

## EXPRESSIONES DE IGF-I EM FOLÍCULOS OVÁRIOS DE DIFERENTES CATEGORIAS

**BOLZAN, Guilherme Nunes<sup>1</sup>; SCHNEIDER, Augusto<sup>2</sup>; PFEIFER, Luiz Francisco Machado<sup>3</sup>; SCHMITT, Eduardo<sup>4</sup>; CORRÊA, Márcio Nunes<sup>5</sup>.**

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária - UFPEL;  
<sup>2</sup>Médico Veterinário, M.C. Doutor - UFPEL;  
<sup>3</sup>Médico Veterinário, M.C. Doutor - UFPEL;  
<sup>4</sup>Médico Veterinário, M.C. Doutor - UFPEL;  
<sup>5</sup>Médico Veterinário, Professor Adjunto - Departamento de Clínica Veterinária - UFPEL.

Universidade Federal de Pelotas  
 Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em  
 Ciências Veterinárias - 96201-900 - Pelotas/RS - Brasil  
[nupeec@ufpel.edu.br](mailto:nupeec@ufpel.edu.br) - [www.ufpel.edu.br/nupeec](http://www.ufpel.edu.br/nupeec)

### 1. INTRODUÇÃO

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) 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, com efeito mitogênico nas células da glândula pituitária potencializando o efeito das gonadotrofinas nos tecidos foliculares (KAWASHIMA et al, 2007). O IGF-II é semelhante em estrutura e função, mas o GH não controla a sua produção (Stewart et al., 1996). O IGF-I e II estão presentes no líquido folicular sendo observado em níveis mais elevados do que o IGF-II (Stewart et al., 1996).

Apesar do IGF-I ser produzido por todos os tipos de células, a maioria da concentração plasmática. No fígado a expressão desse gene é regulada positivamente pelo GH (O receptor hepático de GH) possui cinco classes: GHR1A, GHR1B e GHR1C, respectivamente do RNAm total de GH (Kobayashi et al., 1999). A expressão de IGF-I nas células da granulosa é uma controvérsia, alguns autores demonstram tanto a sua presença (Rabaglia et al, 2008a; Schams et al, 2002; Spicer et al, 1993 e ausência (Amstrong et al, 2000; Perks et al, 1999; Sudo et al, 2007). Apesar disso, a expressão de IGF-I de mRNA é mais facilmente detectável no ovário (Neuvians et al, 2003; Rhoads et al, 2008a). A expressão de mRNA de IGF-I foi observada nas células da granulosa e na teca, expressão encontrada nos folículos foi considerada pequena (Lucy et al, 1993; Kirby et al, 1996).

O objetivo deste estudo é avaliar a correlação entre a expressão de GH e IGF-I em células luteais da granulosa em diferentes fases do ciclo ovariano.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de Tecido

Foram utilizados ovários obtidos em uma latido uo indi vi duase estéreis cortados sol ução f i s i ó l ó g i c a se encortavam vi sí veis no par de ovários ti ver m s e e avaliado quanto à concentração de estr (E2) e progesterona (P4), para determinar a sua categoria.

As ovariárias foram divididas em duas metades e a cavidade art r a l lavada repeti das vezes com so a gelada e as células granulosa recuperadas por centrifugação a 4°C por 2 minutos. Para o CL apenas os de fase III foram selecionados, de acordo com a classificação (Ireland et al., 1980) sendo desidratado do ovário e acondicionado lí qu i d o a 80°C. O di â m e t r o f o l i c u l a r foi estimado a partir do peso do 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 ta m b é m f o i d e t e r m i n a d a p o r R I A ( B u t l e r e B u t l e r , 2 0 0 4 ) considerado como um folículo a (FAT) quando a proporção E2:P4 foi inferior a 1 e um folículo estrógeno (FEA) quando a proporção E2:P4 foi maior do que 1 (Ireland e Roche, 1982). O IGF-I foi quantificado por RIA de acordo com o método descrito por (Butler e

### 2.3 Isolamento e quantificação de RNA (PCR)

As amostras (30 mg de CL e pellet de células da g a ) 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 as reações de reversão com 1 µg de RNA, utilizando Kits de Transcrição Reversa de cDN. Foi avaliada a expressão de GHR, IGF-I, SOCS-1, -2, -3 e expressão de ERα. A expressão de proteína ribossômica foi usada para um controle interno. As seqüências de primers referências estão listadas a (

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

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

As reações de PCR foram realizadas em triplicata 25 µL, utilizando SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems) e a fluorescência foi quantificada como  $D_e$  e  $C_o$  (Applied Biosystems). Para cada ensaio, 40 ciclos de PCR foram executados e uma curva de dissociação foi incluída para avaliar o produto único de PCR, ao final da reação. As análises de quantificação foram realizadas como  $S_f$  e  $T_w$  (Applied Biosystems) e os dados foram analisados usando o método de  $S_c$  (Zhao e Fernald, 2005).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo não houve diferença nas expressões de  $F_{AT}$  e  $F_{FEA}$  em células da granulosa de duas classes de  $F_{AT}$  e  $F_{FEA}$  (Tabela 2).

**Tabela 2** – Características de folículos de  $F_{AT}$  e  $F_{FEA}$  (FEA).

Variável	Atrés	co	Estrogênio ativo	P	
Estradiol (ng/mL)	141 ± 4	7	137.3 ± 39	3	0.0002
Progesterona (ng/mL)	156.8 ± 5	1	693 ± 5	4	0.28
E2:P4	0.2 ±	0	2.1 ±	0	0.002
Diametro (mm)	130 ± 0	9	134 ± 0	9	0.74
IGF-I (ng/mL)	100.1 ± 2	0	962 ±	1	0.85

A expressão de GHR, IGF-I, SOCS-1 e SOCS-2 mRNA foi maior em células luteais do que em células da granulosa (Tabela 3).

**Tabela 3** – Síntese da expressão de genes celulares da granulosa e luteal.

Variável	Granulosa	Luteal	P	
GHR	4.9 ± 0	450 ± 9	3	<.0001
IGF-I	225 ± 9	810.1 ±	3	<.0001
SOCS-1	4.9 ± 1	445 ± 6	8	<.0001
SOCS-2	6.5 ± 1	210.8 ± 6	3	<.0001
SOCS-3	7.9 ± 2	5.6 ±	1	0.89
ER $\alpha$	3.5 ± 0	4.1 ±	1	0.55

Receptor do hormônio de crescimento (GHR), Fator de crescimento (IGF-I), supressor de sinalização de citocinas (SOCS), receptor de estradiol  $\alpha$  (ER $\alpha$ )

Foi observado que a expressão de SOCS-2 mRNA foi correlacionada ( $P < 0,05$ ) com a expressão de GHR mRNA em células da granulosa e luteal. A expressão de IGF-I mRNA não se correlacionou com GHR mRNA na granulosa ( $P=0,83$ ), contudo a expressão de GHR mRNA tendeu a ser correlacionada com SOCS-2 mRNA na granulosa ( $P=0,06$ ) e células luteais ( $P=0,08$ ). Em células luteais a expressão de mRNA de ER $\alpha$  foi correlacionada com a expressão de IGF-I no fluido folicular, mas não se correlacionou com a sua expressão em células da granulosa ( $P=0,30$ ).

IGF-I mRNA foi expresso tanto em células da grãfolo luteal, a sendo que sua expressão foi a mais alta nas células de grãfolo luteal e a FEA e não se correlacionou com a concentração de E2 ou P4 no FF. No entanto, os níveis de mRNA foram muito mais elevados nas células luteais do que nas células da grãfolo luteal, de acordo com observações anteriores (Rhoads et al., 2008a), também não houve correlação entre IGF-I mRNA, como observado por Rhoads et al., (2008a). A expressão de mRNA para GHR, IGF-I, SOCS-1 e -2 foi superior em células luteais do que da grãfolo luteal e houve diferença significativa entre os estrôgios ovarianos.

#### 4. CONCLUSÃO

Então, nenhuma correlação direta entre a expressão de IGF-I mRNA e a expressão de mRNA GHR em células luteais, que é o biológico associado com a expressão de mRNA ER $\alpha$ .

#### 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.