

EXPRESSÃO E IMUNOMARCAÇÃO DE LEPTINA NAS CÉLULAS FOLICULARES BOVINAS

CRISTINA SANGOI HAAS^{1,2}; FABIANA MOREIRA²; MONIQUE ROVANI³; JULIANA GERMANO FERST³; KAUE RODRIGUEZ MARTINS²; BERNARDO GARZIERA GASPERIN^{2,4}

¹Universidade Federal de Pelotas – cristinasangoi@gmail.com

²ReproPEL - Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Santa Maria

⁴Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptina, hormônio produzido pelos adipócitos é um dos principais sinalizadores centrais do estado nutricional de animais e humanos, regulando diversas funções fisiológicas, dentre elas o metabolismo energético e a reprodução. As funções sistêmicas da leptina já estão bem estabelecidas (ZIEBA et al., 2005), sendo este hormônio localizado no tecido adiposo, hipotálamo, hipófise e nos órgãos reprodutivos (BLUER e MANTZOROS, 2007). A expressão de leptina pelos folículos bovinos indica que existe também produção local, no entanto, os efeitos da leptina na função folicular em bovinos são desconhecidos, sendo descritos uma correlação negativa com os níveis intrafoliculares de estradiol e uma associação com os níveis de progesterona (SARKAR et al., 2010) e envolvimento na maturação do oócito (BOELHAUVE et al., 2005).

Os locais de produção de leptina e os tecidos-alvo deste hormônio no ovário ainda não foram estabelecidos em bovinos. Além disso, as funções e mecanismos de ação da leptina no controle autócrino/ parácrino da foliculogênese ainda são desconhecidos. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a localização e a expressão celular da leptina e do seu receptor em ovários de fêmeas bovinas e comparar a imunomarcação da leptina nas células da granulosa de folículos completamente diferenciados (dominantes) e folículos atresícos (subordinados) obtidos *in vivo*.

2. METODOLOGIA

Inicialmente, para determinar os locais de expressão da leptina e seu receptor, amostras de oócitos, células do cumulus, granulosa e teca foram dissecadas de ovários obtidos em abatedouro. Após extração utilizando protocolo com fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol), o RNA total foi tratado com DNase para digerir qualquer DNA contaminante, sendo posteriormente realizada a reação de transcrição reversa com o kit iScript cDNA Synthesis (BioRad), conforme instruções do fabricante. A amplificação do cDNA foi realizada por RT-PCR (StepOne Plus, Applied Biosystems) utilizando os iniciadores:

- ✓ F-TCTACCAACAGATCCTCACCAGTCT e R-GGTCCCGGAGGTTCTCCA para a leptina
- ✓ F-ACGGAAGGAGTAGGGAAACC e R-TGAGGAGGAAATTATTATTGGCACA para o receptor da leptina

Os produtos de PCR foram posteriormente corridos em gel de agarose. Foram utilizadas apenas amostras que amplificaram adequadamente o gene constitutivo GAPDH (indicador de integridade das amostras) e a especificidade dos

amplicons obtidos foi avaliada através de análise das curvas de dissociação (melting) e tamanho dos amplicons (dados não demonstrados).

Para a coleta de folículos dominantes e subordinados *in vivo*, 10 fêmeas bovinas foram sincronizadas através de duas aplicações de prostaglandina com intervalo de 11 dias. Após detecção de estro, as vacas foram submetidas à dinâmica folicular através de exames ultrassonográficos diários por via transretal. Para caracterização da imunomarcação da leptina, foram coletados os ovários de vacas e dissecados os dois maiores folículos no início da onda folicular referente ao dia “4”. O dia da emergência da onda de desenvolvimento folicular foi designado como dia “0”, conforme estabelecido por EVANS E FORTUNE (1997). Os ovários de sete fêmeas bovinas foram coletados via colpotomia e acondicionados em solução de formol a 10%. As amostras foram encaminhadas para o laboratório de histologia da UFPEL e submetidas ao processamento histológico clássico.

A técnica de imunistoquímica (IHQ) foi realizada em lâminas impregnadas com organossilano a 3% (Sigma[®], St. Louis, MO, USA). Para a realização da técnica utilizou-se o anticorpo primário anti-leptina Ob (A-20, Santa Cruz Biotechnology, sc-842 - rabbit) na diluição de 1:1000. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H₂O₂ a 3% e a recuperação antigênica em calor úmido sob pressão. O bloqueio da marcação inespecífica foi realizado com albumina sérica bovina (BSA) à 3%. Após a adição dos anticorpos primários, as lâminas foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C. Logo após, as lâminas para análise do Ob foram instiladas com o sistema streptavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB - Dako K0690 Corporation, CA, USA). A reação foi revelada por meio da adição de solução de diaminobenzidina-peroxidase (DAB-peroxidase, Corporation CA, USA). Os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Mayer (Merck[®], Darmstadt, Germany) e após as lâminas foram fixadas com resina sintética (Sigma Chemical Company[®], St. Louis, MO, USA).

As lâminas submetidas à IHQ foram analisadas em microscópio de campo claro (Olympus DP72) e a imunomarcação de Leptina nos tecidos foi classificada conforme o escore de imunoreatividade: (-) ausente; (+) discreta (menos de 30% das células); (++) moderada (30 a 70% das células); (+++) intensa (mais de 70% das células). Imagens representativas dos resultados foram digitalizadas por meio de câmera digital (Olympus BX 51, Tokyo, Japan) acoplada ao microscópio óptico, com aumento de 40 X.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi possível observar que a leptina é expressa no ovário de fêmeas bovinas, nos oócitos, células do cumulus, granulosa e teca, confirmando sua síntese local no folículo (SARKAR et al., 2010). Já o receptor da leptina está presente apenas no oócito e células da teca (Figura 1). Estes resultados demonstram que a leptina é secretada em todos os tipos celulares do folículo, porém sugerem um efeito apenas sobre as células da teca e oócito. Estudos anteriores indicaram a expressão de receptores de leptina nas células da teca e granulosa de ovários bovinos, sendo os mesmos funcionais, uma vez que a adição da leptina em cultivo *in vitro* foi capaz de inibir a esteroidogênese nos dois tipos celulares (revisado por SPICER, 2001). O fato de não termos observado expressão do receptor nas células da teca pode ser devido a diferenças nas fases e na viabilidade dos folículos utilizados no estudo.



Figura 1: Gel de agarose demonstrando a presença de bandas do gene leptina em oócitos (OOC), células do cumulus (CUM), células da granulosa (GRAN) e células da teca (TECA) e do gene do receptor da leptina (LEPR) em oócitos e células da teca. CN= controle negativo.

De acordo com as análises realizadas (Figura 2) foi possível observar imunomarcagem para leptina nas células da granulosa dos folículos, principalmente dos subordinados. As células da camada da granulosa dos folículos dominantes (F1) apresentaram discreta (Figuras 1A e 1E) ou nenhuma imunomarcagem (Figura 1C) para a leptina, enquanto que as mesmas células dos folículos subordinados (F2) apresentaram intensa imunomarcagem (Figuras 1B, 1D e 1F) em todos os folículos das fêmeas em estudo.

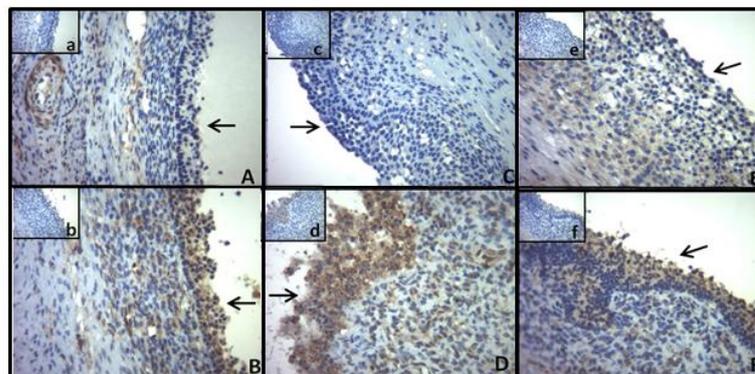


Figura 2. Imunomarcagem para a leptina nas células da granulosa dos folículos ovarianos de fêmeas bovinas. Letras maiúsculas são referentes aos cortes histológicos incubados com anticorpo. Letras minúsculas indicam os cortes histológicos dos controles negativos. As setas indicam as células da granulosa.

A intensa imunomarcagem observada nos folículos subordinados, ou seja, naqueles que estavam em atresia, sugere que a leptina pode estar associada com a inibição do crescimento folicular. Níveis elevados de leptina no fluido de folículos atresícos foram demonstrados por DAYI et al. (2005). É possível inferir que a leptina agindo localmente, esteja regulando a esteroidogênese, inibindo o crescimento folicular, uma vez que os folículos utilizados no presente estudo que apresentaram intensa marcação são folículos com células da granulosa apoptóticas. Em suporte a esta hipótese SARKAR et al. (2010) também observaram uma diminuição na expressão de leptina em folículos com altos níveis de estradiol intrafolicular, ou seja, folículos saudáveis. Recentemente, nosso grupo observou que a rota de sinalização STAT3, ativada pela leptina, só encontra-se ativa (fosforilada) em folículos em avançada atresia (dados submetidos para publicação), ou seja, na mesma fase dos folículos subordinados utilizados neste estudo. É possível que a leptina, ativando a via STAT3, esteja envolvida no mecanismo de morte celular, uma vez que a ativação

da STAT3 é essencial durante a involução da glândula mamária, a qual envolve morte celular por apoptose (CHAPMAN et al., 1999).

Apesar das associações consistentes já demonstradas, a real função da leptina localmente no folículo, ainda é desconhecida. Estudos estão sendo realizados para avaliar a regulação da síntese da leptina, do seu receptor e das rotas de sinalização ativadas pelos mesmos durante o desenvolvimento folicular *in vivo*. Desta forma, pretende-se confirmar a expressão nos diferentes momentos, antes, durante e após a divergência folicular e, através do modelo de injeção intrafolicular, investigar os efeitos da leptina sobre as células foliculares *in vivo*.

4. CONCLUSÕES

A leptina e seu receptor são expressos nos tecidos ovarianos de bovinos confirmando a ação local da proteína e seu envolvimento no crescimento folicular. Ainda, a leptina possui uma maior imunomarcagem no dia “4” da onda folicular, quando as células da granulosa do folículo subordinado entram em apoptose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BOELHAUVE, M.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; LOPES, F.F. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. **Biology of reproduction**. v.73, p. 737–744, 2005.

CHAPMAN, R.S., LOURENCO, P.C., TONNER, E., FLINT, D.J., SELBERT, S., TAKEDA, K., AKIRA, S., CLARKE, A.R., WATSON, C.J. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. **Genes & Development**, v. 13, p. 2604-2616, 1999.

DAYI, A., BEDIZ, C.S., MUSAL, B., YILMAZ, O., COMLEKCI, A., CELILOGLU, M., CIMRIN, D. Comparison of leptin levels in serum and follicular fluid during the oestrous cycle in cows. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 53 (4), p. 457–467, 2005.

EVANS, A. C. O.; FORTUNE, J. E. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. **Endocrinology**, v.138, n.7, p.2963-2971, 1997.

SARKAR, M.; SCHILFFARTH, S.; SCHAMS, D.; MEYER, H.H.D.; BERISHA, B. The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary. **Molecular Reproduction & Development** v. 77, p.174–181, 2010.

SPICER, L.J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 21, p. 251–270, 2001.

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