

PRESENÇA DE LEPTINA EM FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE FÊMEAS SUINAS PRÉ-PUBERES SUPLEMENTADAS COM ÔMEGA-3

EDENARA ANASTÁCIO¹; FABIANA MOREIRA²; MONIKE QUIRINO³;
BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁴; IVAN BIANCHI⁵; THOMAZ LUCIA JUNIOR⁶

¹UFPel 1 – edenara_anastacio@hotmail.com

²Instituto Federal Catarinense – fabimorvet@gmail.com

³UFPel – monikequirino@gmail.com

⁴UFPel – bggasperin@gmail.com

⁵Instituto Federal Catarinense – ivanbianci@gmail.com

⁶UFPel – tluciajr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) são fontes de energia essenciais para o desenvolvimento do embrião e para o crescimento fetal na espécie suína. Entre os PUFA, existem os ácidos graxos da série ômega-3, sendo os mais importantes deste grupo os ácidos eicosapentaenoíco (EPA) e docosahexaenoíco (DHA) (revisado por Tanghe & De Smet, 2013). Em estudo realizado com suplementação de PUFA em dietas durante a gestação e lactação em fêmeas suínas, observou-se a incorporação destes ácidos em membranas de óocitos, modulação nos padrões de expressão de enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas, do metabolismo de hormônios esteróides e de estresse oxidativo (Wathes et al., 2007).

Dietas com altos teores de PUFA, especificamente da série ômega-3, podem resultar em aumento na concentração plasmática de leptina (Cha e Jones, 1998). A leptina e seu receptor (ObRb) foram identificados no hipotálamo de fetos suínos, fêmeas cíclicas, prenhas e pré-púberes (Lin et al., 2001), atuando como um fator permissivo para a sinalização do estado nutricional no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Zieba et al., 2005). A suplementação de leitoas com dietas incluindo PUFA pode também levar a aumento nas reservas de gordura e no peso corporal (Amaral et al., 2010), auxiliando no desencadeamento da puberdade (Zieba et al., 2005). Em decorrência da escassez de estudos nesta área, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da suplementação de PUFA ômega-3 na intensidade da imunomarcação de leptina e seu receptor ObRb em óocitos de fêmeas pré-púberes.

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (9648). O estudo foi realizado em uma granja comercial localizada no sul do Brasil, com 25 fêmeas pré-púberes, F2 mestiças, destinadas ao abate. No início do experimento, as fêmeas possuíam 120 dias de idade e pesavam 50.6 kg, sendo alojadas em baías de terminação com ventilação natural e recebendo uma alimentação diária de 2,5 kg de concentrado, contendo 14,7% de proteína bruta e energia metabolizável de 3.205 Kcal/Kg (NRC, 1998).

As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em dois tratamentos: grupo controle ($n = 13$) que recebeu óleo de soja disponível comercialmente; e um segundo grupo ($n = 12$) que recebeu óleo de peixe (Idealfarma, São Paulo, SP, Brasil) como fonte de ômega-3. Em ambos os tratamentos, as fêmeas foram suplementadas com 9 mL de cada óleo, com seringas descartáveis por via oral,

durante 45 dias. O valor energético de 1,0 g de óleo de soja foi de 8,3 kcal (35,0 kJ), contendo 0,9 g de gordura total, incluindo 0,55 g de PUFA não especificados, sem inclusão de ômega-3. O valor energético em 1,0 g do óleo de peixe foi de 9,5 kcal (40,0 kJ), contendo 0,9 g de PUFA (0,35 g de DHA e 0,5 g EPA), totalizando 8,1 g de PUFA, correspondente a 6,88 g de ômega-3.

No abatedouro os ovários foram recolhidos. Posteriormente, quatro estruturas de cada grupo foram submetidas à técnica de imunohistoquímica (IHQ), como descrito por Moreira et al. (2013), usando para a pesquisa de imunomarcação de leptina os anticorpos anti-leptina [anti-Ob; C-20, SC-842-rabbit (IgG)] e anti-ObR [pAb M-18-goat (IgG)] para o receptor da leptina.

Após a técnica, os oócitos foram classificados como: inclusos em folículos primordiais/primários (OIFP), quando rodeado por uma camada plana de células da granulosa; inclusos em folículos secundários (OIFS), quando rodeados por duas ou mais camadas de células cúbicas da granulosa; ou inclusos em folículos terciários (OIFT), quando cercado por várias camadas de células da granulosa e com formação de antró (Silva et al., 2011).

As imagens foram captadas com uma câmera digital (Olympus DP72) ligada a um microscópio óptico (Olympus BX 51, Tóquio, Japão), utilizando a objetiva de 40 X, para OIFP e OIFS, e a 10 X para OIFT. Para análise de anti-Ob foram avaliados 79 OIFP, 35 OIFS e 28 OIFT, enquanto que para as análises de anti-ObR foram considerados 44 OIFP, 34 OIFS e 21 OIFT. A quantificação proteica foi realizada através de um software de imagem (Di Cataldo et al, 2012). Para cada área avaliada, a média da intensidade de imunomarcação foi registrada pelo aplicativo Image J®, usando uma escala de 0 (maior intensidade de coloração) a 255 (sem coloração).

As médias para os valores mais comuns (modas) observados para a intensidade de imunomarcações para Ob e ObRb nos distintos oócitos foram comparadas entre os tratamentos, através de análise de variância. As comparações entre médias foram realizadas pelo teste de diferença mínima significativa, através do software Statistix® (2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se imunomarcação para leptina e ObRb em oócitos inclusos em folículos de distintos estágios de desenvolvimento, nos dois tratamentos (Figura 1). A imunomarcação para a leptina foi mais intensa no citoplasma de OIFP e em OIFS de fêmeas suplementadas ($P < 0,05$) do que em oócitos semelhantes das fêmeas do grupo controle (Tabela 1). A intensidade da imunomarcação para ObRb também foi mais intensa em OIFS de fêmeas suplementadas, quando comparada com fêmeas do grupo controle ($P < 0,05$).

A imunomarcação para leptina em OIFP e OIFS de leitoas pré-púberes é menos intensa do que em estruturas semelhantes de fêmeas púberes (Moreira et al., 2013). Desta forma, a suplementação com ômega-3 no início da puberdade de fêmeas suínas, como observado em estudo com outros óleos (Zhuo et al., 2014), pode reforçar os potenciais efeitos da leptina na estimulação da puberdade (Zieba et al., 2005).

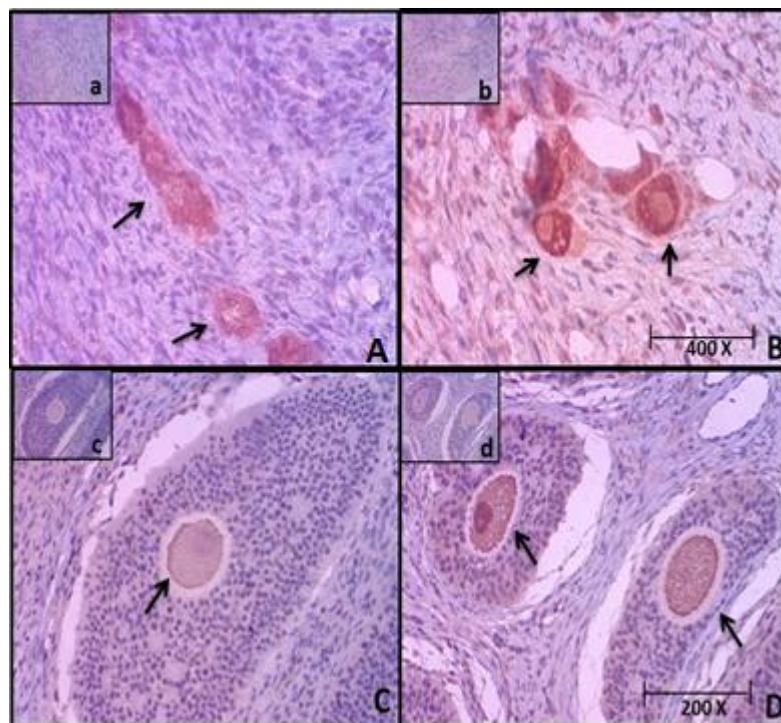


Figura 1: Imunomarcação (setas) para leptina em ovários do grupo controle (A) e de fêmeas pré-púberes suplementadas com ômega-3 (B) e para o receptor de leptina (Ob Rb) em ovários do grupo controle (C) e de fêmeas suplementadas com ômega-3 (D).
a, b, c e d: controle negativo de A, B, C e D, respectivamente

Tabela 1: Intensidade da imunomarcação (médias para as modas observadas) para leptina e seu receptor (ObR-b) no citoplasma de oócitos de fêmeas pré-púberes inclusos nos diferentes tipos foliculares (0: maior intensidade de coloração; 255: sem coloração)

| | TRAT | n | OIFP | n | OIFS | N | OIFT |
|----------------|----------|----|-----------------------------|----|------------------------------|----|-----------------|
| Leptina | Controle | 38 | 81,8 \pm 2,6 ^a | 15 | 76,2 \pm 5,6 ^c | 15 | 64,5 \pm 8,4 |
| | Ômega-3 | 41 | 71,5 \pm 1,7 ^b | 20 | 58,9 \pm 4,5 ^d | 13 | 69,0 \pm 4,2 |
| ObRb | Controle | 21 | 89,9 \pm 3,7 | 17 | 106,1 \pm 5,6 ^x | 10 | 108,7 \pm 5,4 |
| | Ômega-3 | 33 | 89,0 \pm 3,4 | 17 | 86,8 \pm 4,9 ^y | 11 | 101,2 \pm 7,0 |

a,b,c,d,x,y Significa diferença estatística entre os tratamentos na coluna ($P < 0.05$)

Este estudo é o primeiro realizado com a finalidade de avaliar os efeitos do ômega-3, sobre ovários de fêmeas pré-púberes. Os resultados obtidos sugerem que a suplementação deste PUFA aumenta os níveis de leptina e expressão de seus receptores em oócitos, tendo desta forma, efeito sobre os órgãos reprodutores.

O baixo número de fêmeas disponíveis e o fato de que as fêmeas utilizadas eram destinadas ao abate, podem ter limitado as deduções sobre o tema. Desta forma, os efeitos potenciais da suplementação de ômega-3 no desencadeamento da puberdade ainda precisam ser abordados em pesquisas futuras.

4. CONCLUSÕES

A suplementação de fêmeas pré-púberes com ômega-3 intensificou a imunomarcação para leptina e seu receptor em oócitos inclusos em folículos pré-antrais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, W.S., BERNARDI, M.L., WENTZ, I., BORTOLOZZO, F.P., 2010. Reproductive performance of gilts according to growth rate and backfat thickness at mating. **Animal Reproduction Science** 121, 139-144.
- CHA, M.C., JONES, P.J.H., 1998. Dietary fat type and energy restriction interactively influence plasma leptin concentration in rats. **Journal of Lipid Research** 39, 1655-1660.
- DI CATALDO, S., FICARRA, E., MACII, E., 2012. Computer-aided techniques for chromogenic immunohistochemistry: Status and directions. **Computers in Biology and Medicine** 42, 1012-1025.
- LIN, J., RICHARD BARB, C., KRAELING, R.R., RAMPACEK, G.B., 2001. developmental changes in the long form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. **Biology of Reproduction** 64, 1614-1618.
- MOREIRA, F., CORCINI, C.D., MONDADORI, R.G., GEVEHR-FERNANDES, C., MENDES, F.F., ARAÚJO, E.G., LUCIA, T., Jr., 2013. Leptin and mitogen-activated protein kinase (MAPK) in oocytes of sows and gilts. **Animal Reproduction Science** 139, 89-94.
- NRC, 1998. National Research Council. Nutrient Requirements of Swine. Washington, DC.
- SILVA, R.C., BÁO, S.N., JIVAGO, J.L.P.R., LUCCI, C.M., 2011. Ultrastructural characterization of porcine oocytes and adjacent follicular cells during follicle development: lipid component evolution. **Theriogenology** 76, 1647-1657.
- TANGHE, S., DE SMET, S., 2013. Does sow reproduction and piglet performance benefit from the addition of n-3 polyunsaturated fatty acids to the maternal diet? **The Veterinary Journal** 197, 560-569.
- WATHES, D.C., ABAYASEKARA, D.R.E., AITKEN, R.J., 2007. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. **Biology of Reproduction** 77, 190-201.
- ZHUO, Y., ZHOU, D., CHE, L., FANG, Z., LIN, Y., WU, D., 2014. Feeding prepubescent gilts a high-fat diet induces molecular changes in the hypothalamus-pituitary-gonadal axis and predicts early timing of puberty. **Nutrition** 30, 890-896.
- ZIEBA, D.A., AMSTALDEN, M., WILLIAMS, G.L., 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. **Domestic Animal Endocrinology** 29, 166-185.