

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Expressão gênica do corpo lúteo de fêmeas suínas de diferentes grupos genéticos

Vanessa Ricardo de Faria², Karine Assis Costa⁴, Priscila Vendramini Silva³, José Domingos Guimarães⁵, Paulo Sávio Lopes³, Simoni Eliza Facioni Guimarães³

¹Trabalho financiado pela FAPEMIG

²Programa Pós-Graduação Genética e Melhoramento – UFV, Viçosa. Bolsista CNPq. e-mail: vanessa.ricardofaria@yahoo.com.br

³Departamento de Zootecnia – UFV, Viçosa. e-mail: sfacioniguima@gmail.com – plopes@ufv.br

⁴Graduação em Zootecnia – UFV, Viçosa. kryneacosta@yahoo.com.br

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

Resumo: No presente trabalho a expressão de genes candidatos ligados a apoptose do corpo lúteo foi comparada durante o ciclo estral de fêmeas suínas de diferentes grupos genéticos, uma linhagem comercial de alta prolificidade (n = 24) e a raça naturalizada brasileira Piau de baixa prolificidade (n = 21). O dia em que as fêmeas apresentaram o estro foi considerado como dia 0, posteriormente as fêmeas foram abatidas para a coleta do ovário nos dias 0, 4, 10 e 18 e os corpos lúteos foram coletados para a extração de RNA e analisados pela PCR em tempo real. Comparadas às marrãs da linhagem comercial, as marrãs da raça Piau, que apresentam menor prolificidade, exibiram uma expressão superior de genes apoptóticos FASL no dia 18 ($p \leq 0,01$) e CASP3 nos dias 0 ($p \leq 0,05$) e 4 ($p \leq 0,01$) e o gene TGFBR2 apresentou maior expressão em marrãs da linhagem comercial nos dias 0 e 4 ($p \leq 0,0001$ e $P \leq 0,05$ respectivamente). A apoptose no corpo lúteo pode refletir a tendência para um ciclo estral mais curto e regressão lútea mais rápida na raça Piau. Os resultados demonstram que a diferença de expressão dos genes leva a diferentes padrões de desenvolvimento e regressão do corpo lúteo entre as raças estudadas.

Palavras-chave: apoptose, genes, piau, regressão lútea

Gene expression in the corpus luteum of sows of different breeds genetics

Abstract: In this present study the expression of candidate genes related to apoptosis of the corpus luteum was compared during the estrous cycle of gilts of different genetic groups, a commercial breeds of high prolificacy (n = 24) and race naturalized Brazilian Piau low prolificacy (n = 21). The day that the females showed estrus was considered as day 0, then the gilts were slaughtered to collect ovarian on days 0, 4, 10 and 18 and corpora lutea out dissected for RNA extraction and analyzed by real-time PCR. Compared to the commercial line gilts, Piau gilts that have lower prolificacy, exhibited a higher expression of FASL apoptotic genes ($p \leq 0.01$) on days 18 and CASP3 ($p \leq 0.05$) on days 0 and 4 ($p \leq 0,01$) and TGFBR2 gene showed higher expression in the commercial line gilts on days 0 and 4 ($p \leq 0.0001$ and $p \leq 0.05$ respectively). The apoptosis in the corpus luteum may reflect a better propensity for estrous cycle shorter and faster luteal regression in Piau breed. The results demonstrate that the difference in gene expression leads to different patterns of development and regression of the corpus luteum between the breeds studied.

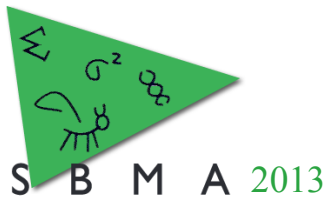
Keywords: luteal regression, apoptosis, genes, Piau

Introdução

Na suinocultura uma das características reprodutivas de grande importância é o tamanho de leitegada que pode proporcionar um aumento no número de leitões desmamados por porca e consequentemente maior retorno econômico para os produtores, mas vale destacar que esta característica apresenta baixa herdabilidade além de expressão limitada pelo sexo dificultando os ganhos genéticos. Como alternativa, pesquisas a respeito do corpo lúteo (CL) e sobre a taxa de ovulação podem atuar como ferramentas para uma maior compreensão dos processos que envolvem a prolificidade em fêmeas suínas.

Há diversos genes ligados a apoptose do CL, como por exemplo o FAS-ligante (FASL) que atua no sinal apoptótico, a caspase 3 (CASP3) que atua na fase de execução da apoptose e o fator de transformação do crescimento- β do tipo II (TGFBR2) que está envolvido no controle da proliferação e diferenciação celular.

Não existem dados de expressão gênica disponíveis para explicar a menor prolificidade da raça naturalizada brasileira Piau, que se encontra em risco de extinção. O objetivo do presente estudo foi de



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

elucidar o padrão de expressão de genes candidatos (FASL, CASP3 e TGFBR2) relacionado ao processo de apoptose celular no corpo lúteo durante o ciclo estral, na linhagem comercial e na raça Piau, como forma de melhor compreender os mecanismos que controlam o desenvolvimento do ciclo estral em suínos.

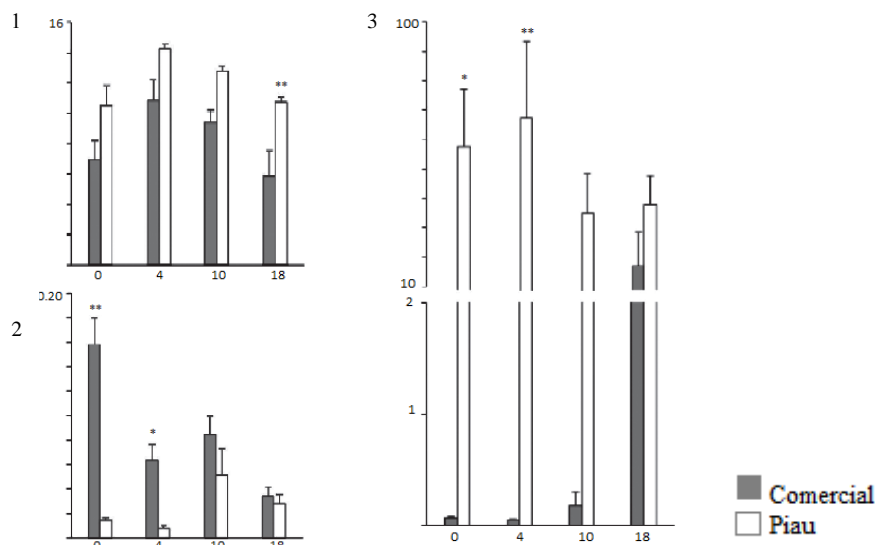
Material e Métodos

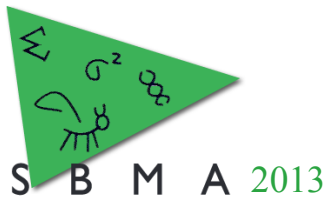
Foram utilizadas 24 fêmeas da linhagem comercial (Landrace/Large-White/Pietrain) e 21 da raça Piau. O estro foi observado com o auxílio de um cachaço uma vez por dia. O dia em que as fêmeas apresentaram o estro foi considerado como dia 0, posteriormente as fêmeas foram abatidas para a coleta dos ovários nos dias 0, 4, 10 e 18. Os animais obtiveram livre acesso a água e arraçoamento de duas vezes ao dia.

Os ovários foram transportados para o laboratório onde foi contabilizado o número de corpos lúteos encontrados. Em seguida foram coletados e tratados com RNAlater e armazenados a -20°C por 48 horas. Posteriormente foram descongelados, macerados em nitrogênio líquido e congelados a -70°C até a extração do RNA. O RNA foi extraído e em seguida foi sintetizado o cDNA, através do qual realizou-se a análise de PCR em tempo real através do programa SyBr Green GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). O iniciador de oligonucleotídeos utilizado para as reações foram obtidos utilizando o Software PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA) a partir de seqüências disponíveis no GenBank suíno. No presente estudo, avaliou-se a expressão dos genes FASL, CASP3 e TGFBR2 e o gene GAPDH foi usado como um gene de referência. As diferenças na expressão de genes foram estimadas utilizando o método $2^{-\Delta\text{Ct}}$ de Livak and Schmittgen (2001). As comparações foram feitas usando o SAS GLM PROCEDURE, com amostras equilibradas.

Resultados e Discussão

Pode-se observar poucas diferenças de expressão de mRNA dos genes relacionados com a apoptose no corpo lúteo entre os grupos genéticos. A expressão de um dos componentes do sistema FAS, o FASL, foi superior na raça Piau ($P \leq 0,01$) no dia 18 (figura 1). O FASL tem sido relatado em muitas espécies como um dos maiores mecanismos de regulação da apoptose nas células do corpo lúteo (Juengel et al., 1993; Rueda et al., 1997), desempenhando um papel importante na regressão do CL no final do ciclo estral (Rueda et al., 1997). A caspase-3 (CASP3), foi superior na raça Piau (figura 1) nos dias 0 e 4 ($P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente). A expressão abundante de CASP3 no CL humano foi avaliada e considerada de grande importância para a regressão luteal, mas pouco se sabe ainda sobre a expressão e o papel de caspases no CL de suínos. A apoptose mediada por CASP3 pode refletir em diferenças na duração do ciclo estral e do tempo de regressão luteal.





X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Figura1. Comparação da quantidade relativa de mRNA do FASL(1), TGFBR2 (2) e CASP3(3) no corpo lúteo da linhagem comercial e da raça Piau em determinados dias do ciclo estral (0,4,10 e 18). Quantidade relativa de mRNA é expresso como média de mínimos quadrados \pm erro padrão médio de $2^{-\Delta Ct}$. * = $P \leq (0.05)$, ** = $P \leq (0.01)$ em comparação com a raça Piau.

Resultados similares foram observados para TGFBR2 (figura1), com maior expressão em marrãs da linhagem comercial nos dias 0 e 4 ($P \leq 0,0001$ e $P \leq 0,05$, respectivamente) do que na raça Piau, o que indica que o processo de regressão pode diferir entre raças. Sriperumbudur et al. (2010), sugeriu que o TGFBR2 pode ter um importante papel na mediação do processo de luteinização em folículos pós-ovulatórios de suínos.

Conclusões

Os perfis de expressão gênica observados foram consistentes entre as raças, com a expressão relativa dos genes influenciando a decisão importante entre a proliferação e a atresia no CL das fêmeas dos diferentes grupos genéticos. A apoptose no CL, mediada por diferenças na expressão de mRNA do FASL no dia 18 e pela expressão da CASP3 e do TGFBR2 nos dias 0 e 4 do ciclo estral levaram a uma regressão lútea mais rápida na raça Piau em comparação com CL da linha comercial. Os resultados demonstram que a diferença de expressão dos genes leva a diferentes padrões de desenvolvimento e regressão do corpo lúteo entre as raças estudadas. Mas ainda são necessários maiores estudos na área, principalmente em relação à raça Piau, que se encontra em risco de extinção, mas que pode ser uma raça muito importante para avanços genéticos futuros.

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

- JUENGEL, J. L., GARVERICK, H. A., JOHNSON, A. L., YOUNGQUIST, R. S., SMITH, M. F. (1993). Apoptosis during luteal regression in cattle. **Endocrinology**, v.132, p.249–254.
- LIVAK, K.J, SCHMITTGEN, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2DDCt method. **Methods**, v.25, p.402-408.
- RUEDA, B. R., HAMERNIK, D. L., HOYER, P. B., TILLY, J. L. (1997). Potential regulators of physiological cell death in the corpus luteum. In 'Cell Death in Reproductive Physiology. Serono Symposia'. p. 161–181.
- SILVA, P.V., GUIMARÃES, S.E.F., GUIMARÃES, J.D., NETO, J.B., LOPES, P.S., NASCIMENTO, C.S. do., CAMPOS, C.F. de., WELLER, M.M.C.A., BOTELHO, M.E., FARIA, V.R. (2011) Gene expression in swine granulosa cells and ovarian tissue during the estrous cycle. **Genetic Molecular Res.** **10** (3), p. 2258-2267.
- SRIPERUMBUDUR, R., ZORRILLA, L., AND GADSBY, J. E. (2010). Transforming growth factor-b (TGF-b) and its signaling components in peri-ovulatory pig follicles. **Animal Reproduction Science** v.120, p.84–94.