

FR 45. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR PRECOZ DE PREÑEZ (EPF) EN SUERO DE CERDAS PREÑADAS Y SEUDOPREÑADAS CON ADMINISTRACIÓN INTRAUTERINA DE FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS (PAF)

A. Vivas¹, C. Nowicki², R. Rovere³ y M. Sereno³

Universidad Nacional de Buenos Aires. Facultad Agronomía y Veterinaria

¹Departamento de Anatomía Animal. ²Clínica Animal. Universidad Nacional de Río Cuarto. ³Facultad de Farmacia y Bioquímica. Argentina.

Abstract

Early pregnancy factor: its characterization and purification from pregnant and PAF intrauterine administrated - pseudopregnant swine serum

The objective of the present research was to purify the early pregnancy factor (EPF) from swine serum using diafiltration and ion-exchange chromatography and compared with that obtained from pseudopregnant serum of PAF intrauterine administrated sows. EPF activity was determined by using rosette inhibition titre (RIT) after the pregnancy serum obtained from a mature swine 13 days after mating, or pseudopregnancy serum from a PAF intrauterine administered sow. When the pattern of SDS-page of pregnant serum was compared with the bands obtained from non-pregnant swine serum (day 0 of cycle, estrus) the 30 KDa band was not confirmed in the non-pregnancy serum. This band (30 KDa) also appeared in pseudopregnancy serum from PAF intrauterine administered sow. When this fraction (30 KDa) was applied onto the DEAE-Sepharose column, the EPF activity was only found in the unabsorbed fraction. Next this fraction was applied onto the S-CL6B sepharose column. No EPF activity was found in the different eluates. It is concluded that EPF is a protein with 30KDa of molecular weight and it has a cationic structure.

Palabras claves: Factor de preñez temprana-cerdas-período perimplantacional

Key words: Early pregnancy factor-Swine-Peri-implantational period.

Introducción

Para lograr una preñez exitosa es necesario un reconocimiento inmunológico entre la madre y el feto (Cavanagh *et al.*, 1991). Tal reconocimiento se realizaría a través de señales muy tempranas entre las que se encuentra el Factor Precoz de Preñez (EPF). Este factor es una herramienta muy útil para monitorear fertilización y viabilidad embrionaria durante la etapa peri-implantacional (Rolfe *et al.*, 1979). Durante la preñez, el EPF tiene dos fuentes de producción una materna o temprana (período peri-implantacional) y una embrionaria o tardía que persiste hasta el último tercio de la preñez. (Koch *et al.*, 1986). Este factor se ha aislado en diferentes especies como la humana (Mehta *et al.*, 1989), la ovina (Wilson *et al.*, 1984) y la bovina (Ito *et al.*, 1992). Además, se lo relaciona con otros factores que aparecen en la preñez temprana como el Factor Activador de Plaquetas (PAF) (Cavanagh *et al.*, 1991).

Hasta este momento, la técnica de detección es tediosa y cara pero si se logra el aislamiento y purificación del EPF se podría implementar técnicas de detección más eficientes. Por ello, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar el Factor Precoz de Preñez (EPF) a partir de suero de cerda preñada y de seudopreñada con administración intrauterina de Factor Activador de Plaquetas (PAF).

Materiales y métodos

Se utilizaron veinticinco cerdas cachorras mestizas púberes de edad uniforme a las que se le sincronizó el celo con Regumate (Alil Trembolona). Se las dividió en 5 lotes de 5 cerdas cada uno: PR, NPR, SPR, PAF y CPAF. Al lote PR, se lo inseminó 3 veces con semen de padrillo de probada fertilidad, diluído 1:1 en Kiev (3x10⁹ espermatozoides/mL) cada 24 h a partir del día del celo (día 0). El lote NPR se le tomó muestra de sangre en el día cero del estro. A los lotes SPR, PAF Y CPAF se les indujo el estado de seudogestación por administración i.m. de benzoato de estradiol (5 mg, 5 días, desde 11-16^{mo} post-celo) (Van der Meulen *et al.*, 1991). Al lote PAF, se administró 5 mg/mL de PAF en PBS/BSA por vía intrauterina y al lote CPAF, 1 mL de PBS/BSA por la misma vía. A todos los animales se les extrajo muestra de sangre a los 13 días de preñez o post-celo en el caso de los otros lotes. Los volúmenes de los sueros utilizados oscilaron entre 1800-2000 mL. Los sueros fueron obtenidos por centrifugación a 3000 rpm, 30 min, 4 °C e inactivados a 56 °C por 30 min y conservados a -2 °C hasta su

utilización.

Se efectuó electroforesis vertical en minigeles de poliacrilamida al 12.5 % de todas las muestras y eluatos, con estándares de peso molecular conocido (97 KDa –14.4 KDa). Se sometió el factor a la tripsinación durante 24 h a 37 °C y a la protección por antiproteasas como Leupeptin. Las fracciones de 30 KDa fue dializada en membrana de poro de 3000 Da, toda la noche a 4°C, contra la solución tampón de PO_4Na_2 20mM, pH=8. La columna de DEAE-Sefarosa fue equilibrada con el mismo tampón y empaquetada en columna de 1.0 x 15 cm. Al finalizar la diálisis la fracción de cerca de 30 kDa fue aplicada a esta columna de DEAE-Sefarosa y lavada con el mismo tampón. Las proteínas enlazadas a la columna fueron eluidas con el mismo tampón con el agregado de Na Cl 0.6M. La fracción activa para EPF controlada con RIT se recuperó y se colocó en una columna de S-Sefarosa CL6B de 1.0 x 15 cm equilibrada con solución tampón de Tris 50 mM.pH=7.0. La columna fue lavada exhaustivamente con este tampón y eluida con un gradiente salino de 0.1-1.0M de KCl. La actividad del factor precoz de preñez fue medida por la técnica de inhibición de rosetas (Greco *et al.*, 1992).

Resultados y discusión

En los lotes PR y PAF se detectaron banda de 30 KDa con actividad EPF por la técnica de inhibición de rosetas, no encontrándose en los otros lotes (NPR,CPAF y SPR) (figura 1 y 2).

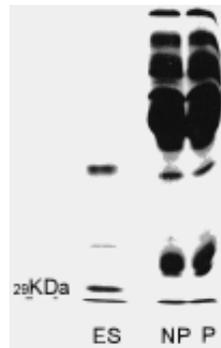


Figura 1. Perfil de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 %. ES: perfil de estándar. NP: perfil de suero de cerda no preñada. P: perfil de suero de cerda preñada.

Esta banda es de menor intensidad en el caso del lote PAF (figura 2) y desaparece cuando el suero es tripsinado. Las antiproteasas Leupeptin no evitaron la desaparición de la banda en dos descongelamientos sucesivos. Esta fracción de 30 KDa separada por diafiltración fue aplicada a una columna de DEAE-Sefarosa y lo recuperado con actividad EPF (RIT614) pasado por una columna de CL6B Sefarosa previo diálisis en membrana de poro de 3000 Da Todas las fracciones eluidas de esta columna no presentaron actividad EPF.

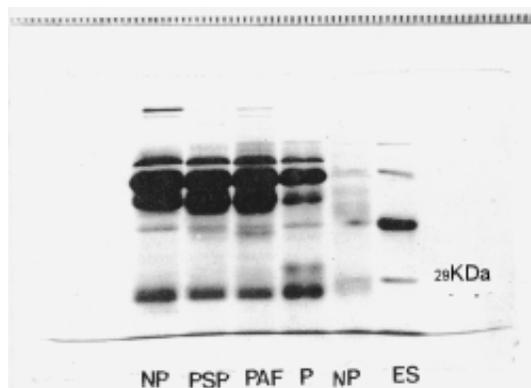


Figura 2. Perfil electroforético en gel de poliacrilamida al 12.5 %. NP: suero de cerda no preñada. PSP: suero de cerda seudo preñada. PAF: suero de cerda seudopreñada con administración de PAF. P: suero de cerda preñada. NP: suero de cerda no preñada. ES: estándar de peso molecular conocido.

Al igual que en humanos (Mehta *et al.*,1989), ovinos (Wilson *et al.*,1984) o en bovinos (Ito *et al.*, 1992) la fracción con actividad EPF de porcino corresponde a un bajo peso molecular aproximadamente de 30 KDa.

Conclusiones

Se concluye que el EPF presenta un peso molecular de aproximadamente 30 KDa. Es susceptible a la tripsinación y de posible naturaleza catiónica .

Literatura citada

Cavanagh, A. C., B. E. Rolfe, S. Athanasas-Platsis, K. A. Quinn y H. Morton. 1991. J. Reprod. Fert. 93: 355-365.

Greco, C., A. Vivas y R. A. Bosch. 1992. Acta Physiol. Pharmacol. Toxicol. Latinoam. 42:35-42.

Ito, K., S. Yamamoto, J. Takahashi y Y. Yasuda. 1992. Anim. Sci. Technol. (Japón) 63:394-397.

Koch, E., H. Y. Niemann y F. Ellendorf. 1986. Anim. Reprod. Sci. 1:195-205.

Mehta, A., T. E. Eessalu y B. B. Aggarwal. 1989. J. Biol. Chem. 264:2266-2271.

Rolfe, B.; Cavanagh, A.; Quinn, K. Y Kaye, M. 1979. Ann. Rev. Med. 30:375-404.

Van Der Meulen, J., F. Elsaesser, C. P. Oudenaarden y F. A. Helmond. 1991. Anim. Reprod. Sci. 24:305-313.

Wilson, S., R. McCarthy y F. Clarke. 1984. J. Reprod. Immunol. 6:253-286.