

## **INFLUÊNCIA DO PERÍODO PÓS-PARTO NO PROTEINOGRAMA DE VACAS HOLANDESAS, OBTIDO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA**

João Paulo Elsen Saut<sup>1</sup>, Samantha Ive Miyashiro<sup>2</sup>, Raquel Fraga e Silva Raimondo<sup>2</sup>, Eduardo Harry Birgel Junior<sup>3</sup>

1. Professor Adjunto da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. FAMEV-UFU – E-mail: jpsaut@usp.br (autor correspondente)
2. Doutorandos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP
3. Professor Livre-docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP

**PALAVRAS-CHAVE:** Bovinos, proteína, proteína de fase aguda, puerpério, SDS-PAGE.

### **ABSTRACT**

#### **INFLUENCE OF THE PUERPERIUM PERIOD ON PROTEINOGRAM DETERMINED BY SODIUM DODECYL SULPHATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS**

This study evaluates the influence of the puerperium period on the proteinogram of Holstein cows. A total of 162 blood samples were collected during the first 90 days after parturition and divided into 9 experimental groups according to the time of postpartum sample collection: 0 – 1<sup>st</sup> day; 1<sup>st</sup> – 2<sup>nd</sup> day; 2<sup>nd</sup> – 4<sup>th</sup> day; 4<sup>th</sup> – 6<sup>th</sup> day; 6<sup>th</sup> – 8<sup>th</sup> day; 8<sup>th</sup> – 15<sup>th</sup> day; 15<sup>th</sup> – 30<sup>th</sup> day; 30<sup>th</sup> – 60<sup>th</sup> day; and 60<sup>th</sup> – 90<sup>th</sup> day. Total protein concentrations were determined by the biuret method and proteins were separated by SDS-PAGE. This procedure detected 21 protein bands and molecular weights varied between 20kDa and 200kDa. The following protein fractions were identified: ceruloplasmin (120kDa), hemopexin (87kDa), transferrin (78kDa), albumin (62kDa), IgG heavy chain (53kDa), haptoglobin (44kDa), acid glycoprotein (36kDa), and IgG light chain (28kDa). Protein levels gradually increased during the puerperium period most likely due to transfer of immunoglobulins into mammary glands. The acute phase protein haptoglobin, acid glycoprotein, and ceruloplasmin increased in partum stimuli and postpartum bacterial contamination. Transferrin protein decreased during parturition showing a bacteriostatic effect against bacterial strains.

**KEYWORDS:** Acute phase protein, cattle, protein, puerperium, SDS-PAGE.

## INTRODUÇÃO

Considera-se como parto eutócico, fisiológico ou normal o momento final da gestação fisiológica, quando, pelo nascimento do produto, há separação orgânica maternal e do feto gerado. Nestas condições, há dilatação da via fetal e o nascimento transcorre sem transtornos e riscos de vida ou ferimentos para mãe e o bezerro (GRUNERT & BIRGEL, 1982).

O período imediatamente após o parto é de suma importância na vida reprodutiva da vaca. Uma involução uterina normal e o restabelecimento da função ovariana no pós-parto são cruciais para que se obtenha curto intervalo entre parto e nova concepção, condição necessária para otimização da produção de leite e bezerras (DOHMEN et al., 2000). Após a parição e subsequente gestação, quatro eventos devem ocorrer concomitantemente: a) involução uterina, b) regeneração do endométrio, c) retorno à ciclicidade ovariana e, d) eliminação da contaminação bacteriana (SHELDON, 2004).

O fracionamento eletroforético das proteínas sangüíneas representa um dos mais confiáveis métodos para a sua identificação (FAGLIARI & SILVA, 2002). A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) possibilita a visualização de concentrações protéicas extremamente baixas, identificação de 20 a 30 proteínas com pesos moleculares que variam entre 24.000 a 340.000 daltons e quantificação de diversas proteínas de fase aguda (FAGLIARI & SILVA, 2002).

As proteínas de fase aguda são encontradas no soro em altas concentrações durante a instalação do processo inflamatório (ALSEMGEEST et al., 1994), podendo ser avaliadas em situações clínicas, pois se acredita que sejam melhores indicadores da resposta sistêmica ao processo inflamatório ou infeccioso do que outras variáveis, tais como febre, aumento no tempo de sedimentação de eritrócitos e leucocitose associada à neutrofilia (HORADAGODA et al., 1999).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do período pós-parto no proteinograma de bovinos da raça Holandesa, através do fracionamento das proteínas séricas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas 162 amostras de sangue de fêmeas bovinas clinicamente sadias e divididas em 9 grupos experimentais, 0 –| 1º dia; 1º –| 2º dia; 2º –| 4º dia; 4º –| 6º dia; 6º –| 8º

dia; 8° –| 15° dia; 15° –| 30° dia; 30° –| 60° dia; e, 60° –| 90° dia pós-parto. As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular externa, utilizando-se sistema Vacutainer®. Após, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos e o soro separado, por aspiração, utilizando-se pipetas Pasteur, em alíquotas, acondicionadas em tubos plásticos e conservadas em freezer a menos 20°C.

A determinação dos teores séricos de proteína total foi feita pelo método do biureto. Para o fracionamento das proteínas foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme a técnica descrita por LAEMMLI (1970) e as recomendações de FAGLIARI & SILVA (2002). A quantificação da frações foi realizada em densitômetro (Byosystems, modelo Epson Expression 1680), com uso de “software” de análise de imagens VisionWorksLS (Ultra-Violet Products). Para perfeita identificação das frações protéicas do soro sangüíneo foi utilizado, em cada corrida de eletroforese, um marcador padrão de pesos moleculares da marca Invitrogen com bandas entre 10 kDa e 220 kDa. Para a análise estatística, utilizou-se o programa Minitab - versão 14.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os valores séricos da concentração das proteínas totais obtidos em amostras colhidas com menos de 24 horas após o parto ( $7,33 \pm 0,82$  g/dL) aumentaram gradativamente nos primeiros dias do puerpério, atingindo valor significativamente diferente nas amostras colhidas entre 15 –| 30 dias após o parto ( $8,08 \pm 0,51$  g/dL), concordando com FEITOSA & BIRGEL (2000) e FAGLIARI et al. (1998). Os baixos valores de proteínas total nos primeiros dias após a parição, nesta pesquisa, devem-se, seguramente, à transferência de globulinas para a glândula mamária para a formação de colostro (NATH et al., 2005).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) permitiu identificar 21 bandas protéicas, cujos pesos moleculares variaram de 20 KDa a 200 KDa. A partir do método utilizado foi possível a identificação nominal de 8 destas proteínas: ceruloplasmina (120 kDa), hemopexina (87 kDa), transferrina (78 kDa), albumina (62 kDa), cadeia pesada de imunoglobulinas (53 kDa), haptoglobina (44 kDa), glicoproteína ácida (36 kDa) e cadeia leve de imunoglobulinas (28 kDa). As demais 13 bandas protéicas foram identificadas apenas com base nos respectivos pesos moleculares, como segue: 187 kDa, 163 kDa, 144 kDa, 133 kDa, 107 kDa, 95 kDa, 40 kDa, 38 kDa, 34 kDa, 33 kDa, 31 kDa, 25 kDa e 23 kDa.

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%, utilizando tampão de aplicação com agente redutor, não se mostrou uma boa técnica para a determinação da concentração de albumina e imunoglobulinas.

A transferrina, proteína de fase aguda negativa, apresentou queda na concentração sérica após o parto ( $132,8 \pm 67,4$  mg/dL) chegando ao patamar mínimo entre o 6<sup>o</sup> – 8<sup>o</sup> dia ( $38,03 \pm 19,47$  mg/dL), retornando somente no 8<sup>o</sup> – 15<sup>o</sup> dia pós-parto ( $108,1 \pm 62$  mg/dL). Uma das funções da transferrina é a habilidade de sequestrar o ferro livre circulante removendo um dos nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano, desta forma agindo como elemento bacteriostático. Esta função assume papel fundamental na parição, pois no momento do parto o útero é exposto a uma série de microorganismos (SHELDON, 2004).

Foi possível identificar três proteínas de fase aguda positivas: ceruloplasmina, haptoglobina e glicoproteína ácida. Estas proteínas elevam suas concentrações plasmáticas imediatamente após a instalação de um processo inflamatório (GODSON et al., 1996).

A parição provocou uma resposta de fase aguda demonstrado pelo aumento das proteínas de fase aguda positiva: ceruloplasmina e haptoglobina. Estas proteínas provavelmente responderam aos danos teciduais decorrentes da passagem do feto pelo canal cervical e a expulsão dos anexos fetais, além de possível influência do cortisol e da prostaglandina aumentados nesta fase (ALSEMGEEST et al., 1993). Após o parto, foi demonstrado um segundo aumento destas proteínas que correspondeu ao estímulo da contaminação bacteriana instalada no útero após o parto (ALSEMGEEST et al., 1993; REGASSA; NOAKES, 1999). A glicoproteína ácida apresentou menor aumento.

As proteínas ceruloplasmina e haptoglobina apresentaram uma terceira elevação, que pode estar relacionado a possíveis estímulos infecciosos, devido às variações nas populações bacterianas e grau de infecção (SHELDON et al., 2001). O grau de inflamação e as camadas envolvidas do útero poderia ser um fator que influenciasse na concentração das proteínas de fase aguda (SMITH et al., 1998).

## CONCLUSÕES

Ocorreu aumento significativo e transitório das proteínas de fase aguda, as quais responderam ao estímulo do parto e à contaminação bacteriana pós-parto, demonstrando desta forma a habilidade dos mecanismos de defesa uterina de eliminar processos infecciosos nesta fase de vacas com pós-parto fisiológico. A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida

contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%, com tampão de aplicação com agente redutor, não é indicada para o estudo do comportamento das proteínas albumina e imunoglobulinas.

## REFERÊNCIAS

ALSEMGEEST, S. P. M.; KALSBECK, H. C.; WENSING, T.; KOEMAN, J. P.; VAN EDEREN, A. M.; GRUYS, E. Concentrations of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (HP) as parameters of inflammatory diseases in cattle. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v.,16, n.,1, p. 21-23, 1994.

ALSEMGEEST, S. P.; TAVERNE, M. A. M.; BOOSMAN, R.; VAN DER WEYDEN, B. C.; GRUYS, E. Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 54, p. 164-167, 1993.

DOHMEN, M. J. W.; JOOP, K.; STURK, A.; BOLS, P. E. J.; LOHUIS, J. A. C. M. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with distocia or retained placenta. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, p. 1019-1032, 2000.

FAGLIARI J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hípidos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-586, 2002.

FAGLIARI, J. J.; SANTAN, A. E.; MARCHIO, W.; CAMPOS FILHO, E.; CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de vacas das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murah durante a gestação, no dia do parto e no puerpério. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 3, p. 273-282, 1998.

FEITOSA, F. L. F.; BIRGEL, E. H. Variação da concentração de imunoglobulinas G e M, de proteína total e suas frações eletroforéticas e da atividade da gama glutamiltransferase no soro sanguíneo de vaca Holandesas, antes e após o parto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 2, p.11-116, 2000.

GODSON, D. L. et al. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 51, p. 277-292, 1996.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H. **Obstetrícia veterinária**. Porto alegre: Ed. Sulina, 1982. p. 323.

HORADAGODA, N. U.; KNOX, K. M. G.; GIBBS, H. A.; REID, S. W. J.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S. E. R.; ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, London, v. 144, p. 437-441, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

MULEI, C. M.; MUTIGA, E. R.; GITAU, G. K. Retained foetal membranes in cattle: relationship between bacterial isolates, blood picture and systemic involvement. **Indian Journal of Animal Science**, New Delhi, v. 63, n. 3, p. 235-238, 1993.

NATH, H. C.; BARUAH, K. K.; BARUAH, A.; SARMAH, H. D.; SARMAH, B. C. Serum cholesterol and protein in pre, peri and postpartum cows. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 82, p. 519-521, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3.ed. New York: Worth, 2000. 1152 p.

REGASSA, F.; NOAKES, D. E. Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria. **Veterinary Record**, London, v. 144, p. 502-506, 1999.

SHELDON, I. M. The postpartum uterus. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 20, p. 569-591, 2004.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N.; DOBSON, H. Acute phase protein response to postpartum uterine bacterial contamination in cattle. **Veterinary Record**, London, v. 148, p. 172-175, 2001.

SMITH, B. I.; DONOVAN, G. A.; RISCO, C.; YOUNG, C. R.; STANKER, L. H.; ELLIOTT, J. Serum haptoglobin concentrations in Holstein dairy cattle with toxic puerperal metritis. **Veterinary Record**, London, v. 142, p. 83-85, 1998a.