

LOCALIZAÇÃO E EXPRESSÃO DA LEPTINA NOS OVÁRIOS E ÚTEROS DE FÊMEAS SUÍNAS PRÉ-PÚBERES PELA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA: RESULTADOS PRELIMINARES

DANIELI, Valquíria Maria¹; MOREIRA, Fabiana¹; OLIVEIRA, Érica Ferri¹;
CORCINI, Carine Dahl¹; LUCIA, Thomaz JR.¹

¹ Grupo de pesquisa ReproPel - PigPel - Faculdade de Veterinária – UFPel
Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

E-mail: erica.ferri@hotmail.com
Site: <http://www.ufpel.edu.br/fvet/repropel-pigpel/>

1 INTRODUÇÃO

Dentro do sistema produtivo da suinocultura, a alta taxa de descarte de fêmeas por baixa eficiência reprodutiva gera uma importante perda econômica. Diferentes marcadores têm sido pesquisados para identificar os possíveis fatores desencadeantes. A leptina é uma proteína de 16 kDa secretada pelos adipócitos e envolvida na regulação do apetite, no metabolismo energético e na reprodução. Localiza-se no tecido adiposo branco, hipotálamo e hipófise e nos órgãos reprodutivos (BLUE & MANTZOROS, 2007). Esta proteína tem efeito direto sobre o fluído folicular, células da teca e da granulosa em ratos (ZACHOW, *et al.*, 1997) e potencialmente envolvida na maturação do ovócito de camundongos (KAWAMURA, 2005). Sua concentração aumenta progressivamente nos folículos em desenvolvimento e atinge o pico nos corpos lúteos recém-formados de porcas pré-púberes (GREGORASZCZUK *et al.*, 2007). Durante o ciclo estral nos suínos a leptina é encontrada nos tecidos uterinos, no entanto, nas fases iniciais de gestação esta proteína está presente no trofoblasto (SMOLINSKA *et al.*, 2007).

Tendo por base as citações descritas acima, as leitoas pré-púberes foram utilizadas como projeto piloto, com a finalidade de padronizar a técnica de imuno-histoquímica para futuras aplicações na suinocultura. O objetivo deste estudo foi determinar a localização e a expressão celular da leptina em ovários (direito e esquerdo) e útero de leitoas pré-púberes.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram realizadas coletas de amostras de tecidos do ovário direito, esquerdo e fragmentos da porção esquerda do útero de 30 fêmeas pré-púberes, de um frigorífico da região de Pelotas-RS, a fim de efetuar a padronização da técnica de imuno-histoquímica. As amostras foram acondicionadas em solução tamponada de formol 10% e processadas no Laboratório de Patologia da faculdade de Veterinária da UFPel, onde sofreram desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Foram obtidos cortes na espessura de 5 µm, em micrótomo automático, corados com Eosina e Hematoxilina e analisados em microscópio óptico. Após, efetuaram-se cortes na espessura de 3 µm, aderidos em lâminas impregnadas por solução de organossilano a 3% (Sigma®, USA) em acetona. Estabeleceu-se um protocolo de imuno-histoquímica. Foram utilizados anticorpos primários policlonais, dirigidos contra a proteína de interesse a Leptina: Anticorpo

Ob (anti-leptina) policlonal desenvolvido em coelhos (A-20, Santa Cruz Biotechnology, USA), em diluição de 1:2000. O anticorpo secundário streptoavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB - Dako K0690) instalou-se sobre as lâminas, incubadas em câmara úmida tampada a temperatura ambiente. Após foi feita a montagem das lâminas para observação em microscópio de campo claro. A expressão de Ob nos tecidos foi classificada, conforme escala apresentada abaixo (Quadro 1):

Quadro 1 – Escore de imunoreatividade pela técnica de imunistoquímica de acordo com a marcação nas células dos tecidos estudados.

Escore	Interpretação
-	Marcação ausente
+	Marcação positiva em menos de 30% das células
++	Marcação positiva em 30 a 70% das células
+++	Marcação positiva em mais de 70% das células

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com as análises realizadas, foi possível observar a presença e a expressão da leptina em células ovariana e uterina das fêmeas suínas pré-púberes. A leptina foi identificada nas células dos ovócitos maduros e fases iniciais do embrião em humanos e camundongos, como também células da granulosa e da teca *in vitro* (ARCHANCO *et al.* 2003). No citoplasma dos ovócitos dos folículos primários, secundários e terciários, dos ovários direito e esquerdo, o anticorpo anti-leptina obteve forte imunoreatividade (+++). Esta observação é fortalecida por resultados encontrados em humanos, que confirmaram não apenas a expressão da proteína, mas também a síntese do seu RNA mensageiro nas células dos folículos pré-ovulatórios, além da presença nas células da granulosa e da teca (CIOFFI *et al.* 1997, AGARWAL *et al.* 1999). Porém neste estudo foi observada marcação discreta (+) ou ausente nas células da granulosa e teca dos folículos terciários da maioria das fêmeas pré-púberes, fato este que pode estar relacionado com o menor índice de escore corporal e eixo reprodutivo subdesenvolvido, característico de fêmeas nessa fase, já que a leptina é responsável por controlar o apetite e aumentar o gasto energético, também exercendo reflexos sobre a função reprodutiva (BARB & KRAELING, 2004); DE RENSIS *et al.*, 2005). De acordo com KUSCU *et al.* (2003) esta explicação pode ainda ser relacionada com o fato da possibilidade da leptina estar mais envolvida na produção de progesterona que de estradiol, pois as células da granulosa e da teca são responsáveis pela esteroidogênese, enquanto as células do corpo lúteo são responsáveis por sintetizar progesterona. Foi observada discreta marcação (+) no corpo albicans de três fêmeas, indicando que estas já haviam ovulado pelo menos uma vez, pois esta estrutura é um corpo lúteo em degeneração. No tecido uterino a proteína expressou marcação discreta (+) à moderada (++) no epitélio de revestimento do endométrio e marcação moderada (++) no citoplasma das células das glândulas endometriais. Foi observada na musculatura lisa dos vasos do endométrio, miométrio e citoplasma das células mesoteliais do perimétrio. Segundo dados de SMOLINSKA *et al.* (2007), a presença da leptina também foi encontrada, nas diferentes camadas uterinas, através de métodos moleculares que reforçam os resultados de marcações aqui apresentados.

4 CONCLUSÕES

Foi possível observar forte expressão da leptina (+++) nos ovócitos dos folículos primários, secundários e terciários. Porém nas células da teca e granulosa a marcação deste anticorpo estava ausente (-) ou de forma discreta (+) nos ovários das leitoas pré-púberes. E a expressão moderada (++) no endométrio uterino e glândulas endometriais foram predominantes. Portanto estes tecidos podem ser utilizados para futuras avaliações em fêmeas destinadas ao descarte por falhas reprodutivas.

5 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPQ pela concessão da bolsa de iniciação científica da segunda autora e a CAPES pela bolsa de doutorado da primeira autora.

6 REFERÊNCIAS

AGARWAL, S.K.; VOGEL, K.; WEITSMAN, R.S.; MAGOFFIN, A.D.; Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, v. 84, n 3, p.1072-1076.

ARCHANCO, M.; MURUZÁBAL, F.J.; LLOPIZ, D.; GARAYOA, M.; GÓMEZ-AMBROSI J.; FRUHBECK, G.; BURREL, M.A. Leptin expression in the rat ovary depends on estrous cycle. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v.51. n.10. p.1269-77. 2003.

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.

BLUER, B.; MANTZOROS, C.S. Leptin in reproduction. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 14, p. 458–464, 2007.

CIOFFI, J.A.; BLERKOM, V.J.; ANTCZAK, M.; SHAFER, A.; WITTMER, S.; SNODGRASS, R.H.; The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Molecular Human Reproduction*, v.3, n. 6, p. 467-472, 1997.

DE RENSIS, F.; GHERPELLI, M.; SUPERCHI, P.; KIRKWOOD, R.N. Relationships between backfat depth and plasma leptin during lactation and sow reproductive performance after weaning. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 95-100, 2005.

DIEHL, G.N.; COSTI, G.; VARGAS, A.J. Monitoramento ovariano ao abate de leitoas descartadas por anestro ou estro atípico. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, p. 121-125, 2003.

ENGBLOM, L.; LUNDEHEIM, N.; DALIN, A.M.; ANDERSSON, K. Sow removal in Swedish commercial herds. **Livestock Science**. v. 106, p. 76-86, 2007.

GREGORASZCZUK, E.; PTAK, A.; WOJCIECHOWICZ, T.; NOWAK, K. Action of IGF-I on expression of the long form of the leptin receptor (ObRb) in the prepubertal period and throughout the estrous cycle in the mature pig ovary. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 289-95, 2007.

KAWAMURA, K.; KAWAMURA, N. MULDER, S.M. Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA n. 102**. p.9206-11. 2005.

KUSCU, N.K.; et al. Effect of insulin on rat ovarian leptin expression by immunohistochemical staining. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* v.29. n.6. p.416-21. 2003.

LUCIA, T.; DIAL, G.D.; MARSH, W.E. Reproductive and financial efficiency during lifetime of female swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.216, p. 1802-1809. 2000.

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.563-81, 2007.

ZACHOW, R.J; MAGOFFIN; D.A. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. **Endocrinology**, v. 138, p. 847-50. 1997.