

RELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DA LEPTINA E SEU RECEPTOR E CAUSAS DE DESCARTE DE FÊMEAS SUÍNAS PÚBERES

Rizzoto, Guilherme^{1,2}; Moreira, Fabiana¹, Mondadori, Rafael Gianella^{1,3}, Gheller, Stela Mari Meneghello^{1,2}, Lucia, Jr., Thomaz^{1,4*}

¹ REPROPel - Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Pelotas.

² Graduando do curso de Medicina Veterinária – FV/UFPEL

³ Departamento de Morfologia – IB/UFPEL; ⁴ Departamento de Patologia Animal – FV/UFPEL
Campus Universitário Capão do Leão – CEP 96010-900 - Pelotas/RS.

*E-mail: tomjr2004@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

A leptina é uma proteína expressa primariamente no tecido adiposo branco, além da placenta, glândula mamária, testículos, ovários, endométrio, estômago, hipotálamo, hipófise e diversos outros órgãos. A leptina atua no balanço energético corporal, tendo reflexos sobre a função reprodutiva (Barb & Kraeling, 2004).

O receptor da leptina (Ob-R) é um membro da classe de receptores de citocinas I com seis isoformas conhecidas e a forma longa do receptor, OBR-b, (Hakansson & Meister, 1998), tem sido descrita em diversos órgãos, incluindo o hipotálamo e os ovários (Lee et al., 1996). A expressão do gene da leptina e de seu receptor (OBR-b) foram observados no hipotálamo de leitões pré-púberes e púberes, de porcas gestantes e de fetos (Lin, et al., 2001).

A avaliação dos sistemas reprodutivos de fêmeas suínas descartadas, colhidos no frigorífico após o abate, pode ser uma fonte de informação sobre algumas falhas reprodutivas, auxiliando no monitoramento do descarte das fêmeas (Karveliëne et al, 2007). Como estas avaliações normalmente se restringem ao exame macroscópico, sua combinação com técnicas de diagnóstico mais precisas, permitem agregar informações sobre o estado hormonal e metabólico das fêmeas descartadas (Lucia et al., 2011).

Este estudo objetivou relacionar o perfil de imunomarcção da leptina e do seu receptor (OBR-b) no hipotálamo, no útero e nos ovários com a causa de descarte de porcas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de órgãos reprodutivos e do cérebro de 28 porcas descartadas, de cinco granjas que possuíam a mesma base genética foram colhidas no frigorífico, por ocasião de seu abate. As amostras foram identificadas individualmente, sendo realizada a avaliação macroscópica dos órgãos genitais. O conjunto de informações foi registrado em fichas específicas.

As causas de descarte foram obtidas a partir dos registros individuais das fêmeas, disponíveis no banco de dados PigCHAMP® e classificadas em 5 grupos: falhas reprodutivas, como anestro, aborto e repetição de cio (n = 12 fêmeas); baixa produção de leitões (n = 4 fêmeas); idade avançada (n = 4 fêmeas); metrite (n = 4 fêmeas); e problemas locomotores (n = 4 fêmeas).

Fragments dos ovários e do útero foram colhidos e acondicionados em solução de Bouin. Os fragmentos de hipotálamo foram colhidos com um corte

transversal da cabeça e acondicionados em formol a 10%. As amostras foram encaminhadas para processamento histológico de rotina.

Para a técnica de imunohistoquímica (IHQ), foram utilizados os anticorpos policlonais anti-leptina e anti-receptor de leptina (A-20, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). A recuperação antigênica foi realizada em solução de citrato pH 6,0, em calor úmido sob pressão. O bloqueio da marcação inespecífica foi realizado com albumina sérica bovina (BSA) a 3% para a análise da leptina e com BSA a 10% para análise do receptor da leptina (Ye, 2009).

Para a adição dos anticorpos secundários nas lâminas marcadas com leptina foram instiladas o sistema streptavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB - Dako K0690 Corporation, CA, USA). Naquelas marcadas com receptor de leptina foram instiladas com kit Histofine[®] (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) (Ye, 2009). A reação foi revelada por meio da adição de solução de diaminobenzidina-peroxidase (DAB-peroxidase, Corporation CA, USA), acrescentada em tempo padrão para cada um dos cortes. Os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Mayer filtrada por 1 minuto e as lamínulas foram fixadas com resina sintética (Sigma Chemical Company[®], St. Louis, MO, USA). As lâminas foram analisadas conforme os sítios de atuação da leptina e seu receptor (Smolinska et al., 2007).

As imagens analisadas foram capturadas por câmara digital (Olympus DP72), acoplada a um microscópico de campo claro (Olympus BX 51, Tokyo, Japan) utilizando as objetivas 10X (para as lâminas de úteros) e 40X (para as lâminas de hipotálamo e ovários). Foram avaliados cerca de 1.100 neurônios, 1.400 glândulas endometriais e 478 ovócitos. As análises foram realizadas a partir do software Image J[®], utilizando o aplicativo 16-bit Histograma, para a obtenção do valor de moda para cada área selecionada. Este aplicativo utiliza uma escala com valores de 0 a 255, na qual o valor 0 indica maior intensidade de marcação e o valor 255 indica ausência de marcação.

Os valores médios das modas para a intensidade da imunomarcação em cada uma das estruturas classificadas foram comparadas entre as causas de descarte das fêmeas através de análise de variância, com comparação entre médias através do teste de Tukey (Statistix[®], 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra a imunomarcação para leptina no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Lep), nos ovócitos (OT Lep) e nas glândulas endometriais (UT Lep). A HP Lep foi mais intensa nas porcas descartadas por problemas reprodutivos e idade avançada ($p < 0,05$). Enquanto que a UT Lep foi mais intensa nas porcas descartadas por falhas reprodutivas ($p < 0,05$), seguida dos animais descartados por problemas locomotores e por idade avançada, os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$). A imunomarcação mais fraca ocorreu para as fêmeas descartadas por baixa produção de leitões e por metrite ($p < 0,05$). No entanto, os OT Lep mais intensamente marcados pertenciam às fêmeas descartadas por metrite ($p < 0,05$), e aqueles com imunomarcação menos intensa pertenciam às porcas descartadas por problemas locomotores e idade avançada. Não houve diferença na imunomarcação entre as fêmeas removidas por falhas reprodutivas e por baixa produção de leitões quando comparadas com os animais das demais causas de descarte ($p > 0,05$). A presença marcante de leptina no hipotálamo e no útero pode ser explicada pelo fato de não terem sido observadas patologias durante o exame

macroscópico do útero e dos ovários. De acordo com Czaja et al. (2002), uma forte imunorreatividade da leptina e do OBR-b foi encontrada em áreas específicas do hipotálamo de porcas, revelando que projeções dos neurônios com OBR-b estabelecem uma ligação entre o hipotálamo e outras regiões do cérebro envolvidas na saciedade e na função reprodutiva. Além disso, esta isoforma é a mais competente na ativação das vias de sinalização intracelulares e dos sinais de transcrição da leptina, sendo predominantemente localizada na região hipotalâmica (Chen et al., 1996). Também é importante ressaltar que, ao longo do seu desenvolvimento puberal fisiológico, as fêmeas suínas têm elevadas concentrações séricas de leptina (Quian et al., 1999).

Na Tabela 2 pode ser observado a imunomarcagem para o receptor da leptina no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Rec), nos ovócitos (OT Rec) e nas glândulas endometriais (UT Rec). Assim como a imunomarcagem para HP Lep foi inferior à observada nas fêmeas descartadas por problemas locomotores ($p < 0,05$) (Tab.1), o mesmo foi observado para o HP Rec (Tab. 2), que foi semelhante para todos os grupos, exceto para as porcas descartadas por problemas locomotores, que apresentaram intensidade de imunomarcagem inferior às demais ($p < 0,05$). Neste contexto, é importante avaliar o escore corporal destas matrizes, pois a ocorrência de lesões de cascos aumenta conforme a diminuição do peso ou da gordura corporal, por falta de biotina (Knauer et al., 2007).

Tabela 1. Intensidade da imunomarcagem* para leptina (valores das médias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Lep), nos ovócitos (OT Lep) e nas glândulas endometriais (UT Lep) de acordo com a causa de descarte de porcas.

Causa de descarte	HP Lep (n = 1.100)	OT Lep (n = 478)	UT Lep (n = 1.400)
Falhas reprodutivas	179,6 ± 1,2 ^a	70,7 ± 3,3 ^{ab}	210,7 ± 1,1 ^a
Baixa produção de leitões	187,2 ± 1,8 ^b	68,8 ± 4,8 ^{ab}	223,4 ± 1,2 ^c
Idade avançada	179,3 ± 2,1 ^a	85,4 ± 5,4 ^b	218,2 ± 1,3 ^b
Metrite	186,2 ± 1,8 ^b	63,9 ± 5,0 ^a	235,2 ± 1,2 ^d
Problemas locomotores	195,2 ± 1,7 ^c	83,7 ± 5,0 ^b	217,6 ± 0,8 ^b

^{a,b,c} Expoentes diferentes indicam diferença significativa na coluna $p < 0,05$.

*0: marcação intensa; 255: sem marcação.

Tabela 2. Intensidade da imunomarcagem* para o receptor da leptina (valores das médias das modas observadas) nos neurônios do hipotálamo (HP Rec), nos ovócitos (OT Rec) e nas glândulas endometriais (UT Rec) de acordo com a causa de descarte de porcas.

Causa de Descarte	HP Rec	OT Rec	UT Rec
Falhas reprodutivas	180,4 ± 2,1 ^a	165,1 ± 2,9 ^a	209,1 ± 0,8 ^a
Baixa produção de leitões	180,9 ± 3,1 ^a	174,1 ± 4,0 ^a	222,7 ± 1,2 ^b
Idade avançada	176,7 ± 3,5 ^a	162,6 ± 4,7 ^a	223,9 ± 1,4 ^b
Metrite	179,7 ± 3,1 ^a	167,7 ± 4,1 ^a	224,6 ± 1,2 ^b
Problemas locomotors	192,2 ± 2,9 ^b	167,1 ± 3,8 ^a	224,2 ± 1,2 ^b

^{a,b} Expoentes diferentes indicam diferença significativa na coluna $p < 0,05$.

*0: marcação intensa; 255: sem marcação.

4 CONCLUSÃO

Fêmeas suínas que foram descartadas por problemas reprodutivos obtiveram imunomarcagem mais intensa para leptina e para o seu receptor no hipotálamo e no útero, enquanto que, nos ovócitos, a imunomarcagem para ambos foi semelhante, independentemente da causa de descarte.

5 REFERÊNCIAS

- BARB, C.R.; KRAELING, R.R. Role of leptin in the regulation of gonadotrophin secretion in farm animals. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p.155–167, 2004.
- CHEN, H., CHARLAT, O., TARTAGLIA, L.A., et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in ob/ob mice. **Cell**, v.84, p.491-495, 1996.
- CZAJA, K.; LAKOMY, M.; SIENKIEWICZ, A.W.; et al. Distribution of neurons containing leptin receptors in the hypothalamus of the pig **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.298, p.333–337, 2002.
- HAKANSSON, M.L.; MEISTER, B. Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. **Neuroendocrinology**, v. 68. p. 420-7. 1998.
- KARVELIENE, B.; ZILINSKAS, H.; RISKEVICIENE, V. Post-mortem Examination of sows genital organs culled for reproductive disturbances and immunohistochemical studies on ER α and PR A receptors in the anoestral sows uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.275–281, 2007.
- KNAUER M.; STALDER, K.J.; KARRIKER L.; et al. A descriptive survey of lesions from cull sows harvested at two Midwestern U.S. facilities. **Preventive Veterinary Medicine**, v.82, p.198–212, 2007.
- LEE, G.H; PROENCA R.; MONTEZ J.M.; CARROLL K.M.; DARVISHZADEH J.G; FRIEDMAN, J.M. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v.379, p.632–635,1996.
- LIN, J.; BARB; C.R.; KRAELING, R.R.; RAMPACEK; G.B.. Developmental changes in the long form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1614-1618. 2001.
- LUCIA, T.; ULGUIM, R.R.; MOREIRA, F.; et al. Uso de monitoramento de abates para validação de causas de descarte de fêmeas suínas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA: PRODUÇÃO, REPRODUÇÃO E SANIDADE SUÍNA. **Anais: VI Simpósio Internacional de Suinocultura: Produção, Reprodução e Sanidade Suína**. p. 2011.
- SMOLINSKA, N.; SIAWIRYS, G.; KAMINSKI, T.; PRZALA, J. Leptin gene and protein expression in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the oestrus cycle of pigs. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, p. 563-581, 2007.
- YE, Y. Leptin and ObRa/MEK signalling in mouse oocyte maturation and reimplantation embryo development. **Reproductive Biomedicine**, v.19, n.2, p.181-190, 2009.