

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Expressão gênica em células da granulosa de porcas de linhagens com baixas e altas taxas de ovulação e prolificidade¹

Darlene Ana Souza Duarte², Adriane Rafaela Barbosa³, Priscila Vendramini Silva⁴, José Domingos Guimarães⁵, Simone Eliza Facioni Guimarães⁴, Fabyano Fonseca e Silva⁶

¹Trabalho financiado pela FAPEMIG

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento – UFV, Viçosa. Bolsista da FAPEMIG. e-mail: darlene.duarte@ufv.br

³Graduação em Zootecnia – UFV, Viçosa. e-mail: adriane.barbosa@ufv.br

⁴Departamento de Zootecnia – UFV, Viçosa. e-mail: sfacioniguima@gmail.com

⁵Departamento de Veterinária – UFV, Viçosa. e-mail: jduima@ufv.br

⁶Departamento de Estatística – UFV, Viçosa. e-mail: fabyanofonseca@ufv.br

Resumo: No presente trabalho a expressão de genes candidatos foi comparada durante o ciclo estral de raças de suínos com altas (linha comercial, n = 24) e baixas (naturalizada brasileira Piau; n = 21) taxas de ovulação e prolificidade. As marrãs foram abatidas nos dias 0, 4, 10 e 18 do ciclo estral e os folículos ovarianos foram classificados pelo diâmetro folicular. A baixa taxa de ovulação e/ou prolificidade em marrãs da raça Piau foi associada com um padrão diferente de desenvolvimento folicular. Comparadas às marrãs da linha comercial, as marrãs menos prolíficas da raça Piau exibiram alta expressão de genes apoptóticos (FAS, BCL2 e CASP3; $P \leq 0.05$) nas células da granulosa sugerindo mecanismos controlando diferenças no desenvolvimento folicular, taxa de ovulação e inerente prolificidade nessa raça de suínos.

Palavras-chave: atresia, Piau, desenvolvimento folicular

Gene expression in granulosa cells from gilts of breeds with low and high ovulation rates and prolificacy

Abstract: In the present study the expression of candidate genes was compared during the oestrous cycle of pig breeds with high (commercial line; n=24) and low (local Brazilian Piau; n=21) ovulation rates and prolificacy. Gilts were killed on Days 0, 4, 10 and 18 of the oestrous cycle and ovarian follicles were classified by follicular diameter. Low ovulation rates and/or prolificacy in Piau gilts were associated with a different pattern of follicle development. Compared with commercial line gilts, less-prolific Piau gilts exhibited higher expression of apoptotic genes (FAS, BCL2 and CASP3; $P \leq 0.05$) in granulosa cells suggesting underlying mechanisms controlling differences in follicular development, ovulation rate and inherent prolificacy in this pig breed.

Keywords: atresia, Piau, follicular development

Introdução

Dentre as características reprodutivas, o tamanho de leitegada é um componente importante na redução de custos e na produtividade dentro de um sistema de criação de suínos. A taxa de ovulação é um dos principais componentes que determinam o tamanho da leitegada, sendo definida como o número de oócitos liberados por estro (Knox, 2005).

O crescimento e o desenvolvimento dos folículos ovarianos requer uma série de acontecimentos coordenados que podem levar à ovulação. Porém, uma vez que tenha iniciado o desenvolvimento, a maioria dos folículos tornam-se atresícos antes de ovular devido à apoptose das células da granulosa (CG), independentemente da fase de desenvolvimento folicular (Tilly, 1996; Guthrie, 2005).

Com o objetivo de identificar diferenças no padrão de desenvolvimento de folículos entre as linhagens comerciais (mais prolíficas) e a raça naturalizada brasileira Piau (menos prolífica), o presente estudo tem como propósito elucidar o padrão de expressão de genes candidatos relacionados ao processo de atresia folicular (BCL2, FAS e CASP3) durante o ciclo estral utilizando a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR), em ambas as linhas genéticas, como forma de melhor compreender os mecanismos que controlam o desenvolvimento folicular ovariano em suínos.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Granja de Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas 24 marrãs de linhagem comercial (Landrace x Large-White x Pietrain) e 21 marrãs da raça naturalizada brasileira Piau. O comportamento estral foi avaliado do primeiro ao sétimo período estral consecutivo. Os abates ocorreram nos dias 0, 4, 10 e 18 do ciclo estral e os ovários foram coletados imediatamente após o abate e transportados para o Laboratório de Biotecnologia Animal onde os folículos foram aspirados. O RNA foi isolado das CG e a partir dele o cDNA foi sintetizado. A PCR quantitativa em tempo real foi realizado utilizando SyBr Green GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno. As diferenças na expressão de genes foram estimadas utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$ de Livak and Schmittgen (2001). Para a análise estatística, foram utilizados seis classificações em relação ao folículo: (1) grande normal; (2) grande atresico, (3) médio normal; (4) médio atresico; (5) pequeno normal, e (6) pequeno atresico. Esses foram comparados entre grupo genético x dias de ciclo estral. As comparações foram feitas usando o GLM PROCEDURE do SAS (*Statistical Analysis System*, versão 9.2.).

Resultados e Discussão

A expressão de mRNA do gene FAS em folículos grandes atresicos foi mais alta em marrãs da raça Piau do que na linha comercial ($P \leq 0.05$) no dia 0 (Figura 1), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada nos folículos grandes normais. De acordo com Manabe et al. (2004), diferenças na iniciação da apoptose de CG entre as espécies indicam mecanismos locais de regulação, principalmente, o mecanismo de estímulos de indução da apoptose. Nesse contexto, o presente estudo indica que a sinalização da apoptose pode ser diferentemente ativada em folículos atresicos entre raças diferentes. Portanto, pode-se sugerir que os folículos na raça Piau fornece um ambiente diferente para apoptose folicular do que os folículos da linha comercial, o que pode contribuir para a inferior prolificidade da raça Piau.

No presente estudo a abundância de mRNA do gene BCL2 em folículos saudáveis de tamanho médio foi maior na raça Piau comparada com as marrãs da linha comercial no dia 0 ($P \leq 0.01$)(Figura 1), novamente sugerindo diminuição da apoptose em CG de Piau durante o desenvolvimento folicular precoce.

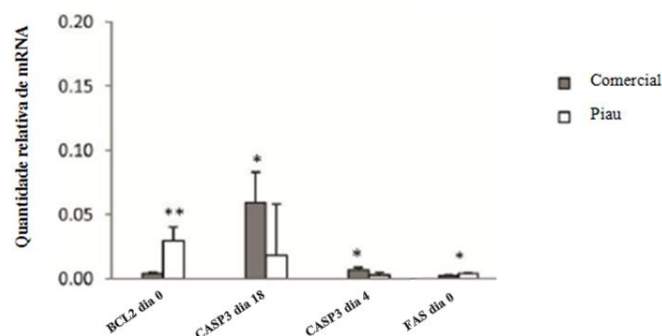
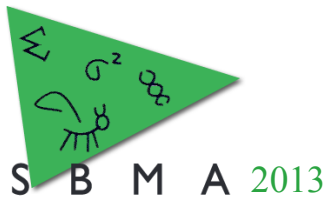


Figura 1. Comparação da quantidade relativa de mRNA em células da granulosa da linhagem comercial e da raça Piau de acordo com a classificação do folículo em determinados dias do ciclo estral. Quantidade relativa de mRNA é expresso como média de mínimos quadrados \pm erro padrão médio de $2^{-\Delta Ct}$. BCL2 em folículo médio normal no dia 0, n=6; CASP3 em folículo médio atresico no dia 18, n=3; CASP3 folículo pequeno normal no dia 4, n=8; FAS em folículo grande atresico no dia 0; n=6 (n=número de animais representados). * = $P \leq (0.05)$, ** = $P \leq (0.01)$ em comparação com a raça Piau.



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

A expressão de mRNA do gene CASP3 foi alta nas marrãs da linhagem comercial para folículos médios atresícos no dia 18. Em folículos pequenos normais e atresícos de tamanho médio no dia 4, a expressão de mRNA do gene CASP3 foi maior (Figura 1) nas marrãs da linha comercial comparada à raça Piau. CASP3 tem sido relatada como molécula essencial para apoptose da CG (Manabe et al. 2004; Matsuda-Minehata et al. 2008). Vários estudos em CG descreveram alterações na expressão da proteína caspase-3 e atividade associada com a progressão da atresia nos folículos ovarianos (Boone and Tsang 1998; Berardinelli et al. 2004). No entanto, pouca informação está disponível sobre os padrões de expressão do mRNA da CASP3 em diferentes raças de suínos durante do ciclo estral.

Conclusões

O perfil da expressão gênica observado foi consistente com a dinâmica folicular entre as raças, com a expressão relativa dos genes BCL2, FAS e CASP3 que influenciam as decisões importantes entre proliferação e atresia na CG de marrãs das diferentes raças.

Nossos resultados apoiam a hipótese de que a expressão diferencial de genes que controlam o crescimento dos folículos medeia o diferente padrão de desenvolvimento folicular observado entre as raças estudadas. Isso pode afetar não só a taxa de ovulação, mas também a qualidade do oócito e do embrião.

Agradecimentos

À Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Literatura citada

- KNOX, R. V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p.385–397, 2005.
- TILLY, J. L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews Reproduction**, v.1, p.162–172, 1996.
- GUTHRIE, H. D. The follicular phase in pigs: follicle populations, circulating hormones, follicle factors and oocytes. **Journal of Animal Science**, v. 83, p.79–89, 2005.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v.25, p. 402–408, 2001.
- MANABE, N.; GOTO, Y.; MATSUDA-MINEHATA, F.; INOUE, N.; MAEDA, A.; SAKAMAKI, K.; MIYANO, T. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.493–514, 2004.
- MATSUDA-MINEHATA, F.; MAEDA, A.; CHENG, Y.; SAI, T.; GONDA, H.; GOTO, Y.; MANABE, N. Regulation of granulosa cell apoptosis by death ligand–receptor signaling. **Animal Science**, v.79, p.1–10, 2008.