

NÍVEIS DE PSPB DURANTE O PÓS-PARTO EM VACAS DE CARNE ALENTEJANAS.

POSTPARTUM LEVELS OF PSPB IN ALENTEJANO BEEF COWS

Carla C. Marques, M. Irene Vasques, A.E.M. Horta, P. Humblot* e G. Sasser**

Dpto. de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional-INIA, Vale de Santarém

** UNCEIA, Services Techniques 13 Rue Jouet 94703 Maisons Alfort, France*

*** University of Idaho, Dpt. Anim. Sciences, 83843 Moscow Id. U.S.A.*

Resumo

Os níveis plasmáticos da *Pregnancy Specific Protein B* (PSPB) foram medidos semanalmente até à 18ª semana pós-parto em 77 vacas alentejanas e comparados entre animais parindo gémeos (n=23) ou singulares (n=54) e com (n=39) ou sem (n=30) retenção placentária (RP). Os coeficientes de regressão obtidos a partir de equações ajustadas para cada animal foram correlacionados com a duração do anestro pós-parto. A gemelaridade foi induzida através de transferência de embriões FIV associada ou não à inseminação artificial, no âmbito do projecto ECLAIR nº AGRE 0018 realizado entre 1990 e 1993 na Estação Zootécnica Nacional. As retenções placentárias foram consequência da gemelaridade e de induções do parto nalguns animais.

As concentrações de PSPB não mostraram diferenças significativas entre os grupos de vacas com partos gemelares ou singulares, excepto na 1ª semana pós-parto ($1611,4 \pm 518,6$ vs. $881,4 \pm 109,4$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,03$). As concentrações desceram exponencialmente em ambos os grupos, ($Y = e^{(8,26 - 0,725 \cdot X)}$, $r = -0,94$; $P < 0,0001$). Os níveis basais só foram atingidos à 17ª semana pós-parto. Contudo, o limiar de diferenciação significativa relativamente às concentrações de vacas da mesma raça com 40 dias de gestação ($1,87 \pm 0,14$ ng/ml), verifica-se à 16ª semana nas partições singulares ($0,47 \pm 0,12$ ng/ml; $P < 0,0001$) e à 14ª nas partições gemelares ($0,83 \pm 0,25$ ng/ml; $P < 0,0001$). As vacas com RP, apresentaram níveis de PSPB significativamente inferiores da 2ª à 16ª semana pós-parto relativamente às que não fizeram RP, tendo atingido os níveis basais uma semana mais cedo (16ª semana). À 12ª semana pós-parto, as vacas com RP apresentaram uma média inferior à detectada em vacas com 40 dias de gestação ($0,93 \pm 0,26$ vs. $1,87 \pm 0,14$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,0001$). A correlação entre a taxa de decréscimo (coeficiente de regressão) dos níveis de PSPB e o início da actividade ovárica pós-parto não foi significativa ($r = 0,095$; $P > 0,05$).

Os resultados permitem concluir que o efeito gemelaridade não afectou o perfil de secreção de PSPB durante o pós-parto. As vacas com RP parecem perder mais cedo a sua capacidade de síntese de PSPB no pós-parto, apresentando níveis significativamente inferiores às que não padecem de RP. A diminuição dos níveis de PSPB no pós-parto verifica-se de uma forma exponencial, sendo detectados níveis da proteína até à 17ª semana. Este trabalho confirma a possibilidade de haver falsos diagnósticos de gestação positivos pela PSPB (aos 40 dias pós-cobrição) em vacas postas à cobrição até às 11 semanas depois do parto.

Summary

Plasma levels of *Pregnancy Specific Protein B* (PSPB) were monitored once weekly by RIA in a group of 77 Alentejano beef cows during the postpartum period. Results were compared between twin (n=23) and single (n=54) calving cows and cows presenting (n=39) or not (n=30) placental retention (PR). Regressions of PSPB levels on postpartum days were calculated for individuals and their slope correlated with the onset of ovarian activity. Gemelarity was induced by the transfer of IVM/IVF bovine embryos associated or not to artificial insemination under the research project nr. AGRE 0018 of the EC ECLAIR program. Placental retention was a consequence of gemelarity and calving induction in some of the animals.

There were no significant differences between twin and single calved cows, exception made for the 1st week after calving (1611.4 ± 518.6 vs. 881.4 ± 109.4 ng/ml, respectively; $P < 0.03$). The concentrations of PSPB declined exponentially during the postpartum in both groups of animals ($Y = e^{(8.26 - 0.725 \cdot X)}$, $r = -0.94$; $P < 0.0001$) and basal levels were only reached at the 17th week. The threshold level allowing to differentiate postpartum and pregnant animals (by 40 days of gestation; 1.87 ± 0.14 ng/ml) was only reached at the 16th week in single (0.47 ± 0.12 ng/ml; $P < 0.0001$) and at the 14th week in twin (0.83 ± 0.25 ng/ml; $P < 0.0001$) calved cows. Cows with PR presented significantly lower levels of PSPB than cows without PR from the 2nd to the 16th week postpartum and reached basal levels one week sooner (16th week). The threshold level allowing the differentiation of postpartum PR and pregnant cows (day 40; 1.87 ± 0.14 ng/ml) was reached at 12th week postpartum (0.93 ± 0.26 ng/ml; $P < 0.0001$). The correlation of the individual slopes in PSPB decline with the onset of postpartum ovarian activity was not significant ($r = 0.095$; $P > 0.05$).

These results suggest that twinning do not affect the profile of PSPB secretion during the postpartum period. Cows with placental retention loose sooner their ability of secreting PSPB than normal calving cows, presenting significantly lower levels of this protein during the postpartum. The decline of PSPB levels after calving is accomplished in an exponential way, basal levels being reached at 17th week. This work confirms the possibility of erroneous positive pregnancy diagnosis results by PSPB determination in cows bred earlier than the 11th week after calving.

Introdução

A PSPB (Pregnancy Specific Protein B) é uma proteína sintetizada pela placenta dos bovinos durante a gestação, inicialmente isolada por Butler et al. (1).

Noutras raças, as concentrações da PSPB durante o pós-parto diminuem lentamente até atingirem valores basais cerca das 13 semanas (2).

Neste trabalho procurou-se saber se estas concentrações diferem entre animais parindo gémeos ou singulares e entre vacas apresentando ou não retenção placentária. São ainda relacionadas as concentrações de PSPB com o reinício da actividade ovárica pós-parto.

Materiais e Métodos

O estudo foi realizado num grupo de 77 vacas Alentejanas mantidas em regime de pastoreio extensivo nas quais a gemelaridade foi induzida através da transferência de embriões FIV associada ou não à inseminação artificial (3) no âmbito do projecto ECLAIR nº. AGRE 0018 realizado entre 1990 e 1993 na Estação Zootécnica Nacional.

Realizaram-se colheitas de sangue periférico semanalmente desde a 1ª à 18ª semana pós-parto para determinação dos níveis plasmáticos de PSPB e progesterona (P4), sendo os resultados comparados entre animais parindo gémeos (n=23) ou singulares (n=54) e com (n=39) ou sem (n=30) retenção placentária. As retenções placentárias foram consequência da gemelaridade e de induções do parto praticadas em alguns dos animais (4).

A PSPB foi doseada por radioimunoensaio (RIA) pela técnica do duplo anticorpo, segundo método descrito anteriormente (5). Todas as amostras foram doseadas em duplicado em diluições de 1/500 na primeira semana pós-parto até zero a partir da 9ª até à 18ª, de acordo com as concentrações esperadas, quer nas vacas que pariram gémeos quer nas que pariram singulares. O doseamento de P4 realizado por RIA (fase sólida) seguiu o método já descrito (6). O reinício da actividade ovárica foi estabelecido quando a P4 se elevou acima de 0,5 ng/ml, com flutuações cíclicas posteriores.

Consideraram-se como retendo a placenta os animais que não expulsaram as membranas fetais nas primeiras 12 horas após o parto (7).

O estabelecimento de limiares de diferenciação nos níveis de PSPB durante o pós-parto com os de vacas gestantes, foi realizado com base em doseamentos realizados em animais da mesma raça gestantes aos 40 dias pós-ovulação, utilizados noutra experiência (8).

As concentrações semanais de PSPB foram comparadas entres os grupos considerados por análise de variância (ANOVA) e testes de menores diferenças significativas (LSD) para uma probabilidade de erro de 5%. A cinética dos valores ao longo do pós-parto foi estabelecida por equações de regressão com o melhor ajustamento para o tipo de valores em causa (exponenciais). Foi ainda calculada a correlação de Pearson entre o coeficiente de regressão obtido para os níveis de PSPB ao longo do pós-parto de cada vaca (velocidade de decréscimo das concentrações da proteína) com o início da actividade ovárica após o parto para singulares e gêmeos.

Resultados

As concentrações de PSPB foram significativamente superiores nas vacas com partos gêmeos na 1ª semana pós-parto ($1611,4 \pm 518,6$ vs. $881,4 \pm 109,4$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,03$) e inferiores na 15ª ($0,46 \pm 0,16$ vs $1,15 \pm 0,20$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,01$; Figura 1).

As concentrações desceram exponencialmente em ambos os grupos, ($Y = e^{(8,26 - 0,725 \cdot X)}$, $r = -0,94$; $P < 0,0001$) e os níveis basais só foram atingidos à 17ª semana pós-parto (Figura 2).

Contudo, o limiar de diferenciação significativa relativamente às concentrações de vacas da mesma raça com 40 dias de gestação ($1,87 \pm 0,14$ ng/ml), verifica-se à 16ª semana nas

parições singulares ($0,47 \pm 0,12$ ng/ml; $P < 0,0001$) e à 14^a nas parições gemelares ($0,83 \pm 0,25$ ng/ml; $P < 0,0001$; Tabela 1).

Figura 1 - Níveis de PSPB após o parto em vacas parindo gémeos e singulares (os desvios representam os intervalos de confiança das médias para 95%).

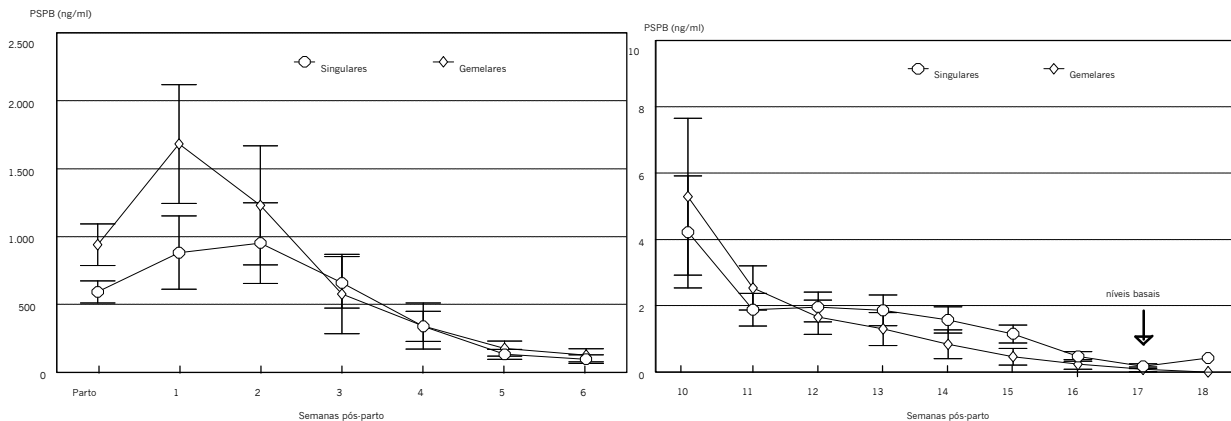
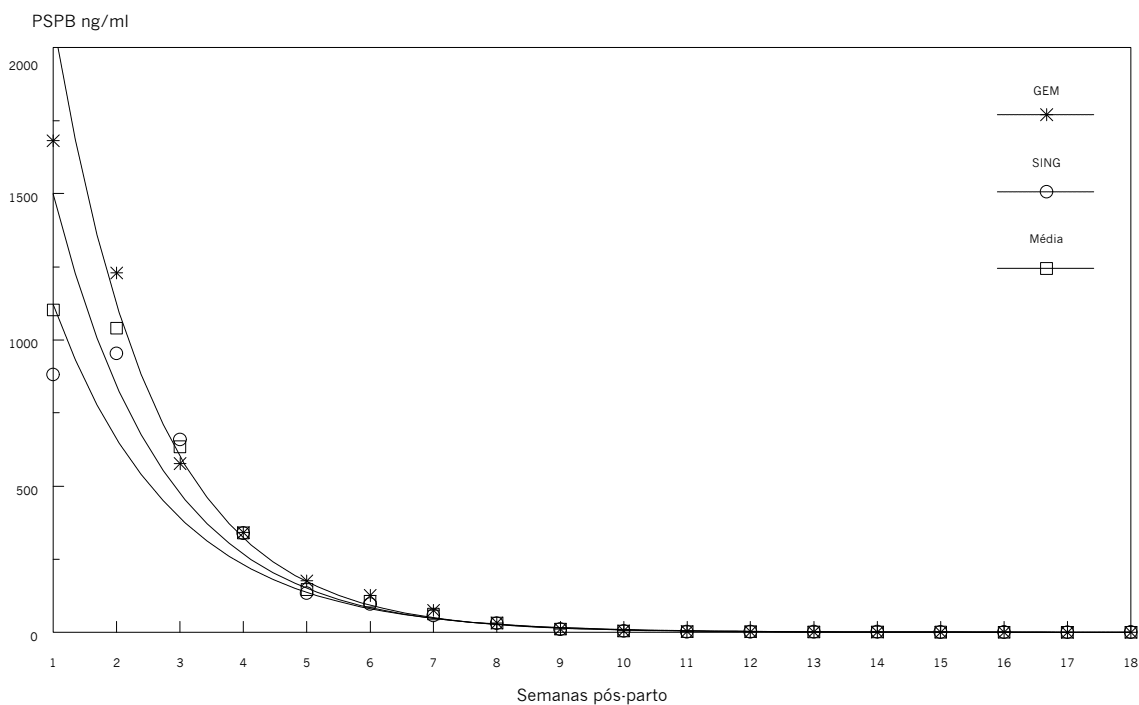


Figura 2 - Regressões dos teores de PSPB durante o período pós parto em vacas parindo singulares ou gemelares. Curva Média: $Y = e^{(8,26-0,725 \cdot X)}$ ($X =$ dias pós-parto).



As vacas com RP, apresentaram níveis de PSPB significativamente inferiores da 2^a à 16^a semana pós-parto relativamente às que não fizeram RP, tendo atingido os níveis basais uma semana mais cedo (16^a semana, Figura 3). À 12^a semana pós-parto, as vacas com RP apresentaram uma média inferior à detectada em vacas com 40 dias de gestação ($0,93 \pm 0,26$ vs. $1,87 \pm 0,14$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,0001$; Tabela 1).

Figura 3 - Níveis de PSPB após o parto em vacas com e sem retenção placentária (os desvios representam os intervalos de confiança das médias para 95%).

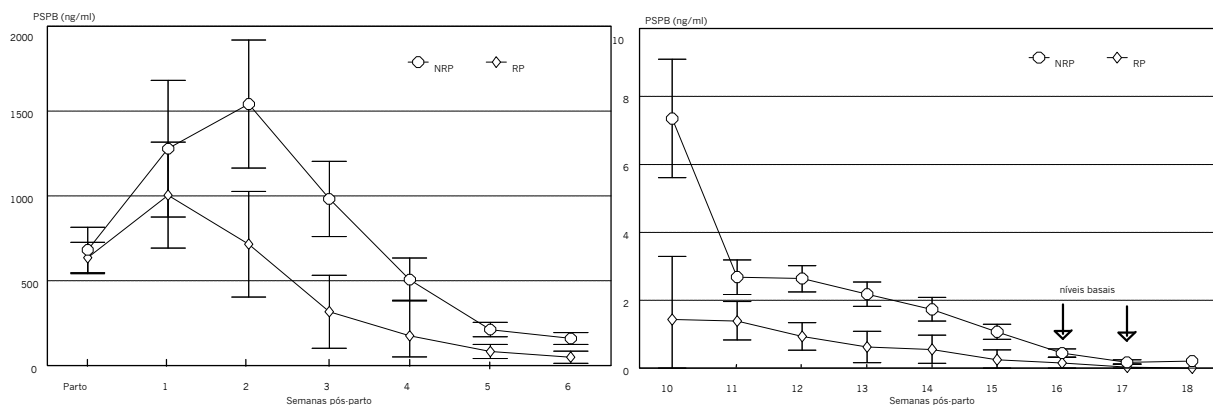


Tabela 1 - Limiar de diferenciação dos níveis de PSPB no pós parto com os de vacas gestantes aos 40 dias de gestação.

Grupos	(n)	Média (ng/ml)	I.C. das médias (LSD)		ANOVA P<0,000 1	Cobrição pós- parto (dias)
			Min	Max		
Gestantes aos 40 dias	72	1,87	1,63	2,11	a	
16 semanas PP (Singulares)	13	0,47	-0,08	1,01	b	72
14 semanas PP (Gemelares)	13	0,83	0,28	1,39	b	58
12 semanas PP (Ret. Placent.)	19	0,93	0,53	1,33	b	44

A correlação entre a taxa de decréscimo (coeficiente de regressão) dos níveis de PSPB e o início da actividade ovárica pós-parto não foi significativa quer nos singulares ou gemelares, quer em ambas as classes de animais em conjunto ($r=0,095$; $P>0,05$). O reinício da actividade ovárica de vacas parindo gemelares ou singulares não foi significativamente diferente entre os grupos ($P>0,05$).

Discussão e conclusões

Os resultados apresentados estão de acordo com trabalhos anteriores relativamente à detecção de PSPB durante várias semanas após o parto (9). Os níveis basais na raça Alentejana só foram atingidos à 17ª semana pós-parto quer em vacas parindo gémeos ou singulares, havendo referências em trabalhos anteriores para as 9 (9) e 13 semanas (2) em vacas parindo singulares. Contudo as vacas com partições gemelares apresentaram concentrações significativamente superiores às das vacas parindo singulares na altura do parto e durante a 1ª semana pós-parto. Esta diferença está de acordo com as concentrações observadas durante a gestações gemelares e singulares da mesma raça (8), reflectindo a manutenção de uma maior secreção de PSPB durante o pós-parto imediato nas vacas parindo gémeos. No entanto esta diferença desaparece a partir da 2ª semana.

A síntese de PSPB durante a gestação é da responsabilidade das células gigantes binucleadas da placenta (9, 10) e a sua semi-vida foi avaliada entre 7,3 e 8,4 dias (9). Em abortos diagnosticados clinicamente cerca dos 100 dias de gestação, verifica-se que os níveis da PSPB decrescem entre 30 a 80 dias antes do aborto, havendo animais em que já não se detecta a proteína na altura da expulsão do feto (11, 12). Estes resultados sugerem que a hipofuncionalidade da placenta em alguns casos de aborto conduz a um desaparecimento mais rápido da PSPB circulante, contrariamente ao que sucede no pós-parto consequente a gestações normais. Existe alguma polémica relativamente à origem da PSPB após o parto, havendo trabalhos que sugerem a sua libertação continuada pelo endométrio (5) contrariando a hipótese de ser unicamente sintetizada e segregada pelas células binucleadas da placenta (10, 13) que possam permanecer encarceradas nas criptas carunculares maternas (9).

Os resultados obtidos em vacas com retenção placentária, onde se observaram concentrações inferiores de PSPB somente a partir da 2ª semana após o parto, parecem não reflectir uma maior produção de PSPB associada a um aumento do número das células binucleadas que normalmente se verifica nestes animais na altura do parto (14). No entanto, nas vacas com retenção placentária verifica-se que a relação PGE/PGF está aumentada como reflexo da persistência das células binucleadas no final da gestação (14), o que prejudica a expulsão das membranas fetais (15), traduzindo-se em menores concentrações plasmáticas de PGF (16). Por outro lado, durante a gestação verifica-se que a PSPB, estimulando a síntese das PGs por estas células, parece ser responsável pelo aumento do ratio PGE/PGF (17). A menor produção de PSPB observada a partir da 2ª semana pós-parto em vacas com retenção placentária, levando estes animais a atingirem níveis basais uma semana mais cedo (16ª semana), poderá ser devida ao aumento da inflamação e das descargas uterinas (descamação) que conduzem a uma depuração mais rápida das células de origem placentária, ou a um aumento da taxa de catabolização da molécula.

Quando comparados os níveis de PSPB aos 40 dias de gestação (8) com as concentrações no pós-parto, verifica-se que o limiar de de diferenciação para vacas com partos singulares, gemelares e com retenção placentária, ocorreu à 16ª, 14ª e 12ª semanas, respectivamente. Estes resultados indicam que as cobrições após o parto não deverão ocorrer antes dos 72, 58 e 44 dias em vacas que tenham parido um vitelo, dois ou que tenham apresentado retenção placentária. Para vacas com partos singulares estes resultados estão de acordo com os de Humblot et al. (2, 18), que referem que nas colheitas realizadas antes dos 100 dias depois do parto, a PSPB resultante da gestação anterior é ainda detectável e a exactidão dos diagnósticos positivos realizados aos 40 dias pós-cobrição diminui em cerca de 10 a 15%. No que se refere às vacas com partos gemelares e com retenção placentária as datas de cobrição podem ser antecipadas para os 58 e 44 dias, respectivamente.

A inexistência de diferenças significativas para a duração do período de anestro entre vacas parindo gémeos e singulares, deve-se ao facto de nem todas as fêmeas parindo gemelares terem amamentado dois vitelos. A amamentação de gemelares atrasa o reinício da actividade ovárica pós-parto nesta raça, como é demonstrado num trabalho anterior (19). A ausência de correlação entre a diminuição diária dos níveis de PSPB com o reinício da actividade ovárica no pós-parto, sugere que estes fenómenos são independentes um do outro.

Bibliografia

- 1 - Butler, J.E., Hamilton, W.C., Sasser, R.G., Ruder, C.A., Hass, G.M., Williams, R.J. (1982). Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol. Reprod.*, **26**:925-933.
- 2 - Humblot, P., Olivera, O., Ruder, C.A., Jeanguyot, N., Thibier, M., Sasser, R.G. (1988). Progesterone and PSPB concentrations at time of AI and at the beginning of pregnancy in dairy cows. Proceedings BARD Int. Workshop on maternal recognition of pregnancy in dairy cows and maintenance of the corpus luteum. Jerusalem, p. 62 (Abst.).
- 3 - Horta, A.E.M., Marques, C.C., Vasques, M.I., Leitão, R.M., Vaz Portugal, A. (1993). Indução de gestações gemelares em vacas de carne por transferência de embriões produzidos in vitro. 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal. SPRA. Aceite para publicação.
- 4 - Horta, A.E.M., Marques, C.M., Vasques, M.I., Leitão, R.M. (1992). Effect of inducing calvings on calf birth weight. 12th International Congress on Animal Reproduction. Haia. **Vol. 2**: 895-897.
- 5 - Humblot, P., Jeanguyot, N., Ruder, C.A., Leriche, I., Thibier, M., Sasser, R.G. (1988). Accuracy of pregnancy diagnosis by bPSPB RIA in the plasma of dairy cows 28 days after I.A. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin. **Vol. 2**: 94-96.
- 6 - Vasques, M.I. (1990). Relatório de Actividades. Adenda. EZN/INIA. Vale de Santarém.
- 7 - Marques, C.C., Vasques, M.I., Horta, A.E.M. (1993). Efeito da gemelaridade e da indução dos partos na incidência de retenção placentária: sua prevenção através da administração de PGF2 alfa. 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal. SPRA. Aceite para publicação.
- 8 - Vasques, M.I., Marques, C.C., Horta, A.E.M., Humblot, P., Sasser, R.G. (1993). Diagnóstico de gestações gemelares e de perdas embrio/fetais em bovinos pelo doseamento de PSPB. 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal. SPRA. Aceite para publicação.
- 9 - Ruder, C.A., Sasser, R.G. (1986). Source of bovine pregnancy-specific protein B (bPSPB) during the postpartum period and estimation of half-life of PSPB. *J. Anim. Sci.*, **63** (Supl.): 335 (abst.)
- 10 - Eckblad, W.P., Sasser, R.G., Ruder, C.A., Panlasigui, P.M., Kuckzinski, T.S. (1985). Localization of pregnancy-specific protein B (PSPB) in bovine placental cells using a glucose oxidase-anti-glucose oxidase immunohistochemical stain. *J. Anim. Sci.*, **61** (Suppl. 1): 149 (abstr.).
- 11 - Humblot, P. (1993). Utilisation des dosages hormonaux dans le control de la reproduction chez la vache laitiere. 5º. Simpósio Internacional de Reprodução Animal. Luso.
- 12 - Semambo, D.K.N., Eckersall, P.D., Sasser, R.G., Ayliffe, T.R. (1992). Pregnancy-specific protein B and progesterone in monitoring viability of the embryo in early pregnancy in the cow after experimental infection with *Actinomyces pyogenes*. *Theriogenology*, **37**:741-748.
- 13 - Reimers, T.J., Sasser, R.G., Ruder, C.A. (1985). Production of pregnancy-specific protein by bovine binucleated trophoblastic cells. *Biol. Reprod.*, **32** (Supl.): 65 (Abstr.)
- 14 - Gross, T.S., Williams, W.F. (1988). Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by binucleate cell. *Biol. Reprod.*, **38**: 1027-1034.
- 15 - Horta, A.E.M. (1984). A summary of studies concerning the effects of prostaglandin synthesis inhibition, PGE2 and PGF2a on the expulsion of placenta and myometrial activity

- in the cow. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Urbana-Illinois, Brief Communications, P413.
- 16 - Horta, A.E.M., Chassagne, M., Brochart, M. (1986). Prostaglandin F2 alpha and prostacyclin imbalance in cows with placental retention: New findings. *Ann. Rech. Vét.*, **17**:395-399.
- 17 - Del Vechio, R.P., Sasser, R.G., Randel, R.D. (1990). Effect of pregnancy-specific protein B on prostaglandin F2a and prostaglandin E2 release by day 16-perifused bovine endometrium tissue. *Prostaglandins*, **40**: 271-282.
- 18 - Humblot, P., Payen, B., Jeanguyot, N., Thibier, M., Sassar, R.G. (1991). Progesterone and pregnancy specific protein B concentrations in serum and plasma 28-30 days after AI and their relationship with embryonic mortality in French beef breeds. *J. Reprod. Fert.*, **43** (Supl.): 302-303 (Abstr.)
- 19 - Marques, C.C., Vasques, M.I., Horta, A.E.M. (1993). Efeito da amamentação gemelar e da retenção placentária no reinício da actividade ovárica pós-parto em vacas Alentejanas. 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal. SPRA. Aceite para publicação.