairy Sci.*, Lancaster, v.72, n.4, p.3363-71, 1989.
- RUSH, M.E. et al. The actions of porcine follicular fluid and estradiol on periovulatory secretion of gonadotropic hormones in rats. *Endocrinology*, v.108, p.2316-23, 1981.
- TAKEDOMI, T. et al. Effects of passive immunization against bovine inhibin on ovulation rate and circulating FSH level in Holstein Heifers. *Theriogenology*, New York, V.43, n.1, p.333, 1995.
- TERQUI, M. et al. Modulation of ovarian function by steroid and inhibin immunization. *Livest. Prod. Sci.*, Amsterdam, v.42, n. p.181-91, 1995.
- WALLACE, J.M. e McNEILLY, A.S. Increase in ovulation rate after treatment of ewes with bovine follicular fluid in the luteal phase of the oestrus cycle. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, v.73, n.2, p.505-15, 1985.