

Proteínas ligantes do insulin-like growth factor (IGFBPs) e dominância folicular em vacas *Bos taurus indicus* puras e cruzadas

Insulin-like growth factor-binding proteins and follicular dominance in *Bos taurus indicus* pure and crossed cows

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Adriana Gradela Lichti
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias da UNESP
Campus de Jaboticabal
Rodovia Carlos Tonanni, km 5
01470-000 – Jaboticabal – SP
e-mail: agradela@zaz.com.br

1 - Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal – SP

Adriana GRADELA¹; Marcelo RONCOLETTA¹; Érica da Silva Carvalho MORANI¹;
César Roberto ESPER¹; Paulo Henrique FRANCESCHINI¹

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar um marcador bioquímico de folículos bovinos com diâmetro maior do que 10 mm, o qual poderia ser utilizado para identificar folículos dominantes nesta espécie. Líquido folicular era aspirado de folículos com diâmetros menores do que 5 mm, entre 5 e 10 mm e maiores do que 10 mm, provenientes de ovários de 37 fêmeas bovinas abatidas. Após aspiração, o líquido folicular (LF) era acondicionado em ependorfs etiquetados e congelados. Os padrões eletroforéticos em SDS-PAGE das proteínas do LF foram determinados e verificou-se que os folículos com diâmetro maior do que 10 mm apresentaram um polipeptídeo com PM entre 39 e 43 KDa identificado como a proteína ligante de IGF-3 (IGFBP-3), o qual não foi observado em folículos com diâmetro menor do que 5 mm e entre 5 e 10 mm. Este estudo sugere que este polipeptídeo possa ser utilizado como marcador bioquímico de folículos maiores do que 10 mm.

UNITERMOS: Fluido folicular; Insulin-like growth factor; Marcadores bioquímicos.

INTRODUÇÃO

A dinâmica folicular se processa através de estágios integrados de recrutamento folicular, seleção e dominância. Recrutamento é o processo pelo qual um grupo de folículos antrais começa a crescer na presença de um milieu de suporte gonadotrófico pituitário suficiente para permitir o progresso até a ovulação. Através do processo de seleção, um único folículo evita a atresia e adquire competência para atingir a ovulação enquanto a dominância é o meio pelo qual o folículo selecionado inibe o recrutamento de um novo grupo de folículos^{1,12}. Os mecanismos exatos pelos quais o folículo dominante inibe o recrutamento de uma nova onda de folículos não são claramente entendidos. Ireland; Roche⁶ sugerem que o folículo dominante poderia secretar fatores hormonais e não-hormonais que regulariam o crescimento dependente de gonadotrofina e a diferenciação dos folículos ovarianos.

Recentes estudos têm demonstrado que o crescimento do folículo dominante é precedido por um aumento nas concentrações periféricas de FSH¹. Embora o FSH possa ser parte do mecanismo iniciador das ondas foliculares e pulsos de LH sejam requeridos para contínua manutenção do folículo dominante¹³, outros fatores parecem estar envolvidos⁸. No ovário, o conteúdo de insulin-like growth factors (IGFs) aumenta a proliferação e a diferenciação de células foliculares por potencializar as ações das gonadotrofinas⁹.

Por sua vez, os efeitos biológicos dos IGFs são extremamente modulados por um número de proteínas ligantes de IGF (IGFBPs), cujos níveis no líquido folicular alteram-se dramaticamente durante a foliculogênese^{5,9}. Segundo Monget *et al.*¹⁰, células da granulosa de ovelhas possuem receptores tipo 1 e proteínas ligantes de IGF-1 que poderiam modular a ação do IGF-1 no processo de desenvolvimento folicular e atresia e, conseqüentemente, as IGFBPs intrafoliculares desempenham uma função-chave na regulação do desenvolvimento folicular por modularem os IGFs e, portanto, as ações das gonadotrofinas⁹. Durante o desenvolvimento folicular, o conteúdo de IGFBPs no líquido folicular tem sido estudado e 4 tipos de IGFBP foram identificados: IGFBP-3 com PM entre 39 e 49KDa; IGFBP-2 com PM de 35 KDa; IGFBP-5 com PM entre 30 e 32Kda; e a IGFBP-4 com PM entre 22 e 28 KDa, em bovinos⁴ e ovinos^{2,3,9}.

O objetivo deste estudo foi identificar a presença de uma proteína que possa ser utilizada como marcador bioquímico de folículos bovinos com diâmetro maior do que 10 mm e, portanto, de folículos dominantes nesta espécie.

MATERIAL E MÉTODO

Ovários de 32 fêmeas cruzadas (*Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*) e de 5 fêmeas puras (*Bos taurus indicus*) abatidas foram coletados. Imediatamente após o abate, os ovários de cada fêmea eram identificados e o diâmetro dos folículos estimado.

O líquido folicular era aspirado com o auxílio de uma agulha e seringa de insulina e o volume anotado e aliquotado em ependorfs etiquetados e congelados a -20°C até a análise. Líquidos foliculares provenientes de folículos com diâmetro menor do que 5 mm (Grupo I) eram colhidos em *pool* no mesmo ependorf, identificando-se apenas o animal e o ovário (direito ou esquerdo) ao qual eles pertenciam. Folículos com diâmetro entre 5 e 10 mm (Grupo II) eram também colhidos em *pool*, se o volume fosse pequeno ou, individualmente, se o volume fosse superior a 500 ml. No caso dos folículos com diâmetro superior a 10 mm (Grupo III), todos eram coletados individualmente.

Antes da eletroforese, diálise era realizada por 24 ou 48 horas, em membrana de celulose, em tampão Tris-Glicina (pH 7,4) a 4°C , sob agitação lenta e constante, com troca de tampão a cada 12 ou 24 horas, respectivamente. A proteína total presente nos líquidos foliculares era determinada pelo método colorimétrico de biureto, utilizando-se um *kit* para a dosagem de Proteínas Totais*¹, antes e após a diálise.

Os perfis eletroforéticos das proteínas do líquido folicular de folículos dos diferentes grupos foram comparados. Para a realização da eletroforese, as amostras foram padronizadas em 2,5 mg/ml de proteína total, sendo preparadas com diluição em tampão Tris-HCl 62 mM (pH 6,8) mais 20% de glicerol e 4% de SDS e, após a diluição, submetidas à fervura por 10 minutos. A eletroforese foi realizada empregando-se a metodologia descrita por Laemmli⁷, utilizando-se o método vertical em gel de poliacrilamida com gel a 13% e sistema de tampão descontínuo. O padrão utilizado foi o MW-SDS-70I*², que marca pesos moleculares entre 14 e 70 quilodaltos, enquanto o corante utilizado foi o Coomassie Brilliant Blue 250-R*³, a 5% por 1 hora e como descorante uma solução de Ácido Acético Glacial a 7%. A significância estatística foi avaliada pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A redução na quantidade de proteína total das amostras após a diálise foi significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos estudados (GI: de 35,7 g/dl para 10,4 g/dl; GII: de 28,6 g/dl para 9,8 g/dl e GIII: de 32,8 g/dl para 9,6 g/dl, antes e após a diálise, respectivamente). Entretanto, não houve diferença ($p > 0,05$) na redução da quantidade de proteínas totais, em porcentagem, quando a diálise era realizada em 24 (63,8%) ou 48h (68,8%). Quando a diálise era realizada durante 48h, uma melhor individualização das bandas com PM acima de 17 KDa era obtida, pois a migração dos polipeptídeos com PM acima deste no gel de poliacrilamida era facilitada. Ao contrário, quando a diálise era realizada por 24h, obteve-se melhor visualização das bandas com PM abaixo de 17 KDa.

Após 48h de diálise, dez bandas de polipeptídeos foram visualizadas no perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas do líquido folicular. Esta visualização foi possível devido à migração diferenciada desses polipeptídeos na matriz de poliacrilamida, frente à carga elétrica imposta e segundo seus pesos moleculares (PM). As cargas elétricas de todas as proteínas foram padronizadas pelo SDS como carga negativa.

Uma característica comum observada no perfil eletroforético do líquido folicular bovino em SDS-PAGE era a presença de fragmentos protéicos com PM entre 22 e 28 KDa (RF entre 79,01 e 80,72), presentes em todos os grupos de folículos estudados e identificados como sendo a proteína ligante de IGF-4 (IGFBP-4)^{2,3,4,9}, (Fig. 1 e 2). Segundo Armstrong *et al.*², esta proteína ligante era detectada em cultura de células da teca, especialmente se as células eram isoladas de folículos pequenos, e suas concentrações aumentavam quando as células eram expostas ao LH. Como esta IGFBP

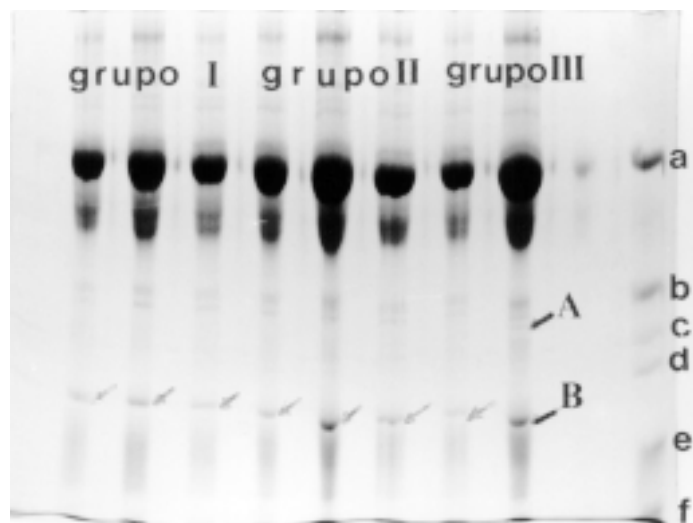


Figura 1

Gel 10- Fotografia representativa dos perfis eletroforéticos observados entre folículos com diâmetro: GI = menor do que 5 mm, GII = entre 5 e 10 mm e GIII = maior do que 10 mm. P = padrão: (a) 66 KDa, (b) 45 KDa, (c) 33 KDa, (d) 29 KDa, (e) 24 KDa, (f) 17 KDa. **A** @ Banda caracterizando polipeptídeo com PM entre 39 e 43KDa e RF entre 61,73 e 65,06. **B** @ Banda caracterizando polipeptídeo com PM entre 22 e 28 KDa e RF entre 79,01 e 80,72.

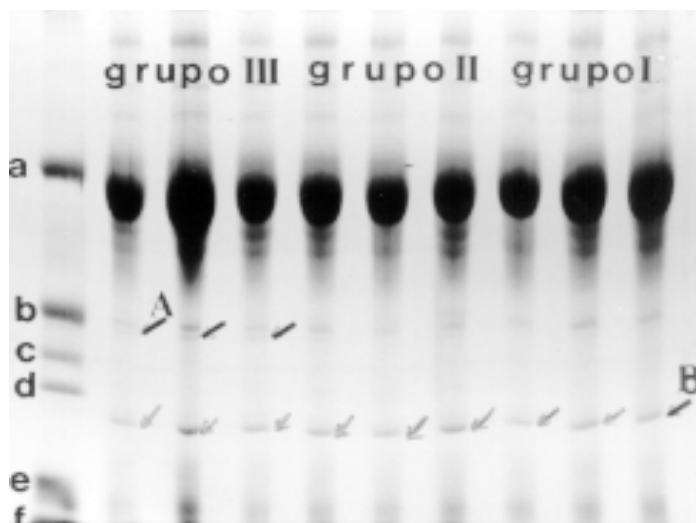


Figura 2

Gel 11- Fotografia representativa dos perfis eletroforéticos observados entre os grupos de folículos com diâmetro: GI = menor do que 5 mm, GII = entre 5 e 10 mm e GIII = maior do que 10 mm. P = padrão: (a) 66 KDa, (b) 45 KDa, (c) 33 KDa, (d) 29 KDa, (e) 24 KDa, (f) 17 KDa. **A** @ Banda caracterizando polipeptídeo com PM entre 39 e 43 KDa e RF entre 61,73 e 65,06. **B** @ Banda caracterizando polipeptídeo com PM entre 22 e 28 KDa e RF entre 79,01 e 80,72.

esteve presente em folículos de todos os tamanhos, ela foi considerada sem importância na caracterização dos grupos analisados.

Quando compararam-se os perfis eletroforéticos das proteínas do líquido folicular de folículos com diâmetro menor do que 5 mm (Grupo I) com aqueles de diâmetro entre 5 e 10 mm (Grupo II) e superior a 10 mm (Grupo III), observou-se diferença nos perfis eletroforéticos. Esta diferença era esperada, uma vez que folículos com estes diâmetros (<5 mm e >10 mm) apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas bastante claras, como, por exemplo, diferença de sensibilidade a baixas concentrações de FSH⁶, habilidade para ligar LH, produção de estradiol-17B diferentes, entre outras¹¹. A diferença observada neste estudo foi entre os fragmentos de PM variando de 33 KDa (c) a 45 KDa (b), onde um polipeptídeo destacou-se no perfil eletroforético do líquido folicular. Este polipeptídeo caracterizou-se por apresentar PM entre 39 e 43 KDa e

RF entre 61,73 e 65,06. Todos os folículos estudados no Grupo III (>10 mm) exibiram este polipeptídeo, enquanto, nos Grupos I (<5 mm) e II (entre 5 e 10 mm) este polipeptídeo não foi observado (Fig. 1 e 2). Em bovinos⁴ e ovinos^{2,3,9} este polipeptídeo tem sido identificado como a IGFBP-3. Segundo Armstrong *et al.*², em ovinos a fonte de IGFBP-3 no líquido folicular de grandes folículos era provavelmente a circulação. Na maioria das espécies mamíferas, desenvolvimento folicular é caracterizado por aumento de IGFBP-3 e diminuição das demais IGFBPs (IGFBP-2, -4 e -5) enquanto a atresia folicular é caracterizada por diminuição no conteúdo de IGFBP-3 e aumento no conteúdo das demais IGFBPs (IGFBP-2, -4 e -5)^{2,3,4,9}.

Portanto, este estudo sugere que o polipeptídeo observado no líquido folicular de folículos bovinos maiores do que 10 mm, identificado como IGFBP-3, pode ser utilizado como marcador bioquímico de folículos dominantes nesta espécie.

SUMMARY

The objective of this study was to identify a possible biochemical marker from bovine follicles with a diameter of more than 10 mm, which could be useful to identify dominant follicles in this species. Follicular liquid (FL) was aspirated from follicles with diameters less than 5 mm, between 5 and 10 mm and more than 10 mm, from both ovaries of 37 slaughtered bovine females. After aspiration, FL was conditioned in identified eppendorfs and frozen. The electrophoretic patterns in SDS PAGE from FL proteins were determined and it was verified that, the follicles with more than 10 mm presented a polipeptide with a molecular weight between 39 and 43 KDa identified like the IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), which wasn't observed in follicles less than 5 mm and between 5 and 10 mm. This study suggests that this polipeptide may be utilized like a biochemical marker from follicles of more than 10 mm.

UNITERMS: Follicular fluid; Insulin-like growth factor; Biochemical markers.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. ASSOCIATION between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, n.1, p.177-88, 1992.
- 2- ARMSTRONG, D.G.; HOGG, C.O.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells. The effects of IGF-1, gonadotropin and size follicle. **Biology of Reproduction**, v.55, n.5, p.1163-71, 1996.
- 3- BESNARD, N.; PISSELET, C.; ZAPF, J.; HORNEBECK, W.; MONNIAUX, D.; MONGET, P. Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth factor-binding proteins levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. **Endocrinology**, v.137, n.5, p.1599-607, 1996.
- 4- De-La-SOTA, R.L.; SIMMEN, F.A.; DIAZ, T.; THATCHER, W.W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, n.4, p.803-12, 1996.
- 5- HOLLY, J.M.P.; EDEN, J.A.; ALAGHBAND-ZADEH, J.; CARTER, G.D.; JEMOTT, R.C. Insulin-like growth factor binding proteins in follicular fluid from normal dominant and cohort follicles, polycystic and multicystic ovaries. **Clinical Endocrinology**, v.33, n.1, p.53-64, 1990.
- 6- IRELAND, J.; ROCHE, J.F. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. **Endocrinology**, v.122, p.150-6, 1983.
- 7- LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage. **T. Nature**, v.277, p.680-5, 1970.
- 8- LAW, A.S.; BAXTER, G.; LOGUE, D.N.; O'SHEA, T.; WEBB, R. Evidence of the action of bovine follicular fluid factor(s) other than inhibin in suppressing follicular development and delaying oestrus in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, n.2, p.603-16, 1992.
- 9- MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. **Hormone Research (Basel)**, v.45, n.3-5, p.211-7, 1996.
- 10- MONGET, P.; MONNIAUX, D.; DURAND, P. Localization, characterization and qualification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. **Endocrinology**, v.125, n.5, p.2484-93, 1989.
- 11- PRICE, C.A.; WEBB, R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinology**, v.122, n.5, p.2222-31, 1988.
- 12- SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; De-La-SOTA, R.L.; WOLFENSON, D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrus cycle in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, n.1, p.197-203, 1993.
- 13- STOCK, A.E.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v.132, n.3, p.1108-14, 1993.

Recebido para publicação: 17/04/1997

Aprovado para publicação: 04/12/1997