

Imunorreatividade para endotelina-1 no plasma e fluido folicular de eqüinos e bovinos*

Endothelin-1 immunoreactive in the plasma and follicular fluid of horses and cattle

Alzira Amélia Martins ROSA E SILVA¹; Maria Clara Soares CALDAS²;
Luís Henrique MONTREZOR²

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Maria Clara Soares Caldas
Laboratório de Melhoramento Genético Animal
Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
Universidade Estadual do Norte Fluminense
Av. Alberto Lamego, 2.000 -Horto
28015-620-Campo dos Goitacazes-RJ
e-mail: aamresil@fmrp.usp.br

1-Departamento de Fisiologia do Laboratório de Fisiologia da Reprodução da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - SP
2-Setor de Reprodução Animal do Laboratório de Melhoramento Genético Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Federal do Norte Fluminense - RJ

RESUMO

A endotelina-1, um peptídeo isolado recentemente, tem sido observada em diferentes tecidos e está envolvida em várias funções reprodutivas. Propusemo-nos a determinar as concentrações da endotelina-1 por radioimunoensaio no plasma de eqüinos e bovinos e no fluido folicular de eqüinos. Foram testados 2 tipos de inibidores de degradação protéica no plasma e fluido folicular. A imunorreatividade média foi de 47,5%, a dose mínima detectável foi de 1 pg/tubo e o coeficiente de variação inter e intra-ensaio foi de 2,36% e 7,26%, respectivamente. O paralelismo entre a curva padrão e as curvas determinadas com diferentes volumes de plasma e fluido folicular valida o radioimunoensaio de endotelina-1 para estas espécies. Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro relato de literatura que detecta por radioimunoensaio a endotelina-1 no plasma e fluido folicular de eqüinos e plasma de bovinos. Os resultados do presente trabalho sugerem a utilização do método de radioimunoensaio utilizando-se kits comerciais para a determinação das concentrações da endotelina-1 no plasma de eqüinos e bovinos e fluido folicular de eqüinos, pelo fato de este apresentar alta sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, podendo assim ser utilizado no estudo de múltiplas funções da endotelina-1 nestas espécies animais e, em especial, no sistema endócrino-reprodutivo.

UNITERMOS: Endotelinas; Radioimunoensaio; Eqüinos; Bovinos.

INTRODUÇÃO

As endotelinas (ETs) pertencem a uma família de peptídeos presentes no organismo em 3 isoformas (ET-1, ET-2 e ET-3), as quais são codificadas por 3 genes¹⁶. As ETs ativas são compostas por 21 aminoácidos (aa) que se originam da quebra de um precursor comum com 38 ou 39 aa (grande ET), pela enzima conversora da ET, a metalo-endopeptidase neutra⁶. Elas apresentam um aumento de 140 vezes na atividade vasoconstritora em relação à grande ET⁹.

Vários relatos sugerem que as ETs atuam como importantes moduladores da função reprodutiva. A ligação da ET com seus receptores no hipotálamo e hipófise desencadeia várias respostas endócrinas, inclusive a estimulação da liberação de gonadotrofinas modulada pelos esteróides ovarianos¹³. A imunorreatividade para ET-1 foi identificada no corpo lúteo (CL) de ratas superovuladas¹⁴, no

meio de cultura de células da granulosa de porcas⁷ e no fluido folicular de mulheres¹ e porcas⁷. Este peptídeo atua na esteroidogênese folicular inibindo o acúmulo de progesterona (P_4)^{3,7,8,14}, devido à diminuição da atividade das enzimas responsáveis por sua síntese e estimulação das enzimas que a degradam¹⁴. Além disso, a expressão do gene da ET-1 é aumentada em ambientes com baixa tensão de O_2 ¹⁰, o que ocorre em folículos ovarianos antes da ovulação, quando as células da granulosa se encontram num ambiente avascular⁴. Estes dados sugerem que a ET-1 atua como um inibidor intra-ovariano da luteinização pré-matura do folículo.

Porém, nada consta na literatura até o presente momento, sobre a sua presença e/ou ação da ET-1 na reprodução de eqüinos e bovinos. Propusemo-nos, então, a determinar a imunorreatividade para ET-1 no plasma e fluido folicular e, a partir dos dados obtidos, verificar possíveis correlações entre a presença e funções da ET-1 na fisiologia reprodutiva destes animais.

* Apoio Financeiro: FAPESP e FAEPA.

MATERIAL E MÉTODO

Colheita e preservação do plasma e fluido folicular

Foram coletadas amostras de sangue de éguas e vacas durante o estro e diestro e fluido folicular de folículos ovarianos de vários tamanhos de éguas. As amostras foram coletadas em seringas geladas, sendo posteriormente transferidas para tubos de polipropileno gelados contendo 2 tipos de inibidores de degradação protéica: 1) aprotinina - Sigma (500 KIU/ml de amostra) e EDTA - Merck (10 µl/ml da amostra da solução 0,372 mg/ml de salina) ou 2) pepstatina A - Sigma (10 µl/ml da amostra da solução 0,342 mg/ml de metanol), fluoreto fenil metilsulfonil - Sigma (PMSF, 10 µl/ml da amostra da solução 0,174 mg/ml de metanol) e EDTA - Merck (10 µl/ml da amostra). O sangue foi centrifugado a 1.600 g por 15 minutos e o plasma estocado até o dia da extração do peptídeo.

Para extrair a ET-1 do plasma ou fluido folicular foram utilizados 5 ml de cada amostra. Dois tipos de tampões foram usados neste processo: 1) tampão A: 1% ácido trifluoroacético (TFA) em água deionizada e 2) tampão B: 60% de acetonitrila em 1% de TFA. A extração foi feita seguindo-se os seguintes procedimentos: 1) adicionou-se um volume igual de tampão A ao plasma, ou seja, ao volume de 1 ml de plasma adicionou-se 1 ml de tampão A; 2) centrifugou-se por 20 minutos a 1.700 g; 3) equilibrou-se a coluna de sepak - C₁₈ (Peninsula Laboratories, Inc.) lavando-a com tampão B (1 ml, 1 vez) e posteriormente com o tampão A (3 ml, 3 vezes); 4) colocou-se a solução de plasma e tampão A (v/v) na coluna de sepak - C₁₈ pré-tratada; 5) lavou-se lentamente a coluna com tampão A (3 ml, 3 vezes) e desprezou-se o lavado; 6) eluiu-se a amostra com tampão B (3 ml, 1 vez) e coletou-se o eluato em tubos de polipropileno de 10 x 70 mm; 7) evaporou-se o eluato em um liofilizador; 8) dissolveu-se o resíduo em 250 µl do tampão utilizado no radioimunoensaio (RIE).

RIE de ET-1

Utilizou-se o *kit* comercial da Peninsula Laboratories, Inc. para a dosagem por RIE da ET-1.

O anticorpo para ET-1 de coelho utilizado apresenta 100% de reação cruzada com a ET-1 de humanos, ratos, suínos, caninos, bovinos e camundongos; 7% com a ET-2 de humanos e caninos; 7% com a ET-3 de humanos, ratos, suínos e coelhos; 17% com a grande ET-1 de humanos; 35% com a grande ET-1 de suínos; menos que 0,01% com a β-ET de camundongos e 3% com a sarafotoxina S6b.

Em cada ensaio foi determinada uma curva padrão com concentrações crescentes de ET-1 ensaiadas em duplicata: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 pg/tubo.

Em dois tubos foi determinado o ponto zero (Padrão 0, B₀ - ligação máxima da anti-ET-1 com a ET-1 ¹²⁵I na

ausência de padrão ou amostra teste). Para avaliar a ligação inespecífica (NSB), havia 2 tubos no ensaio em que a anti-ET-1 foi substituída por tampão.

Plasmas testes extraídos e ressuspensos com 250 µl de tampão do RIE foram colocados no ensaio com diferentes volumes (25, 50, 100 e 200 µl), sendo estes complementados com o tampão do RIE para 200 µl.

A seguinte seqüência temporal foi seguida durante o ensaio: 1) adicionaram-se tampões, amostras, padrões e anticorpo anti-ET-1; 2) agitou-se e incubou-se por 16 - 24 horas a 4°C; 3) adicionou-se ET-1 ¹²⁵I; 4) agitou-se e incubou-se por 16 - 24 horas a 4°C; 5) adicionou-se antigama globulina de coelho produzido na cabra e soro de coelho normal; 6) agitou-se e incubou-se à temperatura ambiente por 90 minutos; 7) adicionou-se tampão (500 µl) e agitou-se; 8) centrifugou-se por 20 minutos a 1.700 g; 9) aspirou-se o sobrenadante (exceto o dos tubos em que foi colocada somente a ET-1 ¹²⁵I); 10) determinou-se a radioatividade em um cintilador sólido - LKB minigama modelo 1275 com 65% de eficiência.

Análise estatística

Os resultados relativos à validação do RIE de ET-1 no plasma de equínos e bovinos e fluido folicular de equínos foram expressos pela média (\bar{x}), desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) intra-ensaio e interensaio, onde $CV = \sigma/\bar{x}$; os resultados relativos à concentração de ET-1 no plasma de equínos e bovinos e fluido folicular de equínos foram analisados pela análise de variância Kruskal-Wallis (ANOVA).

RESULTADOS

As características do ensaio estão representadas na Tab. 1. A imunorreatividade (IR) média foi de 47,5%, variando entre 42,6 - 50%. A sensibilidade média dos ensaios calculada pela dose mínima detectável foi de 1,0 pg/tubo. A reprodutibilidade do ensaio foi determinada pela análise do valor D₅₀ da curva com um CV interensaio de 2,36%. A precisão do ensaio medida pelo CV intra-ensaio ao nível do padrão com valor igual a 16 pg (P_{16 pg}) foi de 7,26% (Tab. 1).

Utilizaram-se diferentes volumes de plasma obtidos de animais em diestro e estro e de fluido folicular de equínos preservados com aprotinina e EDTA, cujos valores de (B/B₀) foram colocados em gráfico juntamente com os valores de (B/B₀) da curva padrão da ET-1 (Fig. 1). Plasmas de bovinos foram coletados com aprotinina e EDTA e também com pepstatina A, PMSF e EDTA (Fig. 2).

Nenhuma diferença foi observada nas concentrações de ET-1 entre os plasmas de bovinos preservados com aprotinina/EDTA ou pepstatina A/PMSF/EDTA (Fig. 2). Evidenciou-se um paralelismo entre as curvas padrão e as curvas determinadas com diferentes volumes de plasma de

Tabela 1

Controle de qualidade do radioimunoensaio de ET-1. Ribeirão Preto, 1996.

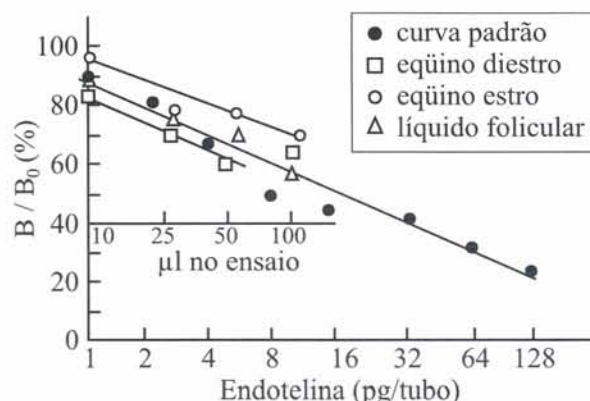
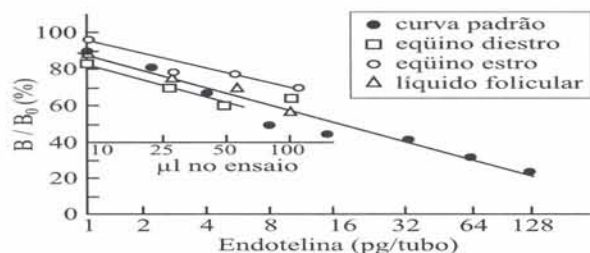


Figura 1

Comparação da imunoreatividade para ET-1 da curva padrão (●—●) com a observada no plasma obtido durante o estro (○—○) e diestro (—) e no fluido folicular de equínos (Δ—Δ). Cada ponto representa a média dos valores de 4 amostras.

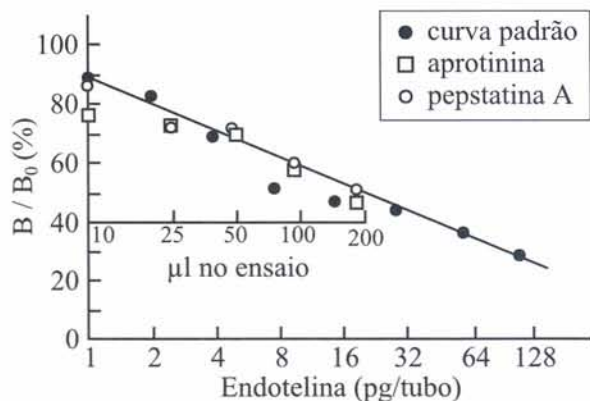


Figura 2

Comparação da imunoreatividade para ET-1 da curva padrão (●—●) com a observada no plasma bovino coletado com aprotinina (□—□) e pepstatina A (○—○). Cada ponto representa a média dos valores de 4 amostras.

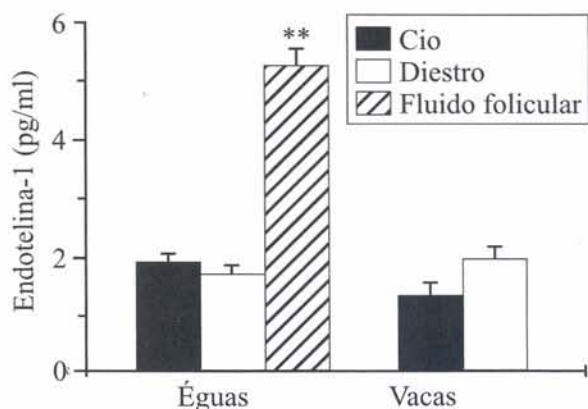


Figura 3

Concentração de endotelina-1 imunoreativa no plasma de equínos e bovinos no estro (n = 5), diestro (n = 5) e no fluido folicular de equínos (n = 8). Os valores representam a média ± o erro padrão da média. **p<0,01.

equínos e bovinos no estro e no diestro e fluido folicular de equínos (Fig. 1 e 2).

A imunoreatividade para ET-1 observada no plasma de equínos em diestro (n = 5) e estro (n = 5) não diferiu significativamente. Concentrações semelhantes de ET-1 também foram observadas em bovinos no estro (n = 8) e no diestro (n = 8). No entanto, observaram-se concentrações maiores de ET-1 no fluido folicular de equínos quando comparadas com as concentrações plasmáticas observadas em qualquer fase do ciclo estral (Fig. 3).

DISCUSSÃO

Segundo dados de literatura, este é o primeiro relato que detecta por RIE a ET-1 no plasma de equínos e bovinos e fluido folicular de equínos. As concentrações estimadas foram da ordem de 1,04 a 3,32 pg/ml no plasma e 1,75 a 6,7 pg/ml no fluido folicular. Iwai *et al.*⁷ demonstraram que as células da granulosa secretam ETs *in vitro*. A ET-1 também é secretada por várias outras células em fluidos corporais, e nestes casos sua concentração também é maior (urina², saliva¹¹, fluido sinovial¹², cerebrospinal⁵) do que as observadas no plasma.

A produção máxima de ET-1 e ET-2 e grande ET por células epiteliais do oviduto *in vitro* em bovinos é de 400 pg/mg de proteína¹⁵. No CL de ratas superovuladas, a concentração de ET-1 imunoreativa em resposta à gonadotrofina coriônica humana varia com a idade do CL: 250 pg/g (CL - 4 dias) e 500 pg/g (CL - 7 dias)¹⁵. No plasma e fluido folicular de mulheres normais, as concentrações de ET-1 determinadas por RIE são elevadas, variando entre 22,0 e 37,0 pg/ml¹, ou seja, nitidamente superiores às observadas neste trabalho.

Em suínos, a concentração de ET-1 no plasma é de

27,7 pg/ml, enquanto no fluido folicular é menor e varia de 9,4 a 14,2 pg/ml⁷. Estas diferenças de aproximadamente 10 vezes entre os valores de ET observados no plasma e fluido folicular de suínos e equínos e plasma de bovinos devem-se provavelmente às diferenças observadas entre a sensibilidade do anticorpo utilizado nos 2 ensaios. O anticorpo utilizado em nosso trabalho apresenta 100% de reação cruzada com a ET-1, 7% com a ET-2, 7% com a ET-3 e 17 e 35% com a grande ET de humanos e suínos, respectivamente. No trabalho de Iwai *et al.*⁷, o anticorpo utilizado apresentava 100% de reação cruzada com a ET-1, 80% com a ET-2, 20% com a ET-3 e 80% com a grande ET. Portanto, detectamos quase que exclusivamente a ET-1, enquanto Iwai *et al.*⁷ detectaram ET-1, ET-2, ET-3 e a grande ET, explicando, portanto, as maiores concentrações observadas por estes autores.

Para confirmar se estávamos medindo especificamente a ET-1 no plasma de equínos e bovinos e fluido folicular de equínos, estimou-se a concentração de ET-1 em 5 ml de plasma e fluido folicular. Após a extração da ET-1 das amostras e a ressuspensão destas com tampão do RIE, foram utilizados volumes que variaram de 25 a 200 µl no RIE e foi observada diminuição do B/B₀ e, portanto, do aumento da concentração de ET-1 nos tubos.

A baixa taxa de ligação ao nível do NSB indica que o

hormônio radioativo, quando utilizado, encontrava-se em perfeitas condições e estes valores encontram-se próximos aos descritos na literatura.

A imunorreatividade de 47,5%, a sensibilidade do ensaio de 10 pg/ml, o CV intra-ensaio de 7,26% e o CV interensaio de 2,36% são semelhantes aos descritos na literatura¹ e são considerados muito bons.

CONCLUSÕES

O dados indicam a presença de imunorreatividade para ET-1 no plasma de equínos e bovinos e no fluido folicular de equínos.

A determinação da imunorreatividade para ET-1 por RIE sugere a utilização desta metodologia como ferramenta para estudos da compreensão dos mecanismos fisiológicos e/ou patológicos onde há participação da ET-1 em equínos e bovinos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Lucila Leico Kagohara Elias e Marina Holanda pelas valiosas sugestões que em muito contribuíram na montagem deste método.

SUMMARY

Endothelin-1, a recently isolated peptide, has been observed in different tissues and is involved in several reproductive functions. The objective of the present study was to determine the concentrations of immunoreactive endothelin-1 in the plasma of horses and cattle and in the follicular fluid of horses using a commercial radioimmunoassay kit. Mean immunoreactivity was 47.5%, the minimum detectable dose was 1 pg/tube and the interassay and intra-assay coefficients of variation were 2.36% and 7.26%, respectively. The parallelism between the standard curves and the curves determined with different volumes of plasma and follicular fluid validates the radioimmunoassay of endothelin-1 for these species. To our knowledge, this is the first report in the literature of detection of endothelin-1 in the plasma and follicular fluid of horses and in the plasma of cattle by radioimmunoassay. The present results suggest the use of the radioimmunoassay method employing commercial kits for the determination of endothelin-1 concentrations in horse and cattle plasma and horse follicular fluid because of its high sensitivity, accuracy and reproducibility, in order to study the multiple functions of endothelin-1 in these animals species, and especially in the endocrine-reproductive system.

UNITERMS: Endothelins; Radioimmunoassay; Horses; Cattle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABAÉ, M.; GLASSBERG, M.; MAJERCIK, M.H.; YOSHIDA, H.; VISTAL, R.; PUETT, D. Immunoreactive endothelin-1 concentrations in follicular fluid of women with and without endometriosis undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v.61, n.6, p.1083-7, 1994.
- 2- BERBINSCHI, A.; KETELSLEGGERS, J.M. Endothelin in urine. **Lancet**, v.2, n.8653, p.6, 1989.
- 3- FLORES, J.A.; QUYYUMI, S.; LEONG, D.A.; VELDHUIS, J.D. Actions of endothelin-1 on swine ovarian (granulosa cells). **Endocrinology**, v.131, n.3, p.1350-8, 1992.
- 4- GOSDEN, R.G.; BYATT-SMITH, J.G. Oxygen concentration gradient across the ovarian follicular epithelium: model, predictions and implications. **Human Reproduction**, v.1, n.2, p.65-8, 1986.
- 5- HIRATA, Y.; MATSUNAGA, T.; ANDO, K.; FURUKAWA, T.; TSUKAGOSHI, H.; MARUNO, F. Presence of endothelin-1 like immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.166, n.3, p.1274-8, 1990.
- 6- INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, T.; MIYAUCHI, T.; GOTO, K.; MASAKI, T. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.86, n.8, p.2863-7, 1989.

- 7- IWAI, M.; HASEGAWA, M.; TAIL, S.; SAGAWA, N.; NAKAO, K.; IMURA, H.; NAKANISHI, S.; MORI, T. Endothelins inhibit luteinization of cultured porcine granulosa cells. **Endocrinology**, v.129, n.4, p.1909-14, 1991.
- 8- KAMADA, S.; KUBOTA, T.; HIRATA, Y.; TAGUCHI, M.; EGUCHI, S.; MARUMO, F.; ASO, T. Direct effect of endothelin-1 on the granulosa cells of the porcine ovary. **Journal of Endocrinology**, v.134, n.1, p.59-66, 1992.
- 9- KIMURA, S.; KASUYA, Y.; SAWAMURA, T.; SHINMI, O.; SUGITA, Y.; YANAGISAWA, M. Conversion of big-endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.13, p.S5-7, 1989. Supplement 5.
- 10- KOUREMBANAS, S.; MARSDEN, P.A.; McQUILLAN, L.P.; FALLER, D.V. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. **Journal of Clinical Investigation**, v.88, n.3, p.1054-7, 1991.
- 11- LAM, H.C.; TAKAHASHI, K.; GHATEI, M.A.; SUDA, K.; KANSE, S.M.; BLOMM, S.R. Presence of immunoreactive endothelin in human saliva and rat parotid gland. **Peptides**, v.12, n.4, p.883-5, 1991.
- 12- NAHIR, A.M.; HOFFMAN, A.; LORBER, M.; KEISER, H.R. Presence of immunoreactive endothelin in synovial fluid: analysis of 22 cases. **Journal of Rheumatology**, v.18, n.5, p.678-80, 1991.
- 13- ORTMANN, O.; WASSMANN, D.; STOJILKOVIC, S.S.; CATT, K.J.; SCHULZ, K-D.; EMONS, G. Ovarian steroids modulate endothelin-induced luteinizing hormone secretion from cultured rat pituitary cells. **Endocrinology**, v.133, n.6, p.2632-8, 1993.
- 14- TEDESCHI, C.; HAZUM, E.; KOBIA, E.; RICCIARELLI, E.; ADASHI, E.Y.; PAYNE, D.W. Endothelin-1 as a luteinization inhibitor: inhibition of rat granulosa cell progesterone accumulation via selective modulation of key steroidogenic steps affecting both progesterone formation and degradation. **Endocrinology**, v.131, n.5, p.2476-8, 1992.
- 15- USUKI, S.; SUZUKI, N.; MATSUMOTO, H.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Endothelin-1 in luteal tissue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.80, n.1/3, p.147-51, 1991.
- 16- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v.332, n.6163, p.411-5, 1988.

Recebido para publicação: 22/05/1997

Aprovado para publicação: 08/07/1999