

VANESSA RICARDO DE FARIA

**EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES ANGIOGÊNICOS EM CORPO
LÚTEO E CÉLULAS DA GRANULOSA E CARACTERÍSTICAS
REPRODUTIVAS DE FÊMEAS DE LINHAGENS COMERCIAIS E DA
RAÇA PIAU**

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

Viçosa - Minas Gerais

2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F224e
2015 Faria, Vanessa Ricardo de, 1990-
Expressão gênica de fatores angiogênicos em corpo lúteo e
células da granulosa e características reprodutivas de fêmeas de
linhagens comerciais e da raça Piau / Vanessa Ricardo de Faria.
– Viçosa, MG, 2015.
ix, 51f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Suíno - Reprodução. 2. Estro. 3. Suíno - Melhoramento
genético. 4. Expressão gênica . I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação
em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 636.4

VANESSA RICARDO DE FARIA

**EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES ANGIOGÊNICOS EM CORPO
LÚTEO E CÉLULAS DA GRANULOSA E CARACTERÍSTICAS
REPRODUTIVAS DE FÊMEAS DE LINHAGENS COMERCIAIS E DA
RAÇA PIAU**

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

APROVADA: 27 de março de 2015

Prof. José Domingos Guimarães
(Coorientador)

Luiz Sergio de Almeida Camargo

Profa. Simone E. F. Guimarães
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, todas as bênçãos e proteção.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia por todas as oportunidades. Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

À Prof. Simone pela confiança e todos os ensinamentos. Aos Profs. JD, Paulo Sávio e Fabyano por todo o conhecimento compartilhado comigo ao longo desses últimos anos. Ao Luiz Sergio pelas suas importantes contribuições. Ao Rogério pelo seu apoio e auxílio em todos os momentos do experimento.

À minha família linda que eu amo tanto, meu pai Jorge e minha mãe Luzia, meus irmãos Augusto e Ana, vocês são minha base, meu exemplo e meu orgulho. Obrigado pela confiança e amor incondicional!

Ao meu namorado Pablo, pelo companheirismo, amor e atenção.

A toda turma e amigos da Granja de Melhoramento de Suínos, por todos os anos deliciosos de trabalho. Aos funcionários, aqui representados pelo Seu Zé, estagiários e alunos da Pós, principalmente ao Rogério e ao Breno. Sem vocês não seria possível concluir esse projeto e ter todo o aprendizado aprimorado.

Aos amigos do Labtec, principalmente o André, a Carol, o Walmir, a Darling e a Renatinha, que compartilharam comigo seus conhecimentos e foram meus companheiros.

Aos colegas da Pós Graduação. À turma da Zootecnia pelos momentos inesquecíveis.

As minhas amigas Virgínia e Dani que sempre foram como irmãs.

As companheiras de República: Clarissa, Olívia, Marcela, Débora, Luciana, Maria e Bruna que fizeram de Viçosa meu lar.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse mais essa etapa.

“Faça o que for necessário para ser feliz, mas não se esqueça que a felicidade é um sentimento simples, você pode encontrá-la e deixá-la ir embora por não entender sua simplicidade...” (Martha Medeiros)

BIOGRAFIA

Vanessa Ricardo de Faria, filha de Jorge Augusto de Faria Filho e Luzia Elena Ricardo Faria, nasceu em 14 de maio de 1990, em Bom Despacho – MG.

No ano de 2008 iniciou o curso de Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa e graduou-se em maio de 2013. Em abril desse mesmo ano ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento na área de Genética e Melhoramento Animal.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO 1: A ANGIOGÊNESE E O CICLO ESTRAL.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 2: EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES ANGIOGÊNICOS EM CORPO LÚTEO E CÉLULAS DA GRANULOSA E CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE FÊMEAS DE LINHAGENS COMERCIAIS E DA RAÇA PIAU.....	16

RESUMO

FARIA, Vanessa Ricardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015.
Expressão gênica de fatores angiogênicos em corpo lúteo e células da granulosa e características reprodutivas de fêmeas de linhagens comerciais e da raça piau.
Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Coorientadores: José Domingos Guimarães e Paulo Sávio Lopes.

O processo desenvolvimento folicular, formação e regressão do corpo lúteo (CL) são caracterizadas por intensa angiogênese. Fêmeas de três grupos genéticos foram comparadas durante o ciclo estral (Linhagem1-L1, Linhagem2-L2 e raça Piau) quanto às características reprodutivas e a expressão de genes candidatos ligados ao processo de angiogênese, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFA), angiopoetinas 1 e 2 (ANGPT1 e ANGPT2), receptor de tirosina quinase (TIE-2/TEK) e metaloproteinase (MMP2), por meio da técnica de PCR em tempo real. Aos 3, 5, 10 e 14 dias do ciclo as fêmeas foram abatidas para coleta de CL e aos 14 e 18 dias para coleta de células da granulosa (CG) e análise da concentração de estradiol. Registrou-se o número e o diâmetro dos folículos e o número de CL. A L1 apresentou maior comprimento do ciclo estral ($P=0,0334$), taxa de ovulação ($P<0,0001$) e diâmetro folicular aos 14 dias ($P=0,0002$). Já em relação à concentração de estradiol, apenas a L2 e Piau apresentaram pico aos 18 dias do ciclo estral ($P=0,002$). Em relação à expressão gênica das CG, os genes ANGPT1 e ANGPT2 não apresentaram diferença ($P=0,7749$ e $P=0,6875$, respectivamente) e o TEK mostrou apenas tendência à variação da expressão entre os grupos ($P=0,0645$). O VEGF, MMP2 e TEK apresentaram padrão de expressão gênica do CL semelhante entre grupos de animais ($P=0,6739$, $P=0,5273$ e $P=0,4288$ respectivamente). Em relação ao ANGPT1 e ANGPT2, a L2 e a raça Piau apresentaram maior abundância que a L1 no dia 10 ($P<0,05$). Entretanto na relação ANGPT2/ANGPT1 apenas a L1 apresentou aumento no dia 14 ($P=0,0049$). Os resultados obtidos em relação à CG demonstram a necessidade de mais estudos quanto à angiogênese folicular. Em relação ao CL, observou-se padrão diferente na expressão de genes ligados ao processo de regressão em fêmeas de diferentes grupos genéticos. Diante dos resultados obtidos conclui-se

que a linhagem comercial 1 possui maior comprimento do ciclo estral e maior fase folicular, embora apresente menor fase luteal que a raça Piau.

ABSTRACT

FARIA, Vanessa Ricardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2015.
Gene expression of angiogenic factors in corpus luteum and granulosa cells and reproductive characteristics of commercial lines and breed Piau. Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-advisers: José Domingos Guimarães and Paulo Sávio Lopes.

Follicular development process, formation, and regression of the corpus luteum (CL) are characterized by intense angiogenesis. Females from three genetic groups were compared during the estrous cycle (Line1-L1, Line2-L2 and breed Piau), the reproductive traits and the expression of candidate genes, vascular endothelium growth factor (VEGFA), Angiopoietins 1 and 2 (ANGPT1 and ANGPT2), tyrosine kinase receptor (TIE-2 / TEK), and metalloproteinase (MMP2), by PCR in real time were evaluated. Females were slaughtered at 3, 5, 10 and 14 day of the estrous cycle to collect CL and at 14 and 18 days to collect granulosa cells (GC) and to analyze estradiol concentrations. It was recorded the number and diameter of the follicles and the number of CL. The L1 showed longer estrous cycle ($P=0.0334$), ovulation rate ($P<0.0001$) and follicular diameter at 14 days ($P = 0.0002$). Regarding to estradiol concentrations, L2 and Piau reached a peak at 18 days of the estrous cycle ($P=0.002$). In addition gene expression in the CG, the ANGPT1 and ANGPT2 genes showed no difference ($P=0.7749$ and $P=0.6875$, respectively) and the TEK showed only the variation trend of expression among the groups ($P=0.0645$). VEGF, MMP2 and TEK showed similar pattern of expression between groups in CL ($P=0.6739$, $P=0.5273$ and $P=0.4288$ respectively). The L2 and the Piau breed showed greater expression than the L1 on the 10 day ($P<0.05$) in relation to ANGPT1 and ANGPT2. However only L1 showed an increase of the relationship ANGPT2 / ANGPT1 at day 14 ($P=0.0049$). The results about gene expression in the CG demonstrate that further study on the follicular angiogenesis will be needed. Regarding CL, different pattern was observed in the expression of genes related to the regression process of different genetic groups females. Based on these results it is concluded that the commercial line 1 has a

greater length of the estrous cycle and higher follicular phase, although it presents lower luteal phase of that breed Piau.

Capítulo 1

A angiogênese e o ciclo estral

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura é um dos setores de produção de carne com maior destaque internacional, sendo a carne suína a mais consumida mundialmente. Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em 2013, foram consumidas 107,2 milhões de toneladas em todo o mundo. O mercado brasileiro ocupa uma posição de destaque nesse setor, sendo o quarto maior produtor e exportador de carne suína. No ano de 2013 a produção brasileira totalizou em 3,4 milhões de toneladas segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal, ABPA (<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mercado-interno.html>).

A expectativa de crescimento do mercado tem levado a busca intensa por avanços em tecnologias, pesquisas envolvendo todo o processo de produção e principalmente pelo melhoramento genético com o intuito de alcançar uma produção cada vez mais eficiente e com maior viabilidade. Nesse contexto, as características reprodutivas recebem grande atenção, pois há muito ainda a ser elucidado. A prolificidade, por exemplo, é uma característica complexa e de grande importância, por isso tem sido o foco de muitos programas de melhoramento. Por muito tempo houve dúvidas por parte dos melhoristas quanto a sua inclusão nos programas, uma vez que os ganhos genéticos de características reprodutivas geralmente são limitados por apresentarem baixa herdabilidade e difícil mensuração (Nogueira et al., 2009).

Os estudos iniciais de seleção para taxa de ovulação foram bem sucedidos, mas o incremento do tamanho de leitegada em relação à taxa de ovulação foi pequeno (Johnson et al., 1999, Newton, 1977). O tamanho e o peso de leitegada são componentes importantes num sistema de produção eficiente, resultando no aumento do número de leitões desmamados por porca por ano e conseqüentemente maior retorno econômico para os produtores. Uma das estratégias para melhorar as taxas de ganho genético pode ser a partição da característica de tamanho de leitegada em taxa de ovulação, capacidade uterina, taxa de fertilização, sobrevivência embrionária, entre outros (Guimarães et al., 1996).

Em estudos realizados com a raça Piau e linhagens comerciais foi possível observar contrastes fenotípicos tanto em relação a características de desempenho, quanto em características reprodutivas (Serão et al., 2011, Silva et al., 2011). O contraste entre os grupos genéticos quanto à prolificidade pode ser de grande importância para elucidar processos envolvidos com as características reprodutivas, levando à melhoria da eficiência produtiva, assim como maior entendimento da fisiologia ovariana, uma vez que trabalhos comparativos sobre dinâmica folicular sugerem distintos padrões de desenvolvimento entre os grupos em estudo. É imprescindível também a obtenção de maiores informações sobre a fisiologia reprodutiva da raça Piau, que se encontra em risco de extinção. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi obter o perfil de expressão de genes que envolvidos com importantes processos biológicos, possam explicar as diferenças observadas no desenvolvimento folicular e do corpo lúteo (CL) de porcas de diferentes raças,

auxiliando assim, no entendimento da fisiologia reprodutiva suína e nas divergências observadas entre fêmeas de diferentes grupos genéticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo Estral em suínos

O estro e a ovulação são decorrentes de fenômenos que envolvem o eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Hafez, 1995). O hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) secretado pelo hipotálamo atua na hipófise, levando a liberação dos hormônios gonadotróficos folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). O FSH estimula o desenvolvimento folicular e a liberação de estrógenos pelo ovário, enquanto que LH estimula a maturação ovocitária, desenvolvimento, manutenção e função do CL. O aumento da concentração de estradiol promove a onda pré-ovulatória de liberação de LH, resultando nas ovulações e consequentemente formação dos corpos lúteos. Com a regressão dos corpos lúteos, diminui a secreção de progesterona o que provoca aumento na liberação de FSH e LH e o ciclo se repete (Coffey et al., 2010).

O ciclo estral dura aproximadamente 21 dias, variando entre 19 e 23 dias. As fêmeas suínas são poliétricas contínuas e a prenhez ou disfunção endócrina interrompem sua ciclicidade (Hafez, 1995).

A ovulação ocorre nos dois ovários e após a ovulação há proliferação, principalmente das células da granulosa, e forma-se o CL, responsável pela produção e secreção de progesterona. Esse hormônio impede o desenvolvimento folicular pré-ovulatório, inibindo a secreção de FSH e LH por meio da supressão da liberação do

GnRH pelo hipotálamo (Coffey et al., 1997). O período de atividade do CL é chamado de fase luteínica, com duração de 16 a 17 dias em porcas. A fase folicular compreende o período de regressão do CL até a ovulação, com duração de 3 a 6 dias. Durante a fase folicular, a síntese de estradiol pelos folículos em desenvolvimento aumenta no final do ciclo estral, promovendo a onda pré-ovulatória do LH.

O contraste entre raças ou fenótipos divergentes quanto ao ciclo estral e à prolificidade pode ser de grande valia para a melhoria da eficiência produtiva, assim como maior entendimento da fisiologia ovariana. Isso pode ser mais evidente considerando raças, como a Piau, e linhagens comerciais. Estudos comparativos sobre o ciclo estral sugerem uma tendência a um maior ciclo estral (20.0 ± 1.0 vs 19.4 ± 1.7 ; $P=0.068$) da linhagem comercial quando comparado à raça Piau (Silva et al., 2013).

A puberdade pode ser definida como primeiro estro com ovulação dos folículos de Graaf e pela liberação de ovócitos capazes de serem fecundados. Vários aspectos podem afetar a idade à puberdade, como o ambiente, a nutrição, o peso corporal, a genética, as práticas de manejo, dentre outros fatores (Hafez, 1995).

A espécie suína atinge a puberdade entre seis e sete meses de idade, sendo que as taxas de ovulação são mais pronunciadas ao terceiro estro após a puberdade, onde se considera que os animais já atingiram a maturidade sexual. A duração do período do estro puberal geralmente é mais curta (47 horas) que as posteriores (56 horas) e as marrãs têm um período de estro mais curto que as porcas. Os ovócitos são liberados entre 36 e 42 horas após o início do cio (Hafez, 1995).

2.2. Dinâmica folicular

A foliculogênese ovariana é regulada pela sinalização endócrina e por mecanismos intra-ovarianos que coordenam o processo de crescimento do folículo, proliferação e diferenciação celular (Thomas and Vanderhyden, 2006). O desenvolvimento do folículo e sua sobrevivência dependem de fatores de crescimento secretados pelas células da granulosa, células da teca, células intersticiais do estroma e do ovócito (Manabe et al., 2004). Há muitas evidências indicando que a interação entre as células da granulosa e o ovócito é essencial para que se desenvolvam de maneira adequada (Thomas e Vanderhyden, 2006).

A fêmea da espécie suína destaca-se pela presença de grande número de folículos, cerca de 30 a 90 folículos com 1 a 2 mm de diâmetro e 30 a 60 folículos com 2 a 7 mm de diâmetro durante a fase luteal do ciclo estral (Guthrie, 1995). Entretanto, durante a fase folicular o número de folículos pequenos e médios diminui de forma significativa e apenas uma parte alcançam o tamanho pré-ovulatório, de 8 a 11 mm (Hafez, 1995).

O desenvolvimento dos folículos ovarianos envolve os seguintes estágios: iniciação, recrutamento, crescimento e seleção. O recrutamento folicular irá ocorrer de 14 a 16 dias do ciclo estral em suínos, e refere-se à população de folículos pequenos e médios presentes na superfície do ovário que podem ser selecionados para se desenvolverem até a ovulação. Os folículos selecionados irão ovular e não passarão pelo processo de atresia (Knox, 2005). Todos esses eventos estão sob controle endócrino. Uma vez que o folículo inicia seu crescimento, concentrações basais de gonadotrofinas, FSH e LH, mantêm seu crescimento até o estágio de

folículo antral. Os pequenos folículos antrais são selecionados para continuar crescendo devido a aumentos sutis nas concentrações basais das gonadotrofinas. Uma vez selecionados, os folículos dominantes adquirem características funcionais específicas que permitem que eles se diferenciem, passem para o estágio pré-ovulatório e sintetizem estradiol. Elevadas concentrações desse hormônio induzem a síntese de gonadotrofinas, como o LH, que por sua vez, estimulam a maturação e ovulação (Richards, 1994).

Após a ovulação, há uma rápida proliferação e hipertrofia celular, das células da teca e principalmente das células da granulosa. Essas células tornam-se luteinizadas e dão origem ao CL. As células luteais derivadas das células da granulosa originam as células luteais grandes e as da teca as células luteais pequenas (Bertan e Binelli, 2006). Inicialmente, o CL é considerado um corpo hemorrágico, uma vez que a sua cavidade central é preenchida por sangue, mas de 6 a 8 dias o CL já é uma massa compacta de células. A fase luteínica (aproximadamente 16 dias) é caracterizada por rápido desenvolvimento do CL, pela manutenção da integridade celular, pela sua função secretória e por rápida regressão até atingir o estágio não-funcional, o corpo albicans (Hafez, 1995). A ovulação, formação e a regressão do CL são essenciais para garantir a ciclicidade normal dos ovários e são caracterizadas por um excessivo remodelamento de tecido (Pitzel et al., 2000) e de vasos sanguíneos.

2.3. Microambiente folicular

O fluido folicular (FF) é produzido durante a foliculogênese e constitui o microambiente para o ovócito (Fortune, 1994), sendo considerado fator determinante

para a maior prolificidade e qualidade de ovócito. Assim, alterações na abundância de proteínas hormonais no FF podem levar a identificação de marcadores para a maturação e qualidade dos ovócitos e, por conseguinte, auxiliar na identificação de embriões de alto ou baixo potencial (Prather et al., 2009).

O desenvolvimento inicial, a maturação, o recrutamento e a seleção folicular estão sob controle endócrino e regulação parácrina, envolvendo inúmeros fatores de crescimento e algumas proteínas biologicamente ativas presentes no FF (Fortune, 1994; Fortune et al., 2004; Hunter et al., 2004). Essas proteínas são na sua maior parte de origem plasmática que chegam ao folículo antral por difusão através da lamina basal. A composição do FF está relacionada com o metabolismo das células foliculares e com a permeabilidade da parede folicular (Fortune, 1994).

Os andrógenos provenientes das células da teca servem como substrato para a secreção de estradiol pelas células da granulosa (Salles e Araújo, 2010), dessa forma, nos folículos saudáveis há andrógenos em baixas concentrações, uma vez que, as células da granulosa possuem capacidade de converter andrógenos em estradiol (Fortune, 1994). Há estudos indicando a relação do estradiol com a regulação de fatores angiogênicos, podendo levar ao incremento ou redução dos mesmos (Ye et al., 2002; Ardelt et al., 2005; Sakata et al., 2006; Lee et al., 2008).

Estudos recentes têm descrito o perfil proteico no FF em suínos (Paradis et al., 2010; Sun et al., 2011), entretanto, existem poucos dados disponíveis na literatura consultada sobre o perfil hormonal do FF nas diferentes raças ou linhagens de suínos. Deste modo, as proteínas presentes no folículo poderiam atuar como marcadores do

estádio de desenvolvimento do folículo, auxiliando assim, no entendimento da fisiologia reprodutiva suína.

2.4. Angiogênese no ovário

A angiogênese é coordenada por uma série de fatores conhecidos como pro e anti-angiogênicos (Bonagura et al., 2010) e pode ser definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir da migração e da proliferação de células endoteliais de vasos pré-existentes. O desenvolvimento e o crescimento de células e tecidos são dependentes de uma rede vascular adequada. A transição do folículo para CL e subsequente luteólise resulta num expressivo desenvolvimento e regressão de vasos sanguíneos, envolvendo complexos processos celulares e moleculares (Reynolds et al., 2000; Plendl, 2000).

Os folículos saudáveis são altamente vascularizados, enquanto folículos atresícos possuem pouca ou pobre vascularização, sugerindo associação entre vascularização e função folicular (Goede et al., 1998). Dessa forma, a manutenção da vascularização dos folículos é de grande importância para a saúde folicular (Reynolds et al., 2000) e a regulação da angiogênese permite maior controle sobre o desenvolvimento folicular e a luteinização (Hunter et al., 2004).

A rede vascular que se desenvolve em torno de cada folículo é confinada às células da teca e à membrana basal, evitando a progressão para a camada de células da granulosa, que continua avascular até o estágio de folículo pré-ovulatório. Apesar disso, as células da granulosa contribuem ativamente para o desenvolvimento da

vascularização da teca por meio da produção de fatores angiogênicos que se difundem para fora do folículo (Fraser, 2006; Plendl, 2000).

O processo de angiogênese é complexo e está relacionado com a expressão coordenada de diversos genes, como os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), metaloproteinases, o sistema Angiotensina-Tie (Ang-Tie) dentre outros.

2.4.1. Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é o principal regulador da angiogênese, promovendo a proliferação, a sobrevivência e a diferenciação das células endoteliais (Moses, 1997; Kere et al., 2014).

As ações celulares do VEGF são mediadas por meio de seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, pertencentes à família de receptores de tirosina quinase (Boonyaparakob et al., 2003; Plendl, 2000). A importância do VEGF durante a vida do CL tem sido descrita em várias espécies (Boonyaparakob et al., 2003; Ribeiro et al., 2007; Kere et al., 2014). Em geral, a expressão do VEGF é maior durante o período de intensa angiogênese, no qual atua como fator de sobrevivência para as células endoteliais recém-formadas. É produzido por uma série de células luteais, incluindo as células da granulosa e células da teca (Boonyaparakob et al., 2003). Em concentrações ótimas, o VEGF, auxilia no processo de maturação do ovócito e seu desenvolvimento (Kere et al., 2014). Ele também tem sido descrito como fator de grande importância para a permeabilidade vascular do CL (Otani et al., 1999; Boonyaparakob et al., 2003; Kere et al., 2014).

2.4.2. Metaloproteinases (MMPs)

Durante a ovulação há três tipos de matriz metaloproteinases (MMP) com maior atividade, a MMP-1, MMP-2 e MMP-9. No processo de vascularização e apoptose, a ativação das MMPs é fundamental para permitir o remodelamento da matriz extra celular (Pitzel et al., 2000; Ribeiro et al., 2007). As ações das MMP's são necessárias para o desenvolvimento de novos tubos vasculares (Moses, 1997) e são consideradas fatores importantes durante o crescimento folicular e a ovulação devido à sua capacidade de remodelamento (Misung et al., 2004). Resultados demonstraram a atividade da MMP-2 juntamente com o VEGF no CL de fêmeas suínas durante o ciclo estral e durante a gestação. A MMP-2 apresenta uma expressão basal durante a formação do CL e durante a gestação, aumentando significativamente durante a luteólise (Ribeiro et al., 2007).

2.4.3. Angiopoetinas (ANGPT)

As angiopoetinas são responsáveis pela maturação e estabilização de vasos sanguíneos (Maisonpierre et al., 1997). A angiopoetina-1 (ANGPT1) liga-se especificamente à subfamília dos receptores tirosina quinase conhecidos como TEK (TIE-2) (Maisonpierre et al., 1997; Wulff et al., 2000), estruturalmente diferentes dos receptores do VEGF (VEGFR). A ANGPT1 é requerida para o recrutamento das células perivasculares que estabilizam os capilares recém-formados e para a maturação de vasos sanguíneos (Wulff et al., 2000). Esta molécula também atua como fator de sobrevivência para células endoteliais (Goede et al., 1998; Otani et al., 1999). A Angiopoetina-2 (ANGPT2) é considerada antagonista da ANGPT1, uma

vez que compete pelo mesmo receptor (TIE-2), promovendo a desestabilização e a regressão dos vasos sanguíneos (Schams e Berisha, 2004). Dessa forma a razão entre as angiopoetinas (ANGPT2/ANGPT1) é de grande importância para a angiogênese (Wulff et al., 2000), sendo que uma maior razão induz à desestabilização dos vasos sanguíneos. Em humanos e ratos a ANGPT2 é encontrada nos locais com intenso remodelamento vascular (Maisonpierre et al., 1997). Na presença de quantidades elevadas de VEGF a desestabilização dos vasos sanguíneos pode resultar na formação de uma nova rede vascular, enquanto a falta de VEGF leva à regressão dos vasos sanguíneos (Schams e Berisha, 2004; Ardelt et al., 2005).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ardelt, A. a., McCullough, L.D., Korach, K.S., Wang, M.M., Munzenmaier, D.H., Hurn, P.D. (2005). Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor- α in a rodent experimental stroke model. *Stroke* 36, 337–341.

Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Martinat-Botte, F., Terqui, M. (1988). Sexual maturation and morphological development of the reproductive tract in large white and prolific Chinese Meishan pigs. *J. Reprod. Fertil.* 83, 723–728.

Bertan, C., Binelli, M. (2006). Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise: revisão de literatura. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 824–840.

Bonagura, T.W., Aberdeen, G.W., Babischkin, J.S., Koos, R.D., Pepe, G.J., Albrecht, E.D. (2010). Divergent regulation of angiopoietin-1 and -2, tie-2, and thrombospondin-1 expression by estrogen in the baboon endometrium. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 430–438.

Boonyaparakob, U., Gadsby, J., Hedgpeth, V., Routh, P., Almond, G. (2003). Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the oestrous cycle. *Reproduction* 126, 393–405.

Coffey, R.D., Specialist, E.S., Parker, G.R., Laurent, K.M. (2010). Manipulation of the Estrous Cycle in Swine. ASC-152

Egito, A., Mariante, a S., Albuquerque, M. (2002). Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. Arch. Zootec. 51, 39–52.

Fortune, J. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. Biol. Reprod. 232, 225–232.

Fortune, J.E., Rivera, G.M., Yang, M.Y. (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. Anim. Reprod. Sci. 82-83, 109–26.

Fraser, H.M. (2006). Regulation of the ovarian follicular vasculature. Reprod. Biol. Endocrinol. 4, 1-18.

Guimarães, S.E.F., Pinheiro, L.E.L. (1996). Princípios Básicos da Genética Molecular e sua Aplicação em Melhoramento Animal: In: Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal, p. 354-373. Editor: Jonas Carlos Campos Pereira.

Guthrie, H. (1995). Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. J. Anim. Sci. 2834–2844.

Hafez, E. (1995). Reprodução animal. 13, 183-192

Hunter, M.G., Biggs, C., Foxcroft, G.R., McNeilly, a S., Tilton, J.E. (1993). Comparisons of endocrinology and behavioural events during the periovulatory period in Meishan and large-white hybrid gilts. J. Reprod. Fertil. 97, 475–480.

Hunter, M.G., Picton, H.M., Biggs, C., Mann, G.E., McNeilly, A.S., Foxcroft, G.R. (1996). Periovulatory endocrinology in high ovulating Meishan sows. J. Endocrinol. 150, 141–147.

Hunter, M.G., Robinson, R.S., Mann, G.E., Webb, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. Anim. Reprod. Sci. 82-83, 461–77.

Irgang, R., Fávero, J. a., Kennedy, B.W. (1994). Genetic parameters for litter size of different parities in Duroc, Landrace, and large white sows. J. Anim. Sci. 72, 2237–2246.

Johnson, R.K., Nielsen, M.K., Casey, D.S. (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.

Kere, M., Siriboon, C., Liao, J.W., Lo, N.W., Chiang, H.I., Fan, Y.K., Kastelic, J.P., Ju, J.C. (2014). Vascular endothelial growth factor A improves quality of matured porcine oocytes and developing parthenotes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 49, 60–9.

Knox, R. V. (2005). Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 385–97.

LaVoie, H. a, Singh, D., Hui, Y.Y. (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 beta. *Endocrinology.* 145, 3122–3134.

Lee, Y.L., Liu, Y., Ng, P.Y., Lee, K.F., Au, C.L., Ng, E.H.Y., Ho, P.C., Yeung, W.S.B. (2008). Aberrant expression of angiopoietins-1 and -2 and vascular endothelial growth factor-A in peri-implantation endometrium after gonadotrophin stimulation. *Hum. Reprod.* 23, 894–903.

Li, H.-K., Kuo, T.-Y., Yang, H.-S., Chen, L.-R., Li, S.S.-L., Huang, H.-W. (2008). Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 103, 312–322.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8.

Losordo, D.W., Isner, J.M. (1978). Estrogen and Angiogenesis A Review. *Psychol. Women Q.* 2, 386–387.

Manabe, N., Goto, Y., Matsuda-Minehata, F., Inoue, N., Maeda, A., Sakamaki, K., Miyano, T. (2004). Regulation Mechanism of Selective Atresia in Porcine Follicles: Regulation of Granulosa Cell Apoptosis during Atresia. *J. Reprod. Dev.* 50, 493–514.

Miranda-Furtado, C.L., Silva, P.V., Guimarães, M.F.M., Serão, N.V.L., Guimarães, J.D., Guimarães, S.E.F. (2010). Differential expression of genes in follicular cells of swines. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 1023-1029

Misung, J., Thomas, L., Wheeler, S., Curry, T. (2004). Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP)-associated MMP-2 activation increases in the rat ovary in response to an ovulatory dose of human chorionic gonadotropin. *Biol. Reprod.* 70, 1024–32.

Moses, M. (1997). The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells.* 15, 180–189.

- Newton, J. (1977). Selection for Evaluation Rate in Swine: Correlated Response in Age and Weight at Puberty, Daily Gain and Probe Backfat. *J. Anim. Sci.* 30–35.
- Noguera, J.L., Rodríguez, C., Varona, L., Tomàs, A., Muñoz, G., Ramírez, O., Barragán, C., Arqué, M., Bidanel, J.P., Amills, M., Ovilo, C., Sánchez, A. (2009). A bi-dimensional genome scan for prolificacy traits in pigs shows the existence of multiple epistatic QTL. *BMC Genomics* 10, 636.
- Otani, N., Minami, S., Yamoto, M., Shikone, T., Otani, H., Nishiyama, R., Otani, T., Nakano, R. (1999). The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 3845–3851.
- Pitzel, L., Lüdemann, S., Wuttke, W. (2000). Secretion and gene expression of metalloproteinases and gene expression of their inhibitors in porcine corpora lutea at different stages of the luteal phase. *Biol. Reprod.* 1127, 1121–1127.
- Plendl, J. (2000). Angiogenesis and Vascular Regression in the Ovary. *Anat. Histol. Embryol.* 29, 257-266.
- Reynolds, L., Grazul-Bilska, A., Redmer, D. (2000). Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12, 1–9.
- Ribeiro, L. a, Turba, M.E., Bernardini, C., Zannoni, a, Bacci, M.L., Forni, M. (2007). Matrix metalloproteinases -2 and -9 in swine luteal tissue angiogenesis and angioregression. *Vet. Res. Commun.* 31 Suppl 1, 193–6.
- Sakata, A., Tamura, H., Asada, H., Miwa, I., Taketani, T., Yamagata, Y., Sugino, N. (2006). Changes in vascular leakage and expression of angiopoietins in the corpus luteum during pregnancy in rats. *Reproduction* 131, 351–360.
- Salles, M., Araújo, A. (2010). Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 34, 185–194.
- Schams, D., Berisha, B. (2004). Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. *Reprod. Domest. Anim.* 251, 241–251.
- Serão, N.V.L., Veroneze, R., Ribeiro, a M.F., Verardo, L.L., Braccini Neto, J., Gasparino, E., Campos, C.F., Lopes, P.S., Guimarães, S.E.F. (2011). Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 128, 28–34.
- Shimizu, T. (2002). Changes of Messenger RNA Expression of Angiogenic Factors and Related Receptors During Follicular Development in Gilts. *Biol. Reprod.* 67, 1846–1852.

Silva, P., Guimarães, S., Guimarães, J., Nascimento, C., Lopes, P., Siqueira, J., Amorim, L., Fonseca e Silva, F., Foxcroft, G. (2013). Follicular dynamics and gene expression in granulosa cells, corpora lutea and oocytes from gilts of breeds with low and high ovulation rates. *Reprod. Fertil. Dev.*

Silva, P., Guimarães, S., Guimarães, J., Neto, J., Lopes, P., Nascimento, C., Campos, C., Weller, M., Botelho, M., Faria, V. (2011). Gene expression in swine granulosa cells and ovarian tissue during the estrous cycle. *Genet. Mol. Res.* 10, 2258–2267.

Steibel, J.P., Poletto, R., Coussens, P.M., Rosa, G.J.M. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 94, 146–52.

Thomas, F.H., Vanderhyden, B.C. (2006). Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 1-19.

Toniollo, G., Vicente, W., Oliveira, C., Malheiros, E., Carvalho, L. (1997) Níveis séricos de cortisol e 17- β estradiol durante o ciclo estral em marrãs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 49, 3, 297-307

Veroneze, R., Lopes, P., Guimarães, S., Guimarães, J., Costa, E., Faria, V., Costa, K. (2014). Using pedigree analysis to monitor the local Piau Pig breed conservation program. *Arch. Zootec* 63, 45–54.

Wulff, C., Wilson, H., Lague, P., Duncan, W.C., Armstrong, D.G., Fraser, H.M. (2000). Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4302–4309.

Ye, F., Florian, M., Magder, S. A., Hussain, S.N.A. (2002). Regulation of angiopoietin and Tie-2 receptor expression in non-reproductive tissues by estrogen. *Steroids* 67, 305–310.

Capítulo 2

RESUMO

FARIA, Vanessa Ricardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015.

Expressão gênica de fatores angiogênicos em corpo lúteo e células da granulosa e características reprodutivas de fêmeas de linhagens comerciais e da raça piau.

Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Coorientadores: José Domingos Guimarães e Paulo Sávio Lopes.

O processo desenvolvimento folicular, formação e regressão do corpo lúteo (CL) são caracterizadas por intensa angiogênese. Fêmeas de três grupos genéticos foram comparadas durante o ciclo estral (Linhagem1-L1, Linhagem2-L2 e raça Piau) e quanto às características reprodutivas e a expressão de genes candidatos ligados ao processo de angiogênese por meio da técnica de PCR em tempo real. Aos 3, 5, 10 e 14 dias do ciclo as fêmeas foram abatidas para coleta de CL e aos 14 e 18 dias para coleta de células da granulosa (CG) e análise da concentração de estradiol. Registrou-se o número e o diâmetro dos folículos e o número de CL. A L1 apresentou maior comprimento do ciclo estral ($P=0,0334$), taxa de ovulação ($P<0,0001$) e diâmetro folicular aos 14 dias ($P=0,0002$). Já em relação à concentração de estradiol, apenas a L2 e Piau apresentaram pico aos 18 dias do ciclo estral ($P=0,002$). Em relação à expressão gênica das CG, os genes ANGPT1 e ANGPT2 não apresentaram diferença ($P=0,7749$ e $P=0,6875$, respectivamente) e o TEK mostrou apenas tendência à variação da expressão entre os grupos ($P=0,0645$). O VEGF, MMP2 e

TEK apresentaram padrão de expressão gênica do CL semelhante entre grupos de animais ($P=0,6739$, $P=0,5273$ e $P=0,4288$ respectivamente). Em relação ao ANGPT1 e ANGPT2, a L2 e a raça Piau apresentaram maior abundância que a L1 no dia 10 ($P<0,05$). Entretanto na relação ANGPT2/ANGPT1 apenas a L1 apresentou aumento no dia 14 ($P=0,0049$). Os resultados obtidos em relação à CG demonstram a necessidade de mais estudos quanto à angiogênese folicular. Em relação ao CL, observou-se padrão diferente na expressão de genes ligados ao processo de regressão em fêmeas de diferentes grupos genéticos. Diante dos resultados obtidos conclui-se que a linhagem comercial 1 possui maior comprimento do ciclo estral e maior fase folicular, embora menor fase luteal que a raça Piau.

1. INTRODUÇÃO

A fase folicular nos suínos compreende o período de regressão do corpo lúteo até a ovulação, em seguida há uma rápida proliferação e hipertrofia celular das células da teca e principalmente das células da granulosa. Essas células tornam-se luteinizadas e dão origem ao corpo lúteo (CL), e o período de atividade deste é chamado de fase luteínica (Hafez, 1995). Nas fêmeas suínas o desenvolvimento folicular, ovulação, formação do CL e luteólise são processos importantes e de grande complexidade, caracterizados por um excessivo remodelamento de tecido (Pitzel et al., 2000) e expressivo crescimento e regressão de vasos sanguíneos (Reynolds et al., 2000; Plendl, 2000). A angiogênese desempenha um papel crítico no desenvolvimento folicular e na formação e regressão do CL. Todo esse processo é fundamental para a ciclicidade das fêmeas suínas, entretanto ainda há poucos estudos avaliando como isso ocorre em diferentes grupos genéticos.

O processo de angiogênese é complexo e está relacionado com a ação coordenada de diversos fatores. Todavia, ainda há questões para serem elucidadas sobre a ação conjunta desses fatores e sua relação com as características importantes do ciclo estral em diferentes grupos genéticos. O principal fator pró-angiogênese é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que promove proliferação, sobrevivência e diferenciação das células endoteliais (Moses, 1997; Kere et al., 2014). A ação da metaloproteinase MMP-2, juntamente com o VEGF, são necessárias para o desenvolvimento de novos tubos vasculares (Moses, 1997). Outro fator de grande importância são as angiopoetinas conhecidas pela função de maturação e estabilização de vasos sanguíneos (Maisonpierre et al., 1997). A angiopoetina-1

(ANGPT1) é requerida para o recrutamento das células perivasculares que estabilizam os capilares recém-formados e para a maturação de vasos sanguíneos (Wulff et al., 2000). A Angiopoetina-2 (ANGPT2) é considerada antagonista do ANGPT1, uma vez que compete pelo mesmo receptor de tirosina quinase (TEK), promovendo a desestabilização e regressão dos vasos sanguíneos (Schams e Berisha, 2004).

Dessa forma o presente estudo teve como objetivo caracterizar a expressão de transcritos no corpo lúteo e nas células da granulosa, durante o ciclo estral em fêmeas de diferentes grupos genéticos, estimar a concentração do hormônio estradiol e correlacionar dados fenotípicos, gênicos e hormonais na predição do comportamento estral em fêmeas suínas comerciais e da raça Piau.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido em uma Granja experimental da Universidade Federal de Viçosa e aprovado pelo CEUAP (UFV; DZO – UFV 59/2014).

2.1. Animais

Foram utilizadas 45 marrãs em fase de crescimento, pertencentes a três grupos genéticos: a raça Piau, e duas linhagens sintéticas comerciais provenientes do cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Duroc (Linhagem 1 – L1) e entre as raças Large White, Landrace e Pietran (Linhagem 2 – L2), todas provenientes da Granja de Melhoramento Genético de Suínos. Os animais foram alojados em baias

coletivas e receberam alimentação *ad libitum* com ração da fase de terminação e livre acesso à água.

A partir dos 120 dias de idade iniciou-se a observação do estro. O estro foi observado duas vezes ao dia, no início da manhã e ao final da tarde, na presença de um rufião. Foi verificado o reflexo de tolerância ao animal e ao homem. O primeiro dia do ciclo estral foi designado como dia 0. Os dados referentes ao ciclo estral, como duração do ciclo e idade ao primeiro estro, foram registrados para posterior análise.

2.2. Coleta de material

Após a identificação do segundo estro, as fêmeas foram abatidas nos dias 3, 5, 10, 14 e 18 do ciclo estral (n=3/dia/grupo). Os ovários foram coletados e registrou-se o número de corpos lúteos (CL) presentes nos dias 3, 5, 10 e 14. Todos os CL de cada ovário foram então excisados, pesados e armazenados em tubos criogênicos com solução de RNA holder® (BioAgency), conforme orientações do fabricante, e mantidas a -80 °C até a extração do RNA total.

Aos 14 e 18 dias do ciclo estral contabilizou-se o número total de folículos antrais e de folículos com diâmetro acima de 4 mm aos 14 dias e acima de 6 mm aos 18 dias. Com o auxílio de uma seringa de 1ml e uma agulha estéril, estes folículos foram aspirados e posteriormente, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, os ovócitos foram identificados e descartados. Em seguida, prosseguiu-se com a centrifugação, em centrífuga refrigerada a -4 °C, para obtenção do fluido folicular (FF) e das células da granulosa. O FF foi mantido a -80 °C até a análise hormonal e as células sedimentadas (pellet) foram imediatamente ressuspendidas e lavadas em PBS

1X (Phosphate Buffered Saline solution). Posteriormente, efetuou-se a contagem das células da granulosa em câmara de Neubauer dupla espelhada e diluição para obtenção de 2.5×10^6 células. Esse número foi adotado devido recomendações do fabricante para adequada extração de RNA.

2.3. Dosagem hormonal

A dosagem do hormônio estradiol foi realizada no Laboratório de Reprodução do Departamento de Zootecnia da UFV. A análise foi feita por imunoluminescência, utilizando o equipamento Access Immunoassay System (Beckman Coulter®, Califórnia, EUA) e o reagente Access® Estradiol (E2; Beckman Coulter®, Califórnia, EUA) conforme as recomendações do fabricante.

2.4. Extração de RNA total e síntese do cDNA

Todas estas análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal (Labtec) no Departamento de Zootecnia, UFV. A extração de RNA total foi feita com a utilização de reagente TRIzol® (Ambion - Life Technologies, Califórnia, EUA) a partir de 90 mg de tecido. Em síntese, todos os CL de cada animal foram macerados juntos e em seguida homogeneizados com TRIzol. Posteriormente adicionou-se clorofórmio e a amostra foi centrifugada. A fase aquosa foi recuperada e com o acréscimo do isopropanol o RNA foi precipitado. Após nova centrifugação formou-se o pellet com o RNA e adicionou-se etanol 75 %. Após nova centrifugação, o pellet foi reidratado com 30 µL de água UltraPure® DNase/RNase-Free.

Em seguida o RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 e 280 nm e a pureza do RNA foi estimada por meio da relação A260/A280. Para verificar a qualidade do RNA procedeu-se a análise da integridade por eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio. Após todos esses procedimentos o RNA foi estocado a -80 °C até a síntese de cDNA. Para a retirada de possível contaminação com DNA, o RNA foi tratado com DNase.

A síntese do cDNA foi realizada por meio do Kit GoScript® Reverse Transcription System (Promega - Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, a partir de 1 µg de RNA total. Em seguida as amostras foram quantificadas e diluídas para concentração de 15 ng/µL e armazenados a -20 °C até o uso na reação de PCR em tempo real.

A extração do RNA total, o tratamento com a DNase e a síntese de cDNA das células da granulosa foram feitas por meio do kit Cells-to-cDNA® (Ambion - Austin, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Com esse kit, foi possível com protocolo mais rápido e eficiente, ir direto ao cDNA. Em seguida as amostras foram quantificadas e diluídas para concentração de 15 ng/µL. Posteriormente esse material foi estocado a -20 °C até o procedimento de PCR em tempo real.

2.5. Análise de PCR em tempo real

Avaliou-se a expressão dos genes de fator de crescimento vascular do endotélio. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFA), angiopoetinas 1 e 2 (ANGPT1 e ANGPT2), receptor de tirosina quinase (TIE-2/TEK) e

metaloproteinase (MMP2) para o CL e a expressão da ANGPT1, ANGPT2 e TEK para as células da granulosa.

Os *primers* (tabela 1) utilizados para amplificação dos genes estudados e dos controles endógenos foram desenhados por meio do programa *PrimerQuest* (www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest) a partir de sequências obtidas do banco de dados do GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Foi feita a otimização para cada primer, a fim de calcular a eficiência (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 1 - Primers usados para amplificação nas reações de PCR em tempo real

Gene	Nº acesso	Sequência dos Primers
VEGFA	NM_214084.1	F GCACATAGGAGAGATGAGCTTC R CAAGGCCACAGGGATTT
ANGPT1	NM_213959.1	F ACAGAGCCACCACCAATAAC R GTGCAAAGGTTGACGAGATTATG
ANGPT2	NM_213808.1	F CTGAGCTGTGATCTCGTCTTG R CTGAACCTGATACTGCCTCTTC
TEK	XM_001926034.5	F CGGCACGAAGTACCTGATATT R GGTGAAGAGGTTTCCTCCTATG
MMP2	<u>NM_214192.1</u>	F CGACGTGGCCAATTACA R GGCATCATCCACCGTTT
GAPDH	<u>NM_001206359.1</u>	F CAAAGTGGACATTGTCGCCATCA R AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT
HPRT1	NW_003540069.1	F GCTGACCTGCTGGATTACAT R CTGGTCATTACAGTAGCTCTTCAG

Foram testados como controle endógeno os genes β -actina, o gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e a hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT1). Esses genes foram selecionados com base no perfil da curva de amplificação e de dissociação. Além disso, verificou-se a estabilidade de

amplificação destes genes entre os tratamentos, onde o melhor controle endógeno foi o GAPDH para o CL e o HPRT1 para as células da granulosa. As reações de PCR em tempo real foram efetuadas em duplicata utilizando o termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA), a partir do método de Quantificação Relativa, utilizando como detecção o sistema SYBR[®] Green (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA) e o kit GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega corporation, Madison, EUA). As reações foram submetidas ao protocolo de ciclos conforme o programa: 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

2.6. Análise Estatística

Os dados reprodutivos coletados (puberdade, dias de ciclo, número de CL, peso do CL, número de folículos antrais e concentração de estradiol no FF) foram submetidos ao teste de normalidade, pelo procedimento UNIVARIATE no SAS (SAS Institute - Cary, NC, EUA), e os dados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM do SAS (SAS Institute - Cary, NC, EUA). Comparações entre as médias foram feitas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram avaliados por análises não paramétricas pelo procedimento NPAR1WAY e as médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste Dunn no SAS (SAS Institute - Cary, NC, EUA) ao nível de significância de 5%.

Os dados de expressão gênica dos genes alvo e endógeno foram gerados na forma de C_t (*cycle threshold*). Posteriormente, esses dados foram analisados

utilizando a macro %QPCR_MIXED desenvolvida no SAS (www.msu.edu/~steibelj/JP_files/QPCR.html) segundo a metodologia proposta por Steibel et al. (2009), onde os valores de C_t individuais para cada gene alvo foram normalizados com base nos valores de C_t dos genes endógenos.

Os resultados foram submetidos à análise de variância de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{gijkr} = G_{ig} + I_{jg} + (G \times I)_{gij} + P_{gij} + e_{gijkr}$$

Onde:

Y_{gijkr} = característica observada, o C_t do g^{th} gene ;

G_i = efeito do i^{th} Grupo Genético no g^{th} gene;

I_j = efeito do j^{th} dia do abate no g^{th} gene;

$(G \times I)_{ij}$ = efeito da interação entre o i^{th} nível de G e o j^{th} nível de I no g^{th} gene;

P_{gij} = efeito aleatório do k^{th} animal;

e_{gijkr} = o erro aleatório.

Foi considerado 5% de probabilidade de erro para as comparações entre as médias. Para a análise e comparação do padrão de expressão, utilizou-se a metodologia da expressão relativa $2^{-\Delta C_t}$ e para a comparação entre os grupos, utilizou-se (fold-change), $2^{-\Delta\Delta C_t}$, descrito por Livak and Schmittgen (2001).

O cálculo de relação entre os genes ANGPT2/ANGPT1 foi feito com base na expressão relativa média de cada gene, $2^{-\Delta C_t}$, e posteriormente submetido ao teste de Kruskal-Wallis. As diferenças entre médias foram analisadas utilizando o teste Dunn com 5% de probabilidade de erro.

3. RESULTADOS

3.1. Dados Fenotípicos

A idade a puberdade foi semelhante ($P=0.774$, tabela 2) para as fêmeas dos três grupos genéticos. Em relação à duração do ciclo estral, houve diferença entre os grupos ($P=0.0334$). Quanto ao número de folículos antrais no córtex ovariano, pode-se observar que não houve diferença aos 14 ($P=0.5395$) e 18 ($P=0.8356$) dias. O número de folículos antrais totais acima de 4 mm aos 14 dias também foi semelhante ($P=0.7347$), porém para os folículos acima de 6 mm aos 18 dias, observou-se uma variação significativa ($P=0.024$), entre a L1 e L2 em relação à raça Piau (tabela 1).

Tabela 2. Características reprodutivas em diferentes grupos genéticos de fêmeas, de acordo com o dia do ciclo estral.

<i>Parâmetros</i>	<i>Grupos Genéticos</i>		
	<i>Linhagem 1</i>	<i>Linhagem 2</i>	<i>Piau</i>
Duração do ciclo estral	21.73±0.49 ^a	21.67±0.59 ^{ab}	20.27±0.33 ^b
Idade a puberdade	185.6±4.4 ^a	184.8±4.23 ^a	181.6±3.95 ^a
Nº de corpos lúteos	16.67±0.68 ^a	14.92±0.95 ^a	10.92±0.56 ^b
Nº Folículos antrais totais 14 d	177.25±16.35 ^a	173.25±26.24 ^a	173.75±18.5 ^a
Nº Folículos antrais 14 d (>4 mm)	16.50±4.21 ^a	20.25±4.11 ^a	15.75±5.41 ^a
Nº Folículos antrais totais 18 d	98.50±12.32 ^a	78.50±26.91 ^a	65.00±26.29 ^a
Nº Folículos antrais 18 d (>6 mm)	15.00±0.41 ^a	16.00±1.78 ^a	11.25±0.48 ^b

^{a,b}Médias seguidas por diferentes letras na mesma linha diferem entre si (P<0.05) pelo teste Tukey ou Dunn; Média±ep = Média e erro padrão; Linhagem 1: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Duroc; Linhagem 2: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Pietran. 14 e 18d = dias do ciclo estral.

O número de CL na superfície ovariana, mostrou que a raça Piau possui menores taxas quando comparada as linhagens comerciais (P<0.0001, tabela 2).

Em relação ao diâmetro dos folículos, aos 14 dias, verificou-se que os três maiores folículos de cada ovário variaram entre os grupos (P=0.0002), sendo que a L1 apresentou diâmetro superior de folículo (5.2±0.14 vs 4.3±0.10 vs 4.5±0.13 para L1, L2 e Piau respectivamente).

Em relação ao peso do CL, não houve variação entre as raças e dias de abate (P=0.5061, tabela 3).

Tabela 3. Peso do corpo lúteo (CL), em gramas, ao longo do ciclo estral puberal de diferentes grupos genéticos de suínos, de acordo com o dia do ciclo estral.

	Grupos Genéticos		
	Linhagem 1	Linhagem 2	Piau
Peso CL 3d	0.199±0.028	0.235±0.114	0.171±0.040
Peso CL 5d	0.322±0.030	0.380±0.037	0.285±0.034
Peso CL 10d	0.431±0.035	0.398±0.025	0.460±0.068
Peso CL 14d	0.494±0.050	0.478±0.018	0.510±0.137

($P>0.05$) pelo teste Tukey; Média±ep = Média e erro padrão; Linhagem 1: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Duroc; Linhagem 2: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Pietran.

A concentração de E2 no FF variou entre grupos ($P=0.0075$) e entre dias de abate ($P=0.0094$). No 14º dia do ciclo estral, as concentrações de E2 foram semelhantes ($P=0.597$), no entanto aos 18 dias do ciclo estral houve diferença entre os valores médios obtidos nos diferentes grupos genéticos ($P=0.002$). Nos grupos genéticos, houve maior concentração de estradiol no dia 18 em relação ao dia 14 do ciclo estral nas fêmeas da L2 e da raça Piau e não variou no grupo L1 ($P=0.0076$, $P=0.0232$ e $P=0.6572$, respectivamente).

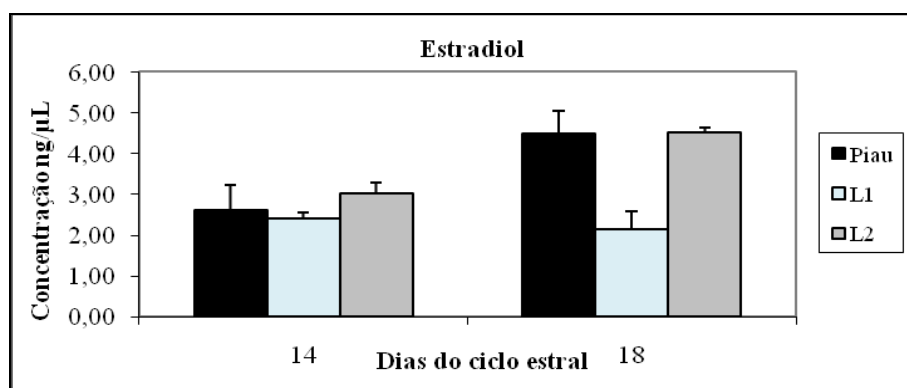


Figura1 - Concentração de E2 entre os grupos genéticos aos 14 e 18 dias do ciclo estral. ^{a,b} Letras diferentes diferem entre si ($P<0.05$) pelo teste Tukey; Linhagem 1: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Duroc; Linhagem 2: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Pietran.

3.2. Expressão gênica em CG e CL

Os genes ANGPT1, ANGPT2 e o receptor TEK exibiram padrão de expressão muito semelhante nas células da granulosa. Esses genes não tiveram variação entre os dias do ciclo estral e os grupos genéticos ($P=0.7749$, $P=0.6875$ e $P=0.1405$, respectivamente). Em relação ao TEK, este apresentou apenas tendência à expressão gênica diferente entre os grupos (Figura 2; $P=0.0645$).

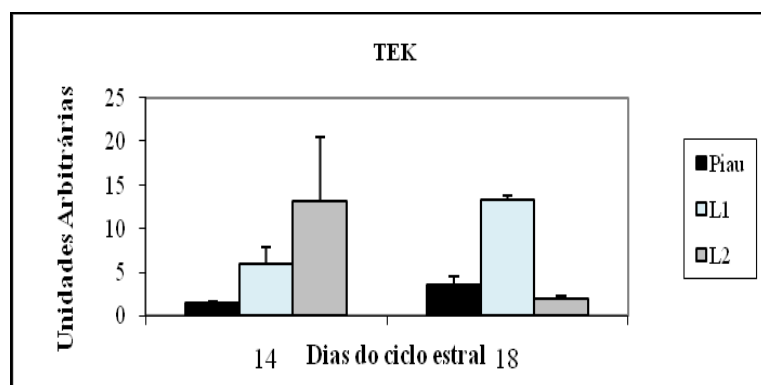


Figura 2 – Expressão relativa em unidades arbitrárias ($2^{-\Delta C_t}$) do receptor de tirosina quinase II (TEK) entre os grupos genéticos e os dias do ciclo estral. Comparação entre raças dentro dos dias do ciclo estral ($P>0.05$); Linhagem 1: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Duroc; Linhagem 2: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Pietran.

No CL, o gene VEGF não apresentou diferença entre os grupos genéticos e os dias do ciclo estral ($P=0.6739$). Em relação ao gene MMP2, pode-se observar apenas uma pequena tendência ao longo do ciclo estral ($P=0.065$), mas não entre os grupos e dias do ciclo estral ($P=0.527$).

A expressão do TEK também se manteve constante no CL ao longo da fase luteínica e não apresentou variação entre os grupos genéticos ($P=0.221$), nem para a interação dos grupos genéticos e os dias do ciclo estral ($P=0.428$). O gene ANGPT1

apresentou variação ao longo dos dias do ciclo estral ($P=0.005$) e entre os grupos genéticos e dia do ciclo estral ($P<0.0001$). Este gene apresentou diferença na expressão aos 5 ($P=0.0009$) e 10 ($P=0.0019$) dias entre as Linhagens 1 e 2, sendo que a linhagem 1 apresentou uma menor expressão em relação a linhagem 2. Aos 10 dias do ciclo estral, a raça Piau teve maior expressão em relação à linhagem 1 ($P<0.0001$).

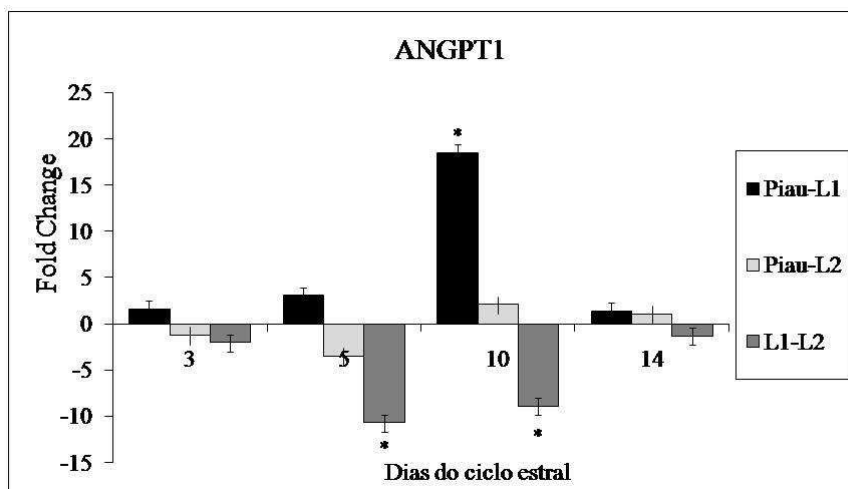


Figura 3 – Fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) da angiopoetina 1 (ANGPT1) entre os grupos genéticos ao longo do ciclo estral. * $P<0.05$; Linhagem 1: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Duroc; Linhagem 2: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Pietran.

No presente estudo, independente do grupo genético, observou-se que houve expressão de ANGPT1 constante no início do ciclo estral e redução na expressão gênica aos 14 dias quando comparado com 3 ($P=0.0156$) e 5 ($P=0.001$) dias do ciclo estral.

Em relação à ANGPT2, este teve variação entre os grupos ($P=0.0069$) e entre os dias do ciclo estral e grupo genético ($P=0.0207$). A raça Piau obteve maior expressão do gene ANGPT2 quando comparada à Linhagem 1, nos dias 10 ($P=0.0029$)

e 14 (P=0.0299). Já a Linhagem 2 foi superior à Linhagem 1 apenas no dia 10 do ciclo estral (P=0.0081, figura 4).

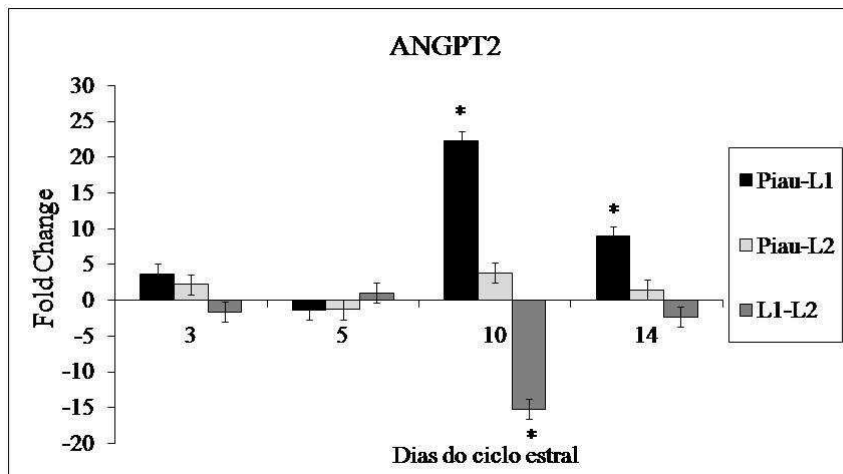
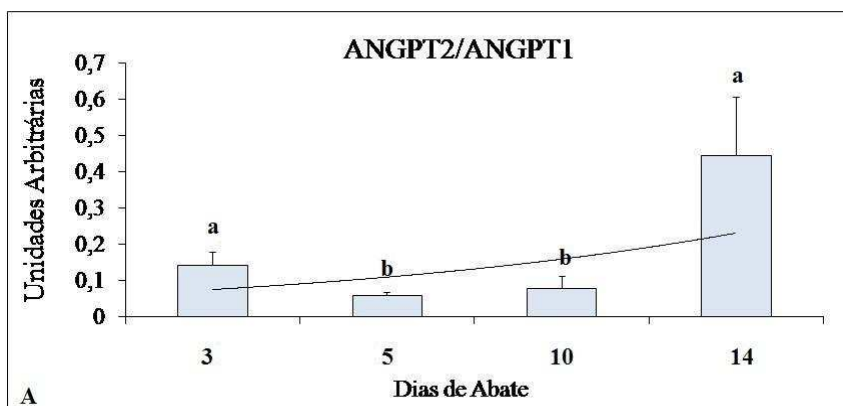


Figura 4 – Fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) da angiopoetina 2 (ANGPT2) entre os grupos genéticos ao longo do ciclo estral. *P<0,05; Linhagem 1: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Duroc; Linhagem 2: cruzamento entre as raças Large White, Landrace e Pietran.

A relação dos genes ANGPT2 e ANGPT1, não apresentou variação nos grupos genéticos L2 (P=0.1398) e raça Piau (P=0.2407), mas no grupos genético L1 a relação variou ao longo do ciclo estral (P=0.0049).



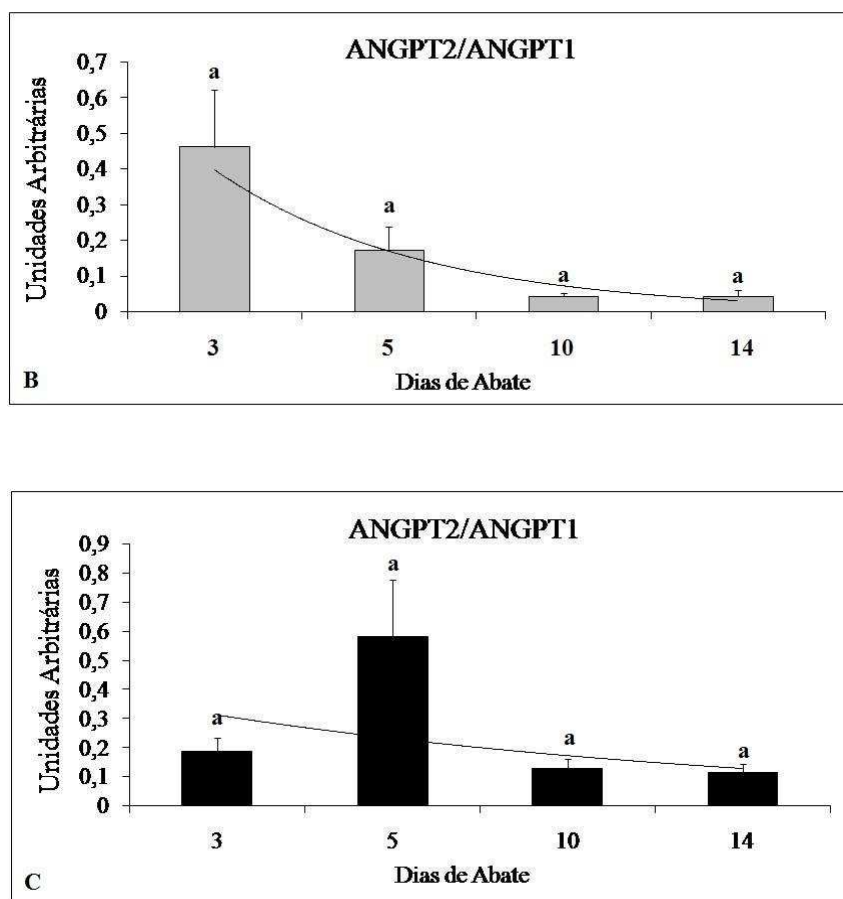


Figura 5 – Relação da expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) da angiopoetina 2 (ANGPT2) e angiopoetina 1 (ANGPT1), entre os grupos genéticos nos dias de abate ao longo do ciclo estral. A – Relação L1; B – Relação L2; C – Relação Piau; Letras diferentes, entre os dias de abate ao longo do ciclo estral, dentro do mesmo gráfico diferem entre si ($P < 0,05$);

4. DISCUSSÃO

As características reprodutivas podem ser afetadas por uma série de fatores, sendo a genética um fator de grande importância. No presente estudo buscou-se

avaliar a expressão gênica de células da granulosa e do CL e avaliar características reprodutivas de três grupos distintos, a L1 (Large White x Landrace x Duroc), a L2 (Large White x Landrace x Pietran) e a raça Piau, a fim de melhor compreender e elucidar os processos biológicos que afetam o desempenho reprodutivo desses animais e, conseqüentemente buscar informações que possam vir a ser importantes para os programas de melhoramento genético.

Dentre os três grupos estudados, a raça Piau, que é uma raça naturalizada brasileira, encontra-se em risco de extinção, sendo a sua maioria criada em pequenas propriedades no sul de Goiás e Triângulo Mineiro para produção de carne e banha para o consumo familiar (Egito et al., 2002). Mas é importante destacar que, muitos estudos vêm mostrando a importância da conservação e da pesquisa com esses animais (Silva et al., 2013; Veroneze et al., 2014; Furtado et al., 2010). A raça apresentou em estudos anteriores uma média de 7.9 ± 2.6 leitões nascidos totais (Silva et al., 2013).

Já a linhagem L2 possui em sua composição a raça Large White, Landrace e Pietran, destas a raça Pietran é conhecida pelo seu alto desempenho no rendimento de carcaça e notável produção de carne magra (Luc et al., 2013). Segundo os autores esta raça apresentou 8.55 leitões nascidos vivos no terceiro parto. A L1 difere da L2 por apresentar a raça Duroc na composição da linhagem. Os animais da raça Duroc são robustos, de alta produção de carne e crescimento rápido. Segundo o estudo realizado por Irgang et al. (1994) as fêmeas da raça Duroc apresentaram menor número de leitões nascidos vivos quando comparada às raças Large White e Landrace. Atualmente, fêmeas de linhagem sintética a partir da raça Landrace e Large White,

com composição muito semelhante às fêmeas que deram origem às marrãs do nosso estudo, são fêmeas consideradas com alto desempenho reprodutivo.

4.1. Dados Fenotípicos

As fêmeas dos três grupos genéticos apresentaram a mesma idade ao atingirem a puberdade. Esse fato já era esperado para as linhagens sintéticas, mas para a raça Piau há registros de idade superior à puberdade (Veroneze et al., 2014).

Semelhante a resultados obtidos pela mesma equipe deste estudo (Silva et al., 2013) as fêmeas da linhagem sintética L1 apresentaram ciclo estral mais longo quando comparadas às da raça Piau, mas pode se observar que as fêmeas da L2 apresentaram ciclo semelhante às da L1 e da raça Piau (tabela 2). A raça Meishan também apresenta um ciclo estral menor, mas se assemelha mais à L2 por ser considerada como uma raça hiperprolífica, do que à raça Piau (Bazer et al., 1988).

Observou-se que houve aumento na concentração de estradiol no fluido folicular dos folículos das fêmeas do grupo genético L2 e da raça Piau aos 18 dias do ciclo estral. Hunter et al. (1996) também descreveram aumento precoce da concentração de estradiol nos folículos da raça Meishan e correlacionou esse fato com a observação antecipada do comportamento de estro e ovulação nas fêmeas. Dessa forma isso corrobora com o fato da linhagem sintética L2 e a raça Piau apresentarem ciclo estral semelhante e também com o fato do Piau apresentar o ciclo menor que L1, mas diferente da raça Meishan, a raça Piau é menos prolífica. Segundo Toniollo et al. (1997), dos 18 dias do ciclo estral à ovulação, há um pico na produção de estradiol e posteriormente queda até o dia 2 após o estro, se mantendo em

concentrações basais até o próximo pico. Esse pico pode ser explicado por resultados obtidos pela mesma equipe do presente estudo, onde foi observada maior abundância na expressão dos genes STAR e CYP19 na fase folicular das fêmeas Piau (Furtado et al., 2010). Esses genes regulam de maneira positiva a síntese de esteróides (LaVoie et al., 2004).

O aumento na produção de estradiol é fundamental para que ocorra um pico pré-ovulatório de LH, para o aumento da capacidade das células da teca em responder a esse pico (Fortune et al., 2004), e conseqüentemente é fundamental para a ovulação. Dessa forma, esses animais apresentam maior produção de esteróides que leva à ovulação e a uma luteinização mais precoce nos folículos, conseqüentemente, menor ciclo estral. A área de pico do estradiol apresenta correlação positiva com a concentração de FSH, antes da onda de LH. As fêmeas Meishan apresentaram área maior de pico de estradiol do que as fêmeas menos prolíferas (Hunter et al., 1996). Isso mostra que, apesar da L2 apresentar um ciclo estral semelhante à Piau ela pode ter uma maior duração do pico de estradiol, uma vez que também possui ciclo semelhante a L1 e ter um período maior de desenvolvimento folicular. Após a ovulação, as células da teca e as células da granulosa, que até então juntas sintetizavam estrógenos, são reorganizadas para formarem o corpo lúteo e passam a sintetizar progesterona (Salles e Araújo, 2010).

Em relação à dinâmica folicular, ao comparar o número de folículos aos 14 dias e aos 18 dias, a raça Piau apresentou semelhança às demais linhagens no início da fase folicular, e apresentou menor população de folículos pré-ovulatórios (tabela 2). Esse comportamento foi semelhante ao encontrado por Silva et al., (2013), que

demonstrou que aos 18 dias do ciclo estral a linhagem sintética apresentou número muito superior de folículos acima de 6mm. O número semelhante de folículos aos 14 dias pode ser influenciado pelo fato de que aos 10 dias do ciclo estral a raça Piau tem baixa porcentagem de atresia quando comparada com as linhagens sintéticas, apenas 17.3 % de folículos atrésicos contra 59.3 %, respectivamente, já aos 18 dias os números de folículos atrésicos passam para 50.0 % contra 25.7 %, respectivamente, (Silva et al., 2013). Isso também pode representar uma rápida seleção e crescimento dos folículos pré-ovulatórios nas linhagens comerciais que, associado a um alto índice de atresia na raça Piau dos folículos pré-ovulatórios (Silva et al., 2013), resulta numa menor taxa de ovulação e consequentemente num menor número de CL na raça Piau quando comparada às linhagens sintéticas.

A taxa de ovulação e o tamanho de leitegada variam muito dentro e entre genéticas (Irgang et al., 1994). Outro ponto que pode estar relacionado com a menor prolificidade da raça Piau é a maior abundância aos 18 dias dos fatores de transformação, o gene GDF9 (fator de diferenciação do crescimento), em ovócitos de folículos grandes (>6mm), e a BMP15 (proteína morfogênica óssea), em folículos médios (de 3 a 6 mm de diâmetro), quando comparada com as linhagens sintéticas (Silva et al., 2013). Em estudos de maturação in vitro o GDF9 foi identificado em maior concentração em ovócitos imaturos e o BMP15 apresentou expressão significativa principalmente durante a fase de expansão do cumulus oophorus (Li et al., 2008). Esses genes estão relacionados ao desenvolvimento folicular e à maturação folicular, sendo que sua maior expressão pode desempenhar papel importante na inibição do início do processo de luteinização e potencialmente interferir no

desenvolvimento folicular e, conseqüentemente, na taxa de ovulação entre as raças. Devido a esses e outros fatos, muitos autores caracterizam a raça Piau como uma raça menos prolífica (Furtado et al., 2010; Silva et al., 2013) e a utilizam para análises comparativas com outros grupos para melhor elucidar os processos biológicos envolvidos com as características reprodutivas.

Interessante observar que aos 14 dias as fêmeas da linhagem L1 apresentaram um diâmetro folicular médio superior ao diâmetro dos folículos da L2 e da raça Piau, o que pode representar crescimento mais acelerado na linhagem ou uma fase folicular precoce. Já em relação ao peso médio do CL (tabela 3), houve semelhança entre os grupos genéticos ao longo da fase luteínica (3 a 14 dias do ciclo estral) e do processo de luteólise (18 dias do ciclo estral). Silva et al. 2013 obtiveram resultados interessantes ao estudar o CL de fêmeas Piau e uma linhagem comercial. No CL de 0 e 4 dias das fêmeas Piau houve expressão abundante de CASP3 (caspase 3), importante para o processo de apoptose, e baixa expressão do gene TGFBR2 (fator de transformação do crescimento), ligado à maturação folicular e ao processo de luteinização. Isso nos leva a inferir que as fêmeas Piau podem ter um CL inicial com menor maturação e, talvez, uma menor capacidade de produzir P4 no início da fase luteínica.

As fêmeas hiperprolíferas da raça Meishan apresentaram produção mais rápida de progesterona após o pico de LH e comportamento de estro mais precoce, o que pode estar relacionado com o fato de apresentarem folículos mais maduros (Hunter et al., 1996; Hunter et al., 1993). Todos esses fatos podem sugerir uma alteração na taxa de fertilidade entre as fêmeas suínas pertencentes a diferentes

grupos genéticos, principalmente na raça Piau, mas é necessária análise hormonal para tal afirmação. Importante ressaltar ainda que os fatores angiogênicos e seus receptores são reguladores do desenvolvimento folicular e da manutenção de concentrações adequadas de progesterona durante a gestação (Hunter et al., 2004).

4.2. Expressão gênica em CG e CL

A angiogênese é coordenada por uma série de fatores pró e anti-angiogênicos (Bonagura et al., 2010). Os folículos saudáveis são altamente vascularizados, enquanto folículos atrésicos possuem pouca ou pobre vascularização, sugerindo a associação entre vascularização e função folicular (Goede et al., 1998). Dessa forma, a manutenção da vascularização dos folículos é de grande importância para a saúde folicular (Reynolds et al., 2000).

No presente estudo foi avaliada a expressão dos genes ANGPT1, ANGPT2 e do receptor TEK nas células da granulosa de folículos do dia 14 e 18 do ciclo estral. Esses genes não apresentaram diferença entre os dias do ciclo estral e o grupo genético. Tais resultados podem estar relacionados com o fato de ainda ser um período com expressão mais constante desses genes nos folículos. O TEK apresentou apenas tendência à variação entre os grupos genéticos, esse fato pode ser importante ao analisar que a ANGPT1 e ANGPT2 são antagonistas e competem pelo mesmo receptor. Sugerindo pequeno aumento aos 18 dias do ciclo estral no grupo L1 e menores níveis no L2 e na raça Piau, sendo que estas também apresentam pico de estradiol nesse dia. Ye et al. (2002) verificaram que o gene TEK teve expressão atenuada quando houve maiores concentrações de estradiol, mas isso foi observado

em tecidos não reprodutivos, dessa forma, ainda são necessários maiores estudos. É importante destacar que a rede vascular que se desenvolve em torno de cada folículo é confinada às células da teca e à membrana basal, evitando a progressão para a camada de células da granulosa, que continua avascular até a fase de folículo pré-ovulatório. Apesar disso, as células da granulosa contribuem ativamente para o desenvolvimento da vascularização da teca por meio da produção de fatores angiogênicos que se difundem para fora do folículo (Fraser, 2006; Plendl, 2000). Dessa forma seria necessária uma análise mais minuciosa dessa relação entre as células da teca e células da granulosa.

Segundo Shimizu (2002) a atividade de angiogênese e formação de nova rede vascular começa a se desenvolver em folículos de fêmeas suínas com diâmetro superior a 4 mm de diâmetro. Em estudos anteriores, a aplicação de eCG (gonadotrofina coriônica eqüina) em fêmeas suínas para coleta de células da granulosa resultou em incremento da expressão do VEGF e bFGF (fator de crescimento fibroblástico) em folículos médios (4 a 5mm) e grandes (>5mm de diâmetro), mas na ausência do eCG não houve variação na expressão entre os diferentes tamanhos de folículo (Shimizu et al. 2002). O estradiol é um potente fator que altera a angiogênese nos órgãos reprodutivos das fêmeas podendo causar incremento ou redução dos mesmos (Losordo e Isner, 1978), mas no presente estudo não foi possível verificar essa alteração, sendo necessário avaliar a expressão dos genes nos folículos próximos à ovulação, acima de 18 dias.

A transição do folículo para CL e subsequente luteólise resulta em expressivo crescimento e regressão de vasos sanguíneos, envolvendo complexos processos celulares e moleculares (Reynolds et al., 2000; Plendl, 2000).

Em relação à expressão dos genes ligados à angiogênese no CL, apenas a ANGPT1 e a ANGPT2 apresentaram interação entre o grupo genético e dia do ciclo estral. Elas apresentaram ainda divergência entre os grupos. A ANGPT1 também teve expressão diferente ao longo do ciclo. O VEGF, a MMP2 e o TEK, apresentaram expressão semelhante entre os grupos e não houve efeito significativo para a interação.

O MMP2 apresentou no presente estudo apenas tendência a variação ao longo do ciclo estral, independente dos grupos genéticos. Resultados encontrados anteriormente demonstraram a atividade da MMP-2 juntamente com o VEGF no CL de fêmeas suínas durante o ciclo estral e durante a gestação (Ribeiro et al., 2007). A MMP2 tem papel importante durante o crescimento folicular e ovulação por causa de sua capacidade de degradar os principais constituintes da membrana basal. Pitzel et al. (2000) relataram o incremento de MMP2 no CL de fêmeas Landrace a partir dos 9 dias do ciclo estral. Já Ribeiro et al. (2007) observaram em seu estudo um aumento significativo deste gene em fêmeas Large White apenas aos 18 dias, período de intensa luteólise. De modo geral, espera-se incremento desse gene na fase de luteólise, uma vez que a ativação das MMPs é fundamental para permitir o remodelamento da matriz extracelular (Pitzel et al., 2000; Ribeiro et al, 2007).

Em relação ao VEGF, conhecido como o principal regulador da angiogênese (Fraser, 2006), não se pode observar nenhuma variação no presente estudo.

Boonyaparakob et al. (2003) verificaram no CL de fêmeas suínas, pertencentes a uma linhagem sintética, expressão constante do VEGF e expressões divergentes dos receptores VEGFR1 e VEGFR2, chegando à conclusão que podem ser os receptores que modulam a ação do VEGF e que todo esse processo está associado a folículos mais saudáveis. Em condições ótimas, o VEGF, promove a maturação do ovócito e seu desenvolvimento (Kere et al., 2014). Em geral, espera-se expressão maior do VEGF durante o período de intensa angiogênese, no qual atua como fator de sobrevivência para as células endoteliais recém-formadas. Enquanto o VEGF é o principal iniciador da angiogênese, a formação e a diferenciação de redes vasculares e sua maturação requerem ação conjunta e coordenada de múltiplos fatores. Nisso se inclui, com grande importância, as angiopoetinas 1 e 2 e seu receptor TEK (Fraser, 2006). Dessa forma pode-se dizer que há semelhança entre os diferentes grupos em relação ao processo de iniciação da angiogênese e que talvez seja a associação do VEGF com seus receptores e outros fatores que estejam explicando as demais divergências fenotípicas existentes entre os grupos.

Os genes ANGPT1 e ANGPT2 apresentaram grande variação no CL ao longo do ciclo entre os três grupos. Esses genes são muito importantes no processo de angiogênese, uma vez que, a relação entre eles é descrita por muitos autores como a responsável pelo processo de estabilização e desestabilização dos vasos sanguíneos (Wulff et al., 2000). A ANGPT1 é requerida para o recrutamento das células perivasculares que estabilizam os capilares recém-formados e para a maturação de vasos sanguíneos (Wulff et al., 2000). A Angiopoetina-2 (ANGPT2) é considerada antagonista da ANGPT1, uma vez que compete pelo mesmo receptor (TEK),

promovendo a desestabilização e regressão dos vasos sanguíneos (Schams and Berisha, 2004).

No presente estudo, a ANGPT1 apresentou maior expressão no início do ciclo estral, dias 3 e 5 diferindo do dia 14. Como dito anteriormente, isso pode explicar numa relação menor ANGPT2/ANGPT1 e assim levar ao importante processo de estabilização dos vasos sanguíneos para a formação dos CL. Wulff et al. (2000) verificaram resultados semelhante ao estudar o CL em humanos, onde a ANGPT1 se expressou de maneira uniforme nas células do CL (células endoteliais, células da teca e da granulosa) com incremento na expressão na fase inicial do ciclo estral. Outra observação interessante do no presente estudo é que a linhagem L2 apresentou expressão superior a L1 nos dias 5 (FC=10.7) e 10 do ciclo estral (FC=8.92). Sendo também menor aos 10 dias do ciclo estral quando comparada à raça Piau (FC=18.53).

A ANGPT2 é encontrada em locais com alto remodelamento de tecido e no trato reprodutivo das fêmeas (Lee et al., 2008). É considerada antagonista da ANGPT1, competindo pelo TEK, promovendo a desestabilização e regressão dos vasos sanguíneos quando há baixa expressão de VEGF (Maisonpierre et al., 1997; Schams e Berisha, 2004). No presente estudo, a ANGPT2 apresentou expressão constante nos dias do ciclo estral, mas houve variações entre os grupos ao longo do ciclo. A raça Piau teve expressão superior quando comparada ao grupo genético L1 nos dias 10 (FC=21.23) e 14 do ciclo estral (FC=8.93). Já o grupo genético L2 foi superior ao grupo L1 apenas no dia 10 (FC=15.18).

A relação entre as angiopoetinas ANGPT2 e ANGPT1 já é conhecida pela sua associação com a atresia ou desenvolvimento folicular e maturação e desestabilização

dos vasos sanguíneos (Maisonpierre et al., 1997; Fraser, 2006; Lee et al., 2008). Na presença de elevada expressão de VEGF a desestabilização resultaria na formação de nova rede vascular (Maisonpierre et al., 1997). Diante disto, que apesar dos grupos genéticos L2 e da raça Piau apresentarem maior expressão de ANGPT2, a relação ANGPT2/ANGPT1 mostrou-se maior no grupo L1 aos 14 dias do ciclo estral, uma vez que, ela teve menor expressão de ANGPT1 comparada ao L2 e à raça Piau. Já foi relatado que em fêmeas de linhagem sintética, com composição genética semelhante às deste estudo, apresentaram incremento na expressão do gene BAX (proteína x associada) no CL aos 18 dias e do gene IGFBP3 (proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina) no dia 11.

O gene BAX pode estar relacionado ao processo de apoptose de forma mais intensa nesses animais e o gene IGFBP3 foi relacionado com luteólise e apresentou correlação negativa com a prolactina que possui importante papel luteolítico no início da fase luteal (Silva et al., 2013; Silva et al., 2011). Deste modo, todos esses fatores sugerem padrão diferente de expressão de genes ligados ao processo de regressão do CL nas fêmeas de diferentes grupos genéticos, de modo que nas linhagens sintéticas, o processo de luteólise pode ocorrer de maneira mais rápida e eficiente e, no caso do grupo genético L1, o aumento da relação ANGPT2/ANGPT1 pode estar causando a desestabilização mais precoce dos vasos sanguíneos, o que pode levar a luteólise mais rápida nessa linhagem.

Associados aos dados de duração do ciclo estral e concentrações de estradiol pode-se sugerir que o grupo genético L1, além de ter maior duração do ciclo estral com aproximadamente 1,5 dias a mais que a raça Piau, pode apresentar menor fase

luteínica e consequentemente maior fase folicular. Este fato explica também o diâmetro superior dos folículos do grupo genético L1 aos 14 dias (5.2 ± 0.14 mm), uma vez que, folículos só são selecionados após o processo de luteólise (Guthrie, 2005), período em que há aumento nas taxas de FSH. Hunter et al. (1996) sugerem que as fêmeas Meishan apresentam fase luteínica menor e uma fase folicular maior que fêmeas menos prolíferas, o que corrobora com os fatos da linhagem L1 apresentar maior fase folicular e maior taxa de ovulação que a raça Piau.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho e em trabalhos anteriores realizados pela mesma equipe de pesquisa sugerem um padrão diferente na expressão de genes ligados ao processo de regressão do CL nas fêmeas de diferentes grupos genéticos e que nas linhagens sintéticas o processo de luteólise pode ocorrer de maneira mais eficiente e consequentemente pode haver melhor desenvolvimento da fase folicular.

O aumento da relação ANGPT2/ANGPT1 pode ter causado desestabilização mais precoce dos vasos sanguíneos no grupo genético L1, podendo induzir luteólise mais rápida, e associado aos dados sobre a duração do ciclo estral, concentração de estradiol e diâmetro folicular, pode-se inferir que o L1, além de ter maior ciclo estral, pode apresentar menor fase luteínica e consequentemente maior fase folicular.

Há necessidade de estudos mais profundos quanto à qualidade folicular, uma vez que, os padrões de expressão gênica das células foliculares obtidos nesse estudo foram semelhantes nos três grupos genéticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ardelt, A. a., McCullough, L.D., Korach, K.S., Wang, M.M., Munzenmaier, D.H., Hurn, P.D. (2005). Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor- α in a rodent experimental stroke model. *Stroke* 36, 337–341.

Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Martinat-Butte, F., Terqui, M. (1988). Sexual maturation and morphological development of the reproductive tract in large white and prolific Chinese Meishan pigs. *J. Reprod. Fertil.* 83, 723–728.

Bertan, C., Binelli, M. (2006). Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise: revisão de literatura. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 824–840.

Bonagura, T.W., Aberdeen, G.W., Babischkin, J.S., Koos, R.D., Pepe, G.J., Albrecht, E.D. (2010). Divergent regulation of angiopoietin-1 and -2, tie-2, and thrombospondin-1 expression by estrogen in the baboon endometrium. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 430–438.

Boonyaparakob, U., Gadsby, J., Hedgpeth, V., Routh, P., Almond, G. (2003). Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the oestrous cycle. *Reproduction* 126, 393–405.

Coffey, R.D., Specialist, E.S., Parker, G.R., Laurent, K.M. (2010). Manipulation of the Estrous Cycle in Swine. ASC-152

Egito, A., Mariante, a S., Albuquerque, M. (2002). Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. *Arch. Zootec.* 51, 39–52.

Fortune, J. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 232, 225–232.

Fortune, J.E., Rivera, G.M., Yang, M.Y. (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 109–26.

Fraser, H.M. (2006). Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 1-18.

Guthrie, H. (1995). Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J. Anim. Sci.* 2834–2844.

Hafez, E., 1995. *Reprodução animal*. 13, 183-192

Hunter, M.G., Biggs, C., Foxcroft, G.R., McNeilly, a S., Tilton, J.E. (1993). Comparisons of endocrinology and behavioural events during the periovulatory period in Meishan and large-white hybrid gilts. *J. Reprod. Fertil.* 97, 475–480.

Hunter, M.G., Picton, H.M., Biggs, C., Mann, G.E., McNeilly, A.S., Foxcroft, G.R. (1996). Periovulatory endocrinology in high ovulating Meishan sows. *J. Endocrinol.* 150, 141–147.

Hunter, M.G., Robinson, R.S., Mann, G.E., Webb, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 461–77.

Irgang, R., Fávero, J. a., Kennedy, B.W. (1994). Genetic parameters for litter size of different parities in Duroc, Landrace, and large white sows. *J. Anim. Sci.* 72, 2237–2246.

Johnson, R.K., Nielsen, M.K., Casey, D.S. (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.

Kere, M., Siriboon, C., Liao, J.W., Lo, N.W., Chiang, H.I., Fan, Y.K., Kastelic, J.P., Ju, J.C. (2014). Vascular endothelial growth factor A improves quality of matured porcine oocytes and developing parthenotes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 49, 60–9.

Knox, R. V. (2005). Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 385–97.

LaVoie, H. a, Singh, D., Hui, Y.Y. (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 beta. *Endocrinology* 145, 3122–3134.

Lee, Y.L., Liu, Y., Ng, P.Y., Lee, K.F., Au, C.L., Ng, E.H.Y., Ho, P.C., Yeung, W.S.B. (2008). Aberrant expression of angiopoietins-1 and -2 and vascular endothelial growth factor-A in peri-implantation endometrium after gonadotrophin stimulation. *Hum. Reprod.* 23, 894–903.

Li, H.-K., Kuo, T.-Y., Yang, H.-S., Chen, L.-R., Li, S.S.-L., Huang, H.-W. (2008). Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 103, 312–322.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8.

Losordo, D.W., Isner, J.M. (1978). Estrogen and Angiogenesis A Review. *Psychol. Women Q.* 2, 386–387.

Luc, D.D.A., Bo, H.X.A., Thomson, P.C.B., Binh, D.V.A., Leroy, P.C., Farnir, F.C. (2013). Reproductive and productive performances of the stress- negative Piétrain pigs in the tropics : the case of Vietnam 173–179.

Manabe, N., Goto, Y., Matsuda-Minehata, F., Inoue, N., Maeda, A., Sakamaki, K., Miyano, T. (2004). Regulation Mechanism of Selective Atresia in Porcine Follicles: Regulation of Granulosa Cell Apoptosis during Atresia. *J. Reprod. Dev.* 50, 493–514.

Miranda-Furtado, C.L., Silva, P.V., Guimarães, M.F.M., Serão, N.V.L., Guimarães, J.D., Guimarães, S.E.F. (2010). Differential expression of genes in follicular cells of swines. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 1023-1029

Misung, J., Thomas, L., Wheeler, S., Curry, T. (2004). Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP)-associated MMP-2 activation increases in the rat ovary in response to an ovulatory dose of human chorionic gonadotropin. *Biol. Reprod.* 70, 1024–32.

Moses, M. (1997). The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells.* 15, 180–189.

Newton, J. (1977). Selection for Evaluation Rate in Swine: Correlated Response in Age and Weight at Puberty, Daily Gain and Probe Backfat. *J. Anim. Sci.* 30–35.

Noguera, J.L., Rodríguez, C., Varona, L., Tomàs, A., Muñoz, G., Ramírez, O., Barragán, C., Arqué, M., Bidanel, J.P., Amills, M., Ovilo, C., Sánchez, A. (2009). A bi-dimensional genome scan for prolificacy traits in pigs shows the existence of multiple epistatic QTL. *BMC Genomics* 10, 636-648.

Otani, N., Minami, S., Yamoto, M., Shikone, T., Otani, H., Nishiyama, R., Otani, T., Nakano, R. (1999). The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 3845–3851.

Pitzel, L., Lüdemann, S., Wuttke, W. (2000). Secretion and gene expression of metalloproteinases and gene expression of their inhibitors in porcine corpora lutea at different stages of the luteal phase. *Biol. Reprod.* 1127, 1121–1127.

Plendl, J. (2000). Angiogenesis and Vascular Regression in the Ovary. *Anat. Histol. Embryol.* 29, 257-266.

Reynolds, L., Grazul-Bilska, A., Redmer, D. (2000). Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12, 1–9.

Ribeiro, L. a, Turba, M.E., Bernardini, C., Zannoni, a, Bacci, M.L., Forni, M. (2007). Matrix metalloproteinases -2 and -9 in swine luteal tissue angiogenesis and angioregression. *Vet. Res. Commun.* 31 Suppl 1, 193–6.

Sakata, A., Tamura, H., Asada, H., Miwa, I., Taketani, T., Yamagata, Y., Sugino, N. (2006). Changes in vascular leakage and expression of angiopoietins in the corpus luteum during pregnancy in rats. *Reproduction* 131, 351–360.

Salles, M., Araújo, A. (2010). Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. *Rev. Bras. Reprodução Anim.* 34, 185–194.

Schams, D., Berisha, B. (2004). Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. *Reprod. Domest. Anim.* 251, 241–251.

Serão, N.V.L., Veroneze, R., Ribeiro, a M.F., Verardo, L.L., Braccini Neto, J., Gasparino, E., Campos, C.F., Lopes, P.S., Guimarães, S.E.F. (2011). Candidate gene expression and intramuscular fat content in pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 128, 28–34.

Shimizu, T. (2002). Changes of Messenger RNA Expression of Angiogenic Factors and Related Receptors During Follicular Development in Gilts. *Biol. Reprod.* 67, 1846–1852.

Silva, P., Guimarães, S., Guimarães, J., Nascimento, C., Lopes, P., Siqueira, J., Amorim, L., Fonseca e Silva, F., Foxcroft, G. (2013). Follicular dynamics and gene expression in granulosa cells, corpora lutea and oocytes from gilts of breeds with low and high ovulation rates. *Reprod. Fertil. Dev.*

Silva, P., Guimarães, S., Guimarães, J., Neto, J., Lopes, P., Nascimento, C., Campos, C., Weller, M., Botelho, M., Faria, V. (2011). Gene expression in swine granulosa cells and ovarian tissue during the estrous cycle. *Genet. Mol. Res.* 10, 2258–2267.

Steibel, J.P., Poletto, R., Coussens, P.M., Rosa, G.J.M. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 94, 146–52.

Thomas, F.H., Vanderhyden, B.C. (2006). Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 1-19.

Toniollo, G., Vicente, W., Oliveira, C., Malheiros, E., Carvalho, L., n.d. (1997). Níveis séricos de cortisol e 17- β estradiol durante o ciclo estral em marrãs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 49, 297-307

Veroneze, R., Lopes, P., Guimarães, S., Guimarães, J., Costa, E., Faria, V., Costa, K. (2014). Using pedigree analysis to monitor the local Piau Pig breed conservation program. *Arch. Zootec* 63, 45–54.

Wulff, C., Wilson, H., Largue, P., Duncan, W.C., Armstrong, D.G., Fraser, H.M. (2000). Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4302–4309.

Ye, F., Florian, M., Magder, S. A., Hussain, S.N.A. (2002). Regulation of angiopoietin and Tie-2 receptor expression in non-reproductive tissues by estrogen. *Steroids* 67, 305–310.