

USO DE METODOLOGIAS GENÔMICAS PARA O ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS COM O ANESTRO EM LEITOAS

Por Monike Quirino¹; Cleverson Hebbell²;
Pricila Basselar^{1,2}; Adriana Mércia Guaratini
Ibelli^{3,4}; Mônica Corrêa Ledur^{2,5}; Marcos
Antônio Zanella Mores³; Rafael Keith Ono⁶;
Maurício Egídio Cantão³; Jane de Oliveira
Peixoto^{3,4}; Fabiana Moreira¹; Mariana
Groke Marques^{1,3}; Rafael da Rosa Ulguim⁷;
Bernardo Garziera Gasperin⁸;
Ivan Bianchi⁹

Crédito: Michele dos Passos Dezordi Franz





ANESTRO EM LEITOAS

A Devido as altas taxas de reposição praticadas no sistema de produção de suínos (variando de 40 a 60%), a categoria de leitoas representa o maior percentual de fêmeas do plantel, compondo de 17 a 21% dos grupos de cobertura. Leitoas selecionadas, apresentando boas condições clínicas, a partir de 150-160 dias de idade já possuem capacidade de expressar o estro puberal, principalmente quando submetidas ao manejo de estimulação diária com um macho sexualmente maduro. Porém, 10 a 25% dos animais selecionados (saudáveis e submetidos ao manejo reprodutivo) acabam por não expressar sinais de estro dentro do período estimado (~40 dias após o início da estimulação com o macho). A ausência de expressão de estro nestas condições configura o quadro de anestro que, fisiologicamente, é caracterizado pelos reduzidos níveis circulatórios do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH). Este quadro decorre da liberação irregular do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo ou presença de folículos com número insuficiente de receptores para o LH.

Em nível populacional, a frequência de casos de anestro em leitoas é variável e uma das principais limitações envolvendo esse tema é a determinação de sua causa. De fato, alguns casos podem estar associados a falhas no manejo de estimulação do estro com o macho e/ou na identificação dos sinais característicos, implicando em quadros falsos de anestro. Já em relação aos casos verdadeiros, os principais fatores de risco envolvidos são: deficiências nutricionais, limitações de ambiência e genética. Para alguns destes casos, melhorias de manejo são suficientes para corrigir o problema. Porém, para as situações relacionadas a fatores genéticos o problema poderá persistir apesar dos ajustes de manejo realizados.

De forma geral, os casos "diagnosticados" como anestro nas granjas são destinados ao descarte, sejam falsos ou verdadeiros, independentemente da real causa. Nesse sentido, a ocorrência de anestro em leitoas representa significativo impacto econômico e produtivo para a indústria suinícola. O investimento estimado em uma leitoa de reposição é de aproximadamente US\$320,00. Além disso, estima-se que o descarte destes animais implique no acúmulo de ~57 dias não produtivos. Deve-se pontuar, ainda, o prejuízo diretamente associado aos indicadores produtivos e econômicos das granjas, considerando a falta de leitoas em estro para atender as metas de cobertura e sua influência no número de leitões entregues.

FATORES GENÉTICOS E O ANESTRO EM LEITOAS

Considerando os casos verdadeiros de anestro, porém indeterminados (sem associação com falhas de manejo), é de extrema importância ponderar sua possível relação com fatores genéticos. Uma forma de verificar a presença de um componente genético é por meio da análise de mutações nas sequências de DNA que podem estar associadas ao desenvolvimento do anestro. Estas mutações ocorrem normalmente no



organismo e podem estar dentro ou próximas a regiões responsáveis pela produção de proteínas ou hormônios envolvidos com a manifestação de estro e são comumente conhecidas como genes.

Neste cenário, uma possibilidade de abordagem prática de diagnóstico de anestro em suínos seria o rastreamento de animais portadores da alteração genética que possam perpetuar indivíduos com o problema. Porém, até o momento, não foram identificados marcadores que permitam indicar com precisão quais leitoas teriam predisposição ao anestro. Nesse sentido, destaca-se o potencial uso das ciências ômicas, as quais permitem analisar milhares de variações genéticas, genes, proteínas e metabólitos ao mesmo tempo e, portanto, fornecem informações associadas à resposta biológica. A aplicação de tecnologias ômicas na reprodução animal ainda é recente, contudo, apresenta significativo potencial para avançar no melhor entendimento sobre a ciclicidade e o anestro em leitoas.

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA – GWAS

Nos últimos anos, foram desenvolvidos Estudos de Associação Genômica Ampla (*Genome-Wide Association Studies*), conhecidos como GWAS. Estes estudos levam em consideração a similaridade genética entre indivíduos que dividem a mesma característica, ou seja: parte-se da ideia de que uma característica comum entre indivíduos está associada à variação genética comum entre eles. A partir da análise de GWAS é possível identificar e comparar populações (grupos) de indivíduos quanto às

regiões genômicas que apresentam alguma variação na sequência de DNA, como a substituição de uma única base do DNA por outra (variação do tipo *Single Nucleotide Polymorphism*; SNP ou polimorfismo de única base do DNA). Assim, são localizadas regiões genômicas e genes que potencialmente participam na expressão de características de interesse (fenótipos), mesmo que sua expressão seja regulada por muitos genes.

É válido ressaltar que estes estudos permitem não somente identificar associações entre milhares de SNPs e características fenotípicas, mas também quantificar a significância de tais associações a partir de estratégias estatísticas aplicadas às comparações entre populações. A ocorrência dessas variações pode ter diferentes efeitos na função de um gene ou de uma região regulatória do genoma. Portanto, a principal vantagem do GWAS é possibilitar a identificação de SNPs ou genes que controlam o desencadeamento de determinada condição sem a necessidade de conhecimento genético prévio.

Na medicina humana, a metodologia de GWAS é amplamente utilizada e já permitiu a identificação de milhares de regiões do DNA associadas à susceptibilidade a doenças e à compreensão de características genéticas complexas. Em suínos, a abordagem já vem sendo aplicada e, até o momento, foram investigadas características como: eficiência alimentar, qualidade da carne, motilidade espermática, puberdade, número de leitões nascidos vivos, entre outras. Em relação a marcadores relacionados à ciclicidade ou ao anestro de leitoas, poucos estudos foram conduzidos, sendo ainda necessário investigar o efeito dos fatores

genéticos sobre essa característica. Neste sentido, nossos grupos de pesquisa têm trabalhado para, através da utilização de GWAS, investigar a existência de variações genéticas que poderiam ser encontradas com maior frequência em leitoas que apresentem o quadro de anestro em comparação às leitoas cíclicas (Figura 1).

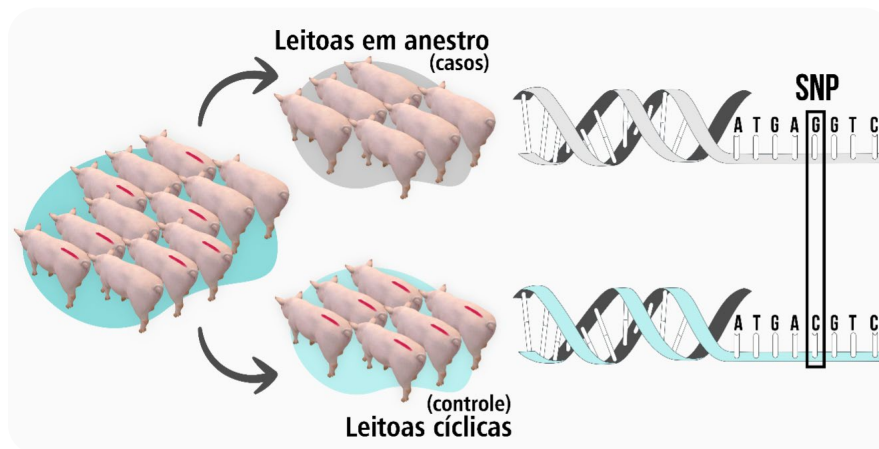


Figura 1: Esquematização da comparação entre o grupo de leitoas em anestro com o grupo de leitoas cíclicas para identificar possíveis marcadores moleculares relacionados à ocorrência desta falha reprodutiva. Fonte: Autores.

Em um de nossos estudos, foram coletadas informações de dois grupos de leitoas de reposição com base no fenótipo de interesse: leitoas em anestro e outro grupo de fêmeas contemporâneas que demonstraram estro e foram inseminadas. O anestro foi confirmado ao abate através da inspeção do trato reprodutivo. De cada animal, uma amostra de tecido da orelha foi coletada (Figura 2), realizando-se a extração de DNA do material seguida de genotipagem com um painel de 50 mil marcadores tipo SNP, para realizar a associação entre o fenótipo e o genótipo. Uma série de análises foi realizada para garantir

a qualidade dos genótipos e, em seguida, fez-se a comparação entre os dados de genótipo e fenótipo, verificando-se se existem variações no DNA que estejam de fato associadas à característica fenotípica de anestro. Até o momento, foi possível encontrar SNPs localizados em três diferentes cromossomos (3, 7 e 9) possivelmente associados com a ocorrência de anestro na população estudada (Figura 3). As análises funcionais, a partir da identificação das regiões associadas com o anestro, estão sendo conduzidas no momento e possibilitarão a identificação de genes candidatos que estão mapeados em tais regiões e que podem influenciar a variação deste fenótipo.



Figura 2: Coleta de amostra do tecido da orelha de leitoas, cíclicas ou diagnosticadas em anestro, para realização de estudo de associação genômica ampla (GWAS). Imagem à esquerda: preparo do instrumento de coleta (unidades de amostragem de tecido, TSU). Imagem à direita: realização da coleta. Fonte: Autores.

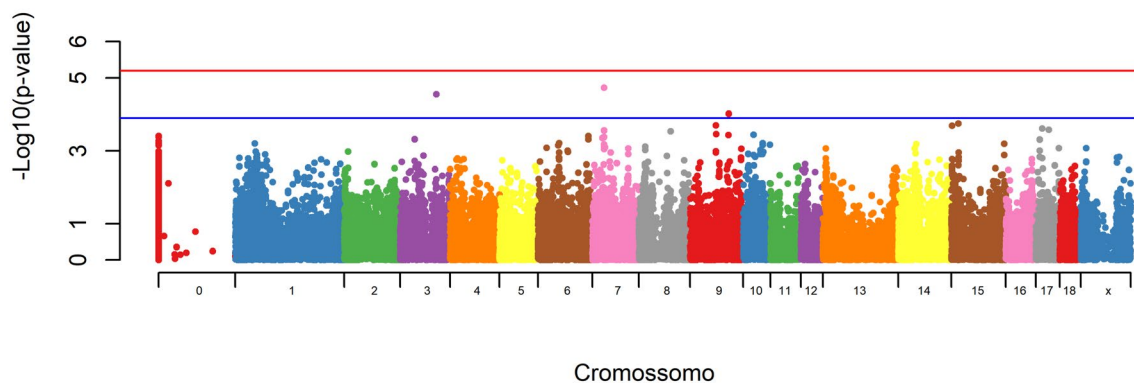


Figura 3: Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla entre o $-\log_{10}(p\text{-valor})$ e o loci do SNP, em ordem sequencial por cromossomo para o anestro em leitoas. Linha superior: limiar de significância de 5% no genoma, com escore de probabilidade de 5,1950. Linha inferior: limiar de significância sugestiva, com escore de probabilidade de 3,8940.

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA PELO SEQUENCIAMENTO DO RNA (RNA-SEQ)

A descoberta de regiões genômicas associadas ao anestro é de extrema relevância para melhor compreender a influência genética sobre a ocorrência de anestro em leitoas. Contudo, ainda é necessário obter informações sobre a diferença na regulação dos genes, assim como o seu impacto na expressão fenotípica da característica de interesse (o anestro). Para isso, estudos de expressão gênica em tecidos ou células responsáveis pelo desencadeamento de determinada característica permitem identificar e quantificar os genes que estão sendo expressos de forma a obter uma visão global dos mecanismos moleculares envolvidos na manifestação do anestro.

Um exemplo de estudo de expressão gênica é a análise do transcriptoma, ou seja, de todos os RNAs que estão sendo produzidos no tecido de interesse, através do sequenciamento do RNA (RNA-Seq). Esta metodologia tem sido amplamente usada na medicina humana para comparar tecidos, tipos e respostas teciduais a uma variedade de condições e doenças. Na produção animal, sua aplicação tem possibilitado melhor compreensão acerca da regulação da expressão gênica de fêmeas suínas em estro, influências de microRNAs no processo de placentação e da identificação de genes diferencialmente expressos nos ovários; colaborando também

para o entendimento de algumas falhas reprodutivas. Considerando que um dos principais fatores fisiológicos associados ao anestro é a liberação irregular de GnRH pelo hipotálamo, nossos estudos têm focado na comparação do transcriptoma do hipotálamo de fêmeas em anestro e cíclicas, utilizando a abordagem de RNA-Seq. Até o momento, foi realizada a coleta do hipotálamo destes animais (Figura 4) e as etapas de verificação de genes diferencialmente expressos entre os dois grupos, que permitirão identificar os mecanismos moleculares envolvidos na ocorrência do anestro em leitoas, ainda estão em andamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de biologia molecular, como as baseadas na genotipagem (GWAS) e no sequenciamento do transcriptoma (RNA-Seq), podem ser utilizadas para a identificação de marcadores moleculares associados à fertilidade e às falhas reprodutivas de fêmeas suínas. A identificação dos marcadores pode ser uma alternativa para otimizar o processo de seleção de fêmeas, de forma a mitigar custos tornando o processo mais eficaz. Além disso, a caracterização de genes e vias metabólicas envolvidos na ocorrência do anestro em leitoas poderá subsidiar estratégias para mitigar esta falha reprodutiva, por meio de ajustes na nutrição, sanidade e ambiente, por exemplo. ⁵¹

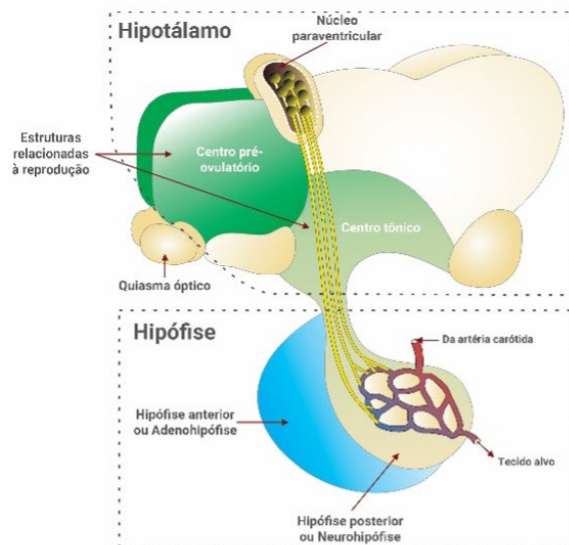


Figura 4: Coleta do hipotálamo e hipófise de leitoas, cíclicas ou diagnosticadas em anestro, para análise do transcriptoma. A) localização da estrutura na base do encéfalo. Fonte: Autores. B) Esquema demonstrando as estruturas de hipotálamo e hipófise. Fonte: Adaptado de Senger, 2015.



Crédito: Michele dos Passos Dezordi Franz

AGRADECIMENTOS

FAPESC: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina;

FAPERGS: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul;

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Pamplona Alimentos S.A.

EQUIPE

Este projeto envolve uma rede interinstitucional de pesquisa que inclui:

¹Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal (PGPSA) do Instituto Federal Catarinense (IFC), (ppgpsa.ifc.edu.br), Araquari, SC

²Pamplona Alimentos S.A.

³Embrapa Suínos e Aves, (www.embrapa.br/en/suinos-e-aves), Concórdia, SC

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR

⁵Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Santa Catarina – UDESC Oeste, Chapecó, SC

⁶Agroceres PIC, Rio Claro, SP

⁷Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Setor de Suínos (www.ufrgs.br/setorsuinos), Porto Alegre, RS

⁸Universidade Federal de Pelotas, Rede FIBRA, (Instagram: [@fibra.ufpel](https://www.instagram.com/fibra.ufpel)), Pelotas, RS

*Contato: ivan.bianchi@ifc.edu.br



As referências bibliográficas deste artigo podem ser obtidas no QR Code ao lado.



47 ANOS
1975-2022

AMARAL

NUTRI AMBIENTAL

Alimentação Animal

Qualidade e pioneirismo
na fabricação de
Farelo de Bolacha

A Amaral Nutri Ambiental ao transformar ingredientes da indústria alimentícia em coprodutos para alimentação animal participa ativamente de um importante elo na cadeia de **Desenvolvimento Sustentável** contribuindo com a preservação do meio ambiente e a segurança alimentar.

MATRIZ
Av. dos Imigrantes, 6776
Bragança Paulista - SP
(11) 4882.9927

FILIAL
Rua Rodolpho Hatschbach, 825
Curitiba - PR
(41) 3268.7621

AMARALNUTRI.COM.BR