

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Veterinária



TESE

Leptina em fêmeas suínas: relação com o status reprodutivo e causas de descarte

FABIANA MOREIRA

Pelotas, 2011

FABIANA MOREIRA

Leptina em fêmeas suínas: relação com status reprodutivo e causas de descarte

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Reprodução Animal).

Orientador: Thomaz Lucia Jr.

Comitê de orientação: Cristina Gevehr Fernandes
Josiane Bonel Raposo
Márcio Nunes Corrêa

Pelotas, novembro/2011

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

M835l Moreira, Fabiana

Leptina em fêmeas suínas : relação com status reprodutivo e causas de descarte / Fabiana Moreira ; orientador Thomaz Lucia Jr.; co-orientadores Cristina Gevehr Fernandes, Josiane Bonel Raposo e Márcio Nunes Corrêa – Pelotas, 2011.-67f. ; il..- Tese (Doutorado).Área de conhecimento em Reprodução Animal. – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Thomaz Lucia Junior
Universidade Federal de Pelotas
(Orientador)

Dr. Eduardo Schmitt
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Geferson Fischer
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Pablo Elias Martinez
Universidade Federal de Rio Grande

“Quem tem um porquê enfrenta qualquer como”

Viktor Frankl

Agradecimentos

À Deus, pela iniciativa, força de vontade, determinação e dedicação existentes dentro de mim em alcançar um dos maiores objetivos da minha vida;

Aos meus pais, Rui Tadeu Moreira e Veraluz S. de Almeida, pelo amor, apoio psicológico e financeiro, paciência, por estarem sempre ao meu lado e principalmente por acreditarem em mim;

Ao meu irmão Israel, à amiga Patrícia, e em especial aos meus sobrinhos Breno e Laura, pelo amor, carinho e pelos momentos de alegria e descontração;

À minha segunda família, Seu Francisco, Dona Marly e Liliane Leite, por todo o carinho, amizade, apoio e incentivo, nos bons e difíceis momentos da minha vida, distantes da minha família;

Ao meu orientador Professor Thomaz Lucia Jr., pelo apoio, incentivo, oportunidade de crescimento e confiança que me fizeram acreditar que seria possível;

Ao Professor e amigo Rafael G. Mondadori, pela ajuda e dedicação indispensáveis e imprescindíveis no desenvolvimento desta tese;

À Professora e amiga Carine D. Corcini, pelo carinho, incentivo e pelas valiosas sugestões;

Aos meus coorientadores e professores, Cristina G. Fernandes, Márcio N. Corrêa, Josiane B. Raposo e Eugênio G. de Araújo, pelo apoio, incentivo e auxílio na confecção deste trabalho;

Às minhas queridas amigas, Antonella, Elisa, Sibebe, Caroline, Maria Elvira, Raquel e Tamine, conquistadas ao longo dos anos de doutorado com imensa estima e eterna duração;

À minha querida tia Edinamar Moreira, pelo constante incentivo e apoio psicológico durante algumas fases da minha vida, indispensáveis ao bom andamento dos trabalhos de doutorado;

Aos respectivos cônjuges do meu pai e minha mãe, Eliana e Nílvio, pelo apoio e pelas palavras amigas em momentos especiais da minha vida;

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Karina, Carlos, Jorgea, Elisângela, Daniel, Alexander e Gustavo, pela agradável convivência, auxílio na execução de etapas do trabalho e momentos de descontração;

Aos estagiários do grupo ReproPEL, especialmente a Stella e Luzia, pela amizade e imensa ajuda na execução desta tese;

Aos Professores Arnaldo Vieira e Ivan Bianchi pelo apoio e ajuda técnica prestada sempre que solicitados;

À BR Foods S/A representada pelos profissionais das áreas da Agropecuária Regional de Rio Verde e Corporativa Agropecuária pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Frigorífico Castro, especialmente ao Nilo, o qual mostrou disposição constante em auxiliar na coleta do material;

À Escola de Veterinária/UFG, pela oportunidade de desenvolver parte do experimento nas dependências do laboratório de imunopatologia; Aos Laboratórios de Reprodução Animal e Patologia da UFPel, pela oportunidade em realizar parte dos experimentos deste trabalho;

Ao Laboratório de Histologia da FURG, em especial ao Antônio Sérgio, pelo auxílio indispensável à conclusão do material e métodos;

À Faculdade de Veterinária – FESURV, pela liberação dos alunos de graduação em Veterinária, Renato e André, que prestaram ajuda indispensável na coleta e parte do processamento do material para este trabalho;

À pós-graduação da faculdade de Veterinária da UFPel, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

Enfim, a todos que de uma forma e outra contribuíram para a realização e conclusão desta Tese de doutorado...

Muito Obrigada

RESUMO

MOREIRA, Fabiana. **Leptina em fêmeas suínas: relação com status reprodutivo e causas de descarte**. 2011. 67f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptina é um hormônio peptídico multifuncional, produzido primariamente pelo tecido adiposo, com receptores (Ob-Rs) presentes em órgãos reprodutivos, hipotálamo e hipófise, que atua na regulação do apetite e no gasto energético, com potencial influência sobre a expressão da função reprodutiva, na puberdade e após a lactação. Desordens reprodutivas são as causas mais comuns, atribuídas ao total dos descartes, entre 30 e 40%. Considerando a alta proporção de descartes por estes problemas, a avaliação dos órgãos genitais no abate tem importante valor diagnóstico, auxiliando na identificação do estágio do ciclo estral da fêmea e na interpretação de possíveis anormalidades reprodutivas. O seu receptor de forma longa (OBR-b) realiza transdução de sinal em diversos tipos celulares via cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), tais como ERK 1/2 e p38. A primeira etapa do trabalho teve por objetivo avaliar a presença da leptina, e das MAPK nos oócitos de fêmeas suínas púberes e pré-púberes. Envolveu ovários de 10 fêmeas pré-púberes e 10 púberes coletados no abate e lâminas foram analisadas de oócitos inclusos em folículos primordiais/primários (OIFP), secundários (OIFS) e terciários (OIFT). Para a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) os anticorpos policlonais instilados foram anti-leptina, anti-phospho- MAPK (ERK 1/2 e p38). A segunda etapa envolveu 28 porcas púberes descartadas, das quais foram analisados os neurônios do hipotálamo, glândulas endometriais e oócitos. Para a IHQ foram utilizados anticorpos policlonais anti-leptina e anti-receptor da leptina e objetivou comparar as respostas com os dados produtivos e reprodutivos a partir do registro de cada fêmea. Em ambas as etapas de trabalho foram utilizadas as modas obtidas pelo aplicativo 16 Bit-Histograma do software Image J[®]. A imunomarcção da leptina e a presença de ERK 1/2 ativada MAPK foram mais intensas em oócitos de porcas ($p \leq 0,05$), enquanto que a marcação para p38 MAPK ativada foi mais intensa em oócitos de leitoas ($p = 0,05$). Em porcas, os OIFP estavam mais intensamente marcados para a leptina e p38 MAPK ($p < 0,05$), mas para leitoas não foi observada diferença na marcação dos oócitos independente do estágio folicular. No hipotálamo a imunomarcção para a leptina foi mais intensa nas porcas descartadas por problemas reprodutivos ($p < 0,05$). O hipotálamo, útero e oócitos das porcas que estavam na fase lútea ou fase folicular apresentaram imunomarcção para leptina e OBR-b mais acentuada que naquelas que possuíam cistos ovarianos. A imunomarcção para a leptina foi mais acentuada no hipotálamo e útero daquelas porcas do grupo ordem de parto 2 (OP 2-4) ($p < 0,05$). Estes resultados demonstram que a leptina pode ser um dos marcadores para competência oocitária. Além disso, pode também ser observado que fêmeas cíclicas com OP 2-4 partos apresentam imunomarcção mais intensa para leptina no hipotálamo e útero, e OBR-b nos oócitos e útero. O OBR-b obteve marcação mais acentuada em fêmeas primíparas e multíparas, que nulíparas. Portanto, a imunomarcção para leptina e OBR-b podem ser um marcador de sinalização reprodutivo em fêmeas suínas.

Palavras-chave: Leptina. Receptor da Leptina. MAPK. Púberes. Pré-púberes.

ABSTRACT

MOREIRA, Fabiana. **Leptin in swine females: relationship between reproductive status and culling causes.** 2011. 67f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptin is a multifunctional peptidic hormone, primarily produced by the adipose tissue, which has receptors (Ob-Rs) in reproductive organs, hypothalamus and hypophysis, acting in the appetite regulation and energetic expenditure, potentially influencing the expression of the reproductive function, at puberty and lactation. Reproductive failure are the main causes for female culling, representing 30% to 40% of the total female culling. Thus, post-mortem evaluation of the genital organs at slaughter may have an important diagnostic value, helping on the identification of the stage of female's estrous cycle and aiding the interpretation of reproductive abnormalities. Its long form receptor (OBR-b) performs signal transduction in several cell types via mitogen-activated protein kinases (MAPK) cascade, such as ERK 1/2 and p38. The first stage of this thesis is aimed to evaluate the presence of leptin and MPK in oocytes of pubertal sows and prepubertal gilts. Ovaries from 10 pubertal sows and 10 prepubertal gilts were collected at a slaughterhouse. Slides were analyzed for the presence of oocytes included in primordial/primary (OIPF), secondary (OISF) and tertiary follicles (OITF). Immunohistochemistry (IHC) was performed with polyclonal antibodies anti-leptin and anti-phospho-MAPK (ERK 1/2 and p38). The second stage involved 28 pubertal sows and the analyses were performed in hypothalamic neurons, endometrial glands and oocytes. For IHC, the antibodies were polyclonal anti-leptin and anti-leptin receptor. Responses were compared with reproductive data registered for each female. All images in both stages were analyzed by 16-Bit Histogram application from Image J[®] software. Immunolabeling for leptin and activated ERK 1/2 MAPK were more intense in sows oocytes ($p \leq 0.05$), while the immunolabeling for activated p38 MAPK was more intense in gilts oocytes ($p = 0.05$). In sows, OIPF were more intensely marked for leptin and p38 MAPK ($p < 0.05$), on the other hand, for gilts there was no difference in the marking of follicular oocytes from the analyzed categories. Hypothalamic neurons were more intensely marked in the sows culled by reproductive problems ($p < 0.05$). The hypothalamus, uterus and oocytes of luteal or follicular phase sows showed more intense immunolabeling for leptin and OBR-b than the females with cystic ovaries. The immunolabeling for leptin was more pronounced in the hypothalamus and uterus of sows from parity order 2 group (PO 2-4) ($p < 0.05$). These results demonstrate that leptin may be a marker for oocyte competence. Also, cyclic females having PO 2-4 presented more intense leptin immunolabeling in the hypothalamus and uterus and for OBR-b in the oocyte and uterus. The OBR-b immunolabeling was more pronounced in primiparous and multiparous females than for nulliparous. Therefore, immunolabeling for leptin and OBR-b can be a marker for reproductive performance in swine females.

Key-words: Leptin. Leptin Receptor. MAPK. Pubertal. Prepubertal.

Lista de Figuras

FIGURA 1	Immunolabeling (arrows) for activated ERK 1/2 MAPK (A) and p38 MAPK (B) in oocyte cytoplasm and nucleus and for leptin (C) only in oocyte cytoplasm. (Photomicrography at 20x).....	37
FIGURA 2	Immunolabeling (arrows) for leptin, p38 MAPK and ERK 1/2 MAPK protein in oocytes of sows and gilts. (Photomicrography at 100x; 40x; and 20x, respectively).....	38

Lista de Tabelas

TABELA 1	Intensity of immunolabeling for leptin (means of the mode observed values), ERK 1/2 MAPK and p38 MAPK in the cytoplasm of oocytes from gilts and sows.....	33
TABELA 2	Intensity of leptin immunolabelling (means of the mode observed values) in the cytoplasm of oocytes from gilts and sows, include in follicles of distinct developmental stages.....	34
TABELA 3	Intensity of activated ERK 1/2 MAPK immunolabeling (means of the mode observed values) in the cytoplasm of oocytes from gilts and sows, included in follicles of distinct developmental stages.....	35
TABELA 4	Intensity of activated p38 MAPK immunolabeling (means of the mode observed values) in the cytoplasm of oocytes from gilts and sows, included in follicles of distinct developmental stages.....	36
TABELA 1	Intensidade da imunomarcção para leptina (valores das mdias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Lep), nos oócitos dos ovários (OT Lep) e nas glândulas endometriais do útero (UT Lep) de acordo com a causa de descarte de porcas.....	50
TABELA 2	Intensidade da imunomarcção para o receptor da leptina (valores das mdias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Rec), dos oócitos dos ovários (OT Rec) e das glândulas endometriais do útero (UT Rec) de acordo com a causa de descarte de porcas.....	50
TABELA 3	Intensidade da imunomarcção para leptina (valores das mdias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Lep), nos oócitos dos ovários (OT Lep) e nas glândulas endometriais do útero (UT Lep) de acordo com o status ovariano de porcas.....	51

TABELA 4	Intensidade da imunomarcção para o receptor da leptina (valores das médias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Rec), dos oócitos dos ovários (OT Rec) e das glândulas endometriais do útero (UT Rec) de acordo com status ovariano de porcas.....	53
TABELA 5	Intensidade da imunomarcção para o receptor da leptina (valores das médias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios (HP Rec), dos oócitos dos ovários (OT Rec) e das glândulas endometriais de acordo com status ovariano de porcas.....	54
TABELA 6	Intensidade da imunomarcção para o receptor da leptina (valores das médias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Rec), dos oócitos dos ovários (OT Rec) e das glândulas endometriais do útero (UT Rec) de acordo com a ordem de parto de porcas.....	54

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tabelas	9
1.0 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.0 ARTIGO 1.....	16
Leptin and mitogen-activated protein kinase (mapk) in oocytes from prepubertal and pubertal swine females.....	12
1. Introduction.....	18
2. Materials and methods	20
3. Results	22
4. Discussion	23
5. Conclusions.....	26
6. References	27
3.0 ARTIGO 2.....	39
Leptina e seu receptor (OBR-b) no hipotálamo, útero e ovários de porcas púberes: correlação com características produtivas e reprodutivas.....	43
2.1 Introdução	42
2.2 Material e Métodos.....	44
2.3 Resultados e Discussão.....	47
2.5 Conclusão	56
2.6 Referências	57
4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
5.0 REFERÊNCIAS GERAIS	62
APÊNDICE	66

1.0 REVISÃO DE LITERATURA

A leptina é uma proteína hormonal com peso molecular de 16 kDA, composta por 146 aminoácidos (ZHANG et al., 1994; BARB & KRAELING, 2004). É produzida primariamente pelos adipócitos e atua na regulação do apetite, no gasto energético, em todo o balanço energético corporal e na função reprodutiva, através da ativação de seus receptores (Ob-Rs) presentes nos órgãos reprodutivos, hipotálamo e hipófise (BARB et al. 2001; DE RENSIS et al., 2005).

Em suínos, a leptina é expressa no endométrio e miométrio, durante as fases do ciclo estral, no trofoblasto, no hipotálamo durante as fases iniciais da gestação (SMOLINSKA et al., 2007), e nos ovários, aumentando progressivamente em folículos em desenvolvimento e atingindo o pico nos corpos lúteos recém-formados (GREGORASZCZUK, et al., 2007).

A leptina desempenha um papel fisiológico importante no desenvolvimento puberal nos mamíferos (SUMMER, et al., 2009) e também na sinalização do status nutricional sobre o eixo reprodutivo central dos mamíferos (ZIEBA et al., 2005), dessa forma parece ser um fator permissivo para a ativação desse eixo em suínos (BARB, et al., 2001), e até mesmo como gatilho para o início da puberdade (ZIEBA et al., 2005).

Diversas isoformas dos receptores, resultantes de *splicings* alternativos, são responsáveis por atividades biológicas distintas e estão envolvidas na mediação das ações da leptina no cérebro e órgãos periféricos (TARTAGLIA, 1997). A forma longa do receptor, OBR-b, um receptor transmembrana, é capaz de efetivar transdução de sinal para as células específicas (HAKANSSON & MEISTER, 1998). Tem sido encontrado em muitos órgãos, incluindo hipotálamo de leitoas pré-púberes, cíclicas, porcas gestantes e fetos onde também há expressão da leptina (LIN et al., 2001), além dos ovários (LEE et al., 1996). As proteínas quinases ativadas por mitógenos

(MAPK) são serina/treonina quinases que atuam como vias de transdução de sinal nos ovários de várias espécies, incluindo a suína (INOUE et al., 1995)

Na espécie suína a leptina é um importante modulador da maturação dos oócitos *in vitro*, e sua adição em meio de maturação aumenta os padrões de desenvolvimento embrionário (JIN et al., 2009), que parece estar envolvido com o aumento da fosforilação da MAPK ERK 1/2 em oócitos (CRAIG et al, 2005). Reforçando estes achados é importante salientar que durante a maturação do oócito, as MAPKs são ativadas no rompimento da vesícula germinativa e permanecerão ativadas até que o início do estágio de metáfase II (Goudet, et al., 1998). Em células de ovário humano, a leptina utiliza a via das MAPK como cascatas de sinalização intracelular, ativando componentes, tais como ERK 1 / 2 e p38 (Van den Brink, et al, 2000).

As evidências de que a expressão da leptina seja regulada pela insulina (HOUSEKNECHT & PORTOCARRERO, 1998) e por outros metabólicos energéticos foi demonstrada em animais com jejum induzido, quando um decréscimo ocorreu da expressão de RNAm no tecido adiposo subcutâneo, acompanhado de um aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados (NEFA) e uma redução nas concentrações de insulina no plasma sanguíneo (SPURLOCK et al., 1998). Além disso, a secreção da leptina pode ser estimulada pela insulina, por glicocorticóides e citocinas (como o fator de necrose tumoral α). No entanto, catecolaminas, ácidos graxos livres, hormônios da tireóide e a exposição ao frio inibem a liberação de leptina. Os estrógenos induzem a produção de leptina enquanto os andrógenos a suprimem (AHIMA et al. 2006).

Ainda que índices corporais e fenômenos clínicos (gênero, massa gorda/distribuição da gordura, hormônios e citocinas) possam influenciar a secreção de leptina, os fatores cruciais para a regulação dos níveis séricos do hormônio seriam a ingestão de calorias e a quantidade de energia armazenada nos adipócitos (KELESIDIS & MANTZOROS, 2006).

Mudanças no peso corporal ou no estado nutricional são caracterizadas por alterações nos níveis séricos de hormônios e fatores de crescimento que regulam o desenvolvimento dos adipócitos, tais como: como insulina; glicocorticóides; hormônio do crescimento; e IGF-1 (BARB et al., 2001). Fatores hormonais podem mediar nutricionalmente a indução da expressão do RNAm da leptina, por aumentar

os níveis desta proteína após a administração de insulina e glicocorticóides (SALADIN *et al.*, 1995).

A leptina atua como um sinalizador metabólico da saciedade, por ação direta sobre o hipotálamo e a hipófise, modulando a atividade secretória do GnRH e do LH, o comportamento alimentar e a função adipocítica, através da inervação adrenérgica dos depósitos de gorduras (BARB *et al.*, 2005). Dados morfológicos demonstram que os receptores da leptina no hipotálamo, contidos em neurônios, são conectados transsinapticamente com depósitos de gordura perirenal (LIN, *et al.*, 2000). Porém, evidências indicam que existe uma ação direta dos neurônios hipotalâmicos na regulação do metabolismo da gordura e da função reprodutiva (BARB *et al.*, 2008).

A espessura de toucinho (ET) seria um indicador do estado metabólico, pois fêmeas com menor ET produzem menos leitões nascidos vivos do que aquelas com maior ET (STALDER *et al.* 2005). Nas fêmeas desmamadas, o consumo reduzido de ração na lactação se traduz em redução na ET e condição corporal insatisfatória, podendo ser associado com incremento nos descartes (ENGBLOM *et al.* 2007). Já que um maior catabolismo levaria à redução das reservas metabólicas e da produção de leite, especialmente em primíparas (KEMP & SOEDE, 2004), com efeitos negativos sobre o tamanho e do peso da leitegada desmamada e a expressão de estro pós-desmame (ANIL *et al.* 2006; ENGBLOM, *et al.* 2007).

Há uma relação entre a ocorrência de baixos níveis circulatórios de leptina e a fertilidade de fêmeas suínas (BARB & KRAELING, 2004), pois a espessura de toucinho (ET) pode ser positivamente associada com a concentração sérica de leptina. Assim, a concentração deste hormônio é aumentada em fêmeas classificadas como gordas, mas reduzida em fêmeas classificadas como intermediárias e magras, no parto como no desmame (DE RENSIS *et al.*, 2005).

A grelina é também um importante hormônio envolvido na maioria dos sinais metabólicos e hormonais (REPACE, *et al.*, 2011). É primariamente sintetizado por um pró-hormônio (pré-grelina), com expressão no estômago e regulação de uma série de fatores e condições fisiológicas como restrição de nutrientes, hipoglicemia e administração de leptina (TOSHINAI *et al.*, 2001). Possui papel importante na homeostase energética, no controle do peso corporal, consumo de alimento e função reprodutiva (HORVATH *et al.*, 2001).

A distribuição da grelina no ovário foi estudada por imuno-histoquímica em fêmeas cíclicas, e os resultados mostraram uma forte imunorreatividade dessa

proteína no corpo lúteo e nas células da teca e granulosa dos folículos em crescimento na fase de diestro do ciclo estral. Os resultados deste estudo sugerem que a grelina pode desempenhar um papel importante na rede endócrina que integra o balanço energético e a reprodução (ZHANG et al., 2008).

Associações entre os hormônios relacionados ao metabolismo e a reprodução com ênfase na leptina, podem gerar respostas e um maior conhecimento sobre a atuação como marcadores das funções reprodutivas na espécie suína.

2.0 ARTIGO 1

(Formatado nas normas da revista Molecular and Cellular Endocrinology)

LEPTIN AND MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK) IN OOCYTES FROM PREPUBERTAL AND PUBERTAL SWINE FEMALES

1 **LEPTIN AND MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK) IN OOCYTES**
2 **FROM PREPUBERTAL AND PUBERTAL SWINE FEMALES**

3
4
5 Fabiana Moreira¹; Cristina Gevehr-Fernandes²; Rafael G. Mondadori^{1,3}; Carine D. Corcini^{1,2};
6 Fernanda F. Mendes⁴; Eugênio G. Araújo⁴; Thomaz Lucia Jr.^{1,2*}

7
8
9 ¹ReproPel, ²Faculdade de Veterinária, ³Instituto de Biologia,
10 Campus Capão do Leão, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas-RS, Brazil;
11 ⁴Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia-GO

12
13
14 **ABSTRACT**

15
16 Leptin is an important modulator of oocyte maturation and follicular development in swine
17 females. MAPK are serine/threonine kinases that act as signal transduction pathways in swine
18 ovaries. Competency of maturation and development of oocytes are related to the sexual
19 maturity of the female, and also with the different stages of follicular development. This study
20 evaluated the presence of leptin, activated MAPK ERK 1/2 and p38 in oocytes of the
21 primordial/primary, secondary and tertiary follicles of prepubertal (gilt) and pubertal.

*Correspondence: Thomaz Lucia Jr., PhD.

ReproPel, Faculdade de Veterinária, Campus Capão do Leão, Universidade Federal de
Pelotas, 96010-900, Pelotas-RS, Brasil.

Phone/Fax: +55 (53) 32759004. E-mail: thomaz@pq.cnpq.br

(sow) swine females. Ovaries from ten gilts and ten sows were collected in an abattoir, fixed in 10% formalin and prepared with classical histology methods. Initial evaluations were performed in 5 μ m cuts stained with hematoxylin and eosin. For immunohistochemistry, slides were incubated with polyclonal antibodies anti-leptin, anti-phospho ERK1/2 MAPK and anti-phospho p38 MAPK. The slides images were analyzed using Image J[®] software. Leptin immunolabeling and the presence of activated ERK 1/2 MAPK were more intense in sows' oocytes ($P \leq 0.05$), whereas p38 MAPK was more active in gilts' oocytes ($P = 0.05$). For sows, oocytes included in primordial/primary follicles were intensely immunolabeled for leptin and p38 MAPK ($P < 0.05$), but for gilts no difference was observed among oocytes in distinct follicle stages. The intense immunolabeling observed in oocytes included in primary follicles indicates that these two markers may be important to start oocyte development. As sows' oocytes are more competent than gilts' oocytes, the intensity of leptin immunolabeling may be related to oocyte competence.

Key-words: ERK, p38, immunohistochemistry, gilt, sow, folliculogenesis

1. Introduction

Leptin is a multifunctional hormone that originates from the gene for obesity (Ob), primarily expressed in the white adipose tissue (Bluer and Mantzoros, 2007), which acts on appetite and energy consumption control, having indirect effects on reproductive function (Barb and Kraeling, 2004, De Rensis et al, 2005). Leptin is an important modulator of swine *in vitro* oocyte maturation, since its addition to maturation media may increase embryo development rates (Jin et al., 2009), also increasing phosphorylation of ERK 1/2 MAPK in oocytes (Craig et al, 2005). In swine, leptin is expressed in the trophoblast and in both the endometrium and myometrium during the estrous cycle, which suggests that locally

48 synthesized leptin may play a role in the control of reproductive function (Smolinska et al,
 49 2007). In swine ovaries, leptin is detected at increasing levels in developing follicles, reaching
 50 its peak in the newly formed corpus luteum (Gregoraszczuk et al, 2007), possibly also
 51 influencing follicular development (Ryan et al., 2003). In ovariectomized gilts, leptin's
 52 mRNA expression in the adipose tissue was induced by estradiol, only when the animals
 53 reached puberty (Qian et al., 1999, Barb et al., 2008) which suggests that leptin also plays a
 54 role in sexual maturation.

55 At its target tissues, leptin binds to specific membrane class I family cytokine
 56 receptors, which, in their long form (OB-Rb), transduce signs at cell level (Hakansson and
 57 Meister, 1998). The mitogen-activated protein kinases (MAPK) are serine/threonine kinases
 58 that act as signal transduction pathways in the ovaries of several species, including swine
 59 (Inoue et al., 1995). During oocyte maturation, MAPK are activated in the germinal vesicle
 60 breakdown and remain activated until the metaphase II stage (Goudet, et al., 1998). In human
 61 ovarian cells, leptin uses MAPK as intracellular signaling cascades, activating components
 62 such as ERK 1/2 and p38 (Van den Brink, et al, 2000), which are important for oocyte
 63 maturation in swine (Inoue et al., 1998). ERK 1/2 MAPK activation is accentuated in mature
 64 swine oocytes to resume of meiosis, keeping oocytes in metaphase II (Liu et al, 1998). During
 65 maturation of rat oocytes *in vitro*, the signal transduction pathway of p38 MAPK is activated
 66 by FSH and may regulate estrogen and progesterone production in granulosa cells (Yu et al.,
 67 2005). The relationship between leptin and p38 MAPK is well described in vascular
 68 physiology and tissue remodeling (Shin et al, 2005), since leptin induces hypertrophy in
 69 smooth muscular cells of blood vessels.

70 Oocytes from prepubertal gilts and pubertal sows differ in several aspects (Bagg et al
 71 al., 2004). In comparison with gilts, cyclic sows present ovaries with more follicles and
 72 oocytes with greater meiotic competence (Pawlak, et al., 2011). Oocyte competence varies

73 according to the stage of follicular development; oocytes from larger antral follicles are
74 generally more competent than oocytes from other follicles (Kim et al., 2010). However, Wu
75 et al., (2001) reported that oocytes obtained from preantral follicles, and submitted to ideal
76 culture conditions, may acquire meiotic competence and capability to be fertilized and to
77 develop until embryos.

78 The objectives of this study were to evaluate the activation of ERK 1/2 and p38
79 MAPK pathways and the leptin presence in oocytes from primordial/primary, secondary and
80 tertiary ovarian follicles from slaughtered gilts and sows.

81

82 **2. Materials and methods**

83

84 Ovaries from ten prepubertal gilts (presenting no corpora lutea) and from ten sows
85 (presenting corpora lutea) were collected in an abattoir and fixed in a 10% formalin buffered
86 solution. The ovaries were then processed by classical histology method and stained with
87 hematoxylin and eosin. Evaluation was performed in optical microscopy.

88 To perform immunohistochemistry (IHC) analysis, 3 μ m slices were obtained in an
89 automatic microtome and adhered in slides impregnated by 3% organosilane (Sigma[®], USA)
90 in ethanol. The samples were deparaffinised with xylene and rehydrated with graded alcohols.
91 After blocking endogenous peroxidase activity with H₂O₂:methanol solution (70:30),
92 antigenic recovery was done through humid heat at 121°C in citrate solution pH 6.0. Non-
93 specific background staining was reduced by covering the tissue sections with 3% bovine
94 serum albumin (BSA) in PBS. All primary antibodies were obtained from Santa Cruz
95 Biotechnology, (Santa Cruz, CA, USA) and diluted in 1.5% BSA solution. Incubation was
96 done overnight in a humid chamber at 4 °C. Anti-leptin (Ob antibody; A-20, sc-842 - rabbit)
97 was diluted 1:2000, whereas anti-phospho-ERK 1/2 MAPK (sc-101760 - mouse) and anti-
98 phospho-p38 MAPK (D-18, sc-7973- mouse), were both diluted 1:100. Samples with anti-

leptin antibody were instilled with streptavidin-biotin-peroxidase (LSAB[®] anti-leptin antibodies kit, Dako Corporation, CA, USA), and slides with anti-phospho-ERK 1/2 and anti-phospho-p38 MAPK antibodies were instilled with Vectastain[®] Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Both secondary antibodies were incubated at room temperature, following manufacturer's instructions. Then, slides were incubated with 3,3'diaminobenzidine (DAB-K3468, DakoCytomation), counterstained with aqueous hematoxylin for 1 min and mounted with coverslips and synthetic resin (Sigma Chemical Company[®], St. Louis, MO, USA).

Slides were evaluated by light microscopy and oocytes were classified as: included in primordial/primary follicles (OIPF), when surrounded by one layer of flat to cubic granulosa cells; included in secondary follicles (OISF), when surrounded by two or more layers of cubic granulosa cells; or included in tertiary follicles (OITF), when surrounded by various granulosa cell layers with antrum formation).

Images of ovarian sections were captured with a digital camera (Olympus DP72) attached to a compound light microscope (Olympus BX 51, Tokyo, Japan), using a 40X objective. Considering the availability of structures per ovary, 30, 20 and 10 images were analyzed, for OIPF, OISF and OITF, respectively. In the captured images, the cytoplasm of each structure was manually delimited, excluding the nucleus. The mode value of each area was obtained by the 16-bit Histogram application from Image J[®] software. This application uses a scale ranging from 0 to 255, where 0 indicates the highest staining intensity and 255 indicates no staining. The means of the mode observed values were compared across female categories (gilts and sows), markers (leptin, ERK1/2 MAPK and p38 MAPK) and follicular developmental stages (OIPF, OISF and OITF) through the Wilcoxon rank sum test, using Statistix[®] (2008).

3. Results

Both ERK 1/2 MAPK and p38 MAPK were observed in the oocyte's nucleus and cytoplasm (Figures 1A and 1B, respectively), whereas leptin was present only in the oocyte's cytoplasm (Figure 1C). The distribution of the three markers was similar in oocytes from sows and gilts and also in oocytes from follicles of different developmental stages.

Regardless of the follicular development stage, immunolabeling for leptin and ERK 1/2 MAPK was more intense ($P \leq 0.05$) in the cytoplasm of oocytes from sows than in those from gilts, whereas p38 MAPK activity was more intense in gilts' oocytes (Table 1).

For sows, leptin staining was more intense ($P < 0.05$) for OIPF and OISF than in OITF (Table 2). However, for gilts, leptin immunolabeling was similar in oocytes from all developmental stages. The OIPF and OISF from sows presented more intense staining than similar structures from gilts ($P < 0.05$), but no differences were observed between OITF from sows and gilts ($P > 0.05$). Figure 2 shows intense leptin immunolabeling in OIPF from sows (Figure 2A) and poor leptin immunolabeling in OIPF from gilts (Figure 2B).

For ERK 1/2 MAPK, more intense immunolabeling ($P < 0.05$) was observed in OITF from sows than in those from gilts (Table 3), although there were no differences between OIPF and OISF ($P > 0.05$). Additionally, no differences were observed ($P > 0.05$) comparing immunolabeling within female categories. More intense immunolabeling for ERK 1/2 MAPK was observed in the cytoplasm of OITF from sows (Figure 2E) in comparison with that observed in OITF from gilts (Figure 2F).

Activated p38 MAPK was present in greater amounts ($P < 0.05$) in gilts than in sows, only for OISF, with no other differences observed between oocytes included in follicles with distinct developmental stages (Table 4). Immunolabeling for activated p38 MAPK was similar among gilts ($P > 0.05$), but more intense in OIPF among sows ($P < 0.05$). As shown in

Figure 2, immunolabeling for activated p38 MAPK was more intense in OISF from gilts (Figure 2C) than in those from sows (Figure 2D).

151

152 **4. Discussion**

153

154 This is the first study to report that leptin immunolabeling is more intense in OIPF
155 and OISF than in OITF in sows, and also greater in sows' than in gilts' ovaries. These results
156 suggest that leptin concentration is greatest in oocytes from preantral follicles, but stabilizes
157 as follicles grow up to the preovulatory stage. This may be explained by a synergism among
158 leptin, FSH and LH that stimulates small and medium follicles to secrete estradiol and
159 corpora lutea to secrete progesterone (Prazla, et al., 2006). The presence of leptin in sow's
160 oocytes may also be related to their greater competence and development in comparison with
161 prepubertal gilt's oocytes. At the beginning of the preantral follicles' formation, oocytes store
162 specific products from some genes that will be critical to their capacity to coordinate follicular
163 growth. This transduction is regulated by many hormonal changes that occur until ovulation
164 (Mermillod et al., 2008). The intense leptin immunolabeling observed in sows may reflect its
165 action on modulating steroid biosynthesis in ovaries, which is induced by FSH (Barkan, et al.,
166 1999). The effects of leptin on steroidogenesis depend on follicular growth (Prazla, et al.,
167 2006), whereas in culture of pre-ovulatory follicles, inclusion of leptin is associated with a
168 reduction in estradiol's basal secretion, simultaneously with an increased secretion of
169 progesterone (Gregoraszczyk et al, 2004).

170 The differences observed in immunolabeling intensity for leptin, activated ERK 1/2
171 MAPK and activated p38 MAPK reflect differences in follicular growth, oocyte maturation
172 competence and reproductive status among the evaluated females. Leptin was present in the
173 cytoplasm of all oocytes, regardless of follicular developmental stage and female category.

174 This finding is corroborated by studies in humans that reported leptin presence in granulosa
175 and theca cells (Agarwal et al., 1999) and synthesis of leptin mRNA in oocytes (Cioffi et al.,
176 1997). In swine, expression of leptin mRNA was reported in follicles of all developmental
177 stages and during oocyte maturation (Graig et al., 2004), corroborating the presence of leptin
178 itself, as identified in the present study. Although leptin controls appetite and energy demand
179 (Zhang et al, 1994; Barb et al, 2001; Barb and Kraeling, 2004, De Rensis et al, 2005), there is
180 evidence that leptin signals some important events for reproductive function, such as the
181 control of ovarian function (Brann et al. 2002; Bluer and Mantzoros, 2007), through its action
182 on the pituitary-hypothalamus axis (Barb et al., 2001).

183 The weak leptin immunolabeling observed in gilts' oocytes may occasionally be
184 related to poor physical condition, since low circulatory leptin levels may occur
185 concomitantly with delayed puberty and irregular cyclicity, due to nutritional disorders (Barb
186 et al, 1997). The fact that the evaluated gilts were prepubertal, not selected for reproduction
187 and destined for slaughter may reflect an underdevelopment of their neuroendocrine system,
188 which would impair GnRH and LH secretion (Lin et al 2001). In sows, low leptin plasma
189 levels may also reflect poor body condition and reduced backfat thickness (De Rensis et al,
190 2005), especially for weaned sows that faced relevant adipose tissue loss during lactation
191 (Summer et al, 2009). Poor body condition is commonly associated with subsequent
192 reproductive failures, such as anestrous, prolonged weaning-to-estrous interval and repeated
193 estrous, which are common reasons for female culling, especially at low parities (Lucia et al,
194 1999; 2000; Engblom et al, 2007). Thus, leptin may act as a flagging hormone for
195 reproductive failure in swine females, with potential impact on herd culling rates, which is
196 worth investigation in further studies.

197 Activated MAPKs were present in the oocyte cytoplasm and nucleus in follicles of
198 all developmental stages. These kinases are phosphorylated (activated) in both the cytoplasm

199 and in the nucleus, acting on transcription of factors that determine several specific actions of
200 the activated transduction pathway (Widmann et al, 1999). MAPKs, especially ERK 1/2, are
201 important pathways of the cumulus oophorus-oocyte complex. In oocytes, MAPKs are
202 indirectly activated by MOS, a MAPK kinase kinase (MAPKKK) and some of its functions
203 may be driven by ERK 1/2 MAPK, because its active form is present in the oocyte nucleus
204 (Van den Brink et al, 2000). In the present study, ERK 1/2 MAPK was activated more
205 intensively in sows' oocytes. The main function of kinases, especially of ERK 1/2 MAPK, is
206 to reactivate meiosis and to arrest the oocyte nucleus in metaphase II during maturation, as
207 reported for bovine (Liu et al., 1998) and swine (Ohashi et al., 2003). Meiosis resumption and
208 progression to metaphase II is crucial for oocyte maturation, even before ovulation (Su et al.,
209 2003).

210 The intense *in situ* p38 MAPK activation observed in the present study in gilts'
211 oocytes is consistent with the high level of activated p38 MAPK previously observed *in vitro*
212 in gilts' oocytes (Villa-Diaz and Miyano, 2004). The MAPK family includes well-defined
213 components of the Ras/Raf/MAPK signaling cascade, which may become activated through
214 leptin stimuli (Frühbeck, 2006), since leptin stimulates phosphorylation of MEK, a precursor
215 of active ERK 1/2 MAPK in trophoblast cells (Pérez-Pérez et al, 2008). Besides stimulating
216 the classic MAPK pathway, hypothalamic leptin neurons can activate phosphorylation of the
217 p38 MAPK pathway (Shin et al., 2005; Cui et al., 2006).

218 Similarly to leptin immunolabeling, the presence of activated p38 MAPK in sows'
219 OIPF was more intense. If so, as immunolabeling was similar for those two markers in gilts'
220 oocytes, regardless of the follicular developmental stage, perhaps such molecules may act in
221 association on maturation of swine oocytes. Furthermore, a protein called adiponectin,
222 secreted by the adipose tissue, would have a positive effect on oocytes' maturation and
223 embryonic development in swine, using MAPK's signaling cascade through the activated p38

MAPK pathway (Chappaz et al. 2008). Thus, as leptin is also secreted by the adipose tissue (Bluer and Mantzoros, 2007), it may also be involved in oocyte maturation, when p38 MAPK is activated. As p38 MAPK is activated more intensively in OIPF than in OISF and OITF in sows, it may play a role in initial oocyte development, even though its activation is not so intense in subsequent stages of follicular development. In this context, it is worth considering that, when induced by FSH, p38 MAPK may also act on meiosis resumption in oocytes, leading to germinal vesicle breakdown, as hypothesized by Villa-Diaz and Miyano (2004). Additionally, under the influence of FSH, leptin also acts on steroidogenesis regulation, through the activation of the p38 MAPK pathway (Yu et al, 2005).

Immunolabeling for activated ERK 1/2 MAPK was more intense in sows' than in gilts' OITF. This finding corroborates that of other groups, reporting that exogenous leptin treatment reinforces the activity of ERK 1/2 MAPK in the maturation process (Graig et al., 2004) and may accelerate the formation of pro-nucleus after fertilization, which is likely mediated by activation of ERK 1/2 MAPK (Jin et al., 2009). Considering that sows' oocytes are more efficient than gilts' ones, this allows us to speculate that this pathway is used for hormones which act in the final developmental stages of the oocyte.

Some unpublished data generated by our research group indicate that activated p38 MAPK is present in the epithelial lining of primordial/primary follicles, in both sows and gilts. As the experimental use of specific p38 MAPK and ERK 1/2 inhibitors in cell culture leads to a reduction in follicular growth, p38 MAPK may play an important role in the growth of primordial follicles (Oktem and Oktay, 2007). Nevertheless, as there was no leptin staining in the follicles' epithelial lining in all evaluated females, activation of the p38 MAPK pathway in such follicles is apparently unrelated to leptin action.

247

248 5. Conclusions

Leptin and activated ERK 1/2 MAPK were more intensively present in sows' oocytes, but activated p38 MAPK were more intensively present in gilts' oocytes. The more intense immunolabeling observed in sows' oocytes included in primordial/primary follicles indicates that leptin and p38 MAPK may be important for starting oocyte development. On the other hand, immunolabeling for activated ERK 1/2 MAPK was more intense in oocytes from sows' tertiary follicles, i.e., the more competent ones. Despite presenting similar morphology, oocytes from gilts and sows presented biochemical differences that may explain their distinct level of competence. As sows' oocytes are more competent than gilts' oocytes, the intensity of leptin and activated ERK 1/2 immunolabeling may be related to oocyte competence.

259

Acknowledgements: The CAPES foundation is acknowledged for financial support of the first author, for the scholarship granting.

262

263 6. References

264

Agarwal, S.K., Vogel, K., Weitsman, S.R., Magoffin, D.A. 1999. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1072-1076.

Bagg, M.A.; Vassena, R.; Papasso-Brambilla, E.; Grupen, C.G.; Armstrong, D.T.; Gandolfi, F.; Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. *Theriogenology*, v.62 1003–1011. 2004.

Barb, C.R., Kraeling R.R., Rampacek G.B., Dove C.R. 1997. Metabolic changes during the transition from the fed to the acute feed-deprived state in prepubertal and mature gilts. *J Anim Sci* 75, 781–789.

- 275 Barb, C. R., Hausman, G.J., Houseknecht, K.L. 2001. Biology of leptin in the pig. Dom Anim
276 Endocrinol 21, 297-317.
- 277 Barb, C.R., Kraeling, R.R. 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in
278 farm animals. Anim Reprod Sci 82–83, 155–167.
- 279 Barb, C.R., Hausman, G.J., Lents, C.A. 2008. Energy metabolism and leptin: effects on
280 neuroendocrine regulation of reproduction in the gilt and sow. Reprod Dom Anim 43,
281 324-330.
- 282 Barkan, D., Jia, H., Dantes, A., Vardimon, L., Amsterdam, A., Rubistein, M. 1999. Leptin
283 modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. Endocrinol 140, 1731-
284 1738.
- 285 Brann, D.W., Wade, M.F., Dhandapani, K.M., Mahesh, V.B. Buchanan, C.D. 2002. Leptin
286 and reproduction. Steroids 67, 95-104.
- 287 Bluer, B., Mantzoros, C.S. 2007. Leptin in reproduction. Curr Opin Endocrinol Diabet Obes
288 14, 458–464.
- 289 Chappaz, E., Albornoz, M.S., Campos, D., Che, L. Marie-France Palin [c](#), Bruce D. Murphy^b,
290 Vilceu Bordignon. 2008. Adiponectin enhances in vitro development of swine
291 embryos. Domest Anim Endocrinol 35, 198-207.
- 292 Cioffi, J.A., van Blerkom, J., Antczak, M., Shafer, A., Wittmer, S., Snodgrass, H.R. 1997.
293 The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. Mol
294 Human Reprod 3, 467-472.
- 295 Craig, J., Zhu, H., Dyce, P.W., Petrik, J., Li, J. 2004. Leptin enhances oocyte nuclear and
296 cytoplasmic maturation via the mitogen-Activated protein kinase pathway. Endocrinol
297 145, 11, 5355-5363.
- 298 Craig, J.A., Zhu, H., Dyce, P.W., Wen, J., Li, J. 2005. Leptin enhances porcine
299 preimplantation embryo development in vitro. Mol Cell Endocrinol 229, 141-147.

- 300 Cui, H., Cai, F., D. Belsham, D.D. 2006. Leptin signaling in neurotensin neurons involves
301 STAT, MAP kinases ERK1/2, and p38 through c-Fos and ATF1. *The FASEB J* 20,
302 2268-2276.
- 303 De Rensis, F., Gherpelli, M., Superchi, P., Kirkwood, R.N. 2005. Relationships between
304 backfat depth and plasma leptin during lactation and sow reproductive performance
305 after weaning. *Anim Reprod Sci* 90, 95-100.
- 306 Engblom, L., Lundeheim, N., Dalin, A.M., Andersson, K. 2007. Sow removal in Swedish
307 commercial herds. *Liv Sci* 106, 76-86.
- 308 Frühbeck, G. 2006. Intracellular signaling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393, 7-20.
- 309 Gregoraszczyk E.L., Ptak, A., Wojtowicz, A.K., Gorska, T., Nowak, K.W. 2004. Estrus cycle-
310 dependent action of leptin on basal and GH or IGF-I stimulated steroid secretion by
311 whole porcine follicles. *Endocr Regul* 38, 1, 15-21.
- 312 Gregoraszczyk, E., Ptak, A., Wojciechowicz, T., Nowak, K. 2007. Action of IGF-I on
313 expression of the long form of the leptin receptor (ObRb) in the prepubertal period and
314 throughout the estrous cycle in the mature pig ovary. *J Reprod Dev.* 53, 289-295.
- 315 Goudet, G., Belin, F., Bézard, J., Gérard, N. 1998. Maturation-promoting factor (MPF) and
316 mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence
317 for in vitro maturation in the mare. *Mol Hum Reprod* 4, 6, 563–570.
- 318 Hakansson, M.L., Meister, B. 1998. Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of
319 the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 68, 420-427.
- 320 Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., et al. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase
321 during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* 3, 265–271.
- 322 Inoue, M., Naito, K., Nakayama, T., Sato, E. 1998. Mitogen-activated protein kinase
323 translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in
324 porcine oocytes. *Biol Reprod* 58, 130–136.

- 325 Jin, Y.X., Cui, X.S., Han, Y.J., Kim, N.H. 2009. Leptin accelerates pronuclear formation
326 following intracytoplasmic sperm injection of porcine oocytes: possible role for MAP
327 kinase inactivation. *Anim Reprod Sci* 115, 137–148.
- 328 Kim, J., You, J., Hyun, S-H., Lee, G., Lim, J., Lee, E. 2010. Developmental competence of
329 morphologically poor oocytes in relation to follicular size and oocyte diameter in the
330 pig. *Mol Reprod Develop* 77, 330-339.
- 331 Lin, J., Barb, C.R., Kraeling, R.R., Rampacek, G.B. 2001. Developmental changes in the long
332 form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. *Biol*
333 *Reprod* 64, 1614-1618.
- 334 Liu, L., Ju, J.C., Yang, X. 1998. Differential inactivation of maturation-promoting factor and
335 mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine
336 oocytes. *Biol Reprod* 59, 537-545.
- 337 Lucia, T. Jr., Dial, G.D., Marsh W.E. 2000. Lifetime reproductive performance in female
338 swine having distinct reasons for removal. *Liv Prod Sci* 63, 213-222.
- 339 Lucia, T. Jr., Dial, G.D., Marsh, W.E. 1999. Estimation of lifetime productivity of female
340 swine. *J Amer Vet Med Assoc* 214, 1056-1059.
- 341 Mermillod, P.; Bies-Tran, R.; Uzbekova, S.; Thelie, A.; Traverso, J.M.; Perreau, C.; Papillier,
342 P.; Monget, P. 2008. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle?
343 *Reprod Dom Anim* 43, 393-400.
- 344 Ohashi, S., Naito, K., Sugiura, K., Iwamori, N., Goto, S., Naruoka, H., Tojo, H. 2003.
345 Analyses of mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine
346 oocytes. *Biol Reprod* 68, 604-609.
- 347 Oktem, O., Oktay, K. 2007. The role of extracellular matrix and activin-A in in vitro growth
348 and survival of murine preantral follicles. *Reprod Sci* 14, 358-366.

- 349 Pérez-Pérez, A., Maymó, J., Dueñas, J.L., Goberna, R., Calvo, J.C., Varone, C., Sánchez-
350 Margalet, V. 2008. Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of
351 MAPK pathway. *Arch Biochem Biophys* 447, 390-395.
- 352 Prazla, J., Gregoraszcuk, E.L., Kotwica, G., Stefanczyk-Krzymowska, S., Adam J. Zieciket,
353 Blitek, A., Ptak, A., Rak, A., Wójtowicz, A., Kamiński, T., Siawrys, G., Smolińska,
354 N., Franczak, A., Kurowicka, B., Oponowicz, A., Wąsowska, B., Chłopek, J.,
355 Kowalczyk, A.E., Kaczmarek, M.M., Wacławik, A. 2006. Mechanisms ensuring
356 optimal conditions of implantation and embryo development in the pig. *Reprod Biol* 6,
357 59-87.
- 358 Pawlak, P.; Renska, N.; Pers-Kamczyc, E., Warzych, E.; Lechniak, D.: 2011. The quality of
359 porcine oocytes is affected by sexual maturity of the donor gilt. *Reprod Biol* 11, 1-18.
- 360 Qian, H., Barb, C.R., Compton, M.M., Hausman GJ, Azain MJ, Kraeling RR, Baile CA.
361 1999. Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age,
362 weight, and estradiol in pigs. *Dom Anim Endocrinol*, 16, 135-143.
- 363 Ryan, N.K., Van Der Hoek, K.H., Robertson, S.A., Norman R.J. 2003. Leptin and leptin
364 receptor expression in the rat ovary. *Endocrinol* 144, 5006-5013.
- 365 Shin, H. J., Oh, J., Kang, S.M., Lee, J.H., Shin, M.J., Hwang, K.C., Jang, Y., Chung, J.H.
366 2005. Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat
367 vascular smooth muscle cells. *Biochem Bioph Res Co* 329, 18-24.
- 368 Smolinska, N., Siawirys, G., Kaminski, T., Przala, J. 2007. Leptin gene and protein
369 expression in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the
370 oestrus cycle of pigs. *J Physiol Pharmacol* 58, 563-581.
- 371 Statistix®, Statistix 9 analytical software. Tallahassee, FL, USA. 2008.

- 372 Summer, A., Saleri, R., Malacarne, M., Bussolati, S., Beretti, V., Sabbioni, A., Superchi, P.
373 2009. Leptin in sow: influence on the resumption of cycle activity after weaning and
374 on the piglet gain. Liv Sci 124, 107-111.
- 375 Su, Y., Denegre, J.M., Wigglesworth, K., Pendola, F.L., O'Brien, M.J., Eppig J.J. 2003.
376 Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus
377 cells is required for the maturation of the mouse oocyte–cumulus cell complex. Dev
378 Biol 263, 126-138.
- 379 Van den Brink, G.R, O'Toole, T., Hardwick, J.C., Van den Boogaardt, D.E., Versteeg, H.H.,
380 van Deventer, S.J., Peppelenbosch, M.P. 2000. Leptin signaling in human peripheral
381 blood molecular cells, activation of p38 and 42/44 mitogen-activated protein (MAP)
382 kinase and 70 S6 kinase. Mol Cell Biol Res Commun 4, 144-150.
- 383 Villa-Diaz, L.G., Miyano, T. Activation of p38 MAPK during porcine oocytes maturation.
384 (2004). Biol Reprod 71, 691-696.
- 385 Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. 1999. Mitogen-activated protein kinase:
386 conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev 79, 143-180.
- 387 Wu, J., Emery, B.R., Carrell D.T. 2001. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and
388 embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. Biol Reprod 64,
389 375-381.
- 390 Yu, F.Q., Han, C.S., Yang, W., Jin, X., Hu, Z.Y., Liu, Y.X. 2005. Activation of the p38
391 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in
392 granulosa cells differentially. J Endoc 186, 85–96.
- 393

394 Table 1: Intensity of immunolabeling for leptin (means of the mode observed values), ERK
 395 1/2 MAPK and p38 MAPK in the cytoplasm of oocytes from gilts and sows*

Marker	Gilts (Means $\pm$ SE)	Sows (Means $\pm$ SE)
Leptin	156.2 $\pm$ 3.8 ^a	128.1 $\pm$ 3.7 ^b
ERK 1/2 MAPK	181.0 $\pm$ 2.2 ^a	175.0 $\pm$ 1.2 ^b
p38 MAPK	148.4 $\pm$ 2.6 ^a	154.1 $\pm$ 3.1 ^b

396 ^{a,b} Means having distinct superscripts within line differ by at least $P \leq 0.05$.

397 *0: highest intensity; 255: no staining

398

399 Table 2: Intensity of leptin immunolabelling (means of the mode observed values) in the
 400 cytoplasm of oocytes from gilts and sows, included in follicles of distinct developmental
 401 stages*.

Follicles	Gilts (Means $\pm$ SE)	Sows (Means $\pm$ SE)
Primordial/primary (n=30)	162.1 $\pm$ 5.2 ^{aA}	124.7 $\pm$ 4,5 ^{Ba}
Secondary (n=20)	146.9 $\pm$ 6.7 ^{aA}	117.3 $\pm$ 6,5 ^{Ba}
Tertiary (n=10)	160.0 $\pm$ 5.0 ^{aA}	157.1 $\pm$ 5,0 ^{aB}

402 ^{A,B} Means having distinct superscripts within columns differ by at least $P < 0.05$

403 ^{a,b} Means having distinct superscripts within rows differ by at least $P < 0.05$

404 *0: highest intensity; 255: no staining

405 Table 3: Intensity of activated ERK 1/2 MAPK immunolabeling (means of the mode observed
 406 values) in the cytoplasm of oocytes from gilts and sows, included in follicles of distinct
 407 developmental stages*

Follicles	Gilts (Means $\pm$ SE)	Sows (Means $\pm$ SE)
Primordial/primary (n=30)	179.0 $\pm$ 3.3 ^{aA}	174.3 $\pm$ 1.5 ^{Aa}
Secondary (n=20)	182.6 $\pm$ 1.5 ^{aA}	177.5 $\pm$ 1.8 ^{Aa}
Tertiary (n=10)	184.1 $\pm$ 2.8 ^{aA}	172.8 $\pm$ 3.8 ^{Ba}

408 ^{A,B} Means having distinct superscripts within columns differ by at least $P < 0.05$

409 ^{a,b} Means having distinct superscripts within rows differ by at least $P < 0.05$

410 *0: highest intensity; 255: no staining

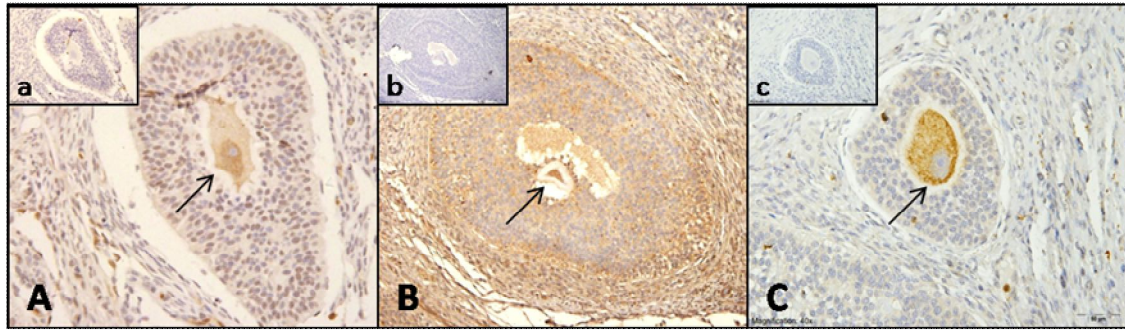
411 Table 4: Intensity of activated p38 MAPK immunolabeling (means of the mode observed
 412 values) in the cytoplasm of oocytes from gilts and sows, included in follicles of distinct
 413 developmental stages*

Follicles	Gilts (Means $\pm$ SE)	Sows (Means $\pm$ SE)
Primordial/primary (n=30)	148.2 $\pm$ 3.3 ^{aA}	145.0 $\pm$ 5.1 ^{aA}
Secondary (n=20)	149.0 $\pm$ 4.8 ^{aA}	163.3 $\pm$ 2.9 ^{bB}
Tertiary (n=10)	147.4 $\pm$ 7.8 ^{aA}	162.7 $\pm$ 6.1 ^{aB}

414 ^{A,B} Means having distinct superscripts within columns differ by at least $P < 0.05$

415 ^{a,b} Means having distinct superscripts within rows differ by at least $P < 0.05$

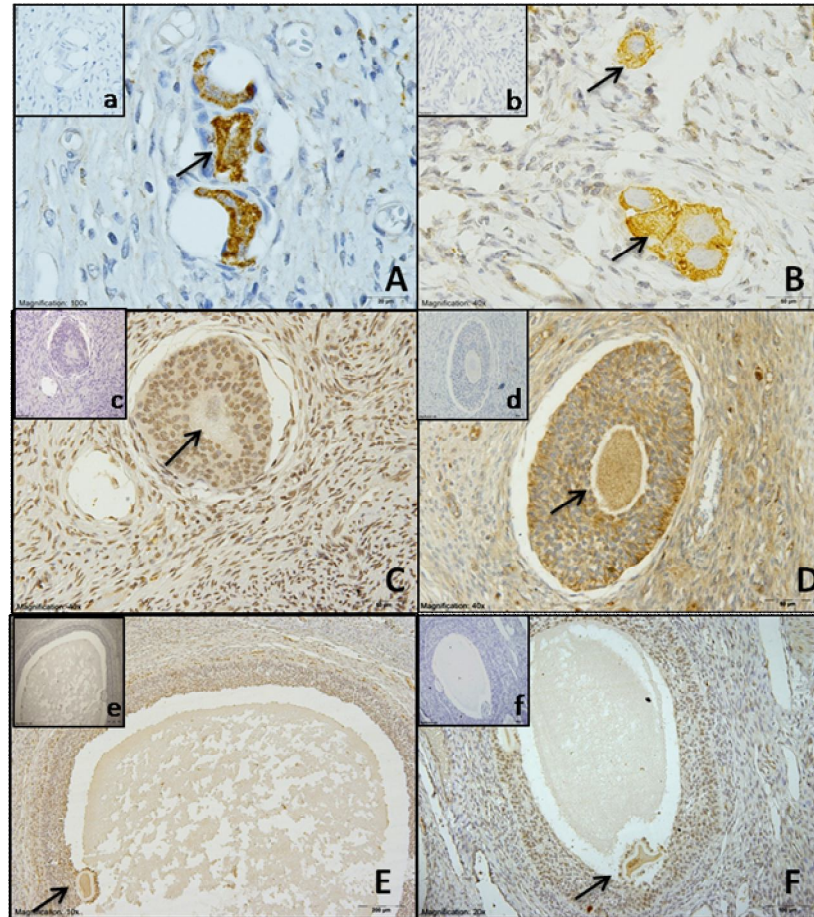
416 *0: highest intensity; 255: no staining



417

418 Figure 1: Immunolabeling (arrows) for activated ERK 1/2 MAPK (A) and p38 MAPK (B) in
419 oocyte cytoplasm and nucleus and for leptin (C) only in oocyte cytoplasm. Figures a, b and c -
420 Negative control of the A, B and C figures, respectively.

421 (Photomicrography at 20 x).



422

423 Figure 2: Immunolabeling (arrows) for leptin, p38 MAPK and ERK 1/2 MAPK protein in
 424 oocytes of sows and gilts. (Photomicrography at 100 x; 40 x; and 20 x, respectively).

425 (A) Oocyte from primordial/primary sows' follicles showing more intense leptin
 426 immunolabeling in the cytoplasm than oocytes in primordial/primary gilts' follicles (B).

427 (C) Oocyte from secondary sows' follicles showing less intense immunolabeling in the
 428 cytoplasm for activated p38 MAPK than oocyte in secondary gilts' follicles (D).

429 (E) Oocyte from tertiary sows' follicles having more intense immunolabeling in the
 430 cytoplasm for activated ERK 1/2 MAPK than oocyte in tertiary gilts' follicles (F).

431 Figures a, b, c, d, e, f – Negative control of the A, B, C, D, E and F figures, respectively.

3.0 ARTIGO 2

(Formatado conforme as normas da Revista Brasileira de Zootecnia)

LEPTINA E SEU RECEPTOR (OBR-b) NO HIPOTÁLAMO, ÚTERO E OVÁRIOS DE PORCAS PÚBERES: CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS E REPRODUTIVAS

**Leptina e seu receptor (OBR-b) no hipotálamo, útero e ovários de porcas púberes:
correlação com características produtivas e reprodutivas**

Fabiana Moreira¹, Rafael Gianella Mondadori², Antônio Sérgio Varella Júnior³, Stella Meneghello Gheller², Luzia Hallal Duval¹, Josiane Bonel Raposo¹, Thomaz Lucia Jr.¹

¹Departamento de Patologia Animal - UFPel - fabimorvet@gmail.com

²Instituto de Biologia - UFPel

³Instituto de Ciências Biológicas - FURG

RESUMO: A leptina uma proteína produzida pelos adipócitos, atua sobre o peso corporal e gasto energético, com reflexos sobre as funções reprodutivas através da ativação de seus receptores presentes nos órgãos reprodutivos, hipotálamo e hipófise. A combinação dos registros de produção com técnicas de diagnóstico mais precisas, permitem agregar informações sobre o estado hormonal e metabólico das fêmeas descartadas. Este estudo objetivou avaliar o perfil da leptina e do seu receptor (OBR-b) no hipotálamo, útero e ovários comparando aos registros de produtividade, causas de descarte e status ovarianos de porcas púberes. Amostras de útero, ovários e hipotálamo de 28 porcas foram coletadas em frigorífico. As variáveis categóricas causa de descarte; número total de leitões nascidos/fêmea (TN); ordem de parto (OP); e status ovariano foram relacionadas às variáveis respostas de imunomarcção para leptina e seu receptor. Para a técnica de imuno-histoquímica foram utilizados os anticorpos policlonais anti-leptina e seu receptor. As imagens foram analisadas com auxílio do software Image J[®]. A imunomarcção para a leptina no hipotálamo e no útero foi mais intensa nas porcas descartadas por problemas reprodutivos ($p < 0,05$). Para as três estruturas analisadas a imunomarcção da leptina e do OBR-b das porcas que estavam na fase lútea ou fase folicular apresentaram intensidade mais acentuada que naquelas com cistos ovarianos. A imunomarcção para a leptina foi mais acentuada no hipotálamo e útero das porcas do grupo OP2 ($p < 0,05$). E a presença do OBR-b foi mais marcante nos oócitos e útero das porcas do grupo OP2. Os resultados demonstraram que fêmeas cíclicas com ordem de parto de 2-4 partos apresentam imunomarcção mais intensa para leptina no hipotálamo e útero e de OBR-b nos oócitos e útero.

Palavras-chave: Descarte, imuno-histoquímica, ordem de parto, ciclo estral

ABSTRACT: Leptin is a protein produced by adipocytes that acts on body weight and energy expenditure that has repercussions on the reproductive function through the expression of its receptors in reproductive organs. The combination of database information with precise diagnostic techniques allows value to data collected from female reproductive tracts in slaughterhouses to provide information about their reproductive and metabolic status. This study evaluated the profile of leptin and its receptor (OBR-b) in the hypothalamus, uterus and ovaries and compared their expression across data about performance, ovarian status and culling reason for pubertal sows. Samples of the uterus, ovaries, and hypothalamus of 28 sows were collected at slaughterhouse. The categorical variables used for comparisons were: culling reason, total number of piglets/female, parity (PO) ovarian status and backfat thickness (BF). Those variables were correlated with the immunolabeling for leptin and its receptor. Immunohistochemistry was performed with polyclonal antibody anti-leptin (Ob) and its receptor (OBR-b). The images were analyzed using the Image J[®] software. Immunolabeling for leptin in the hypothalamus was more intense for sows culled by reproductive problems ($p < 0.05$). For the three studied structures, immunolabeling for leptin and OBR-b for sows in the luteal or follicular phase showed increased intensity than for those who had cystic ovaries. The immunolabeling for leptin was more pronounced in the hypothalamus and uterus of PO2 group sows ($p < 0.05$). However, for oocytes there was no difference between the PO2. The presence of OBR-b was more pronounced in oocytes and uterus of the sows in PO2 group. The results showed that with cyclic females, with 2-4 parities have more intense immunolabeling for leptin in the hypothalamus and uterus and OBR-b in the oocyte and uterus.

Key-words: Culling, immunohistochemistry, parity order, estrous cycle

2.1 INTRODUÇÃO

A leptina (Ob) é uma proteína com peso molecular de 16-kDa, produzida primariamente pelos adipócitos, que atua sobre o peso corporal e gasto energético (Zhang et al., 1994; Barb & Kraeling, 2004). Desempenha um papel fisiológico importante na sinalização do status nutricional sobre o eixo reprodutivo central dos mamíferos (Zieba et al., 2005), e parece ser um fator permissivo para a ativação desse eixo em suínos (Barb, et al., 2001), e até mesmo como gatilho para o início da puberdade (Zieba et al., 2005). Em porcas, estudos já evidenciaram forte relação entre condição corporal e reprodução (Hùlten et al., 2002;), dessa forma, a leptina além de controlar o apetite e o peso corporal (Zhang et al., 1994) apresenta também reflexos sobre a função reprodutiva (De Rensis, et al., 2005). Ainda, a leptina é expressa no endométrio e miométrio (Smolinska et al, 2007) e nos ovários, aumentando progressivamente em folículos em desenvolvimento e atingindo o pico nos corpos lúteos recém-formados (Gregoraszczyk et al., 2007).

O receptor da leptina (Ob-R), produto do gene da diabetes (*db*), é um membro da classe de receptores de citocinas I com seis isoformas conhecidas, e a forma longa do receptor, OBR-b, um receptor transmembrana, é capaz de efetivar transdução de sinal para as células específicas (Hakansson & Meister, 1998). Tem sido encontrado em muitos órgãos, incluindo hipotálamo de leitoas pré-púberes, cíclicas, porcas gestantes e fetos onde também há expressão da leptina (Lin, et al., 2001), além dos ovários (Lee, et al., 1996).

A leptina pode ser responsável por fornecer informações ao cérebro sobre níveis críticos de gordura corporal necessária para a liberação de LH e ativação do eixo hipolâmico-hipofisiário-gonadal, e em geral a resistência a leptina tem sido relatada como desordens reprodutivas (Metwally et al., 2008).

89 A produtividade e os custos de produção são constantemente afetados pelas causas
90 de descarte (Diehl *et al.* 2003; Lucia, 2004, 2007), que costumam atingir 50% anualmente
91 (PigCHAMP®, 2009; AGRINESS®, 2010). Em função destas altas taxas de remoção, grande
92 parte do plantel é composta por fêmeas com baixo número de partos (Lucia *et al.*, 2000;
93 Rodriguez-Zas *et al.*, 2003), com grande predisposição a apresentarem falhas reprodutivas,
94 resultando em redução da eficiência reprodutiva indicada como número de leitões
95 desmamados/fêmea/ano.

96 A coleta do aparelho reprodutivo das fêmeas no frigorífico pode ser uma fonte de
97 informação sobre algumas falhas reprodutivas, podendo auxiliar no monitoramento da política
98 de descartes adotada pela granja (Karveliëne *et al.*, 2007). Devido a imprecisão destas
99 informações, seria mais apropriado que a avaliação destes órgãos fosse realizada
100 independente da razão atribuída ao seu descarte (Moreira *et al.*, 2006; Ulguim, 2011). Como
101 estas análises normalmente se restringem ao exame macroscópico, sua combinação com
102 técnicas de diagnóstico mais precisas, permitem agregar informações sobre o estado hormonal
103 e metabólico das fêmeas descartadas (Lucia *et al.*, 2011).

104 Um indicador metabólico relevante é a espessura de toucinho (ET), que de acordo
105 com De Rensis *et al.*, (2005) está associada positivamente com as concentrações plasmáticas
106 de leptina. Em fêmeas desmamadas, o consumo reduzido de ração na lactação se traduz em
107 redução na ET e condição corporal insatisfatória, podendo ser associado com incremento nos
108 descartes (Engblom *et al.* 2007).

109 Este estudo objetivou avaliar o perfil da leptina e do seu receptor (OBR-b) no
110 hipotálamo, útero e ovários traçando uma comparação entre os registros de produtividade,
111 causa de descarte e status ovarianos de porcas púberes.

112

113

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais/Amostras

Amostras de órgãos reprodutivos e cérebro de 28 porcas de descarte, provenientes de cinco granjas com aproximadamente 2.000 matrizes suínas cada, com a mesma base genética foram coletadas no frigorífico da Brasil Foods S.A, localizado em Rio Verde-GO, de abril a junho de 2009. A espessura de toucinho (ET) foi mensurada com paquímetro na meia carcaça entre a 12^o e 13^o vértebra lombar. O material coletado foi identificado individualmente por animal e simultaneamente foi realizada a avaliação macroscópica dos órgãos genitais e o conjunto de informações anotadas em fichas específicas. Fragmentos de ovário e útero de cada amostra foram colhidos e acondicionados em solução de bouin. Os fragmentos de hipotálamo foram colhidos após o corte transversal da cabeça e acondicionados em formol a 10%. As amostras foram encaminhadas para processamento em laboratório e submetidas a desidratação, diafanização e inclusão em parafina.

Classificação das Variáveis Categóricas

As variáveis como causas de descarte, total de leitões nascidos/fêmeas/ano e ordem de parto foram obtidas a partir de registros individuais através do banco de dados PigCHAMP[®]. E, visando avaliar a correlação com as variáveis respostas analisadas, imunomarcção para leptina e para seu receptor, as variáveis (1) causa de descarte; (2) número total de leitões nascidos/fêmea (TN); (3) ordem de parto (OP); (4) status ovariano; e (5) espessura de toucinho (ET), foram divididas em categorias conforme descrito abaixo.

As causas de descarte foram classificadas em 5 grupos: problema reprodutivo (anestro, aborto e repetição de cio) – 12 fêmeas; baixa produtividade – 4 fêmeas; idade avançada – 4 fêmeas; metrite – 4 fêmeas; e problema locomotor – 4 fêmeas. O TN foi distribuído em 6 grupos: Grupo TN0 - nenhum leitão nascido; Grupo TN1 - de 7 a 9,0 TN;

Grupo TN2 - de 10 a 11,2 TN; Grupo TN3 - de 11,3 a 13,0 TN; Grupo TN4 - de 13,1 a 14 TN; e Grupo TN5 - mais de 14 TN.

A partir da avaliação macroscópica dos ovários coletados as porcas foram distribuídas em 3 grupos: Grupo OV1 – Fase lútea (ovários com predomínio de corpos lúteos); Grupo OV2 – Fase Folicular (ovários com predomínio de folículos); Grupo OV3 – Presença de cistos ovarianos (Moreira et al., 2006). A ordem de parição (OP) foi distribuída em 4 grupos: Grupo OP0 – ordem de parto 0 – 05 fêmeas; Grupo OP1 – ordem de parto 1 – 02 fêmeas; Grupo OP2 – ordem de parto de 2-4 – 09 fêmeas; Grupo OP3 – ordem de parto > 4 – 12 fêmeas. A espessura de toucinho (ET) foi classificada em 3 grupos: Grupo ET1 – ET de 7-16mm; Grupo ET2 – ET de 17-22mm; e Grupo ET3 – ET $\geq$ 23mm.

149

150 ***Imuno-histoquímica (IHQ)***

A técnica de IHQ foi realizada em cortes de 3 μ m obtidos em micrótomo automático e distendidos em lâminas impregnadas com organossilano a 3% (Sigma[®], USA). Para a realização da técnica utilizou-se anticorpos primários policlonais (A-20, Santa Cruz Biotechnology, C.A. USA): anticorpo anti-leptina Ob (A-20, sc-842 - rabbit) na diluição de 1:2000 e o anticorpo anti-receptor da leptina OB-Rb (pAb M-18 - goat), em diluição de 1:100. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H₂O₂:metanol (70:30) e a recuperação antigênica em solução de citrato pH 6,0, em calor úmido sob pressão. O bloqueio da marcação inespecífica foi realizado com albumina sérica bovina (BSA) à 3% para a análise da leptina e com BSA à 10% para análise do receptor da leptina (Ye, 2009). Após a adição dos anticorpos secundários, as lâminas foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C. Logo após, as lâminas para análise da leptina foram instiladas com o sistema streptavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB - Dako K0690 Corporation, CA, USA) e as para análise de receptor de leptina foram instiladas com kit Histofine[®] (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan). A incubação

foi realizada a temperatura ambiente em câmara úmida tampada. 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 contracorados com Hematoxilina de Mayer filtrada por 1 minuto e as lamínulas foram fixadas com resina sintética (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA).

169

Classificação e análise das estruturas selecionadas

Conforme os sítios de atuação da leptina e seu receptor já descritos na literatura (Smolinska et al., 2007; Lin, et al., 2001), nos cortes de hipotálamo foram analisados os neurônios; nos cortes de útero as glândulas endometriais e nas lâminas de ovário, foram analisados os citoplasmas dos oócitos.

As imagens analisadas foram capturadas por câmara digital (Olympus DP72) acoplada a microscópico de campo claro (Olympus BX 51, Tokyo, Japan) utilizando as objetivas 10X (lâminas de úteros) e 40X (lâminas de hipotálamo e ovários). Foram capturados 5 campos contendo 10 estruturas para o hipotálamo e útero, e para os ovários foram obtidas imagens do maior número possível de oócitos. No total, foram avaliados cerca de 1100 neurônios, 1400 glândulas endometriais e 478 oócitos. As análises foram realizadas a partir do software Image J® utilizando-se o aplicativo 16-bit Histograma para a obtenção do valor de moda para cada área selecionada. Este aplicativo utiliza uma escala de 0 a 255, onde 0 indica maior intensidade de marcação e 255 indica ausência de marcação.

184

Análise Estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e os valores das modas, de cada uma das análises das estruturas classificadas, foram submetidos ao teste de ANOVA e realizado comparação de médias através do teste de Tukey pelo software

189 *Statistix*® (2008). Para todas as análises estatísticas diferenças com $p \leq 0,05$ foram
190 consideradas significativas.

191

192 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

193

194 Relacionando as variáveis, ordem de parto e causa de descarte foi possível observar
195 que 41,9% das fêmeas em OP0 foram descartadas por problemas reprodutivos, 51% das
196 porcas em OP1 foram descartadas por baixa produção de leitões, 49,8% das fêmeas que
197 estavam em OP2 foram removidas da granja por problemas de metrite, e como o esperado,
198 todas as porcas (100%) das que se encontravam no grupo OP3, foram descartadas por idade
199 avançada. As falhas reprodutivas, como anestro, e repetição de cio são comuns razões para o
200 descarte em fêmeas com baixa condição corporal (Lucia et al, 2000; Engblom et al, 2007).
201 Para Knauer et al., (2007) ovários acíclicos (anestro) são as causas mais comuns referentes a
202 problemas reprodutivos observados em fêmeas destinadas ao abate.

203 A avaliação macroscópica dos ovários mostrou que 23 fêmeas estavam ciclando, ou
204 seja, na fase lútea ou na fase folicular, independente da causa de descarte e apenas 5
205 apresentam cistos ovarianos. Relacionando a causa de descarte com o status ovariano foi
206 possível observar que 49,3% das fêmeas descartadas por problemas reprodutivos estavam na
207 fase luteal, assim como, 51% das fêmeas descartadas baixa produtividade; 75,1% das
208 descartadas por idade avançada e 75,2% das descartadas por baixa produtividade. A
209 predominância de animais na fase folicular (74,6%) foi observada quando esses foram
210 descartados por metrite. As fêmeas com cisto se distribuíram similarmente entre as causas de
211 descarte. De acordo com Moreira et al., (2006), mais de 90% das fêmeas envolvidas em seu
212 estudo possuíam ovários cíclicos independentemente das causas de descarte.

213 A frequência do TN e OP, de acordo com as causas de descarte, indicou que 41,9%
214 das fêmeas com TN0 foram descartadas por problemas reprodutivos; e 51% das porcas com
215 TN1 o descarte foi devido a baixa produção de leitão e faziam parte do grupo OP2. Para
216 aquelas do grupo TN2 foram descartadas na mesma frequência, 24,9%, por baixa produção e
217 idade avançada, e 75% pertenciam ao grupo OP2. No grupo TN3 75% das fêmeas foram
218 descartadas por idade avançada e 100% faziam parte da OP3. Das fêmeas do grupo TN4
219 (25,7%) e do grupo TN5 (74,3%) foram descartadas por problemas locomotores, 74,6%
220 faziam parte do grupo OP1 e 50% do OP2, respectivamente.

221 A ET foi avaliada em 13 porcas e independente das causas de descarte a maior parte
222 das fêmeas apresentou ET entre 17-22mm. Os ovários estavam apresentando folículos em
223 mais de 75% das fêmeas com ET1 – 2, e 75% das que possuíam cisto ovariano apresentaram
224 $ET \geq 23\text{mm}$. As fêmeas que foram descartadas por problemas locomotores apresentavam ET
225 $< 17\text{mm}$ (50%) ou $> 23\text{mm}$ (50%), ou seja, , duas categorias não recomendadas para porcas
226 em produção (Silveira et al. 1998).

227 Na Tabela 1 pode ser observado a imunomarcação no citoplasma dos neurônios do
228 hipotálamo para leptina (HP Lep), dos oócitos dos ovários (OT Lep) e das glândulas
229 endometriais do útero (UT Lep). Na Tabela 2 pode ser observado a imunomarcação no
230 citoplasma dos neurônios do hipotálamo para leptina (HP Rep), dos oócitos dos ovários (OT
231 Rep) e das glândulas endometriais do útero (UT Rep).

232 A HP Lep foi mais intensa nas porcas descartadas por problemas reprodutivos e
233 idade avançada ($p < 0,05$). Enquanto que a UT Lep foi mais intensa nas porcas descartadas por
234 problemas reprodutivos, seguida dos animais descartados por problema locomotores e idade
235 avançada que não diferiram entre si e a imunomarcação mais fraca foi para os animais
236 descartados por baixa produtividade e metrite ($p < 0,05$). No entanto, os OT Lep mais
237 intensamente marcados pertenciam às fêmeas descartadas por metrite ($p < 0,05$) (Tab.1), e os

238 mais fracamente marcados pertenciam às porcas descartadas por problemas locomotores e
239 idade avançada. Não houve diferença na imunomarcção entre as fêmeas removidas por
240 problema reprodutivo e baixa produção quando comparadas com os animais das demais
241 causas de descarte.

242 A presença marcante de leptina no hipotálamo e útero pode ser explicada devido ao
243 fato de não ter sido observada patologia ao exame macroscópico nos úteros e ovários, assim
244 de acordo com Czaja et al., (2002), descreve que uma forte imunorreatividade da leptina e do
245 OBR-b foram encontradas em áreas específicas do hipotálamo de porcas e revelaram que
246 projeções dos neurônios com OBR-b, estabelecem uma ligação entre o hipotálamo e outras
247 regiões do cérebro envolvidas na saciedade e função reprodutiva. Além do que ao longo do
248 desenvolvimento puberal fisiológico as fêmeas suínas tem concentrações séricas elevadas de
249 leptina (Quian et al., 1999).

250 A imunomarcção para HP Lep mais baixa foi observada nos animais descartados
251 por problemas locomotores ($p < 0,05$) (Tab.1). O mesmo pode ser observado para o HP Rec
252 (Tab. 2), e para que foi semelhante para todos os grupos, exceto para as porcas descartadas
253 por problemas locomotores que apresentou intensidade inferior aos demais ($p < 0,05$). Neste
254 contexto pode se considerar o escore corporal destas matrizes, ou seja, de acordo com
255 (Knauer et al., 2007) as lesões de cascos aumentam conforme o a diminuição do peso ou
256 gordura corporal, tendo pouca relação com ovários acíclicos.

257 Portanto, estas lesões podem estar associadas a uma deficiência dietética, por
258 exemplo, biotina, atuando como impacto sobre a integridade do casco resultante de um escore
259 corporal baixo. Portanto não se esperaria presença marcante da leptina e seu receptor no
260 hipotálamo em fêmeas sinalizando um gasto de energia e conseqüente redução do apetite.
261 Ainda, é importante salientar que medidas de ET entre 10,5 e 17,3mm ao desmame foi

considerada aceitável para se recuperar uma baixa condição corporal adquirida nesta fase (Kongsted & Hermansen, 2009).

264

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

Causa de Descarte	HP Lep (n=1100)	OT Lep (n=478)	UT Lep (n=1400)
Problema Reprodutivo	179,6 ± 1,2 ^a	70,7 ± 3,3 ^{ab}	210,7 ± 1,1 ^a
Baixa Produtividade	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.

271

Tabela 2. Intensidade da imunomarcacão* para o receptor da leptina (valores das médias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Rec), dos oócitos dos ovários (OT Rec) e das glândulas endometriais do útero (UT Rec) de acordo com a causa de descarte de porcas.

Causa de Descarte	HP Rec	OT Rec	UT Rec
Problema Reprodutivo	180,4 ± 2,1 ^a	165,1 ± 2,9 ^a	209,1 ± 0,8 ^a
Baixa Produtividade	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 Locomotores	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.

A avaliação conforme o status ovariano dos animais estão demonstradas nas Tabelas 3 e 4). Para HP Lep do HP Rec as imunomarcações foram mais intensas em animais sem patologia ovariana, ou seja que possuíam ovários cíclicos ($p < 0,05$). Tanto a expressão da leptina como do OBR-b no hipotálamo foram encontradas durante a fase luteal do ciclo estral e durante a prenhez de fêmeas suínas (Siawrys et al., 2009).

No entanto, neste estudo não foi encontrada diferença significativa na intensidade de imunomarcação para leptina e para o OBR-b dos neurônios e dos oócitos das porcas na fase lútea e folicular do ciclo estral (Tab. 3 e 4, respectivamente). O fato por ser explicado por serem porcas de descarte com condição corporal baixa, já que as concentrações de leptina são correlacionadas positivamente com gordura corporal (Engblom *et al.* 2007). Além de estar bem estabelecido que a reprodução é muito sensível ao estado nutricional e estado metabólico, em particular ao balanço energético, o qual é um potente regulador da leptina e expressão gênica em porcas (Supurlock et al., 1998; Barb et al., 2001).

Tabela 3. Intensidade da imunomarcação* para leptina (valores das médias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Lep), nos oócitos dos ovários (OT Lep) e nas glândulas endometriais do útero (UT Lep) de acordo com o status ovariano de porcas.

Status ovariano	HP Lep (n=1100)	OT Lep (n=478)	UT Lep (n=1400)
Fase Lútea	183,9 $\pm$ 0,9 ^a	75,5 $\pm$ 2,2 ^a	223,2 $\pm$ 0,6 ^b
Fase Folicular	181,1 $\pm$ 1,4 ^a	68,8 $\pm$ 1,8 ^a	213,2 $\pm$ 1,0 ^a
Cisto Ovariano	191,5 $\pm$ 1,8 ^b	79,2 $\pm$ 4,6 ^b	226,7 $\pm$ 1,2 ^c

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

*0: marcação intensa; 255: sem marcação.

De acordo com OT Lep e OT Rec (Tab. 3 e 4, respectivamente) em relação ao status ovariano, as fêmeas com ovários nas fases lútea e folicular apresentaram imunomarcação mais

301 acentuada que naquelas que apresentaram cistos ovarianos ($p<0,05$). O mesmo ocorreu com a
302 marcação para UT Lep (Tab. 3). A imunomarcação no UT Rec foi mais intensa quando os
303 ovários dos animais estavam na fase lútea ($p<0,05$) em relação a fase folicular, porém ambos
304 não diferiram do UT Rec dos ovários com cistos (Tab. 4).

305 De acordo com os resultados descritos acima as três estruturas estudadas a
306 imunomarcação da leptina e do OBR-b das porcas que estavam ciclando apresentaram
307 intensidade mais acentuada que naquelas que apresentavam cistos ovarianos. Os oócitos de
308 suínos expressam a leptina e o OBR-b independente do tamanho dos folículos e da maturação
309 dos oócitos durante a fase folicular do ciclo estral (Graig et al., 2004), e durante a fase luteal a
310 leptina se restringe ao estágio de formação do corpo lúteo, enquanto a expressão do OBR-b
311 foi detectada 12 horas após a luteinização *in vitro* (Gregoraszczyk et al., 2007). A presença
312 de cistos ovarianos pode afetar o desempenho reprodutivo das porcas em produção (Castagna
313 et al., 2004) o que vem de encontro com os achados deste estudo pela marcação fraca de
314 leptina e de OBR-b nos oócitos das fêmeas que apresentaram cistos ovarianos.

315 Por outro lado, Britt et al., (1999) não observaram diferenças nas concentrações
316 séricas de progesterona, estradiol, LH e cortisol entre porcas no diestro daquelas com a
317 presença de cistos. Sob este contexto as concentrações de leptina também podem não estar
318 alteradas, mesmo apresentando baixa intensidade nos tecidos analisados destas fêmeas com
319 ovários contendo cistos.

Tabela 4. Intensidade da imunomarcacão * para o receptor da leptina (valores das médias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Rec), dos oócitos dos ovários (OT Rec) e das glândulas endometriais do útero (UT Rec) de acordo com status ovariano de porcas.

Status ovarian	HP Rec	OT Rec	UT Rec
Fase Lútea	179,6 $\pm$ 1,6 ^a	167,7 $\pm$ 2,1 ^a	218,9 $\pm$ 0,6 ^a
Fase Folicular	176,6 $\pm$ 2,5 ^a	164,2 $\pm$ 3,2 ^a	222,3 $\pm$ 1,0 ^b
Cisto Ovariano	189,8 $\pm$ 3,0 ^b	170,0 $\pm$ 4,1 ^b	221,2 $\pm$ 1,2 ^{ab}

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

*0: marcação intensa; 255: sem marcação.

A tabela 5 mostra os resultados para HP Lep, OT Lep e UT Lep conforme a OP das porcas. HP Lep foi mais intensa no grupo OP2, seguida da OP0 que diferiu do grupo OP3 que apresentou a marcação mais fraca, porém OP0 e OP1 não diferiram de OP3. Os resultados para OT Lep não diferiram entre si em nenhum dos grupos conforme a ordem de parto. A Tabela 9 mostra que a imunomarcacão para UT Lep foi mais acentuada na OP2 que nas demais (p<0,05), exceto para a OP1, que não diferiu da OP3. No entanto, o UT Lep das fêmeas OP0 obteve a marcação mais fraca e foi diferente das demais (p<0,05).

Na tabela 6 o HP Rec apresentou maior intensidade no grupo OP0, seguido do OP3 (p<0,05). Os grupos OP1 e OP2 apresentaram a menor intensidade e não diferiram entre si (p>0,05). No entanto, ainda  possível observar que para OT Rec foi marcado mais intensamente para porcas do grupo OP2 (p<0,05), sendo semelhante a OP3, que por sua vez foi semelhante aos animais de OP0 e estes as fêmeas de OP1 que apresentaram imunomarcacão menos intensa. Para o UT Rec o mesmo pode ser observado quando o marcador foi o receptor em relação a imunomarcacão da leptina, o qual se apresentou de forma mais fraca das porcas do grupo OP0 (p<0,05), sendo que os demais grupos não diferiram entre si.

Tabela 5. Intensidade da imunomarcacão* para leptina (valores das médias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Lep), nos oócitos dos ovários (OT Lep) e nas glândulas endometriais do útero (UT Lep) de acordo com a ordem de parto de porcas.

Grupo	HP Lep (n=1100)	OT Lep (n=1100)	UT Lep (n=1400)
OP0	184,0 ± 1,9 ^b	75,1 ± 5,1 ^a	226,2 ± 1,3 ^c
OP1	192,5 ± 2,5 ^c	75,7 ± 7,3 ^a	220,3 ± 1,7 ^{ab}
OP2	177,5 ± 1,2 ^a	74,1 ± 3,4 ^a	216,3 ± 0,8 ^a
OP3	187,9 ± 0,9 ^{bc}	73,1 ± 2,5 ^a	221,3 ± 0,6 ^b

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

*0: marcação intensa; 255: sem marcação.

OP0 - ordem de parto 0; OP1- ordem de parto 1; OP2 - ordem de parto 2-4; OP4- ordem de parto>4.

351

Tabela 6. Intensidade da imunomarcacão* para o receptor da leptina (valores das médias das modas observadas) no citoplasma dos neurônios do hipotálamo (HP Rec), dos oócitos dos ovários (OT Rec) e das glândulas endometriais do útero (UT Rec) de acordo com a ordem de parto de porcas.

Grupo	HP Lep	OT Rec	UT Rec
OP0	157,2 ± 3,2 ^a	167,6 ± 4,3 ^{ab}	230,5 ± 1,3 ^b
OP1	199,7 ± 4,4 ^c	186,1 ± 5,7 ^c	218,8 ± 1,7 ^a
OP2	191,3 ± 2,1 ^c	155,8 ± 2,8 ^b	216,3 ± 0,8 ^a
OP3	187,9 ± 0,9 ^{bc}	159,8 ± 2,2 ^{ab}	217,6 ± 0,6 ^a

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

*0: marcação intensa; 255: sem marcação.

OP0 - ordem de parto 0; OP1- ordem de parto 1; OP2 - ordem de parto 2-4; OP4- ordem de parto>4.

360

Em relação a ordem de parto (OP) foi possível observar que a imunomarcacão para a leptina estava mais acentuada no hipotálamo e útero daquelas porcas do grupo OP2, ou seja,

363 que haviam apresentado OP 2-4 partos. Porém, para a marcação da leptina dos oócitos não
364 houve diferença entre as OP. E a presença do OBR-b foi mais marcante nos oócitos e útero
365 das porcas do grupo OP2. Reforçando estes achados a presença da leptina e do OBR-b no
366 hipotálamo, hipófise (Lin et al., 2001), útero e ovários (Smolinska et al., 2007), a secreção de
367 LH induzida pela leptina a partir de células hipofisiárias e a liberação de GnRH hipotalâmico
368 em tecidos *in vitro*, comprovam sua ação e do seu receptor sobre o eixo reprodutivo
369 hipotalâmico-hipofisiário (Summer et al., 2009).

370 Conforme observado neste estudo o grupo OP2 por compor fêmeas com, 2, 3 e 4
371 partos, podem estar apresentando níveis de leptina progressivos relacionados a maior
372 concentração de hormônios circulantes, associado a um maior número de leitões por parição,
373 que de acordo com Hoving et al., (2011) o esperado para fêmea suína em produção é que seu
374 desempenho reprodutivo aumente com o aumento do número de partições, atingindo o pico de
375 produção de leitões entre a OP 3-5. Ainda assim, a ocorrência da síndrome do segundo parto é
376 um fato importante apresentado pelas porcas em produção, o qual registra taxas de parição e
377 tamanho de leitegada geralmente menor que o primeiro parto (Saito et al., 2010). Em conjunto
378 com estas informações o TN encontrado para as fêmeas em OP2 foi observado distribuído na
379 maior parte das fêmeas com produção de 7 a 9,0 leitões e 13,1 a 14 leitões. Corroborando com
380 a literatura (Koketsu et al. 1999; Hoving et al., 2011) fêmeas na segunda parição
381 frequentemente produzem menos leitões, ou seja, abaixo do que se espera como alvo de
382 produção, porém, o pico de produção da maior parte do plantel encontra-se entre o terceiro e
383 quarto parto.

384 As fêmeas que faziam parte do grupo OP0 apresentaram fraca imonmarcação para a
385 leptina e para o OBR-b no útero e nos oócitos, porém a presença do OBR-b no hipotálamo foi
386 acentuada. Estas fêmeas são consideradas leitoas e apresentam o eixo reprodutivo e condição
387 corporal subdesenvolvida, dessa forma de acordo com Quian et al., (1999) a secreção e

expressão da leptina, são reguladas pelo peso, idade, secreção de estradiol no tecido adiposo. E em adição aos resultados encontrados no hipotálamo de suínos, a expressão da leptina e do OBR-b (Siawrys et al., 2009) foi alta durante o início e final da fase luteal e início dos estágios de prenhez, respectivamente, sendo sintetizados pelo hipotálamo, e por fim sugerem a participação da leptina na regulação de áreas hipotalâmicas, incluindo o controle da reprodução durante as fases do ciclo estral.

As associações mais consistentes são de que as concentrações séricas de leptina tanto em fêmeas suínas primíparas como múltiparas são correlacionadas positivamente com espessura de toucinho e níveis de energia consumidos durante a gestação e consumo de ração (Estienne et al., 2003). Talvez este fato também possa ter relação com a imunomarcação mais intensa do OBR-b nos ovários e útero das fêmeas pertencentes aos grupo OP1 e OP2, e OP3, que fêmeas do grupo OP0 consideradas nulíparas, comportamento contrário da marcação do receptor no hipotálamo. Porém, é necessário mais estudos com associação de outras técnicas moleculares, a fim de comprovar a quantidade de leptina e seu receptor nos tecidos alvos, relacionando-os aos índices de produtividade, e em conjunto com análises metabólicas busca de encontrar associações com outros marcadores de ação local e central em fêmeas suínas.

2.5 CONCLUSÃO

A leptina e o OBR-b estavam presentes de forma mais intensa no hipotálamo e útero das fêmeas que foram descartadas por problemas reprodutivos, enquanto nos oócitos a imunomarcação para ambos foi semelhante nas porcas independente da causa de descarte. Fêmeas cíclicas apresentaram maior marcação para leptina e OBR-b no hipotálamo, útero e oócitos que fêmeas com cisto ovariano.

A presença mais intensa de leptina e o OBR-b no hipotálamo e útero esteve mais relacionada com fêmeas com 2 a 4 partos que com as demais ordens de parto, porém essa diferença não foi observada nos oócitos.

Fêmeas primíparas e multíparas apresentaram mais imunomarcção para OBR-b nos ovários e útero que fêmeas nulíparas, ao contrário do observado no hipotálamo.

2.6 REFERÊNCIAS

- AGRINESS® [2010]. Sistemas e tecnologias de informação Ltda. Disponível em: <www.agriness.com.br>. Acessado em: 04/04/2011.
- BARB, C.R.; HAUSMAN, G.J.; HOUSEKNECHT, K.L. Biology of leptin in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, p.297-317, 2001.
- 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.
- BARB, C.R.; HAUSMAN, G.J.; LENTS, C.A. Energy metabolism and leptin: effects on neuroendocrine regulation of reproduction in the gilt and sow. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.324-3, 2008.
- BRITT, J.H.; ALMOND, G.W.; FLOWERS, W.L. Diseases of the reproductive system. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 8 ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1999, p.883-911.
- CASTAGNA, C.D.; PEIXOTO, C.H.; BORTOLOZZO, F.P.; et al. Ovarian cysts and their consequences on the reproductive performance of swine herds. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.115-123, 2004.
- CRAIG, J.; ZHU, H.; DYCE, P.W.; et al. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Endocrinology**, v.145, n.11, p.5355-5363, 2004.
- 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.
- DE RENSIS, F.; GHERPELLI, M.; SUPERCHI, P.; et al. 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.; et al. Monitoramento ovariano ao abate de leitoas descartadas por anestro ou estro atípico. **Archives of Veterinary Science**, v.8, n.1, p.121-125, 2003.
- ENGBLOM, L.; LUNDEHEIM, N.; DALIN, A.M.; et al. Sow removal in Swedish commercial herds. **Livestock Science**, v.106, p.76-86, 2007.
- ESTIENNE, A.F.; HARPER, D.M.; KOZINK, J.W. Knight Serum and milk concentrations of leptin in gilts fed a high- or low-energy diet during gestation M.J. **Animal Reproduction Science**, v.75, p.95-105, 2003.
- GREGORASZCZUK, E.; PTAK, A.; WOJCIECHOWICZ, T.; et al. 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, n.2, p.289-95, 2007.
- HAKANSSON, M.L.; MEISTER, B. Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. **Neuroendocrinology**, v.68, p.420-7, 1998.
- HOVING, L.L.; SOEDE, N.M.; GRAAT, E.A.M.; et al. Reproductive performance of second parity sows: relations with subsequent reproduction. **Livestock Science**, v.140, p.124–130, 2011.
- 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.
- KOKETSU, Y.; TAKAHASHI, H.; AKACHI, K. Longevity, lifetime pig production and productivity, and age at first conception in a cohort of gilts observed over six years on commercial farms. **Journal Veterinary Medical Science**, v.61, n.9, p.1001-1005, 1999.
- KONGSTED, A.G.; HERMANSEN, J.E. Sow body condition at weaning and reproduction performance in organic piglet production. **Acta Agriculturae Scand Section A**, v.59, p.93-103, 2009.
- LEE, G.H.; PROENCA R.; MONTEZ J.M.; et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v.379, p.632–635, 1996.
- LIN, J.; BARB, C.R.; KRAELING, R.R.; et al. Developmental changes in the long form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. **Biology Reproduction**, v.64, p.1614-1618, 2001.
- LUCIA, T.; DIAL, G.; MARSH, W. Lifetime reproductive performance in female pigs having distinct reasons for removal. **Livestock Production Science**, v.63, p.213-222, 2000.
- LUCIA, T. Impacto de políticas de reposição e descarte sobre o desempenho durante a vida reprodutiva em matrizes suínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p.241-252, 2004.
- LUCIA, T. Políticas e novos conceitos de reposição e descarte de fêmeas suínas. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35, (Supl) p.1-8, 2007.
- 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.
- METWALLY, M.; LEDGER, W.L.; LI, T.C. Reproductive endocrinology and clinical aspects of obesity in women. *Annals of the New York Academy Science*, n.1127, 140–146. 2008
- MOREIRA, F.; PILATI, C.; REIS, R.N.; et al. Aspectos macroscópicos dos ovários de matrizes suínas, oriundas de granjas da microrregião de rio verde-go e descartadas para abate por motivos diversos. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.3, 47-52, 2006.
- PigCHAMP[®]. Benchmarking PigCHAMP[®] [2009]: Year end summary. Disponível em: <http://www.pigchamp.com/summary_archives.html>. Acessado em: 02/04/2011.
- QIAN, H.; BARB, C.R.; COMPTON, M.M.; et al. Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight, and estradiol in pigs. **Domestic Animal Endocrinology**, v.16, n.2, p.135-143, 1999.

- 505 RODRIGUEZ-ZAS, S.L.; SOUTHEY, B.R.; KNOX, R.V.; et al. Bioeconomic evaluation of
 506 sow longevity and profitability. **Journal of Animal Science**, v.81, n.12, 2915-2922,
 507 2003.
- 508 SAITO, H.; SASAKI, Y.; HOSHINO, Y.; et al. The occurrence of decreased numbers of pigs
 509 born alive in parity 2 sows does not negatively affect herd productivity in Japan.
 510 **Livestock Science**, v.128, p.189-192, 2010.
- 511 SIAWRYS, G.; KAMINSKI, T.; SMOLINSKA, N.; et al. Expression of leptin and long-form
 512 leptin-receptor proteins in porcine hypothalamus during oestrous cycle and pregnancy.
 513 **Reproduction Domestic Animal**, v.44, p.920-926, 2009.
- 514 SILVEIRA, P.R.S.; BORTOLOZZO, F.; WENTZ, I.; et al. Manejo da fêmea reprodutora In:
 515 SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; SESTI, L. A. **Suinocultura**
 516 **intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho**. 2ed. Brasília: EMBRAPA, Sistema
 517 de produção e informação – SPI, 1998, p.163-196.
- 518 SMOLINSKA, N.; SIAWRYS, G.; KAMINSKI, T.; et al. Leptin gene and protein expression
 519 in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the oestrus cycle of
 520 pigs. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 58, n.3, p.563-581, 2007.
- 521 STATISTIX®, STATISTIX 9 ANALYTICAL SOFTWARE. TALLAHASSEE, FL, USA.
 522 2008.
- 523 SUMMER, A.; SALERI, R.; MALACARNE, M.; et al. Leptin in sow: influence on the
 524 resumption of cycle activity after weaning and on the piglet gain. **Livestock Science**,
 525 v.124, n.1, p.107-111, 2009.
- 526 SPURLOCK, M.E.; FRANK, G.R.; CORNELIUS, S.G.; et al. Obese gene expression in
 527 porcine adipose tissue is reduced by food deprivation but not by maintenance or
 528 submaintenance intake. **Journal of Nutrition**, v.128, p.677-82, 1998.
- 529 ULGUIM, R.R. **Descarte de fêmeas suínas em granjas de quarto sítio e em unidades**
 530 **produtoras de leitões com reposição de leitoas gestantes: eficiência reprodutiva e**
 531 **validação das razões atribuídas para o descarte**. 2011 36f. Dissertação (Mestrado em
 532 Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- 533 YE, Y. Leptin and ObRa/MEK signalling in mouse oocyte maturation and reimplantation
 534 embryo development. **Reproductive Biomedicine**, v.19, n.2, p.181-190, 2009.
- 535 ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; et al. Positional cloning of the mouse obese gene
 536 and its human homologue. **Nature**, v.372, 425-432, 1994.
- 537 ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin in
 538 reproduction and metabolism: A comparative review. **Domestic Animal**
 539 **Endocrinology**, v.29, p.166–185, 2005.

4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As considerações mais relevantes referem-se a presença acentuada ou fraca dos marcadores utilizados em ambos os trabalhos. A leptina mostrou ser um marcador importante de ação local para indicar sinais relacionados a reprodução na fêmea suína. Tais como a sua relação com a puberdade, devido sua presença marcante em oócitos de animais púberes, e nos oócitos das fases iniciais do desenvolvimento folicular, que em fêmeas pré-púberes. De acordo com a literatura a leptina utiliza de várias cascatas de sinalização para realizar suas funções, e neste estudo foi observado que as MAPK, ERK 1/2 e p38, podem estar associadas com algumas ações da leptina, como maturação dos oócitos e maturidade sexual das fêmeas suínas. Portanto, estes achados em conjunto aos demais encontrados este trabalho demonstrou que apesar de apresentarem morfologia semelhante os oócitos, de fêmeas pré-púberes e púberes apresentam diferenças bioquímicas, que podem explicar diferentes níveis de competência oocitária.

Reforçado essa afirmação o registro da marcação mais intensa no hipotálamo e útero e do seu OBR-b nos oócitos e útero em porcas púberes cíclicas com ordem de parto 2-4, coincidindo com o aumento progressivo do número de leitões. Ainda, o OBR-b obteve marcação mais acentuada em fêmeas primíparas e multíparas que nulíparas. Portanto, a presença do seu receptor é determinante para o entendimento das ações da leptina, dessa forma os resultados apresentados pela imunomarcação do OBR-b confirmam que mesmo sem a presença da proteína no momento em que estruturas analisadas foram coletadas, estes se encontravam distribuídos de forma local na membrana do hipotálamo, útero e oócitos.

Corroborando com os achados encontrados na literatura a leptina é um hormônio com reflexos sobre as funções reprodutivas, porém é importante salientar que mais estudos envolvendo técnicas moleculares, que comprovem a quantidade

real da leptina e de seu receptor são de suma importância para a compreensão dessa proteína no desempenho produtivo e reprodutivo da fêmea suína.

E, ainda a associação com marcadores metabólicos de ação sistêmica podem elucidar algumas questões ainda desconhecidas sobre o verdadeiro papel da leptina na reprodução.

5.0 REFERÊNCIAS GERAIS

- AHIMA R.; QI, Y.; SINGHAL, N.S.; JACKSON, M.B.; SCHERER, PE. Brain adipocytokine and metabolic regulation. **Diabetes**, v. 55 (Suppl 2), p.S145–S154, 2006.
- ANIL, S.S.; ANIL, L.; DEEN, J. BAIDOO, S.K.; WALKER, R.D. Association inadequate feed intake during lactacion with removal of sows from the breeding herd. **Journal of Swine Health and Production** v. 14, p. 296-301, 2006.
- BARB, C.R.; HAUSMAN, G.J.; HOUSEKNECHT, K.L. Biology of leptin in the pig. **Domestical Animal Endocrinology**. v.21, p.297-317, 2001.
- 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.
- BARB, C.R.; HAUSMAN, G.J.; CZAJA, K. Leptin: A metabolic signal affecting central regulation of reproduction in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**. v.29. p.186-192. 2005.
- BARB, C.R. HAUSMAN, G.J.; LENTS, C.A. Energy metabolism and leptin: effects on neuroendocrine regulation of reproduction in the gilt and sow. **Reproduction in Domestic Animals**. v.43. p.324-30. 2008.
- CRAIG, J.A., ZHU, H., DYCE, P.W., WEN, J., LI, J. Leptin enhances porcine preimplantation embryo development in vitro. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.229, p.141-147, 2005.
- DE RENSIS, F.; GHERPELLI, M.; SUPERCHI, P.; KIRKWOOD, R.N. Relationships between backfat depth and plasma leptin during lactacion and sow reproductive performance after weaning. **Animal Reproductive Science**. v. 90, p. 95-100, 2005.
- ENGBLOM, L.; LUNDEHEIM, N.; DALIN, A.M.; ANDERSSON, K. Sow removal in Swedish commercial herds. **Livestock Science**. v. 106, p. 76-86, 2007.
- GOUDET, G., BELIN, F., BÉZARD, J., GÉRARD, N. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Molecular Human Reproduction*, v.4, n.6, p.563–570. 1998.
- 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.

HAKANSSON, M.L.; MEISTER, B. Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. **Neuroendocrinology**, v.68, p.420-7, 1998.

HORVATH, T.L.; DIANO, S.; SOTONYI, P.; HEIMAN, M.; TSCHOP, M. Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance-a hypothalamic perspective. **Endocrinology**, v.142, p.4163–4169, 2001.

HOUSEKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**. v.15, n.6, p.457-475, 1998.

INOUE, M., NAITO, K., NAKAYAMA, T., SATO, E. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology Reproduction*, v.58, p.130-136, 1998.

JIN, Y.X., CUI, X.S., HAN, Y.J., KIM, N.H. Leptin accelerates pronuclear formation following intracytoplasmic sperm injection of porcine oocytes: possible role for MAP kinase inactivation. **Animal Reproduction Science**, v.115, 137-148, 2009.

KELESIDIS, T.; MANTZOROS, C.S. The emerging role of leptin in humans. **Pediatrics Endocrinology Review**, v.3, p.239-248, 2006.

KEMP, B.; SOEDE, M.N. Reproductive problems in primiparous sows. In: *Internacional Pig Veterinary Society Congress*, 2, 2004 Germany. **Proceddings**...Germany: IPVS, 2004, p. 843.

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. 2001. Developmental changes in the long form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. *Biol Reprod* 64, 1614-1618.

LIN, J., BARB, C.R.; MATTERI, R.L.; KRAELING, R.R; CHEN, X.; MEINERSMANN, R.J.; RAMPACEK, G.B. Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**. v.19. p.53–61. 2000.

REPACI, A.; GAMBINERI, A.; PAGOTTO, U.; PASQUALI, R. Ghrelin and reproductive disorders (Molecular and Cellular Endocrinology). **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.340, p.70-79, 2011.

SALADIN, R.; DE VOS P.; GUERRE-MILLO, M.; LETURQUE, A.; GIRARD, J.; STAELS, B.; AUWERX, J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. **Nature**. v.377. p.527-529. 1995.

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.

STALDER , K.J.; SAXTON, A.M.; CONASTSER, G.E.; SERENIUS, T.V. Effect of growth and compositional traits on first parity and lifetime reproductive performance in U.S. Landrace. **Livestock Production Science** v.97, p. 151-159, 2005.

SUMMER, A.; SALERI, R.; MALACARNE, M.; BUSSOLATI, S.; BERETTI, V.; SABBIONI, A.; SUPERCHI, P. Leptin in sow: Influence on the resumption of cycle activity after weaning and on the piglet gain. **Livestock Science**. 124, 107-111.2009.

SUPURLOCK, M.E. et al. Obese gene expression in porcine adipose tissue is reduced by food deprivation but not by maintenance or submaintenance intake. **Journal of Nutrition**. v.128. p.677-82. 1998.

TARTAGLIA, L.A: The leptin receptor. **Journal of Biological Chemistry**. v.272. p.6093–6096. 1997.

TOSHINAI, K., MONDAL, M.S., NAKAZATO, M., DATE, Y., MURAKAMI, N., KOJIMA, M. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.281, p.1220–1225, 2001.

VAN DEN BRINK, G.R, O'TOOLE, T., HARDWICK, J.C., VAN DEN BOOGAARDT, D.E., VERSTEEG, H.H., VAN DEVENTER, S.J., PEPPELENBOSCH, M.P. Leptin signaling in human peripheral blood molecular cells, activation of p38 and 42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase and 70 S6 kinase. **Molecular Cellular Biology Research Communications**, v.4, p.144-150, 2000.

ZHANG, W.; LEI, Z.; SU, J.; CHEN, S. Expression of ghrelin in the porcine hypothalamo–pituitary–ovary axis during the estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.109, p.356-367, 2008.

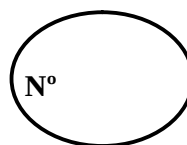
ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.372, 425-432, 1994.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.166–185, 2005.

APÊNDICE

Fabiana Moreira –FV/ UFPel - EV/UFG

Data:



Granja:

Ordem do Abate:

Identificação:	Raça:	Idade:
Cor do Brinco:	Motivo do descarte:	

1. Exame do útero

Grau 0 - útero normal	Grau 1- presença de feto macerado
Grau 2 - útero gravídico	Grau 3 -endometrite purulenta

2. Exame dos Ovários

2.1 Ovário direito (Frasco n°)

Grau 0
Grau 1
Grau 2

2.2 Ovário esquerdo (Frasco n°)

Grau 0
Grau 1
Grau 2

Conclusão (fase do ciclo estral):

3. Exame do Hipotálamo e Hipófise

Macroscopia:

PigChamp – Monitor de performance n°: