

EXPRESSÃO DE GHR E IGF-I EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE DIFERENTES CATEGORIAS

BOLZAN, Guilherme Nunes¹; SCHNEIDER, Augusto²; PFEIFER, Luiz Francisco Machado³; SCHMITT, Eduardo⁴; CORRÊA, Marcio Nunes⁵.

¹Graduando em Medicina Veterinária – UFPel;

²Médico Veterinário, M.C., Doutor em Biotecnologia – UFPEL;

³Médico Veterinário, M.C., Doutor em Zootecnia – UFPEL;

⁴Médico Veterinário, M.C., Doutor em Veterinária – UFPEL;

⁵Médico Veterinário, M.C. Dr. Professor Adjunto – Departamento de Clínicas Veterinária – UFPel.

Universidade Federal de Pelotas
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC)
Campus Universitário – 96010 900 – Pelotas/RS – Brasil
nupeec@ufpel.edu.br – www.ufpel.edu.br/nupeec

1. INTRODUÇÃO

O fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) é produzido principalmente no fígado sob o controle do hormônio do crescimento (GH) (Jones e Clemmons, 1995). O IGF-I é importante no crescimento, desenvolvimento e maturação ovocitária, atuando com efeito mitogênico nas células da granulosa e potencializando o efeito das gonadotrofinas nos tecidos foliculares (KAWASHIMA et al, 2007). O IGF-II é semelhante ao IGF-I em estrutura e função, mas o GH não controla a sua secreção (Vicini et al., 1991). O IGF-I e II estão presentes no líquido folicular, com IGF-II sendo observado em níveis mais elevados do que o IGF-I (Stewart et al., 1996).

Apesar do IGF-I ser produzido por todos os tecidos, a produção hepática representa a maior parte da concentração plasmática. No fígado, a transcrição desse gene é regulada positivamente pelo GH (Kobayashi et al, 1999). O receptor hepático de GH (GHR) possui cinco classes de transcritos, sendo o GHR 1A, GHR 1B e GHR 1C responsáveis por 50%, 35% e 15% respectivamente do RNAm total de GHR (Kobayashi et al., 1999). A Expressão de IGF-I nas células da granulosa do folículo de bovinos é controversa, alguns autores demonstram tanto a sua presença (Rhoads et al, 2008a; Schams et al, 2002; Spicer et al, 1993 e ausência (Armstrong et al. , 2000; Perks et al, 1999; Sudo et al, 2007). Apesar disso, a expressão de IGF-I mRNA é maior e mais facilmente detectável no corpo lúteo (CL) (Kirby et al, 1996; Neuvians et al, 2003; Rhoads et al, 2008a). A expressão de GHR mRNA foi observada no folículo (células da granulosa) e CL, porém a expressão encontrada no folículos foi consideravelmente menor do que no CL (Lucy et al, 1993; Kirby et al, 1996).

O objetivo deste estudo é avaliar a correlação entre a expressão de GHR e IGF-I em células luteais e da granulosa em diferentes categorias de folículos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de Tecido

Foram utilizados ovários obtidos em um abatedouro local, coletados em frascos individuais e estéreis, contendo solução fisiológica. Os folículos presentes que se

encontravam visíveis no par de ovários tiveram seu fluido folicular aspirado e avaliado quanto à concentração de estradiol (E2) e progesterona (P4), para determinar a sua categoria.

Ao laboratório o folículo foi hemipartido em duas metades e a cavidade antral lavada repetidas vezes com solução fisiológica gelada e as células da granulosa recuperadas por centrifugação a 1.200 x g por 2 minutos. Para o CL apenas os de fase III foram selecionados, de acordo com a classificação (Ireland et al., 1980) sendo dissecado do ovário e acondicionado em nitrogênio líquido a -80°C. O diâmetro folicular foi estimado a partir do peso do fluido folicular (FF).

2.2 Análises hormonais

E2 no FF foi determinado por radioimunoensaio (RIA), procedimento descrito por (Butler et al., 2004). A progesterona (P4) retirada em amostras de FF também foi determinada por RIA (Elrod e Butler, 1993).

2.3 Isolamento e quantificação de RNA em tempo – real (PCR)

As amostras (30 mg de CL e pellet de células da granulosa) foram homogeneizadas com 1 mL de Qiazol, o total de RNA foi isolado e purificado. A quantidade e a integridade do RNA foram determinadas usando o Bioanalyzer e RNA Nano Lab Chip Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). Foram realizadas reações de transcrição reversa com 1µg de RNA, utilizando Kits de Transcrição Reversa de cDNA com RNase. Foi avaliada a expressão de GHR, IGF-I, SOCS-1, -2, -3 e expressão de ERα. A expressão de proteína ribossomal S9 (RPS9) foi usada para um controle interno. As seqüências de primers e as referências estão mostradas na (Tabela 1).

Tabela 1 – Sequência e referência de primers usados no experimento.

Primer	Sequência (5'- 3')	Referência
RPS9	F: CCTCGACCAAGAGCTGAAG R: CTCCAGACCTCACGTTTGTTT	(Janovick-Guretzky et al., 2007)
GHR	F: GGTATGGATCTCTGGCAGCTG R: CTCTGACAAGGAAAGCTGGTGTG	(Rhoads et al., 2008b)
IGF-I	F: TTGGTGGATGCTCTCCAGTTC R: GCACTCATCCACGATTCTGT	(Rhoads et al., 2008b)
SOCS-1	F: CACAGCAGAAAAATAAGCCAGAGA R: CTCGTACCTCCTACCTCTTCATGTT	(do Amaral et al., 2010)
SOCS-2	F: GGGATGCTTCCCTTCCTAAG R: GTGCTGGGACCTTTCACCTA	(do Amaral et al., 2010)
SOCS-3	F: GGCCACTCTCCAACATCTCTGT R: TCCAGGAACTCCCGAATGG	(do Amaral et al., 2010)
ERα	F: AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC R: CGGTGGATGTGGTCTCTCTCT	(Pfaffl et al., 2002)

As reações de PCR foram realizadas em triplicata com um volume de 25 uL, utilizando SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems) e a fluorescência foi quantificada com o Detector de Sequência ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). Para cada amostra, 40 ciclos de PCR foram executados e uma curva de dissociação foi incluída para verificar a amplificação de um produto único de PCR, ao final da

reação. As análises de gráficos de amplificação foram realizadas com o software de detecção de seqüência (Applied Biosystems) e os dados foram analisados usando o método descrito por (Zhao e Fernald, 2005). Os resultados foram demonstrados em número de vezes (folds over) em relação ao mínimo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As classes de folículos foram combinadas e as células da granulosa de 18 folículos foram comparados com as células luteais de 7 C.L. Nenhuma diferença foi observada entre as classes dos folículos. A expressão de mRNA de células luteais do GHR, IGF-I, SOCS-1, SOCS-2 foi mais elevado que em células da granulosa. A taxa de IGF-I para mRNA do GHR, foi maior em células luteais do que nas da granulosa (figura 1).

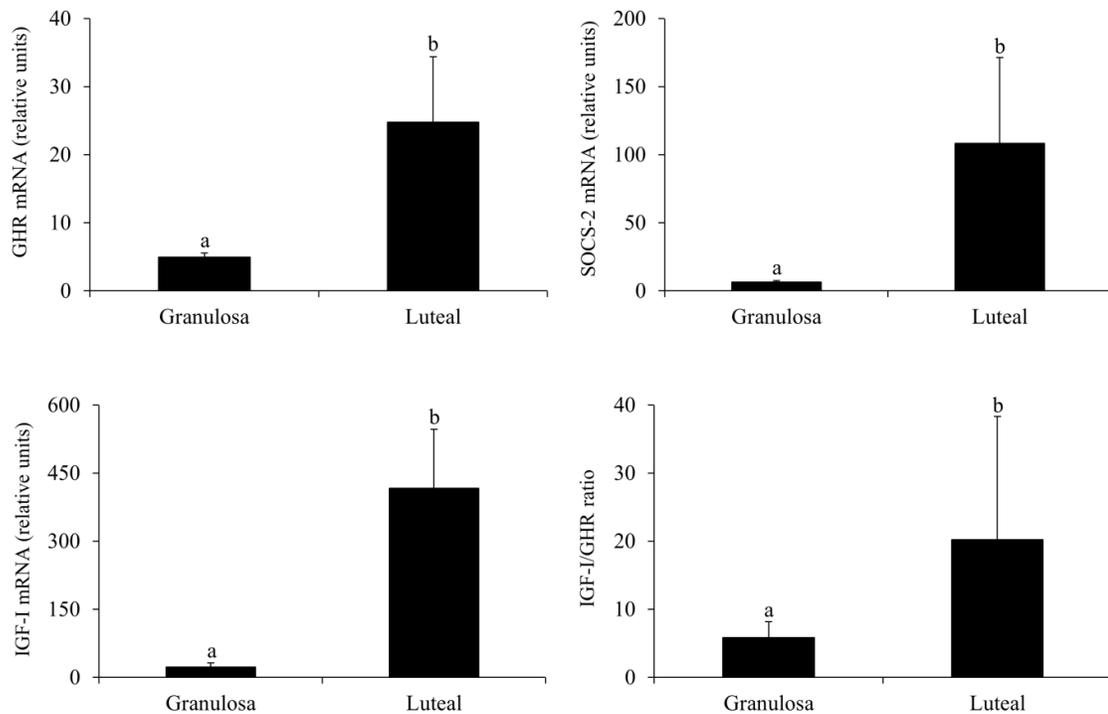


Figura 1 – Expressão do fator de crescimento semelhante á insulina (IGF-I), receptor do hormônio do crescimento (GHR), percentual do supressor de sinalização de citocinas (SOCS-2) e taxa de IGF-I : GHR, para as células da granulosa e luteais. Os resultados da expressão de mRNA são apresentadas ao longo do folds over do mínimo. Diferentes letras (a, b) indicam diferença estatística entre as células da granulosa e luteais.

A expressão de GHR, IGF-I, SOCS-1 e SOCS-2 mRNA foi maior em células luteais do que as da granulosa.

Em células luteais a expressão de SOCS-2 mRNA, obteve uma forte correlação negativa com a taxa de IGF-I com a expressão de GHR mRNA, indicando que em células luteais se observa um efeito de ativação negativo.

IGF-I mRNA foi expresso em células luteais e da granulosa, demonstrado por (Rhoads et al, 2008a; Schams et al, 2002;). Neste estudo a proporção de IGF-I para GHR foi maior em células luteais do que da granulosa, indicando que o GH possui um maior efeito induzindo a produção de IGF-I em células luteais do que as da granulosa. Apesar disso, as SOCS-2 e 3 não estão envolvidas nesta via inibitória de sinalização das células da granulosa.

4. CONCLUSÃO

A expressão de mRNA do GHR, IGF-I, SOCS-1 e -2 foi maior em células luteais do que nas da granulosa, e não houve diferença na expressão destes genes entre as células da granulosa de folículos saudáveis ou atresícos. Expressão de SOCS-2 mRNA em células da granulosa não foi associada com a concentração de estradiol no FF e não houve efeito sobre a expressão de IGF-I mRNA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KAWASHIMA, C.; SAKAGUCHI, M.; SUZUKI, T.; SASAMOTO, Y.; TAKAHASHI, M.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Metabolic Profiles in Ovulatory and Anovulatory Primiparous Dairy Cows During the First Follicular Wave Postpartum. **Journal of Reproduction and Development**. Vol.53, n 1, 2007
- Rhoads, M.L., Meyer, J.P., Kolath, S.J., Lamberson, W.R., Lucy, M.C., 2008a, Growth hormone receptor, insulin-like growth factor (IGF)-1, and IGF-binding protein-2 expression in the reproductive tissues of early postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 91, 1802-1813.
- Perks, C.M., Peters, A.R., Wathes, D.C., 1999, Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility** 116, 157-165
- NEUVIANS, T.P. et al. The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. **Domest Anim Endocrinol** v.25, 359-372. 2003.
- KOBAYASHI, Y.; BOYD, C.K.; BRACKEN, C.J.; LAMBERSON, W.R.; KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle caused by a specific downregulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. **Endocrinology**. p.3947-3954, 1999.
- SCHAMS D, BERISHA B, KOSMANN M, AMSELGRUBER WM. Expression and localization of igf family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology** 2002;22:51-72.