

CRISTIANA LIBARDI MIRANDA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES EM CÉLULAS FOLICULARES DE
SUÍNOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

CRISTIANA LIBARDI MIRANDA

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES EM CÉLULAS FOLICULARES DE SUÍNOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de julho de 2007.

Dra. Marta M. F. Guimarães
(Co-orientador)

Prof. Paulo Sávio Lopes
(Co-orientador)

Prof. José Domingos Guimarães

Dra. Lílian Tamy Iguma

Prof^a. Simone E. Facioni Guimarães
(Orientadora)

*“O Temor do Senhor é o
princípio da ciência...”
(Pv. 1:7)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu bom Deus, por seu amor incondicional, pelas grandiosas bênçãos, por sempre estar atento a voz do meu clamor e por mais esta vitória que Ele me proporcionou, pois neste momento, só Ele é digno de toda honra e toda glória. Senhor tu és Maravilhoso!

“Eu te louvarei, porque de um modo terrível e tão maravilhoso fui formado; maravilhosas são as tuas obras, e a minha alma o sabe muito bem” (Sl. 139: 14).

À minha amada mãe, Ana, por seu exemplo de mulher batalhadora, de mãe dedicada, por fazer tudo pela minha felicidade, pelo seu grande amor e por sempre estar pertinho de mim. Mãe, te Amo!

Ao meu pai, Wilson, por seu amor, por todo apoio, por todo esforço na minha realização profissional e por sempre confiar em mim. Amo você, pai!

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora, Simone Eliza Facione Guimarães, pelo apoio, pelo incentivo, pela paciência e pelo rico convívio.

Aos meus conselheiros, Marta Martins Fonseca Guimarães e Paulo Sávio Lopes, pelas grandiosas contribuições práticas e teóricas essenciais para este mestrado.

Ao professor José Domingos Guimarães, pela grandiosa ajuda referente ao tema reprodução.

À pesquisadora Lílian Tamy Iguma, pelas valiosas sugestões.

Ao professor Aldrin Vieira Pires, pela amizade e pela confiança em mim depositada. Obrigada por tudo, Aldrin!

A todos os colegas do LABTEC (Laboratório de Biotecnologia Animal), em especial à Priscila, Débora, Isabela, Kleibe e Nicola, pela amizade, pela rica convivência e por sempre me ajudarem em tudo.

Ao técnico do laboratório, Mário, pela amizade e pela ENORME paciência.

Aos funcionários da Granja de Melhoramento de Suínos da UFV, em especial ao Zé Geraldo e a quase funcionária, Renata, pela amizade por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Ao meu querido amigo Gilvan, pelas orações, por toda dedicação e disposição, por sempre estar ao meu lado e por tudo que eu aprendi com esta convivência. Você foi essencial para que este momento se concretizasse e, através do seu exemplo, tive vontade de crescer e de buscar valiosas experiências. Adoro você!

Às minhas mais que amigas, irmãs, Letícia, Liliane, Jaqueline e Alessandra, pela amizade que me proporcionou muito aprendizado e pelas valiosas orações. Sem vocês teria sido muito mais difícil. Aqui, amo vocês!

Aos meus amigos e irmãos, Samuel, Tércio, Lucas, Daniel e Winder, pela amizade, por todo apoio e dedicação e pelas orações preciosíssimas. Sem vocês eu não teria conseguido!

A todos os colegas conquistados durante o mestrado e a todos os professores que indiretamente contribuíram para essa realização.

Ao Pr. Augusto Kohls Filho, meu pai de coração, pelas orações, por todo apoio, confiança e carinho por mim demonstrado.

A todos os irmãos da Igreja Cristã Maratana de Viçosa e de Maracanã III, pela amizade e pelas orações, pois sem elas eu não teria chegado até aqui.

A todos, que de alguma forma contribuíram para o sucesso deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!!

BIOGRAFIA

Cristiana Libardi Miranda, filha de Wilson Ignácio Miranda e Ana Maria Libardi, natural de Cariacica, Estado do Espírito Santo, Brasil, nasceu em 28 de novembro de 1980.

Em fevereiro de 2000, ingressou no curso de Ciências Biológicas, pela Faculdade de Saúde e Meio Ambiente - FAESA, em Vitória, Espírito Santo.

Em julho de 2004, graduou-se em Ciências Biológicas, pela Faculdade de Saúde e Meio Ambiente.

Em agosto de 2005, iniciou o Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa.

Em 13 de julho de 2007, submeteu-se ao exame final de defesa de tese para obtenção do título *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Características reprodutivas.....	4
2.2. Fisiologia ovariana e as células foliculares.....	6
2.3. Ovulação e gestação.....	8
2.4. QTLs e genes identificados para características reprodutivas em suínos.....	9
2.5. PRC quantitativo em tempo real.....	13
2.6. Genes selecionados para análise.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Coleta de Material.....	18
3.2. Dados fenotípicos.....	19
3.3. Quantificação das células.....	21
3.4. Extração do RNA total.....	22
3.5. Síntese do cDNA.....	23
3.6. Confeção dos Sistemas de PCR em Tempo Real.....	23
3.7. Análise de RT-PCR em Tempo Real.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMO

MIRANDA, Cristiana Libardi; M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Expressão diferencial de genes em células foliculares de suínos.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-orientadores: Marta Martins Fonseca Guimarães e Paulo Sávio Lopes.

Dentre as características produtivas, o número de leitões é fundamental para o sucesso na produção de suínos. A taxa de ovulação é um dos principais fatores que determinam o tamanho da leitegada. Deste modo, o estudo da expressão gênica nos folículos ovarianos, mais precisamente nas células foliculares, pode causar grande avanço no entendimento desta característica. Portanto o presente trabalho foi realizado com o objetivo de identificar a expressão diferencial dos genes STAR (Proteína esteroidogênica regulatória aguda), GATA (Proteína de ligação GATA-4), $PGF_{2\alpha}$ (Prostaglandina $F_{2\alpha}$), P4R (Receptor de progesterona 4), FSHR (Receptor do hormônio folículo estimulante) e CYP19 (Citocromo aromatase P450) em células foliculares, coletadas durante a fase folicular do ciclo estral de três fêmeas suínas de alta e três de baixa prolificidade, provenientes de um *tricross* das raças Landrace, Large White e Pietrain, por meio da metodologia de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Nas fêmeas com alta prolificidade, utilizadas neste estudo, a

média do número de leitões por leitegada foi 8,51 enquanto para as fêmeas com baixa prolificidade foi de 12,03. Para examinar se algum dos genes relacionados acima afetava as taxas de prolicidade nos animais deste estudo, o RNA total do líquido folicular foi extraído e, em seguida, fez-se dois *pools* com o RNA total, sendo um do grupo de fêmeas com alta prolificidade e o outro do grupo com baixa prolificidade. O RNA total de cada um dos *pools* foi usado na confecção da primeira fita de cDNA. As reações de qPCR foram realizadas usando-se o gene β -Actina como controle endógeno. Os *primers* foram gerados a partir de seqüências obtidas nos bancos de ESTs de suínos. A maior diferença de expressão foi observada para o gene P4R, que foi expresso 7,73 vezes a mais nos animais com baixa prolificidade. O gene $\text{PGF}_{2\alpha}$ apresentou expressão diferencial de 2,84 vezes a mais nas fêmeas hipoprolíficas. A expressão do gene STAR, que codifica para uma proteína reguladora da síntese de hormônios esteróides, foi 2,32 vezes maior nos animais com baixa prolificidade. A expressão do gene GATA foi 2,31 vezes maior nas fêmeas hipoprolíficas. Esse gene codifica para a proteína de ligação GATA-4, pertencente a um grupo de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de vários genes e a diferenciação de diversos tipos celulares. A expressão do CYP19 leva à produção de uma enzima chave na biossíntese de estrogênio, a Citocromo aromatase P450 (P450_{aro}), sendo que, para este gene, foi observada uma expressão relativa de 2,30 vezes a mais nas fêmeas de baixa prolificidade. O gene FSHR não atingiu o limiar de diferença de expressão, estabelecido neste estudo (1,5 vezes). A expressão dos genes STAR, GATA, $\text{PGF}_{2\alpha}$, FSHR, P4R e CYP19 nas células foliculares possibilitou a identificação de diferenças de expressão entre as fêmeas com alta e baixa prolificidade, sendo que a maior diferença de expressão para os genes estudados foi verificada nos animais de baixa prolificidade, exceto para o gene FSHR, que não foi considerado diferencialmente expresso nesse trabalho. Com vistas ao melhor entendimento dos fenótipos reprodutivos em suínos, é necessário que estudos sejam conduzidos no sentido de examinar a expressão desses e de outros genes relacionados, durante todo do ciclo reprodutivo das fêmeas, pois, a expressão de um gene depende, dentre outros fatores, do estágio do desenvolvimento do tecido e da idade do animal.

ABSTRACT

MIRANDA, Cristiana Libardi; M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007.
Gene expression differential in follicular cells in swine. Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-adviseres: Marta Martins Fonseca Guimarães and Paulo Sávio Lopes.

Among the productive traits, the number of the piglets is essential for success in swine production. The ovulation rate is one of the key factors that determine the litter size in pigs and the study of gene expression in the ovary follicles, more precisely in the follicular cells, might cause a big advance in the comprehension of this characteristic. Thus, the objective in this work was to identify the differential expression of the STAR (Steroidogenic Acute Regulator-STAR), GATA (GATA binding protein 4), $PGF_{2\alpha}$ (Prostaglandin $F_{2\alpha}$), P4R (Progesterone Receptor), FSHR (Follicle Stimulating Hormone Receptor) and CYP19 (Cytochrome Aromatase P450) genes in follicular cells, collected during the follicular phase in the estrous cycle of three sows with high and three sows with low litter size which comes from a tricross of the Landrace, Large White and Pietrain breeds, throughout the semi quantitative real time PCR (qPCR). In the

hyperprolific sows, analyzed in this study, the average of the number of the piglets were 8,51 and for the hypoprolific sows the average was 12,03. For examination if any one related genes above were affecting the ovulation rate in the prolificity rate in the animals studied, the total RNA of the follicular liquid was extracted and than was made two pools with the total RNA of the hypo and hyperprolific sows groups. The total RNA of each pool was used for the first strand cDNA synthesis. The PCR reactions were accomplished using as an endogenous control the β -Actina gene. The primers were generated by sequences in the Pig ESTs data base. The major expression difference was observed for P4R gene, who express 7,73 turns mostly in the animals with low prolificity. The $\text{PGF}_{2\alpha}$ gene displayed differential expression of 2,84 times as a large in the hypoprolific animals. The STAR gene expression, that codes for the protein regulating hormone steroids synthesis, was 2.32 turns mostly in the animals with low prolificity sows. The GATA gene expression was 2.31 times as a large in the hypoprolific sows. This gene codes for the GATA binding protein 4 belonging a transcription group factors that are responsible for too many gene expression and diverse cell differentiation types. The CYP19 gene expression taken the enzyme production that is the key factor in the estrogens biosynthesis, the Cytochrome Aromatase P450 (P450_{aro}), for this gene was observed the relative expression of the 2.30 turns mostly in the sows with low prolificity. The FSHR gene expression hasn't achieved the threshold difference established in this study (1.5 times). The STAR, GATA, $\text{PGF}_{2\alpha}$, FSHR, P4R and CYP19 gene expression in the follicular cells has enabled identify difference of expression between sows with low and high prolificity, where the largest difference of expression in relation to the studied genes was verify in the hypoprolific sows, except for the FSHR gene that wasn't considerate differentially express in this work. With views the best agreement about the reproductive phenotypes in swine, it's necessary yet, studies to examine the expression in these and other genes related to female reproductive cycle, in as much as gene expression is dependent, in the midst of another factors, the stage of development of the tissue and the animal age.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a suinocultura vem crescendo significativamente em volume de produção e obtendo melhores índices produtivos, devido aos progressos genéticos alcançados quanto ao conhecimento do genoma suíno, ocorrido principalmente no final dos anos noventa e início da década atual. Esta atividade representa um importante setor entre as atividades pecuárias, em que o Brasil ocupa posição de destaque, encontrando-se entre os cinco maiores produtores do mundo (Abipecs, 2007).

De acordo com dados da FAO/Abipecs (Abipecs, 2007), em 2006, a produção mundial de carne suína atingiu 104.990 toneladas e o consumo *per capita* foi de 15,9 kg/hab/ano. Esses resultados colocam a carne suína em posição de destaque, sendo a mais consumida no mundo. Em detrimento de um mercado em expansão, esta atividade vem se tornando cada vez mais eficiente e, assim, várias metodologias vêm sendo empregadas no sentido de aumentar a produtividade, proporcionando maiores retornos para os criadores e indústrias, além de maior satisfação do consumidor com o produto final.

Para aumentar os índices produtivos da suinocultura, torna-se necessária a produção de machos e fêmeas com alto potencial genético no

plantel, o que tem sido facilitado pelos avanços nas diferentes áreas de produção animal. Aliado a esses fatores, nos últimos anos, observa-se um significativo progresso em pesquisas na área do melhoramento tradicional e da genômica dos suínos, pois, além de possuir um grande interesse econômico, esta espécie é considerada um modelo para se trabalhar nesta, em razão do grande número de leitões por leitegada, curto período gestacional e reduzido intervalo de gerações.

Na suinocultura, a partir do melhoramento genético dos rebanhos, tem sido possível obter animais com alto potencial produtivo, visto que o progresso genético alcançado em programas de melhoramento são permanentes e cumulativos, sendo transferidos de uma geração para outra. Assim, um incremento na característica, mesmo mínimo, é representativo e proporciona grande retorno econômico aos produtores.

Os programas de melhoramento genético de suínos visam melhorias nas características relacionadas à produção e à resistência a doenças. Dentre as características produtivas, a performance reprodutiva, em especial o número de leitões por leitegada, é fundamental para o sucesso na produção de suínos (Pires *et al.*, 2000). No entanto, em suínos, características de reprodução possuem baixas estimativas de herdabilidade e, devido a este fato, tem sido observada pouca inclusão de tais características nos programas de melhoramento.

Mesmo com um baixo ganho por seleção, proporcionando pouco progresso genético, ainda é compensador incluir características reprodutivas, como o tamanho da leitegada, no processo de seleção, pois, o número de leitões reflete-se diretamente no número de animais abatidos no processo final de produção. Assim, pesquisas com a finalidade de determinar a base genética deste fenótipo vêm sendo intensificadas, possibilitando elucidar o controle genético de características quantitativas economicamente importantes.

À medida que identificam genes ou QTL (do inglês, *Quantitative Trait Loci*) para tamanho de leitegada, as tecnologias moleculares são ferramentas fundamentais para o melhoramento genético das características reprodutivas, quando associadas aos métodos clássicos de seleção, proporcionando maiores ganhos genéticos.

A expressão de um gene em um tecido pode variar, consideravelmente, dependendo do estágio de desenvolvimento de cada tecido. Isto pode ser observado na dinâmica dos ovários, que podem sofrer sérias mudanças em um período curto da vida do animal, sendo um complexo processo dependente de uma cascata de eventos, que culminam na desintegração do folículo ovariano para liberação do oócito fértil (Caetano *et al.*, 2003).

Como a taxa de ovulação é um dos principais fatores que determinam o tamanho da leitegada em suínos e considerando que esta característica tem grande valor econômico, o estudo da expressão gênica nos folículos ovarianos, mais precisamente nas células que o recobrem, pode causar grande impacto na indústria suinícola. Devido a importância desta característica no sucesso reprodutivo dos suínos, no presente trabalho objetivou-se identificar genes de expressão diferencial em células foliculares de fêmeas suínas com alta e baixa prolificidade, por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características reprodutivas

Os suínos são animais altamente prolíficos, apresentando uma produtividade superior a 20 leitões/matriz/ano (Jhonson *et al.*, 1999; Pereira, 2001). Nas últimas décadas, têm sido observados incrementos reprodutivos e, segundo Irgang (1998), o número de leitões nascidos por leitegada passou de 7 a 8 para 10 a 12. Esse aumento no número de leitões leva a um menor custo de produção por leitão desmamado e maior retorno econômico.

A eficiência reprodutiva dos suínos, baseada no número de leitões desmamados por porca/ano, depende da redução da idade das leitoas a primeira concepção ou ao primeiro parto (precocidade sexual), do intervalo de partos, da duração do período de aleitamento e do intervalo de desmame-descarte das porcas, bem como do aumento da taxa de concepção, do tamanho da leitegada ao nascer e da porcentagem de sobrevivência dos leitões (Irgang, 1985).

Em suínos, as características reprodutivas, são consideradas como inerentes às fêmeas, sendo limitadas pelo sexo, sendo que sua importância está relacionada ao aumento da eficiência do sistema, pois, quanto melhor o desempenho reprodutivo do rebanho, menor será o custo de manutenção por matriz (Torres-Filho *et al.*, 2005). A performance reprodutiva, em especial o tamanho da leitegada, é essencial para o sucesso da criação de suínos (Pires *et al.*, 2000; Pereira, 2001). No entanto, as características reprodutivas ainda são pouco incluídas nos programas de melhoramento, devido à sua baixa herdabilidade e à sua expressão ser limitada a animais adultos (Lopes *et al.*, 1998).

As estimativas de herdabilidade das características reprodutivas nos animais são, normalmente, baixas e a variabilidade existente em tais características é atribuída, principalmente, a fatores não genéticos e efeitos genéticos não aditivos (Torres-Filho *et al.*, 2005). As estimativas de herdabilidade para o número de leitões por leitegada encontram-se em torno de 0,10 (Pereira, 2001; Chen *et al.*, 2003). Pires *et al.* (2000), utilizando dados provenientes de animais das raças Duroc, Landrace e Large White, registraram estimativas em torno de 0,16 a 0,22. Torres-Filho *et al.* (2005) encontraram, para uma linhagem em desenvolvimento da raça Large White, estimativas de herdabilidade para número total de leitões nascidos e nascidos vivos de 0,22 e 0,19, respectivamente.

Apesar da importância econômica desta característica, pouco ou nenhum progresso genético é observado por intermédio da seleção, devido, principalmente, ao efeito genético aditivo dos genes, implicando grande dificuldade na utilização dessas características nos programas de melhoramento genético (Pires, 1999; Chen *et al.*, 2003). Para aumentar o progresso genético por geração, Cristenson (1993) propõe a subdivisão da característica de tamanho de leitegada em taxa de ovulação, espaço uterino, taxa de fertilização e sobrevivência embrionária, a fim de para melhorar os ganhos genéticos nos processos de seleção.

Quanto ao tamanho da leitegada, dois fatores intimamente ligados são a taxa de ovulação e a sobrevivência ou a mortalidade embrionária. A taxa de ovulação refere-se ao número de oócitos liberados no período do estro, sendo o mais importante componente da prolificidade (Pereira, 2001; Caetano *et al.*,

2003). De acordo com Pereira (2001), uma elevada taxa de ovulação, cuja estimativa é de herdabilidade de 0,40, implica alta mortalidade embrionária, com herdabilidade estimada em 0,15, mostrando uma forte correlação genética negativa entre taxa de ovulação e sobrevivência pré-natal.

A complexidade em prover progresso genético com a seleção direta ou indireta para tamanho da leitegada é grande, sendo que uma alternativa consiste em explorar a variabilidade genética existente entre as raças. Assim, os cruzamentos constituem um mecanismo eficaz para a melhoria na performance reprodutiva das porcas, levando-se em consideração a heterose obtida, geralmente, beneficia as características de baixa herdabilidade (Pereira, 2001).

2.2. Fisiologia ovariana e as células foliculares

A principal função do ovário é o desenvolvimento dos oócitos. A oogênese inicia-se durante a vida fetal, sendo altamente influenciada, posteriormente, durante o período reprodutivo, pelo desenvolvimento folicular. No início da puberdade, 10 a 25 folículos desenvolvem-se para o processo ovulatório e liberam oócitos em cada período estral. O número total de ovulações é denominado como taxa de ovulação, sendo um importante parâmetro na eficiência reprodutiva de suínos (Cárdenas & Pope, 2002).

Os folículos ovarianos são revestidos, internamente, por uma lâmina basal sem suprimento sanguíneo (camada da teca) e uma camada de células cubóides, que constituem as células da granulosa (Hafez & Hafez, 2004). O crescimento, a maturação, a ovulação e a luteinização dos folículos de graaf dependem de uma série de hormônios, produzidos pelo hipotálamo, pela pituitária anterior e pelo ovário (Caetano *et al.*, 2003; Hafez & Hafez, 2004).

Os eventos, que ocorrem durante o ciclo estral, são controlados principalmente pela interação dos hormônios gonadotróficos, FSH (hormônio foliculo estimulante) e LH (hormônio luteinizante), bem como pelos esteróides estrogênio e progesterona. O FSH e o LH são secretados pela hipófise anterior, sendo esta controlada pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e pelos esteroides gonadais (Hafez & Hafez, 2004).

Os esteróides são produzidos pelas gônadas e possuem importante papel no crescimento e diferenciação dos tecidos reprodutivos e na manutenção da fertilidade (Drummond, 2006). Os principais hormônios esteróides são o estrogênio e a progesterona, que são produzidos pelos folículos ovarianos e pelo corpo lúteo, respectivamente (Hafez & Hafez, 2004). Estes hormônios não interagem com receptores da membrana plasmática, mas com receptores intracelulares que são trans-ativadores transcricionais. O complexo hormônio-receptor atua, ligando-se às seqüências de DNA altamente específicas, denominadas elementos de resposta hormonal (HREs, do inglês *Hormone Response Elements*) e alteram a expressão gênica, aumentando ou suprimindo a expressão de genes adjacentes (Nelson & Cox, 2002).

O estrogênio possui importantes funções no ciclo reprodutivo, sendo responsável pela manifestação do cio, além de atuar no útero, aumentando a amplitude e freqüência de contrações, potencializando os efeitos da ocitocina e da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Em porcas, eles auxiliam na manutenção dos corpos lúteos, que em suínos são essenciais à manutenção da prenhez até o parto (Hafez & Hafez, 2004).

Segundo Vanderhyden *et al.* (1992), a proliferação das células da granulosa é estimulada por estrógenos e pelo hormônio folículo estimulante (FSH), os quais atuam sinergicamente na promoção deste evento. Estas células são ricas em receptores do hormônio FSH e, conseqüentemente vários genes nelas presentes são regulados pela ação deste hormônio. Portanto, elas têm um papel fundamental na entrada na fase estral e, assim, apresentam um uso potencial na identificação de expressão diferencial de genes relacionados à prolificidade (Bonnet *et al.*, 2006; Vanderhyden *et al.*, 1992).

No final da maturação folicular, as células da teca e da granulosa sintetizam e secretam significativas quantidades de esteróides, hormônios peptídeos e prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$) dentre outras substâncias. Esses hormônios são importantes, pois, participam ativamente do desenvolvimento folicular, sendo que muitos levam sinais que coordenam as funções dos eixos hipotalâmico - hipofisário - ovariano (Cárdenas & Pope, 2002).

Nos mamíferos, menos de 1% dos folículos ovarianos desenvolve-se até a fase de ovulação, a grande maioria entra em atresia em vários estádios do desenvolvimento folicular (Tilly, 1996). Este processo é importante para manter

o ciclo reprodutivo normalizado e depende do balanço entre os folículos que se desenvolvem e aqueles que entram em atresia. Este estado folicular é causado pela apoptose das células da granulosa, sendo que um elevado número de folículos nesse estágio pode resultar em perda de fertilidade (Johnson, 2003).

2.3. Ovulação e gestação

A ovulação ocorre como resultado de uma série de eventos fisiológicos, bioquímicos e biofísicos (Hafez & Hafez, 2004). Na porca, o estro inicia-se entre o 5º a 6º dia após o fim da fase lútea. Como a fase folicular se inicia antes da fase luteínica, a ovulação ocorre cedo no ciclo estral. Assim, se o óvulo não for fecundado, o corpo lúteo regride e ocorre um novo recrutamento de folículos ovarianos, que iniciam um novo período de pró-estro. A liberação da $PGF_{2\alpha}$ inicia a regressão do corpo lúteo, em espécies de animais domésticos. Em suínos, o corpo lúteo é diferente daqueles de outras espécies de animais domésticos, pois, não sofre regressão em resposta a pequenas doses de $PGF_{2\alpha}$ até depois do 12º dia do ciclo estral (Marques *et al.*, 2004).

A ovulação ocorre durante o estro, sendo que a maioria dos oócitos são liberados entre 35 a 45 horas após o início do cio. A taxa de ovulação consiste no número de oócitos liberados durante o ciclo estral e varia, consideravelmente, sendo que cerca de 10 a 20 oócitos são liberados. Os fatores que interferem neste número são o parto, a idade, o nível nutricional, a estação do ano e a raça. A porca mais jovem tem baixa taxa de ovulação, em comparação com aquelas mais maduras, pois, o número de oócitos liberados aumenta a cada ciclo estral, com um aumento médio de dois oócitos a cada ciclo estral. A consangüinidade reduz a taxa de ovulação, enquanto os cruzamentos aumentam o número de ovulações. Em linhagens consangüíneas, observa-se observar um aumento médio de 1,1 oócito do primeiro para o terceiro cio, mas a partir do quarto cio é observado pouco ou nenhum aumento (Hafez & Hafez, 2004).

A elevação da taxa de ovulação tem um alto potencial no aumento da eficiência reprodutiva dos suínos. Resultados experimentais mostram que o hormônio FSH e muitos outros fatores ovarianos, como os receptores

hormonais, fatores de crescimento, hormônios esteróides e atividade enzimática, controlam o desenvolvimento folicular, a taxa de ovulação e, conseqüentemente, o número de fetos (Cárdenas & Pope, 2002).

O período gestacional dos suínos (111 a 117 dias) é relativamente constante, com média de 114 dias. As variações no tamanho da leitegada, número de fetos que regridem até parto, idade da fêmea ou as condições ambientais têm pouca influência no período gestacional. O principal fator atuante durante este período são as diferenças genéticas; no entanto, essas diferenças ocorrem no intervalo de 3 dias, dependendo da raça (Hafez & Hafez, 2004).

2.4. QTL e genes candidatos para características reprodutivas em suínos

Com a criação do projeto de mapeamento genético europeu PiGMap, a partir dos anos 1990, vários esforços foram iniciados no sentido de conhecer o genoma dos suínos. Desde então, novos marcadores vêm sendo identificados e mapeados, sendo que algumas integrações dos mapas continuam sendo realizadas com a finalidade de elucidar do controle genético das características complexas (NAGPR, 2007).

De acordo com o *Brief Summary of the Pig Genome Coordination Program for 2005* (NAGPR, 2007), novas publicações sobre mapeamento genético em larga escala têm sido disponibilizadas, sendo que, até o momento, nos bancos de dados de suínos existem cerca de 1.588 genes e 2.493 marcadores. O mapeamento físico do genoma suíno vem crescendo rapidamente e, até momento, há 6.000 seqüências mapeadas (incluindo genes e marcadores anônimos), graças aos painéis de células híbridas e de células irradiadas.

O primeiro passo na identificação de genes e de polimorfismos causais para características de importância na agricultura e na medicina é a identificação de QTL (do inglês, *Quantitative Trait Loci*) afetando tais características (Seaton *et al.*, 2002). Estudos de QTL em suínos têm alcançado grande avanço na identificação de mutações, que afetam características de importância na suinocultura. De acordo com o *PigQTLdb*, há 1.675 QTL

identificados até o momento, obtidos de 110 publicações, representando 246 características (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>, acessado em 12/04/07). No entanto, poucos desses QTL têm sido estudados para identificação de mutações causais. Segundo Rothschild *et al.* (2007), há 67 QTL identificados para características reprodutivas em suínos, dentre os quais, 27 estão relacionados, especificamente, ao tamanho da leitegada.

De acordo com Hu *et al.* (2005), no PigQTLdb, foram reportados dois QTL para taxa de ovulação, localizados no cromossomo 15 (SSC 15) por diferentes grupos de pesquisa. O primeiro QTL foi identificado por Rathje *et al.* (1997), por meio de varredura genômica. Os autores identificaram quatro regiões de possíveis QTL para taxa de ovulação. Além do SSC 15, eles relataram a presença de QTL nos SSC 4, 8 e 13. O segundo QTL para taxa de ovulação, citado no SSC 15, foi evidenciado por Rohrer *et al.* (1999). Analisando o genoma completo, esses autores verificaram associação com características reprodutivas em seis cromossomos e, além do SSC15, foram relatados QTL nos SSC 1, 3, 8, 9, 10. Nessas análises, os SSC 8 e SSC 10 apresentaram múltiplas associações em diferentes regiões. Nos SSC 3, 8, 9, 10 e 15 foram verificadas associações com o componente taxa de ovulação. Nos SSC 1 e 10, foram observadas associações com idade à puberdade e, no cromossomo 8, com capacidade uterina e peso do ovário.

A segunda metodologia de análise genômica é o estudo de genes candidatos. Genes candidatos são genes seqüenciados, cuja ação biológica é conhecida e estão envolvidos com o desenvolvimento ou fisiologia da característica, podendo ser estruturais ou regulatórios (Rothschild & Soller, 1999). A partir de estudos de genes candidatos e da genômica comparativa, é possível identificar vários genes com efeito fenotípico significativo, que podem ser utilizados em programas de melhoramento genético.

Para características reprodutivas em suínos, foram identificados vários genes controlando o tamanho da leitegada. Dentre esses, encontra-se o receptor de estrógeno (ESR), localizado no SSC1 na posição p25-p24, que possui importante papel no ciclo reprodutivo de fêmeas (Rothschild & Soller, 1999; Drogemuller *et al.*, 2001). O estrógeno está envolvido no reconhecimento materno da prenhez (Geisert *et al.*, 1990). Segundo Rothschild y Soller (1999),

entretanto, a expressão do gene ESR depende do “*background*” genético, ou seja, o efeito dos alelos pode diferir entre raças e, ou populações.

Outros dois genes, o receptor de ácido retinóico (vitamina A) (RARG – *Retinoic Acid Receptor Gamma*) localizado no cromossomo 5 (SSC5) e o gene que codifica para a proteína 4 de ligação ao retinol (RBP4 – *Retinol-Binding Protein 4*), localizado no SSC 14, são expressos durante o alongamento da vesícula embrionária, um crítico período da gestação em suínos, sendo que ambos genes possuem importante papel no aumento do tamanho da leitegada (Rothschild & Soller, 1999). Rothschild *et a* (2000) ressaltaram o efeito do gene RBP4 em 2.555 leitegadas de uma linhagem comercial de suínos, com efeito genético aditivo de 0,23 leitões/leitegada. Entretanto, nenhum efeito relacionado ao gene RARG foi verificado para o tamanho da leitegada.

O gene do receptor de prolactina (PRLR – *Prolactin Receptor Gene*) (SSC16) tem sido identificado em vários tecidos, sendo considerado um candidato para tamanho da leitegada, devido seu papel na rota da Prolactina (PRL) (Rothschild & Soller, 1999). A prolactina afeta a produção de progesterona, que é um hormônio produzido pelo corpo lúteo. O fator epidérmico de crescimento (EGF – *Epidermal Growth Factor*) foi estudado como candidato, baseando-se em sua função na fisiologia reprodutiva (Linville *et al.*, 2001), estimulando o crescimento e a proliferação de muitos epitélios (Hadley, 1996).

A prostaglandina-endoperóxido sintetase 2 (PTGS2 – *Prostaglandin-Endoperoxidase Synthase 2*), geralmente conhecida como ciclo-oxigenase 2 (COX 2), é uma enzima responsável pela produção de prostaglandinas (Lages, 1998) e possui importante papel no estabelecimento da gravidez, em suínos (Drogemuller *et al.*, 2001). Outro gene candidato para tamanho da leitegada em suínos é o hormônio folículo estimulante beta (FSH β - *Follicle-stimulating Hormone Beta*) cuja posição cromossômica no SSC 2 é p16-p12. Este hormônio atua no crescimento dos pequenos e médios folículos ovarianos (Mannaertz *et al.*, 1994). Embora não encontrando efeito genético aditivo no tamanho da leitegada associado a um marcador dentro da região genômica de FSH β , Linville *et al.* (2001) consideram este gene como candidato em estudos de prolificidade.

Além da análise de QTL e genes candidatos, a análise de seqüências transcritas também tem sido empregada na identificação e caracterização de genes desconhecidos, em que há possibilidade de determinar a expressão dos genes em diferentes tecidos e em diferentes estádios do desenvolvimento (Adams *et al.*, 1991). Esta análise tem sido uma importante ferramenta para a seleção e identificação de genes candidatos (Fahrenkrug *et al.*, 2002). Com relação aos tecidos reprodutivos, encontram-se descritas 21.499 seqüências expressas estudadas em parcerias por vários grupos de pesquisa (PigESTs, 2007).

Bonnet *et al* (2006), utilizando hibridização subtrativa, identificaram a expressão diferencial de genes em células da granulosa de suínas, tratadas com FSH, em comparação com células isoladas de folículos ovarianos imaturos. Duas bibliotecas foram geradas e 501 clones foram obtidos inicialmente, sendo que 76 foram seqüenciados. Nesses genes, foram observadas correspondências com 55 genes diferentes. Os autores verificaram cinco genes, que geralmente são regulados pelo hormônio FSH: HP1-BP74, cox-2, CCT3, SCARB1 e GPX3, dentre outros genes que não foram identificados, podendo tratar-se de novos genes, sendo, portanto, necessários futuros estudos para sua identificação.

Outro estudo envolvendo folículos ovarianos de suínos foi realizado por Caetano *et al* (2003), que analisaram seqüências diferencialmente expressas em duas bibliotecas normalizadas de cDNA de fêmeas com alta e baixa taxa de ovulação. Foram avaliados folículos sem nenhum tratamento e folículos submetidos à ação do hormônio PGF2 α (após os seis primeiros dias da injeção hormonal). Os autores obtiveram 5.231 seqüências provenientes da biblioteca de cDNA. Dentre essas seqüências, 3.479 eram *clusters* e 2.661 seqüências únicas. Por meio da análise BLASTN (NCBI, 2007) dos 3.479 *clusters*, 1.037 (29,8%) seqüências não apresentaram homologia com nenhuma seqüência depositada no GenBank (NCBI, 2007). No entanto, a maioria das ESTs observadas apresentou homologia com outras ESTs depositadas no banco de dados. Observou-se um total de 59 proteínas ribossomais ao longo dos clones seqüenciados, indicando significativa amostra das mensagens expressas nos folículos ovarianos.

Faherenkrug *et al.* (2002), visando maximizar a coleção de seqüências únicas e a diversidade de genes em suínos, analisaram duas bibliotecas normalizadas de cDNA, derivadas de tecidos embrionário (MARC 1PGI) e reprodutivo (MARC 2PGI) e obtiveram um total de 66.245 clones depositados no GenBank. A partir desse resultado, foi obtido em total de 15.616 tentativas de seqüências consenso e 31.466 seqüências únicas. Com a *clusterização* das análises, observou-se um baixo número de seqüências redundantes na biblioteca subtrativa. No seqüenciamento da biblioteca MARC 1PGI, dois genes foram identificados em maior freqüência: APEH (*N-Acylaminoacil-Peptide Hydrolase*) e EF1 α , enquanto na biblioteca MARC 2PGI foram encontrados, em maior freqüência, os genes COL3A1 (*Collagen Type III Alpha 1*) e NUMA 1 (*Nuclear Mitotic Apparatus Protein 1*).

2.5. PCR quantitativo em tempo real

A análise das seqüências transcritas de um tecido tem sido empregada na caracterização de genes desconhecidos, possibilitando a determinação de sua expressão em diferentes tecidos e diferentes estádios do desenvolvimento (Adams *et al.*, 1991; Hatey *et al.*, 1998). Estudos de expressão gênica vêm sendo empregados em vários organismos. como humanos, ratos, suínos, bovinos e outras espécies. A maioria dos estudos em suínos e bovinos tem a finalidade de identificar e caracterizar genes relacionados a características economicamente importantes, como no caso das reprodutivas e aquelas relacionadas à resistência a doenças, sendo esta uma importante ferramenta para a seleção e avaliação de genes candidatos (Faherenkrug *et al.*, 2002).

Como a prolificidade em suínos é uma característica complexa, muitos genes estão envolvidos em sua expressão. Dentre as metodologias disponíveis para a identificação e expressão de determinados genes, encontra-se a análise genômica funcional, que possibilita caracterizar os padrões de expressão de mRNA e proteína e tem demonstrado ser uma estratégia muito informativa. O produto inicial da expressão gênica em um organismo é denominado transcriptoma e refere-se ao conjunto de RNA mensageiro, cuja informação é requerida pela célula em um determinado momento (Binneck, 2004). Portanto o

a quantidade de mRNA é um indicativo da expressão de um determinado gene (Hocquette, 2005).

Dentre as técnicas que possibilitam estudar os transcriptomas, a análise de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), tem se mostrado uma poderosa ferramenta na quantificação da expressão gênica (Livak & Schmittgen, 2001; Wong & Medrano, 2005). Esta técnica monitora a reação de PCR ciclo a ciclo; assim, os dados são coletados desde o início até o fim do processo de amplificação. Desta forma, a análise em tempo real combina amplificação, detecção e quantificação em um único passo (Wong & Medrano, 2005).

Esta técnica associa a amplificação do gene alvo em cada ciclo com a emissão de fluorescência. Assim, a quantidade gerada de produto gênico é proporcional à quantidade de fluorescência emitida (Bustin & Nolan, 2004; Wong & Medrano, 2005). Várias metodologias para amplificação em qPCR vêm sendo desenvolvidas e variam quanto à especificidade do alvo de amplificação, custo e precisão. Dentre elas, pode ser citado o sistema *SYBR Green* que é um fluoróforo com sistema de detecção não específico, que se liga em qualquer dupla fita de DNA gerada durante a reação de PCR, emitindo fluorescência (Bustin & Nolan, 2004; Bustin, 2002).

A análise comparativa da expressão do mRNA de genes de interesse em diferentes células ou tecidos, requer métodos de normalização acurados. Para tanto, são necessários genes de caráter constitutivo, os quais mantêm as funções celulares básicas com mRNA expresso em todos os tipos celulares e estágio de desenvolvimento (Bas *et al.*, 2004). Estes genes são denominados como genes referência, ou controle endógeno, em que as mensurações no final da reação de PCR são estimadas a partir dele, evitando-se, assim, erros comumente associados a tais sistemas de amplificação. Vários são os genes referência utilizados, sendo os mais comuns: β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT) e o RNA ribossomal (rRNA) 18S (Huggett *et al.*, 2005).

Independente da metodologia utilizada, as reações de PCR são caracterizadas por um ponto no ciclo, no qual a amplificação é primariamente detectada, durante a fase exponencial da amplificação. Este ponto, denominado “ciclo limiar” (*Threshold Cycle* - Ct), é aquele em que a intensidade de fluorescência da amostra é maior que o *background* de fluorescência, sendo

este valor inversamente proporcional à quantidade de material inicial para amplificação (Bustin & Nolan, 2004).

Em função do Ct obtido em cada amostra, duas estratégias de quantificação podem ser empregadas: a quantificação absoluta ou a quantificação relativa. A quantificação absoluta do número de cópias de mRNA é determinada pela construção de uma curva padrão. A quantificação relativa, ou método comparativo, é baseada na comparação da expressão do gene alvo com a referência interna por meio dos Cts de cada amostra (Pfaffl *et al.*, 2002).

A alta sensibilidade desta técnica elimina a necessidade de qualquer passo após a amplificação, reduzindo as chances de contaminação e o aparecimento de resultados falso-positivos (Wacker & Godard, 2005; Wong & Medrano, 2005), podendo ser utilizada para determinar a presença ou ausência de um determinado transcrito, comparar níveis de mRNA em diferentes amostras, para caracterizar padrões de expressão de mRNAs e para discriminação entre mRNAs bem relacionados (Corrêa & Lima, 2005). A técnica de qPCR ainda pode ser utilizada na detecção de mutações e variantes alélicas em diagnósticos moleculares (Bustin, 2000)

2.6. Genes selecionados para análise

A metodologia de qPCR requer conhecimento prévio dos genes que afetam a característica a ser avaliada. Dentre os genes disponíveis no *GenBank* para características reprodutivas em suínos, os genes $PGF_{2\alpha}$ (prostaglandina $F_{2\alpha}$), FSHR (receptor do hormônio folículo estimulante), STAR (proteína esteroidogênica regulatória aguda), P4R (receptor de progesterona 4), CYP19 (citocromo aromatase P450) e GATA (proteína de ligação GATA 4) estão envolvidos em um grande número de processos fisiológicos reprodutivos.

A $PGF_{2\alpha}$ é um forte agente luteolítico em um grande número de espécies, tem sido implicada como moduladora da pressão intra-ocular e pode ser importante na contração da musculatura lisa do útero e de outros tecidos. Não há informação quanto à localização cromossômica deste gene em suínos. Em humanos, o gene $PGF_{2\alpha}$ foi mapeado na posição 9 q34.2-q34.3 e, em

bovinos, no cromossomo 11 (NCBI, 2007). A ação da $PGF_{2\alpha}$ na célula, como no caso do processo de regressão do corpo lúteo, é primariamente, se não exclusivamente, mediada pela associação com o receptor de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (FPr), que é uma proteína G-ligada contendo sete domínios transmembrana e parece ser codificada por um único gene. (Anderson *et al.*, 2001; Boonyaparakob *et al.*, 2003).

Outro gene relevante é o que codifica para o receptor do hormônio FSH, que participa no controle da síntese ovariana de estrógenos. O FSHR foi mapeado no SSC 3 na posição q2.2-q2.3, por Remy *et al.* (1995). O hormônio FSH é um heterodímero pertencente à família das glicoproteínas e possui duas subunidades, alfa e beta, cada uma codificada por distintos genes, sendo que a subunidade beta oferece especificidade (Linville *et al.*, 2001). Este é considerado, em suínos, como melhor indutor da taxa de ovulação devido sua atuação na maturação dos pequenos e médios folículos ovarianos e por inibir a apoptose das células da granulosa (Cárdenas & Pope, 2002). Em suínos, o FSH regula positivamente a transcrição para a produção do mRNA do FSHR e, negativamente, a expressão de seu receptor (Sites *et al.*, 2007).

Na avaliação das características reprodutivas, outro gene importante é o P4R, cuja localização se dá no SSC 9p13-p11 (NCBI, 2007). O receptor de progesterona é uma proteína intracelular, que medeia os efeitos da progesterona (Ying *et al.*, 2000). Este hormônio possui papel-chave no estabelecimento e na manutenção da prenhez, coordenando uma série de passos interativos, iniciando com a pré-implantação, a implantação e a manutenção do embrião no útero materno (YING *et al.*, 2000). Sua secreção é, primariamente, estimulada pelo LH e atua sinergicamente com o estrogênio, na manifestação do cio. No entanto, em níveis elevados, a progesterona provoca a inibição do cio e do pico pré-ovulatório de LH, possuindo, assim, um importante papel na regulação hormonal do ciclo estral, além de inibir a mortalidade embrionária (Hafez & Hafez, 2004). A expressão do gene que codifica para P4R é regulada, positivamente, pelo estrogênio (*up-regulation*) e negativamente pela progesterona (*down-regulation*) na maioria dos tecidos (Bouchard, 1999).

O gene GATA-4 codifica uma proteína, que é membro de um grupo de fatores de transcrição, estruturalmente, relacionados com o controle da

expressão gênica e a diferenciação de vários tipos celulares. Em humanos, este gene encontra-se localizado na posição cromossômica 8p23.1-p22 (NCBI, 2007). Membros desta família de proteínas de ligação ao DNA (*DNA-binding proteins*) reconhecem a seqüência consenso conhecida como GATA, que é um elemento *cis* essencial, localizado nos promotores e *enhancers* de uma gama de genes (ARCECI *et al.*, 1993). Um exemplo é o gene STAR, cuja expressão é mediada por vários fatores de transcrição, dentre os quais se encontra o GATA 4 (Lavoie *et al.*, 2004).

A proteína codificada pelo gene STAR possui papel-chave na regulação da síntese dos hormônios esteróides pelo aumento da conversão do colesterol em pregnenolona. Esta proteína permite a clivagem do colesterol em pregnenolona, mediando o transporte do colesterol da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna. Em suínos, não há descrição quanto à localização cromossômica deste gene. No entanto, o gene STAR foi mapeado no cromossomo 8p11.2 de humanos e no cromossomo 27 de bovinos (NCBI, 2007).

No ovário, a mensagem e a proteína STAR são reguladas, positivamente, durante a luteinização pós-ovulação das células foliculares no corpo lúteo, período em que ocorre aumento na síntese de progesterona. (Lavoie *et al.*, 2004).

Outro gene importante para o desenvolvimento folicular é o CYP19, cuja expressão codifica para a enzima chave na biossíntese de estrogênio, a Citocromo Aromatase P450 (P450_{aro}). As reações de hidroxilação e oxigenação na biossíntese dos hormônios esteróides são catalisadas por oxidases de função mista, que empregam NADPH, O₂ e citocromo mitocondrial P450 (Nelson & Cox, 2002). A aromatase catalisa a aromatização da androstediona e testosterona em estrona e estradiol, respectivamente. As células da granulosa são ricas em receptores para FSH, o qual tem papel chave no controle da atividade da P450_{aro} (Robel, 1993).

O gene CYP19 foi descrito, primeiramente, em humanos (localizado no cromossomo 15 na posição q21.1). Em bovinos, é expresso em diferentes concentrações e por diferentes promotores em células da granulosa e no corpo lúteo gravídico desses animais (Vanselow *et al.*, 2004). Em suínos o gene

CYP19 encontra-se localizado no SSC 1 (NCBI, 2007), sendo sua expressão regulada, positivamente, pelo estrogênio (Komar *et al.*, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de material

Foram coletadas amostras do líquido folicular de fêmeas de linhagem comercial, proveniente de um *tricross* das raças Large White, Landrace e Pietrain, alocadas na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Esses animais foram abatidos durante a fase folicular do ciclo estral no segundo semestre de 2006, Foram utilizadas três fêmeas hiperprolíficas (H) com média de 12,03 leitões por leitegada e três fêmeas classificadas como hipoprolíficas (L), que apresentaram 8,51 leitões por leitegada. Os dados relativos ao número de partições dos animais e ao número de leitões nascidos e nascidos vivos em cada parto, estão apresentados na Tabela 1.

Foram coletadas células foliculares por punção e aspiração folicular dos ovários das fêmeas L e fêmeas H por meio de seringa descartável de 5 mL

Foram aspirados folículos com diâmetro entre 5 e 10 milímetros. Após aspiração, as células foliculares foram peletizadas por centrifugação do líquido folicular a 5200 g durante 6 minutos. Foram adicionados 500 µL de tampão fosfato salino 1X (PBS 1X - *Phosphate Buffered Saline*) ao pelete, para lavagem e, posteriormente, o material foi novamente centrifugado a 5200 g durante 6 minutos. Este procedimento se repetiu por duas ou três vezes, dependendo do estado das células peletizadas. Após a lavagem, as células foram ressuspensas no tampão RLT, contendo β-mercaptoetanol (Kit RNeasy Mini Kit - Qiagen) para imediata extração do RNA total.

3.2. Dados fenotípicos

Na Tabela 1, são apresentados o número de partos de cada fêmea e, conseqüentemente, o número de leitões nascidos e o número de leitões nascidos vivos em cada parição.

Tabela 1 - Número de partições de cada fêmea avaliada e o número de leitões nascidos e nascidos vivos referente a cada parto.

Fêmea	1° Parto		2° Parto		3° Parto		4° Parto		5° Parto		6° Parto		7° Parto	
	NLN	NLNV	NLN	NLNV	NLN	NLN	NLNV	NLNV	NLN	NLNV	NLN	NLNV	NLN	NLNV
H ₁ (200)	14	14	6	5	17	15	16	15	13	12				
H ₂ (694)	11	9	15	12	13	13	17	17	14	11				
H ₃ (1593)	12	11	12	11	12	12	14	13	15	13	10	9		
L ₁ (674)	9	7	10	10	3	2	9	9	9	7	13	12	11	11
L ₂ (743)	9	9	7	7										
L ₃ (1207)	9	9	13	10	10	8	10	10						

NLN - Número de Leitões Nascidos; NLNV - Número de Leitões Nascidos Vivos.

As médias dos dados fenotípicos dos animais, referentes ao número de leitões nascidos (NLN) e número de leitões nascidos vivos (NLNV), bem como e o número de células foliculares (NCF) presentes no líquido folicular de cada fêmea são apresentados na Tabela 2. O cálculo da diferença entre as médias baseou-se no Teste T de Student.

Tabela 2 - Médias dos dados fenotípicos das porcas analisadas

Fêmeas	NLN	NLNV	NCF/mL
H ₁ (200)	13,2	12,2	4,8 x 10 ⁶
H ₂ (694)	14,0	12,4	3,6 x 10 ⁶
H ₃ (1593)	12,5	11,5	2,8 x 10 ⁶
L ₁ (674)	9,24	8,29	1,4 x 10 ⁶
L ₂ (743)	8,0	8,0	3,8 x 10 ⁶
L ₃ (1207)	9,25	9,25	4,2 x 10 ⁶

NLN - Número de Leitões Nascidos; NLNV - Número de Leitões Nascidos Vivos; NCF - Número de Células da Foliculares por mL de solução.

3.3. Quantificação das células

Após a lavagem, com o material em suspensão no tampão PBS 1X, o número de células foliculares presentes na solução foi estimado para extração do RNA total por meio de Câmara de Neubauer. Foi coletada uma alíquota das células em suspensão, a qual foi diluída na proporção de 1:20 no tampão PBS 1X. Esse material foi utilizado para preencher os dois compartimentos de contagem da câmara. Como a suspensão inicial foi diluída, o número de células contadas em toda câmara de contagem foi igual à média do número de células presentes nos dois compartimentos da câmara multiplicada pelo fator de diluição. Para obter o número de células por mL de solução, o valor encontrado para as células foi multiplicado por 1.000, pois, 1 mL equivale a 1.000 mm³ e, posteriormente, foi multiplicado por 10, pois, na câmara é obtido

o número de células por 0,1 milímetro cúbico (mm³), assim o valor foi multiplicado por 10.000 (Ferreira-Neto *et al.*, 1997). Portanto, tem-se

$$\text{N}^\circ \text{ de Células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células} \times 20 \times 10.000}{2}$$

3.4. Extração do RNA total

O RNA total das amostras de células foi extraído, utilizando-se o Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) e seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células em suspensão foram peletizadas e ressuspendidas em tampão RLT mais β -mercaptoetanol (98%) para lise celular, sendo que, em cada 1 mL de tampão, foram adicionada 10 μ L β -mercaptoetanol. Ao lisado, adicionou-se álcool etílico 70% e todo volume foi adicionado à coluna Rneasy, onde o RNA ligou-se ao suporte por afinidade (fase estacionária). Foi realizado um tratamento com DNase liofilizada, a qual foi diluída em 550 μ L de água livre de RNase. À coluna, foram adicionados 80 μ L da solução, contendo 10 μ L de DNase mais 70 μ L de tampão RDD, fornecidos pelo Kit RNase-Free DNase set (Qiagen).

A coluna foi lavada com o tampão RPE por duas vezes e o RNA ligado à coluna foi eluído em 30 μ L de água livre de RNase por centrifugação a 5000 g, durante três minutos. Foram adicionados mais 30 μ L de água livre de RNase à coluna para uma nova eluição, obtendo-se um total de 60 μ L de solução final. O RNA total obtido foi quantificado por espectrofotometria, sendo a relação OD₂₆₀/OD₂₈₀ utilizada para avaliação da qualidade, pois, devido às baixas concentrações do material, não foi possível visualiza-lo e avaliar a qualidade em gel. O RNA foi armazenado a -70°C até o momento de seu uso.

3.5. Síntese do cDNA

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), foi feito um *pool* das amostras, que consiste na junção do RNA total dos animais da mesma classe. Assim, foi obtida uma amostra com material das fêmeas L e outra com material das fêmeas H, diluídos na mesma concentração.

Tendo como molde o RNA total, a primeira fita foi sintetizada, utilizando-se o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), sendo que onde em 6 μL de RNA total foram adicionados 1 μL oligo(dT)₂₀ (50 μM) e 1 μL de *Anneling Buffer*, correspondendo a um volume total de 8 μL . A reação foi incubada a 65°C durante 5 minutos e, posteriormente, incubada em gelo por 1 minuto.

Em seguida, foram adicionados 10 μL de 2X *First-Strand Reaction Mix* e 2 μL de *SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix* (Invitrogen). A reação foi incubada à temperatura de 50°C durante 50 minutos e a 85°C por 5 minutos para inativação enzimática, sendo, então, resfriada no gelo.

As concentrações médias do cDNA das amostras foram analisadas por espectrofotometria, e corresponderam a 769,07 ng/ μL para as fêmeas hiperprolíficas e 908,23 ng/ μL para as fêmeas hipoprolíficas. O cDNA fita simples foi estocado a -20°C até o uso na reação de qPCR.

3.6. Confeção dos sistemas de PCR em tempo real.

A análise da expressão dos genes STAR, CYP19, GATA, P4R, FSHR e PGF_{2 α} foi realizada, aplicando-se a metodologia de qPCR. Para a confeção dos *primers* visando a amplificação dos genes estudados e do controle endógeno (gene β -actina), utilizou-se o programa PrimerQuest (Primer Quest, 2007) fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA). Todos os *primers* foram gerados a partir de seqüências, obtidas nos bancos de ESTs de suínos, sendo apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Conjuntos de *primers* empregados para cada gene analisado nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Numero de acesso (GenBank)	Primer	Tamanho dos fragmentos (pb)
β -Actina	AJ 312193	F - TCATGAAGATCCTCACGGAGCG R – CGTAGCAGAGCTTCTCCTTGATGT	89
STAR	NM_213755	F - TGTTTCATCCAGCCAGGAGCTTCA R - AACCAGAGTGGATGTTGCTGCAC	138
CYP19	S80148	F - TGAGGCAACAGGAGTCCTAAATG R - ATCTTGTGTTGCTTGATCTCAGGG	114
GATA	Nm_214293	F - CAAATCGAAGACGTCAGCAGGTC R - TCTGTCTTGATGGGACGCATCTCT	124
P4R	S49016	F - AGCTCACAGCGTTTCTACCAGCTT R – GGAAATTCAACACTCAGTGCCCG	123
FSHR	Nm_214386	F - AGAACTTCCGCAGGGATGTCTTCA R - TTGGATGAATGTTGTGGGCAGTGG	111
PGF _{2α}	Ab115763	F - TGACTACAAGAACTACGCCCTGCT R – AGACAATGCCGTCCTCTGTGAAG	168

STAR – Proteína Esteroidogênica Regulatória Aguda; CYP19 – Citocromo P450; GATA – Proteína de Ligação 4; PGF_{2 α} – Prostaglandina F_{2 α} ; FSHR – Receptor do Hormônio Folículo Estimulante; P4R – Receptor de Prostaglandina .

3.7. Análise de RT-PCR em tempo real

As reações de qPCR foram feitas utilizando-se o termociclador SDS ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, C.A., USA). Foi escolhido o método da quantificação relativa, sendo utilizado como controle endógeno, o gene da β -actina e como detecção o sistema SYBR® Green (Bio-Rad, CA). As reações de qPCR foram feitas em replicata para o controle endógeno e para os genes alvo.

Antes da quantificação em tempo real, foram testadas as concentrações de *primer* e de DNA, que permitiram a melhor eficiência de reação tanto para

os genes alvo quanto para o gene da β -actina. Foram testadas quatro diluições de cDNA (200, 100, 10 e 1 ng) e três diluições de *primer* (400, 200 e 100 nM). A concentração de cDNA para a amplificação foi otimizada em 200 ng para o gene PGF2 α (Prostaglandina F2 α) e 100 ng para os demais genes. Na Tabela 4, apresenta-se a concentração de *primer*, a temperatura de dissociação (TD) e o valor do coeficiente de determinação (R²) da análise de regressão para cada gene, incluindo o controle endógeno.

A técnica de qPCR requer que a eficiência da reação, tanto para os genes alvo quanto para o controle endógeno, seja similar e alta. A eficiência da reação foi calculada de acordo com Livak & Schmittgen (2001), sendo é construída uma curva-padrão, gerada a partir da diluição serial do cDNA.

Os componentes para cada reação foram 12,5 μ L de 2X SYBR® Green Supermix (tampão, dNTPs, MgCl₂, SYBR® Green e Taq DNA polimerase), 100, 200 ou 400 nM de cada *primer*, e 100 ou 200 ng de cDNA em um volume final de 25 μ L (Tabela 3), para construção da curva de dissociação.

Para a análise de quantificação relativa de cada gene, foram feitas reações em tubos individuais, sendo assim, não foram realizadas reações *multiplex*, pois, como fluoróforo, foi utilizado o SYBER GREEN. As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 3 minutos para ativação da Taq polimerase; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos; e anelamento e extensão a 60°C durante 60 segundos. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, a fim de validar a ausência de produtos não específicos e dímeros de *primers*. As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 30 segundos, partindo de 60°C até atingir o limite de 94°C.

Os resultados, obtidos com a análise de expressão do alvo e da referência endógena, foram comparados diretamente. A normalização da expressão gênica foi feita por do meio método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), em que

$$\Delta C_T = C_T (\text{alvo}) - C_T (\text{referência})$$

Onde: Alvo – Gene Analisado

Referência – Controle Endógeno (β -Actina)

O valor obtido foi, então, multiplicado por 1.000 para efeito de escala. Foram amplificadas duas repetições de cada *pool* para cada gene e foram calculados o desvio-padrão e o coeficiente de variação entre as duas repetições. As amostras cujo coeficiente de variação excedia 5% foram refeitas, tanto para o gene alvo quanto para o controle endógeno. Diferenças de expressão iguais ou superiores a 1,5 vezes entre as fêmeas de alta e de baixa prolificidade foram consideradas como diferencialmente expressas.

Tabela 4 – Concentração de *primer*, temperatura de dissociação (TD) e coeficiente de determinação (R^2) para cada gene analisado.

Gene	<i>Primer</i> (nM)	TD (°C)	R^2	Concentração de cDNA (ng)
β -Actina	200	85,6	0,91	100
STAR	200	80,4	0,78	100
CYP19	200	80,0	0,84	100
GATA	400	87,3	0,86	100
P4R	400	80,2	0,95	100
FSHR	200	80,5	0,96	100
PGF2 α	400	80,5	0,68	200

STAR – Proteína Esteroidogênica Regulatória Aguda; CYP19 – Citocromo P450; GATA – Proteína de Ligação 4; PGF2 α – Prostaglandina F2 α ; FSHR – Receptor do Hormônio Folículo Estimulante; P4R – Receptor de Prostaglandina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias do NLN e do NLNV para o grupo L foram respectivamente 9,21 e 8,51, enquanto para o grupo H as médias foram 13,23 e 12,03 respectivamente. Quando comparadas pelo teste T de Student, as médias de NLN e de NLNV se mostraram significativamente diferentes entre os grupos L e H ($P < 0,01$).

Após a constituição do *pool* gênico H e L, foi realizada a análise da expressão relativa de cada gene. Os valores da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação (CV), baseados nos valores do “ciclo limiar” (Cycle Threshold – Ct) dos genes β -Actina, STAR, CYP19, GATA, $PGF_{2\alpha}$, FSHR e P4R nas células foliculares das amostras L e H são apresentados nas tabela 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 – Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos genes β -Actina, STAR, GATA, $\text{PGF}_{2\alpha}$, P4R, FSHR e CYP19 baseados nos valores de Ct das porcas de baixa prolificidade.

Genes	C_t	XC_t	Desvio padrão	CV (%)	ΔC_t	$2^{-\Delta C_t}$	x1000
β -Actina	24,95 25,11	25,03	0,11	0,45			
STAR	24,35 23,01	23,68	0,95	4,00	-1,35	2,55	2549,12
CYP19	24,51 25,13	24,82	0,44	1,77	-0,21	1,16	1156,69
GATA	28,05 27,25	27,65	0,57	2,05	2,62	0,16	162,67
P4R	28,6 28,25	28,425	0,25	0,87	2,25	0,21	210,95
FSHR	29,79 29,09	29,44	0,49	1,68	4,41	0,05	47,04
$\text{PGF}_{2\alpha}$	31,15 30,42	30,79	0,52	1,68	5,76	0,02	18,52

STAR – Proteína Esteroidogênica Regulatória Aguda; CYP19 – Citocromo P450; GATA – Proteína de Ligação 4; $\text{PGF}_{2\alpha}$ – Prostaglandina $F_{2\alpha}$; FSHR – Receptor do Hormônio Folículo Estimulante; P4R – Receptor de Prostaglandina;

C_t – *Cycle Threshold* (Ciclo Limiar);

XC_t – Média dos Cts;

$\Delta C_t = C_T$ (alvo) - C_T (referência)

$2^{-\Delta C_t}$ – Unidades arbitrárias

Tabela 6 – Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos genes β -Actina, STAR, GATA, $PGF_{2\alpha}$, P4R, FSHR e CYP19 baseados nos valores de Ct das porcas de alta prolificidade.

Genes	C _t	XC _t	Desvio Padrão	CV (%)	Δ Ct	$2^{-\Delta$ Ct	x1000
β -Actina	26,28 26,08	26,18	0,14	0,54			
STAR	26,23 25,86	26,05	0,26	1,00	-0,14	1,10	1098,09
CYP19	27,19 27,15	27,17	0,03	0,10	0,99	0,50	503,48
GATA	30,19 29,82	30,01	0,26	0,87	3,83	0,07	70,56
P4R	28,6 28,25	28,43	0,25	0,87	2,25	0,21	210,95
FSHR	30,69 29,35	30,02	0,96	3,16	3,84	0,07	69,83
$PGF_{2\alpha}$	33,33 33,55	33,44	0,16	0,47	7,26	0,01	6,52

STAR – Proteína Esteroidogênica Regulatória Aguda; CYP19 – Citocromo P450; GATA – Proteína de Ligação GATA 4; $PGF_{2\alpha}$ – Prostaglandina F_{2 α} ; FSHR – Receptor do Hormônio Folículo Estimulante; P4R – Receptor de Prostaglandina;
Ct – Cycle Threshold (Ciclo Limiar);
XCt – Média dos Cts;
 Δ CT= CT (alvo) - CT (referência)
 $2^{-\Delta$ Ct – Unidades arbitrárias

A maioria das amostras apresentou coeficiente de variação relativamente baixo (<5%), sugerindo boa qualidade para a análise de expressão, sendo a maior variação registrada para o gene STAR no *pool* das fêmeas com baixa prolificidade (4%).

Na literatura disponível, não foram observados relatos de outros estudos de expressão dos genes, aqui descritos, em suínos. Os genes STAR, GATA, $PGF_{2\alpha}$, P4R, FSHR e CYP19 foram escolhidos, a partir de dados obtidos nos bancos de ESTs de suínos, enquanto as diferenças da expressão de cada gene, representadas pelo valor relativo de $2^{-\Delta$ Ct (unidades arbitrárias), está

apresentada em medidas relativas, pelo número de vezes que cada gene se expressa mais no *pool*/L do que no *pool*/H (Tabela 6).

Tabela 6 – Diferença relativa da expressão dos genes STAR, GATA, PGF₂ α , P4R, FSHR e CYP19.

Genes	Diferença Relativa
	L/H
STAR	2,32
CYP19	2,30
GATA	2,31
P4R	7,73
FSHR	0,67
PGF ₂ α	2,84

STAR – Proteína Esteroidogênica Regulatória Aguda; CYP19 – Citocromo P450; GATA – Proteína de Ligação GATA 4; PGF₂ α – Prostaglandina F₂ α ; FSHR – Receptor do Hormônio Folículo Estimulante; P4R – Receptor de Prostaglandina.

O ciclo estral é coordenado por uma série de passos e interações hormonais, que iniciam o crescimento folicular e culminam na ovulação do oócito fértil. Devido à importância hormonal na taxa de ovulação, os genes selecionados para análise são codificadores de hormônios, de receptores hormonais, de proteínas e de enzimas, que participam na biossíntese de alguns esteróides, bem como de genes que participam na regulação da expressão de outros genes.

Dentre os genes analisados, a maior diferença de expressão foi verificada para o gene P4R, que foi expresso 7,73 vezes a mais nos animais com baixa prolificidade do que naqueles com alta. O P4R medeia os efeitos fisiológicos da progesterona, que é o principal hormônio produzido pelo corpo lúteo, sendo responsável pela implantação e manutenção da prenhez em

mamíferos, em que possui papel-chave numa série de passos coordenados, que estendem-se do início ao fim da implantação do embrião no útero materno (Ying *et al.*, 2000).

Peralta *et al* (2005) analisaram a expressão dos receptores de progesterona no oviduto de fêmeas suínas durante a fase folicular e a fase luteal do ciclo estral. Os autores afirmam que os maiores moduladores fisiológicos da concentração do P4R são os hormônios ovarianos estrogênio (*up-regulation*) e progesterona (*down-regulation*). Os animais com baixa prolificidade apresentaram maior expressão do gene P4R do que os animais com alta prolificidade e, caso todo mRNA seja traduzido a proteína, esses animais podem possuir baixas concentrações de progesterona, pois, este hormônio controla, negativamente, o nível do seu receptor e, como este hormônio é essencial à manutenção da prenhez, isto pode estar afetando a taxa de concepção desses animais.

Posterior ao gene P4R, a maior diferença de expressão foi encontrada para o gene $PGF_{2\alpha}$, que expressou 2,84 vezes a mais nas fêmeas hipoprolíficas. A prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) é o principal hormônio responsável pela luteólise ou regressão do corpo lúteo e conseqüente entrada na fase folicular, quando os níveis de $PGF_{2\alpha}$ começam a reduzir. Este comportamento hormonal é essencial à manifestação do cio na maioria dos mamíferos (McCracken *et al.*, 1999).

A liberação da $PGF_{2\alpha}$ é induzida pela ocitocina luteal (Hafez & Hafez, 2004), sendo sua ação mediada pela ligação ao receptor de membrana, que é uma proteína G-ligadora denominada FPr. No final da fase luteolítica, é observado um aumento no número de FPr no corpo lúteo e uma reduzida concentração do hormônio $PGF_{2\alpha}$ (McCracken *et al.*, 1999). No entanto, a quantidade de $PGF_{2\alpha}$ não pode ser somente explicada pelo número de receptores, mas, também pela expressão de outros mediadores.

A $PGF_{2\alpha}$ é, particularmente, potente na interrupção da prenhez em fase inicial (Hafez & Hafez, 2004) sendo que este fato pode estar influenciando o tamanho da leitegada dos animais hipoprolíficos. Outro fato, evidenciando que altas concentrações de Prostaglandina $F_{2\alpha}$ podem estar afetando a manutenção da prenhez, nas porcas de baixa prolificidade, é que em suínos o

corpo lúteo é importante na manutenção da gestação, sendo que sua remoção resulta na terminação deste período, o que não é observado em outras espécies em que, somente, a placenta mantém esse evento (Pillon *et al.*, 1997) e como este hormônio atua na luteólise, isto pode estar prejudicando diretamente esses animais.

O gene STAR expressou 2,32 vezes a mais nos animais com baixa prolificidade. Este gene codifica para uma proteína, que regula positivamente a síntese de hormônios esteróides (esteroidogênese) durante a luteinização, antes da entrada no cio. Os tecidos envolvidos na esteroidogênese são o corpo lúteo e a placenta (Pilon *et al.*, 1997).

A proteína STAR participa deste evento facilitando o transporte de colesterol na membrana mitocondrial, aumentando, assim, a conversão de colesterol em pregnenolona (Lavoie *et al.*, 2004). A pregnenolona é um precursor de outros hormônios, dando origem à progesterona e esta, por sua vez, aos estrógenos e aos andrógenos. A esteroidogênese, nos folículos ovarianos, ocorre tanto nas células da teca, onde há conversão do colesterol em progesterona e, em seguida, testosterona, quanto nas células da granulosa, as quais importam os andrógenos das células da teca para a síntese de estrógenos (Robel, 1993).

A transcrição do gene e a tradução do mRNA de STAR, em suínos, são reguladas positivamente, durante a luteinização pós-ovulatória das células foliculares no corpo lúteo, período diretamente relacionado ao aumento da síntese de progesterona. Estudos indicam que a expressão do STAR é regulada, positivamente, pelas gonadotrofinas, FSH e LH, sendo que a estimulação mais prolongada da mensagem para o STAR ocorre pelo LH. O controle negativo se dá pela prostaglandina $F_{2\alpha}$ que aparece, suprimindo a expressão do mRNA para o gene STAR (Lavoie *et al.*, 2004). Neste caso, era esperado que o gene STAR se expressasse mais nos animais com alta prolificidade, pois, esses animais apresentaram menor expressão do gene que codifica para $PGF_{2\alpha}$, comparação com os animais que apresentam baixa prolificidade.

Levando-se em consideração que a expressão do gene STAR leva a produção de enzima, que participa na biossíntese de esteróides e, conforme os resultados de expressão do P4R, os animais com baixa prolificidade

apresentariam menores concentrações do mRNA para o hormônio progesterona, este resultado se contrapõe aos demais resultados de expressão. No entanto, como a análise em tempo real faz uso do mRNA, pode-se afirmar que a mensagem está sendo expressa, mas o mesmo não pode ser dito quanto à tradução da proteína ou quanto ao seu processamento, devido aos controles pós-transcricionais, que modulam o produto gênico gerado. Outro fato relevante é que as proteínas animais encontram-se em um estado dinâmico, sendo constantemente sintetizadas e degradadas. Caso esteja ocorrendo a tradução à proteína, esta pode possuir uma meia-vida curta o que impossibilita sua atuação na esteroidogênese, ou ainda, esta proteína poderia não estar agindo com eficácia no transporte do colesterol, ou estaria ocorrendo algum problema no restante da rota metabólica, não levando à produção de esteróides necessários à manutenção dos processos reprodutivos.

Outro gene que tem papel-chave na esteroidogênese é o CYP19, cuja expressão relativa foi 2,30 vezes a mais nas fêmeas hipoprolíficas. A expressão deste gene leva à produção da enzima Citocromo Aromatase P450 (P450_{aro}), que é responsável pela biossíntese de estrogênio (Robel, 1993). Baseado em estudos de expressão do CYP19 em células da granulosa de bovinos, Vanselow *et al.* (2005) afirmam que a expressão deste gene está associada a mecanismos epigenéticos, principalmente metilação no DNA. Vários estudos evidenciaram diferentes polimorfismos no gene CYP19, proporcionando diferenças étnicas em populações humanas (Kvitko *et al.*, 2004).

A expressão do gene CYP19 é regulada, positivamente, pelo estrogênio, sendo observados maiores níveis de expressão durante a fase folicular do ciclo estral, pois, os níveis deste hormônio foram aumentados para possibilitar a entrada no cio. Posteriormente, após a elevação do hormônio luteinizante (LH), observou-se que o nível de estrogênio decresceu, assim como a expressão deste gene nos folículos pré-ovulatórios de bovinos (Komar *et al.*, 2001).

O resultado de expressão deste gene indica que os animais com baixa prolificidade podem estar apresentando maiores concentrações de estrogênios, pois, o produto por ele codificado participa na conversão dos andrógenos em estrogênios. Pode-se aventar, ainda, que os animais com baixa prolificidade devem possuir maiores quantidades de estrogênio, responsável pela

manifestação do cio, pois sua expressão é controlada positivamente por este hormônio. No entanto, deve-se ainda verificar o “*background*” genético de cada indivíduo, devido aos polimorfismos identificados nesse gene levando a mecanismos epigenéticos de expressão (Kvitko *et al.*, 2004).

A expressão do gene GATA foi 2,31 vezes maior nas fêmeas hipoprolíficas. Este gene codifica para a proteína de ligação GATA-4 pertencente a um grupo de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de vários genes e a diferenciação de diversos tipos celulares. Membros dessa família de ligação ao DNA reconhecem a seqüência consenso, conhecida como motivo GATA-4, que é um elemento *cis* essencial, localizado nos promotores e *enhancers* de uma gama de genes (Arceci *et al.*, 1993). A expressão do mRNA GATA-4, segundo Arceci *et al.* (1993), é induzida pelo ácido retinóico e é tecido-específica, sendo observada no coração, no epitélio intestinal, no endoderma primitivo e nas gônadas, possuindo assim papel chave na expressão gênica nesses tecidos. O GATA-4 é expresso antes da diferenciação das células gonadais (Lavoie *et al.*, 2004), sendo extremamente importante para este evento.

O gene STAR possui a expressão mediada por vários fatores de transcrição, dentre os quais se encontra o GATA-4 (Lavoie *et al.*, 2004). O gene STAR apresentou maior expressão nos animais com baixa prolificidade, assim como gene GATA. No entanto, para ambos os genes, esperava-se que uma maior expressão fosse observada nos animais com alta prolificidade, pois, o gene GATA promove a expressão do gene STAR, o qual possui papel fundamental na biossíntese dos hormônios esteróides, importantes para a manutenção da prenhez em mamíferos.

Em contrapartida, na literatura disponível, não foram encontrados dados referentes à atuação do GATA-4 na regulação da expressão dos demais genes. Assim, como a maioria dos genes foram mais expressos nos animais com baixa prolificidade, este gene pode também estar regulando, positivamente, a expressão dos genes P4R, PGF_{2α} e CYP19, sendo necessário investigar sua atuação no controle transcricional destes genes.

O gene FSHR expressou 1,48 vezes a mais nos animais de alta prolificidade, aproximando-se do limiar estabelecido neste estudo para expressão diferencial que foi de 1,5. O hormônio folículo estimulante (FSH)

possui, como principal função, o crescimento dos pequenos e médios folículos ovarianos (Mannaert *et al.*, 1994; Hafez & Hafez, 2004). Este hormônio é um indutor do recrutamento folicular em suínos e inibidor da apoptose das células da granulosa, o que o colocaria como o principal regulador do desenvolvimento folicular e da taxa de ovulação em suínos, de acordo com Cárdenas & Pope (2002).

Em análise de genes candidatos para o tamanho da leitegada em suínos de raças chinesas, Li *et al.* (2000), consideraram o gene FSH β como *major gene* para esta característica, verificando efeitos positivos para o alelo favorável B com efeito estimado, em todos os partos em torno de um leitão, podendo ser aplicado na seleção assistida por marcador molecular para o melhoramento dessa característica.

A quantidade de mRNA para o FSHR é relativamente alta durante a fase inicial do desenvolvimento folicular. No entanto, esta concentração diminui consideravelmente, quando os folículos crescem e aproxima-se a ovulação. Cárdenas & Pope (2002) sugeriram pouca influência deste hormônio nos folículos pré-ovulatórios, em que a atuação central é do hormônio LH. Sites *et al.* (1994), em estudos com culturas de células da granulosa de suínos, afirmam que o gene que codifica para a proteína FSHR é regulado, negativamente, pelo FSH, ao passo que a síntese do mRNA para o FSHR e a biossíntese de progesterona são estimuladas positivamente.

Provavelmente, os níveis de mensagens para o FSHR encontravam-se baixos, devido ao estágio avançado de desenvolvimento dos folículos analisados (em média 5 a 10 mm), não evidenciando diferença significativa de expressão entre os *pools*, de acordo com o presente estudo. A condução de estudos do desenvolvimento folicular, em fases anteriores, poderia avaliar melhor a atividade deste gene em fêmeas hipo e hiperprolíficas.

É provável que a expressão dos genes tenha sido influenciada pela fase do ciclo reprodutivo, em que os animais foram analisados, a fase folicular do ciclo estral. Deve-se levar em consideração, ainda, que estudos que utilizam a metodologia de qPCR fazem uso do cDNA para quantificação da expressão gênica. Portanto, torna-se necessário que futuros estudos sejam conduzidos em nível de proteínas e de discriminação alélica, para reafirmação dos resultados apresentados.

Ainda deve-se levar em consideração, em estudos de tamanho da leitegada, que outros fatores inerentes à fêmea atuam, influenciando essa característica, como capacidade uterina, idade da fêmea, número de partos e morte ou sobrevivência embrionária. Além disso, devido à baixa herdabilidade, a maior variação fenotípica é atribuída aos fatores ambientais.

A expressão de um gene afetando uma característica quantitativa, como os fenótipos reprodutivos, deve ser analisada, durante todo o ciclo reprodutivo, pois, esta depende dos estádios de desenvolvimento do tecido em estudo e da vida do animal.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão dos genes STAR, GATA, PGF2 α , P4R e CYP19 em células da granulosa de fêmeas suínas, durante a fase folicular do ciclo estral possibilitou identificar diferenças de expressão entre animais com diferentes fenótipos reprodutivos.

As maiores expressões relativas dos genes STAR, GATA, PGF2 α , P4R e CYP19 foram verificadas, em os animais com menor número de leitões por leitegada (hipoprolíficas).

O gene FSHR não atingiu o limiar de diferença de expressão estabelecido no presente trabalho.

Não se pode afirmar se os genes estudados estão expressando somente a mensagem, ou se estão expressando o mRNA e a proteína.

Estudos proteômicos e de discriminação alélica tornam-se necessários, para confirmação dos resultados apresentados.

Há necessidade, ainda, de se verificar diferenças de expressão desses e de outros genes relacionados, durante as demais fases do ciclo reprodutivo das fêmeas com vistas ao melhor entendimento dos fenótipos produtivos em suínos.

6. REFERÊNCIAS

Arceci RJ, King AAJ, Simon MC, Orkin SH and Wilson DB (1993) A Retinoic acid-Inducible mouse GATA-4: GATA-Binding in Factor Transcription Expressed Endodermally and Heart Tissues Derived. *Mol Cell Biol* 13(4):2235-2246.

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombie WR and Venter JC (1991) Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and human genome project. *Science* 252:1651-1656.

Anderson LE, Wu LY, Tsai SJ and Wiltbank, MC (2001) Prostaglandin receptor in ovine corpus luteum *Biology of F Reproduction* receptor in the corpus luteum: recent in formation on the gene, messenger ribonucleic acid and protein. *Biol Reprod* 64:1041-1047.

Associação brasileira da indústria produtora e exportadora de carne suína (ABIEPCS), <http://www.abiepcs.org.br> (abril 26, 2007).

Bas A, Forsberg G, Hammarström S and Hammarstro M-L (2004) Utility of the Housekeeping Genes 18SrRNA, b-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-

Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 59, p. 566–573, 2004.

Basic local alignment and search tool (BLAST), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (abril 16, 2007).

Binneck E (2004) As ômicas: integrando a bioinformação. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 32:28-37.

Bonnet A, Frappart PO, Dehais P, Tosser-Kloper G and Hatey F (2006) Identification of differential gene expression in vitro FSH treated pig granulosa cells using suppression subtractive hybridization. *Biol Endocrin* 4(35):1186–1477.

Boonyaprakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh P and Almond GW (2003) Cloning of pig prostaglandin F (FP) receptor cDNA and expression of its mRNA in the corpora lutea. *Reproduction* 125:53–64.

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169-193.

Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29:23–39.

Bustin SA and Nolan T (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Techniques* 15:155-166.

Caetano AR, Johnson RK and Pomp D (2003) Generation and sequence characterization of a normalized cDNA library from swine ovarian follicles. *Mammalian Genome* 14:65-70.

Cárdenas H and Pope WF (2002) Control of ovulation rate in swine. *J Anim Sci*, v. 80, n. 1, p. 36-46

Chen P, Baas TJ, Mabry JW, Koehler KJ and Dekkers JCM (2003) Genetic parameters and trends for litter traits in U.S. Yorkshire, Duroc, Hampshire, and Landrace pigs. *J Anim Sci* 81:46–53.

Christenson RK (1993) Ovulation rate and embryonic survival in chinese meishan and white crossbred pigs. *J Anim Sci* 71:3060-3066.

Corrêa F and Lima A (2005) PCR quantitativo em tempo real. In: *Semana da Biologia*. UFV, Viçosa, 28 pp.

Drogemuller C, Hamann H and Distl O (2001) Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. *J Anim Sci* 79:2565–2570.

Drummond AE (2006) The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4(16):1-11.

Fahrenkrug SC, Smith TPI, Freking BA, Cho J, White J, Vallet J, Wise T, Roher G, Perteau G, Sultana R, Quachenbush J and Keele JW (2002) Porcine gene discovery normalized cDNA-library sequencing and EST cluster assembly. *Mammalian Genome* 13: 475-478.

Ferreira-Neto JF, Viana ES and Magalhães LM (1997) *Patologia Clínica Veterinária*. Rabelo e Brasil, Belo Horizonte, 279 pp.

Geisert RD, Zavy MT, Moffatt RJ, Blair RM and Yellin T (1990) Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *J Reprod Fert Supp* 40: 293–305.

Hafez ESE and HAFEZ B (2004) *Reprodução Animal*. 7rd edition. Mande, Barueri, 513 pp.

Hadley ME (1996) *Endocrinology*. 4 rd edition. Prentice Hall, Upper Saddle River.

Hatey F, Tosser-Klopp G, Cloucard-Martinato C, Mulsant P and Gasser F (1998) Expressed Sequence Tags for genes: a review. *Genet Select Evol* 30: 521-554.

Hocquette JF (2005) Where are we in genomics?. *J Physiol and Pharmac* 56(3):37-70.

Hu ZL, Dracheva V, Jang W, Maglott D, Bastiaansen J, Rothschild MF and Reecy JM (2005) A QTL resource and comparison tool for pigs: PigQTLdb. *Mammalian Genome* 15:792-800.

Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. *Genes and Immunity* 1-6.

Irgang R (1985) Estimativas de herdabilidade para características que compõem a produtividade anual de leitões por porca. Embrapa–cnpsa: CT/81.

Irgang R (1998) Limites fisiológicos do melhoramento genético de suínos. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia. Botucatu, 35. pp 337–353.

Johnson AL (2003) Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci* 78:185-201.

Johnson RK, Nielsen MK and Casey DS (1999) Responses in ovulation rate embryonal survival and litter traits in swine to 14 generations of selection to increase litter size. *J Anim Sci* 77: 541-557.

Komar CM, Berndtson AK, Evans ACO and Fortune JE (2001) Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17 α -hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod* 64:1797–1805.

Kvitko K, Nunes JCdeB and Hutz MH (2004) (TTTA) $_n$ polymorphism of CYP19 (aromatase gene) in Euro- and Afro-Brazilians. *Genet Mol Biol* 27(3):335-336.

Lavoie HA, Singh D and Hui YY (2004) Concerted Regulation of the Porcine Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene Promoter Activity by Follicle-Stimulating Hormone and insulin-Like Growth Factor I in Granulosa Cells Involves GATA-4 and CCAAT/ Enhancer Binding Protein. *Endocrinology* 145(7):3122–3134.

Li N, Zhao YF, Xiao L, Zhang FJ, Chen YZ, Dai RJ, Zhang JS and Shen SQ (1998) Candidate gene approach for identification of genetic loci controlling litter size in swine. In Proceedings of the 6th world congress on genetics applied to livestock production. Armidale, Australia, 26. pp 183-186.

Linville RC, Pomp D, Johnson RK and Rothschild MF (2001) Candidate gene analysis for loci affecting zed ovulation rate in swine. *J Anim Sci* 79:60–67.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method. *Elsevier Science* 25: 402–408.

Lopes PS Freitas RTF and Ferreira AS (1998) Melhoramento de suínos - Caderno Didático 37. Universidade Federal Viçosa, Viçosa, 39 pp.

McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC (1999) Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews* 79(2):263-324.

Mannaertz B, Uilenbrock J, Schot P and Leeuw Rde (1994) Folliculogenesis in hypophesectomized rats after treatment withre-combinant human follicle stimulating hormone. *Biol Reprod* 51(1):72–81.

Marques JA, Albuquerque AP, Prado IN, Negrão JA, Kutsunugi E and Sakuno MLD (2004) Metabólitos e hormônios plasmáticos de novilhas bubalinas confinadas em função do uso de promotor de crescimento ou esferas de chumbo no útero. *Acta Scientiarum* 26(2):225-232.

National animal genome research program - Pig genome coordination program (NAGRP), <http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>, (abril 27, 2007).

National center for biotechnology information (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>, (abril 16, 2007).

Nelson DL and Cox MM (2002) *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3 rd edition, 975 pp.

Peralta LE, OLarte M, Argañaraz M, Ciocca D and Miceli DC (2005) Progesterone receptors: their localization, binding activity and expression in the

pig oviduct during follicular and luteal phases. *Domestic Anim Endocrin* 28:74–84.

Pereira JCC (2001) *Melhoramento genético aplicado a produção animal*. 3 ed. FEPMVZ, Belo Horizonte, 555 pp.

Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. *Nucleic Acids Res* 30(9):36.

Pilon N, Daneau I, Brisson C, Ethier J-F, Lussier JG and Silversides DW (1997) Porcine and bovine steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression during gestation. *Endocrinology* 38(3):1085-1091.

Pires AV (2001) *Avaliação genética de características reprodutivas em suínos.. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 83 pp.*

Pires AV, Lopes PS, Torres RA, Euclides RF, Silva MA and Costa ARCda (2000) Tendências genéticas dos efeitos genéticos direto e materno em características reprodutivas de suínos. *Rev Bras Zootec* 29(6):1689-1697.

Integrated DNA Technologies (IDT), www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest/, (dezembro 10, 2006)

Rathje TA, Rohrer GA, Johnson RK (1997) Evidence for quantitative trait loci affecting ovulation rate in pigs. *J Anim Sci* 75:1486-1494.

Remy JJ, Mansais YL, Yerle M, Bozon V, Couture L, Pajot E, Grébert D and Salesse R (1995) The porcine follitropin receptor: cDNA cloning, functional expression and chromosomal localization of the gene. *Gene* 163:257-261.

Robel P (1993) Steroidogenesis: The enzymes and regulation of their genomic expression. In Thibault C, Levasseur MC and Hunter RHF (eds) *Reproduction in mammals and man*. Elipses, Paris, pp 135-142.

Rohrer GA, Ford JJ, Wise TH, Vallet JL and Christenson RK (1999) Identification of quantitative trait loci affecting female reproductive traits in a

multigeneration Meishan-White composite swine population. *J Anim Sci* 77:1385-1391.

Rothschild MF, Hu SI and Jiang Z (2007) Advances in QTL Mapping in Pigs. *J Biol Sci* 3:192-197.

Rothschild MF, Messer L, Day A, Wales R, Short T, Southwood O and Plastow G (2000) Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. *Mammalian Genome* 11:75-77.

Rothschild MF and Soller M (1999) Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. In *Simpósio internacional de genética e melhoramento animal*. UFV, Viçosa, pp 219-242.

Seaton G, Halley CS, Knott SA, Kearsley M and Visscher PM (2002) QTL express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* 18(2):339-340.

Sites CK, Patterson K, Jamison CS, Degen SJF and Labarbera AR (2007) Follicle-stimulating hormone (FSH) increases FSH receptor messenger ribonucleic acid while decreasing FSH Binding in Cultured Porcine Granulosa Cells. *Endocrinology* 134(1): 411-417.

Tilly JL (1996) Apoptosis and ovarian function. *J Reprod Fert* 1:162-172.

Torres-Filho RA, Torres RA, Lopes PS, Pereira CS, Euclides RF, Araújo CV, Silva MA and Breda FC (2005) Estimativas de parâmetros genéticos para características reprodutivas de suínos. *Arq Brás Med Vet Zootec* 57(5):684-689.

Vanselow J, Fürbass R, Rehbock F, Klautschek G and Schwerin M (2004) Cattle and sheep use different promoters to direct the expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene, Cyp19, during pregnancy. *Domestic Anim Endocrin* 27:99-114.

Vanderhyden BC, Telfer EE and Eppig JJ (1992) Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol Reprod* 46:1196–1204.

Wacker MJ and Godard MP (2005) Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using superscript III. *J Biomol Techniques* 16:266-271.

Wong ML and Medrano JF (2005) Real-time for mRNA quantification. *Biotechniques* 39(1):1-11.

Ying C, Yang Y-C, Hong W-F, Cheng WTK and Hsu W-L (2000) Progesterone receptor gene expression in preimplantation pig embryos. *J Endocrin* 143:697-703.