

Carla Bianchini Ponchirolli

**INFLUÊNCIA DOS FATORES DE CRESCIMENTO NO
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR**

**Botucatu
2003**

**Universidade Estadual Paulista - UNESP
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu**

**INFLUÊNCIA DOS FATORES DE CRESCIMENTO NO
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR**

Monografia apresentada à disciplina Seminários I,
do programa de pós-graduação em Medicina
Veterinária, área de Reprodução Animal, da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
UNESP, Botucatu

Aluna: **Carla Bianchini Ponchirolli**

Orientadora: **Profª Adj. Fernanda da Cruz Landim
e Alvarenga**

Docentes responsáveis:

Profª Adj. Maria Denise Lopes

Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo

**Botucatu
2003**

Sumário

1. Introdução	3
2. Revisão de literatura	3
2.1 Regulação do desenvolvimento folicular	3
2.2 Insulina e sistema IGF	4
2.3 Superfamília dos fatores de crescimento de transformação- β (TGF- β)	6
2.4 Fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF)	7
2.5 Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs)	8
3. Conclusões	9
4. Referências	10

1. Introdução

O ovário de uma fêmea bovina recém-nascida contém uma grande quantidade de folículos primordiais. Porém, menos de 0,1% desses folículos se desenvolvem, sofrem maturação e ovulam durante a vida reprodutiva de uma vaca (ERICKSON, 1966 apud CUSHMAN et al., 2001).

A seleção de um folículo dominante capaz de ovular, dentre um grupo de folículos de tamanhos similares, é um ponto crítico do desenvolvimento folicular. Os mecanismos que regulam a seleção de um número espécie - específico de folículos dominantes para a ovulação não estão esclarecidos (FORTUNE et al., 2001).

Sabe-se que o desenvolvimento folicular em diferentes espécies animais é controlado pelas gonadotrofinas produzidas pela hipófise, além de esteróides produzidos pelos ovários e fatores de crescimento, produzidos tanto pelos ovários, como por outros órgãos sistêmicos.

Esta revisão tem como objetivos determinar quais são os principais fatores de crescimento e como eles atuam no desenvolvimento folicular de mamíferos.

2. Revisão de literatura

2.1 Regulação do desenvolvimento folicular

A função ovariana em bovinos é regulada pela interação entre mecanismos de *feedback* negativos locais e sistêmicos, envolvendo gonadotrofinas da glândula pituitária e esteróides e proteínas dos ovários (WEBB & ARMSTRONG, 1998). Esse sistema de controle garante que, em 91% das fêmeas ou mais (RUTLEDGE, 1975 apud WEBB & ARMSTRONG, 1998), apenas um folículo ovule durante um ciclo estral.

O desenvolvimento folicular ocorre em um padrão de ondas de crescimento e cada onda é caracterizada pela emergência de um folículo dominante, entre todos que estão em crescimento. Essas ondas de crescimento folicular são precedidas por aumentos recorrentes na secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) (ADAMS et al., 1992; SUNDERLAND et

al., 1996), que fornecem o estímulo inicial para o recrutamento dos folículos que iniciam o desenvolvimento (TURZILLO & FORTUNE, 1990).

As gonadotrofinas fornecem o estímulo endócrino primário para o desenvolvimento folicular. Porém, Webb e colaboradores (1994) demonstraram que outros fatores sistêmicos influenciam significativamente a função ovariana. De acordo com esses mesmos autores, fatores de produção local também interferem no desenvolvimento folicular.

Conforme prosseguem os estudos, o número de fatores de crescimento e suas ações tornam-se mais conhecidas. Entre eles, já se sabe as funções do sistema de fatores de crescimento semelhantes a insulina (*insulin like growth factor*, IGF), membros da superfamília de fatores de crescimento de transformação- β e fatores de crescimento de transformação- α (*transforming growth factor- β* , TGF- β e *transforming growth factor- α* , TGF- α), fatores de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*, FGFs) e citocinas (WEBB & ARMSTRONG, 1998). Barboni e colaboradores (2000) estudaram a produção de fatores de crescimento endotélio-vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) em folículos de fêmeas suínas.

A seguir, serão descritos os principais fatores de crescimento com ação ovariana e suas principais funções.

2.2 Insulina e sistema IGF

Mais de vinte anos após a determinação da seqüência de aminoácidos da insulina, em 1955, sugeriu-se o envolvimento da insulina como regulador da atividade ovariana (SANGER, 1955; CHANNING, 1976 apud SPICER & ECHTERNKAMP, 1995). A presença de insulina e fatores do sistema IGF no ovário foi relatada pela primeira vez em porcas (HAMMOND et al., 1982; 1985 apud SPICER & ECHTERNKAMP, 1995). Desde então, a presença de IGFs no fluido folicular de várias outras espécies tem sido documentada, incluindo bovinos, ovinos, eqüinos e humanos (SPICER et al., 1988; JESIONOWSHA, 1990, KIRB et al., 1993 apud SPICER & ECHTERNKAMP, 1995).

Em geral, os efeitos da insulina nas células ovarianas são positivos, estimulando a proliferação das células da granulosa e a produção de progesterona. Estudos realizados com suínos, ovinos e bovinos demonstraram os efeitos estimulantes da insulina e IGF-1 na

proliferação das células da granulosa e síntese de DNA (SPICER et al., 1993).

As estruturas da insulina, IGF-1 e IGF-2 foram determinadas e aproximadamente 45% dos aminoácidos que compõem essas moléculas são idênticas (RINDERKNECHT et al., 1978 apud SPICER & ECHTERNKAMP, 1995).

Em bovinos e suínos, verificou-se que o IGF-1 além de estimular a proliferação mitótica das células da granulosa, aumenta a produção de esteróides por essas células, induzida pelo FSH (SPICER et al., 1993).

Em cultivos de células da teca de suínos, o IGF-1 parece aumentar os efeitos mitogênicos de outros fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor*, EGF) (MAY et al., 1992), porém, esse efeito é menos pronunciado do que o observado com as células da granulosa (MAY et al., 1988).

De acordo com a espécie, a insulina, o IGF-1 e o IGF-2 podem estimular a produção de estrógeno pelas células da granulosa. Em ratos e primatas, estudos indicam que esses fatores estimulam a produção de estradiol pelas células da granulosa *in vitro*, provavelmente mediados pelos receptores para IGF-1, sendo que o IGF-1 mostrou-se mais potente, em relação a dose utilizada (GIUDICE, 1992). Por outro lado, em bovinos, a insulina é mais potente que o IGF-1 em relação ao estímulo da produção de estradiol pelas células da granulosa (SPICER et al., 1994).

Há controvérsias quanto ao efeito estimulante da insulina e sistema IGF na produção de estrógeno. Spicer et al. (1994) observaram que o IGF-1 e IGF-2 podem inibir a produção de estradiol estimulada pela insulina, nas células da granulosa, tanto em folículos pequenos (entre 1 e 5 mm), como em folículos grandes (iguais ou maiores que 8 mm). A mesma equipe observou aumentos significativos nas concentrações de estradiol no fluido folicular, sem alterações das concentrações de IGF-1 (SPICER et al., 1988; 1991 apud SPICER & ECHTERNKAMP, 1995) e, ao contrário, aumentos nas concentrações de IGF-1 intrafoliculares, sem aumentos nas concentrações de estradiol (SPICER et al., 1991 apud SPICER & ECHTERNKAMP, 1995). Em resumo, as concentrações de IGF-1 e estradiol no fluido folicular de bovinos podem estar correlacionadas negativa ou positivamente (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995).

Em contraste com os estudos realizados em bovinos, a produção de estradiol pelas células da granulosa de suínos não é alterada ou é inibida pela insulina *in vitro*, enquanto

que a produção desse hormônio é estimulada pelo IGF-1 e em menor extensão pelo IGF-2 (HOWARD & FORD, 1994).

Vários estudos, em diferentes espécies de mamíferos (incluindo bovinos e suínos), demonstraram que a insulina, o IGF-1 e o IGF-2 estimulam a produção de progesterona pela célula da granulosa, na seguinte ordem, em relação a potência: IGF-1 > IGF-2 > insulina (MORLEY et al., 1989; MONNIAUX et al., 1992; SPICER et al., 1993). Além disso, parece que a insulina e o IGF-1 podem estimular a produção de progesterona pelas células da teca de bovino (ROBERTS, 1990 apud SPICER & ECHTERNKAMP, 1995), suíno (MORLEY et al., 1989) e rato (MAGOFFIN, 1993).

O IGF-1 e a proteína ligadora de IGF (*IGF binding protein*, IGFBP) parecem exercer papel fundamental na aquisição da dominância folicular, durante o desenvolvimento folicular, já que as concentrações de IGF-1 no fluido folicular aumentam, enquanto que as concentrações de IGFBP-2 decrescem durante o estabelecimento da dominância (FORTUNE et al., 2001; GINTHER et al., 2002).

2.3 Superfamília dos fatores de crescimento de transformação- β (TGF- β)

A superfamília TGF- β é composta por algumas proteínas com potentes ações reguladoras intra-ovarianas. As ativinas e inibinas pertencem a essa família de fatores de crescimento. As células da teca de bovinos produzem TGF- β em sistemas de cultivo celular (LOBB & DORRINGTON, 1992 apud WEBB & ARMSTRONG, 1998) e os TGF- β s inibem a proliferação tanto das células da teca, quanto das células da granulosa, enquanto promovem o incremento da produção de esteróides estimulada por gonadotrofinas (ROBERTS & SKINNER, 1991 apud WEBB & ARMSTRONG, 1998).

A ativina e a inibina apresentam efeitos opostos em determinadas funções ovarianas. Alguns estudos demonstraram que existem pelo menos sete formas diferentes de inibinas no fluido folicular de bovino e as quantidades e proporções variam de acordo com a fase folicular ou luteal do folículo (IRELAND et al., 1994; SUNDERLAND et al., 1996).

A administração de inibina bovina a novilhas ovariectomizadas reduz a concentração plasmática de FSH (BEAR et al., 1990 apud WEBB & ARMSTRONG, 1998). Além disso, anticorpos contra inibina ou fragmentos da inibina neutralizam sua atividade biológica,

resultando em um aumento nas concentrações plasmáticas de FSH, em estudos com bovinos (KANEKO et al., 1993; GLENCROSS et al., 1994 apud WEBB & ARMSTRONG, 1998).

Esses resultados evidenciam o envolvimento da inibina no controle endócrino das funções ovarianas, exercendo *feedback* negativo na liberação de FSH pela glândula pituitária.

2.4 Fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF)

Durante as fases de crescimento e atresia folicular, ocorre uma reorganização dos capilares sanguíneos a fim de suprir as necessidades teciduais. Esse processo é definido como angiogênese e é dependente da produção de fatores angiogênicos específicos (FOLKMAN & KLAGSBRUM, 1987; REYNOLDS et al., 1992 apud BARBONI et al., 2000).

Apesar de não se conhecer totalmente os mecanismos que envolvem o desenvolvimento folicular, sabe-se que as gonadotrofinas apresentam um papel crucial e a regulação da vascularização ovariana pode estar envolvida nesses mecanismos, promovendo o suprimento sanguíneo ao folículo e conseqüentemente, o contato das gonadotrofinas e outros fatores com as células foliculares. (MOOR & TROUNSON, 1977 apud BARBONI et al., 2000).

Recentes pesquisas, realizadas com roedores de laboratório e primatas apontaram o fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF) como o principal fator angiogênico da regulação da vascularização ovariana e tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, sua produção é influenciada pelas gonadotrofinas (FERRARA et al., 1992).

Barboni et al. (2000) demonstraram que células foliculares de suínos produzem uma quantidade considerável de VEGF. O nível de produção varia de acordo com a fase da dinâmica folicular. A administração de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) em fêmeas pré-púberes levou ao aumento do diâmetro folicular e, paralelamente, ao aumento de VEGF no fluido folicular.

Entre os sinais que regulam a produção de VEGF, a baixa tensão de oxigênio (O₂) tem sido relatada como um agente estimulante, enquanto altas tensões desse gás estão relacionadas com a inibição de sua produção. Dentro do folículo, a tensão de oxigênio é

baixa, principalmente em folículos grandes, onde os gases devem difundir-se a partir dos vasos presentes na camada de células da teca, até a membrana basal da camada da granulosa e acumular-se no líquido folicular (VAN BLERKOM et al., 1997 apud BARBONI et al., 2000). As células foliculares, ao serem submetidas a uma tensão elevada de O₂, têm a produção de VEGF inibida, quando é adicionado eCG ao meio de cultivo folicular, enquanto que folículos cultivados em ambiente com baixa tensão de O₂, semelhante à fisiológica, respondem ao estímulo do eCG, produzindo VEGF (DISSEN et al., 1996 apud BARBONI et al., 2000).

Ainda durante o experimento realizado por Barboni et al. (2000), determinou-se que a produção de VEGF diminui drasticamente no final da fase de crescimento folicular, em resposta ao pico de hormônio luteinizante (LH) ou à administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG), como foi feita nesse experimento. Esses resultados estão de acordo com as observações realizadas por Cavender et al. (1988) apud Barboni et al. (2000), de que ocorre evidente diminuição na vascularização do folículo logo antes da ovulação.

2.5 Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs)

O membro mais estudado dessa família de fatores de crescimento é o FGF-2 ou FGF básico. Foi demonstrado que a produção desse fator de crescimento ocorre nas células da granulosa de bovinos (NEUFIELD et al., 1987 apud WEBB & ARMSTRONG, 1998) e que tem a função de induzir a mitose em células da teca (SPICER & STEWART, 1996).

O FGF também é um potente fator angiogênico, em virtude de seu efeito estimulante na proliferação de células endoteliais, porém, seu exato envolvimento na proliferação de vasos sanguíneos permanece sem esclarecimentos (REDMER & REYNOLDS, 1996 apud WEBB & ARMSTRONG, 1998).

3. Conclusões

O conhecimento dos fatores que regulam a função ovariana, nas diferentes espécies de mamíferos e na mulher, contribui para o estabelecimento de métodos que possam interferir no controle da dinâmica folicular e maturação ovocitária.

Programas de inseminação artificial, superovulação e produção de embriões *in vitro* podem ser amplamente beneficiados a partir do conhecimento da fisiologia ovariana e dos fatores que a regulam.

Os papéis das gonadotrofinas e esteróides parecem estar determinados, porém, o conhecimento da interação desses hormônios com os fatores de crescimento produzidos localmente e em outros órgãos sistêmicos, ainda está aquém do ideal. Os estudos estão evoluindo, demonstrando que a dinâmica folicular é um processo extremamente complexo.

Avanços na área da biologia molecular têm sido de fundamental importância para a determinação dos fatores de crescimento que participam da dinâmica folicular, uma vez que é possível, utilizando testes de alta sensibilidade, determinar a presença desses fatores no líquido folicular ou de seus receptores, na superfície das células foliculares. A possibilidade de cultivar, *in vitro*, folículos, células foliculares e ovócitos também contribui para os estudos da influência dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular, já que experimentalmente, tem-se um controle maior das substâncias presentes nos meios de cultivos.

Atualmente, os fatores de crescimento já estão sendo utilizados na prática, promovendo resultados positivos e significativos na maturação *in vitro* de ovócitos de diferentes espécies, além da produção *in vitro* de embriões, principalmente de bovinos, suínos e humanos.

4. Referências

1. ADAMS, G.P. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 94, p.177-188, 1992.
2. BARBONI, B. et al. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 858-864, 2000.
3. CUSHMAN, R.A. et al. Alteration of activation, growth and atresia of bovine preantral follicles by long- term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 581-586, 2001.
4. FERRARA, N. et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr. Ver**, v.13, p. 1832, 1992.
5. FORTUNE, J.E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.
6. GINTHER, O.J. et al. Actin A, estradiol, and free insulin-like growth factor-1 in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v.67, p. 14-19, 2002.
7. GIUDICE, L.C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. **Endocrine Ver.**, v. 13, p. 641-669, 1992.
8. HOWARD, H.J.; FORD, J.J. Differential steroidogenic response of subpopulations of porcine granulosa cells to insulin-like growth factor-1 (IGF-1) or IGF-1 analogs. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 108-115, 1994.
9. IRELAND, J.L.H. et al. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 1265-1276, 1994.
10. MAGOFFIN, D.A. et al. Effect of insulin-like growth factor-1 on cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expression in ovarian theca-interstitial cells. **Biology of Reproduction**, v. 1166-1173, 1993.
11. MAY, J.V. et al. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/ insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- β on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. **Endocrinology**, v. 123, p. 168-179, 1988.
12. MAY, J.V. et al. The regulation of porcine theca cell proliferation in vitro: synergistic actions of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. **Endocrinology**, v. 131, p.

- 689-697, 1992.
13. MONNIAUX, D. et al. Uncoupling between proliferation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-1 and follicle-stimulating hormone in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 109-119, 1992
 14. MORLEY, P. et al. Insulin enhances luteinizing hormone-stimulated steroidogenesis by porcine theca cells. **Biology of Reproduction**, v. 40: 735-743, 1989.
 15. SPICER, L.J. et al. Effects of insulin, insulin-like growth factor-1 and gonadotropins on bovine granulosa cells proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth-factor-1 production in vitro. **Journal Animal Science**, v. 71, p. 1232-1241, 1993.
 16. SPICER, L.J. et al. Evidence for an inhibitory effect of insulin-like growth factor-1 and 2 on insulin-stimulated steroidogenesis by nontransformed ovarian granulosa cells. **Endocrine**, v. 2, p. 735-739, 1994.
 17. SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p. 223-245, 1995.
 18. SPICER, L.J.; STEWART, R. Interaction among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-1 receptors. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 255-263, 1996.
 19. SUNDERLAND, S.J. et al. Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular and luteal-phase dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 453-462, 1996.
 20. TURZILLO, A.; FORTUNE, J.E. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 89, p. 643-653, 1990.
 21. WEBB, R. et al., Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. **Theriogenology**, v. 41, p. 25-30, 1994.
 22. WEBB, R.; ARMSTRONG, D.G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock Production Science**, v. 53, p. 95-112, 1998.