



Níveis de insulina e cortisol no fluido folicular ovariano de ovelhas mestiças pantaneiras

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Maria Inês Lenz Souza¹, Eunice Oba²,
Adriana Piccinin³, Marcelo Alexandrino Leandro Gressler⁴

¹ Departamento de Morfofisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

² Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

³ Faculdades do Sudoeste Paulista, Avaré, SP, Brasil.

⁴ Mestrando, Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil.

mariaines@nin.ufms.br

(Recibido: 4 abril, 2009; aprobado: 15 mayo, 2009)

RESUMO: Com o objetivo de verificar os níveis de insulina e cortisol, em folículos ovarianos ovinos de diferentes tamanhos, e suas possíveis correlações com os eventos do ciclo estral desta espécie, o fluido folicular de ovários provenientes de 100 fêmeas mestiças Pantaneiras abatidas foi colhido e avaliado para estes hormônios, por radioimunoensaio, utilizando-se kits comerciais. Os valores obtidos foram analisados por ANOVA e teste de Tukey. A insulina demonstrou diferenças significativas entre os folículos ($P < 0,000001$), à medida em que aumentavam seu diâmetro, enquanto o cortisol manteve-se sem variações significativas em relação ao tamanho folicular ($P > 0,05$). Conclui-se que os folículos ovarianos ovinos possuem concentrações decrescentes de insulina e constantes de cortisol, em relação ao seu tamanho e desenvolvimento.

Palavras chave: diâmetro folicular, folículos, hormônios, ovinos.

Insulin and cortisol levels in ovarian follicular fluid of Pantaneiras crossbred sheep

ABSTRACT: The present study was carried out in order to determine the relationship between the insulin and cortisol follicular levels in ovarian follicles of different sizes and the events of the estrous cycle in female ovines. Follicular fluid of ovine ovaries from 100 crossbred Pantaneiras females was collected and evaluated for hormonal determination by radioimmune test using commercial kits. The values obtained were analyzed by means of ANOVA and Tukey test. Insulin showed significant differences between follicles ($P < 0.000001$), as their diameter increased, while cortisol did not present any significant changes in relation to follicular size ($P > 0.05$). In conclusion, ovine ovarian follicles had decreasing insulin and constant cortisol concentrations, in relation to size and development.

Key words: follicular diameter, follicles, hormones, sheep.

Introdução

Durante o crescimento folicular, as células da teca e da granulosa sofrem marcantes modificações de desenvolvimento para a síntese de hormônios androgênicos e estrogênicos e liberação do ovócito para a ovulação; este complexo processo de crescimento e diferenciação é, estreitamente, acompanhado por uma série de mecanismos moleculares seqüenciais intracelulares, os quais são regulados por estímulos hormonais (Sharma & Majumdar, 1999; Webb et al., 2004). Entre os fatores endócrinos que controlam o desenvolvimento folicular, a insulina e o hormônio do crescimento (GH), fatores relacionados ao metabolismo, também são cruciais para esta função (Webb et al., 2004; Shimizu et al., 2008). Modificações no fornecimento de glicose mediado pela insulina, nas células da teca e da granulosa, modulam a função folicular, pois o transportador de glicose dependente de insulina (GLUT-4) está presente nas células da teca e da granulosa de folículos ovinos (Somchit et al., 2007). O status de desenvolvimento folicular no momento em que há concentrações máximas de glicose e hormônios metabólicos como a insulina pode ser um dos fatores que determinam se a taxa de ovulação será incrementada ou não (Viñoles et al., 2005). Possivelmente a insulina afete o reinício dos pulsos de LH em animais submetidos a períodos de subnutrição, por modificações na utilização de combustíveis metabólicos oxidáveis (Szymanski et al., 2007). Um aumento no fornecimento de glicose mediado pela insulina nas células foliculares pode ser crítico para o crescimento de folículos e a prevenção da atresia, incrementando o *pool* de folículos ovulatórios (Somchit et al., 2007).

Os glicocorticóides exercem seus efeitos em todos os sistemas do organismo, e estão envolvidos em numerosos processos fisiológicos, principalmente aqueles ligados ao metabolismo e resposta inflamatória (Andersen, 2002; Cunningham & Klein, 2008). O ovário também é susceptível à ação destes hormônios, com receptores para eles aí detectados, sendo conhecido que a função reprodutiva pode ser enfraquecida durante

períodos de hiperatividade adrenal (Andersen, 2002; Acosta et al., 2005). Além de um efeito direto sobre os ovários, Andersen (2002) cita, ainda, que os glicocorticóides (especialmente o cortisol) também afetam a função ovariana indiretamente, via eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, em ação antagonista (Acosta et al., 2005). Em humanos, o fluido folicular possui, próximo à ovulação, níveis de cortisol livre cerca de dez vezes mais elevados que no soro. O cortisol interfere com a ação *feedback* positiva de estradiol para induzir o pico pré-ovulatório de LH, porém atrasando a liberação do pico de LH e reduzindo sua amplitude, mas não causando bloqueio neste mecanismo (Wagenmaker et al., 2009). Em folículos pré-ovulatórios de vacas, a parede folicular contém níveis de cortisol duas vezes mais elevados nas 24 horas que antecedem a ovulação, e isto não é acompanhado por aumentos nas concentrações venosas ovariana e jugular (Acosta et al., 2005).

A ovulação tem sido descrita como uma reação inflamatória controlada, envolvendo síntese de citocinas, prostaglandinas, e liberação de histamina, em combinação com a produção de enzimas proteolíticas (Murdoch, 1985; Murdoch et al., 1997; Terranova, 1997). Uma vez que a degradação proteolítica imunomediada tenha enfraquecido a parede folicular e uma passagem tenha sido estabelecida, permitindo que o oócito seja expelido, mecanismos para reduzir e confinar este processo inflamatório devem ocorrer para prevenir danos ao folículo e ao desenvolvimento do corpo lúteo (Murdoch et al., 1997; Andersen, 2002). Os altos níveis locais de cortisol livre têm sido sugeridos, conforme revisão de Andersen (2002) e Acosta et al. (2005), como participantes nestes processos, por limitarem o dano tecidual e atuarem como agentes anti-inflamatórios.

Este trabalho teve como objetivo quantificar as concentrações de insulina e cortisol no fluido de folículos ovarianos ovinos de diferentes tamanhos, correlacionando-as aos processos fisiológicos correspondentes aos distintos tamanhos foliculares.

Material e Métodos

Utilizaram-se ovários ovinos provenientes de 100 fêmeas cíclicas adultas, mestiças Pantaneiras, abatidas em frigorífico, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Após a colheita, avaliaram-se os ovários em seu conteúdo folicular e classificaram-se os folículos de acordo com seu tamanho (em milímetros), distribuindo-os em quatro grupos: G1 = <2 mm; G2 = 2-4 mm; G3 = >4-6 mm e G4 = > 6mm. Uma vez classificados, os folículos foram puncionados com agulhas de insulina, e o seu conteúdo aspirado com seringas e transferido para eppendorfs identificados, armazenados em freezer a -20°C.

Ao término das colheitas de fluido folicular de todos os ovários, procedeu-se às dosagens de insulina e cortisol, por radioimunoensaio, utilizando-se kits comerciais em fase sólida (insulina¹ e cortisol²) no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, nas diferenças encontradas entre médias, aplicou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Os folículos, classificados em quatro tipos, de acordo com o seu tamanho, apresentaram uma média geral \pm desvio padrão de 188,65 \pm 95,26 μ UI/ml para insulina (amplitude de 3,54 a 332,15 μ UI/ml) e de 3,60 \pm 0,84 μ g/dl para cortisol (amplitude de 2,50 a 7,58 μ g/dl). A insulina demonstrou diferenças estatísticas significativas entre os folículos ($P < 0,000001$), ao contrário do verificado para o cortisol ($P > 0,05$).

Na Tabela 1 pode-se observar as médias obtidas para insulina e cortisol nos quatro grupos foliculares, bem como as diferenças verificadas entre eles com relação à insulina.

Tabela 1. Concentrações intrafoliculares médias de insulina (μ UI/ml) e de cortisol (μ g/dl), em quatro grupos de folículos ovarianos ovinos.

FOLÍCULOS	INSULINA	CORTISOL
0-2 mm	255,61 ^a	3,55 ^a
2-4 mm	191,40 ^{ab}	3,38 ^a
4-6 mm	112,22 ^{bc}	4,01 ^a
>6 mm	42,99 ^c	3,61 ^a
Média geral	188,65	3,60

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,01$).

Letras iguais indicam ausência de diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$).

A insulina tem um papel fundamental na foliculogênese, por causa de sua ação reguladora geral do fornecimento de glicose ou sua ação direta sobre a foliculogênese, sugerindo um envolvimento deste hormônio no mecanismo dos efeitos nutricionais sobre a foliculogênese

em ovinos (Somchit et al., 2007). A nutrição tem efeitos sobre a atividade ovariana, correlacionada com modificações nas concentrações circulantes de hormônios metabólicos, incluindo a insulina, sem afetar os níveis de gonadotrofinas (Webb et al., 2004). Na Tabela 1, percebe-se uma redução nos níveis de insulina folicular à medida que os folículos crescem, especialmente naqueles maiores, mais próximos do tamanho ovulatório. Isto é confirmado pelos achados de Viñoles et al. (2005), que relataram um número aumentado de

¹ Insulin Coat-A-Count fase sólida, Diagnostic Products Corporation, 5700 West 96th Street, Los Angeles, CA 90045-5597.

² Cortisol Coat-A-Count fase sólida, Diagnostic Products Corporation, 5700 West 96th Street, Los Angeles, CA 90045-5597.

foliculos em crescimento de 2-3 mm de diâmetro com níveis elevados de insulina, em um efeito agudo, demonstrando uma maior importância dos hormônios (insulina) e substâncias (glicose) metabólicas em relação ao FSH no crescimento folicular. Também para Shimizu et al. (2008), o sistema insulina pode suportar a maturação de foliculos pré-ovulatórios, sendo necessária a expressão de um alto nível de receptores de insulina nas células da granulosa, para o desenvolvimento ao estágio ovulatório de um foliculo. No entanto, estes mesmos autores não encontraram diferenças nos níveis de insulina folicular entre foliculos dominantes pré-ovulatórios, foliculos dominantes estrógeno-ativos, foliculos dominantes estrógeno-inativos e foliculos pequenos.

A concentração de glicose no fluido folicular de pequenos foliculos (<3,5 mm) foi significativamente maior que nos grandes foliculos ($\geq 3,5$ mm), no experimento de Somchit et al. (2007). Considerando-se que, um incremento no fornecimento de glicose mediado pela insulina pode ser crítico para o crescimento folicular e a prevenção da atresia, pode-se sugerir que a glicose torna-se reduzida com o aumento do tamanho folicular, provavelmente pela elevação dos requerimentos de energia para os processos finais de foliculogênese. No presente experimento, isto pode ser evidenciado pelos níveis decrescentes de insulina em relação ao tamanho folicular, refletindo a chegada de glicose, mediada pela insulina, aos foliculos. Por outro lado, para Szymanski et al. (2007), em ovelhas submetidas à restrição alimentar, os pulsos de LH são reiniciados, por modificações na utilização de combustíveis metabólicos e, possivelmente, insulina, o que necessitaria de uma relação inversa nos níveis deste hormônio, com elevações nos foliculos de maior tamanho. Da mesma forma, Webb et al. (2004) citam, em sua revisão, resultados que evidenciam uma maior secreção de insulina no período pré-ovulatório, relacionada ao crescimento nos níveis de estrógeno, ainda que também relatem altos níveis de insulina em foliculos antrais pequenos

(1-4 mm), demonstrando uma ação direta dos hormônios metabólicos sobre a função folicular.

As concentrações de cortisol mantiveram-se em níveis estatisticamente semelhantes nos diferentes grupos foliculares ($P > 0,05$), sem manifestar a alta concentração citada por Andersen (2002) como presente no foliculo pré-ovulatório logo antes da ovulação, num papel anti-inflamatório. Isso encontra respaldo nos achados de Wagenmaker et al. (2009), de que o cortisol atrasa a liberação do pico de LH por interferir com a ação *feedback* positiva de estradiol para induzir o pico pré-ovulatório de LH; portanto, suas concentrações não podem sofrer elevações proporcionais ao aumento do tamanho folicular. No entanto, para Acosta et al. (2005) a presença de altos níveis de cortisol na parede folicular, próximo à ovulação, demonstra a presença de um mecanismo regulatório local para a produção/conversão em foliculos ovulatórios, num mecanismo que pode modular a reação inflamatória induzida pelo pico de LH na parede folicular, de forma independente aos níveis sistêmicos deste glicocorticóide. A regulação local da concentração de cortisol biologicamente ativo é um importante mecanismo fisiológico pelo qual os glicocorticóides afetam os órgãos reprodutivos femininos (Andersen, 2002).

Segundo Acosta et al. (2005), o ambiente glicocorticóide na parede folicular ajusta-se aos níveis locais, e pode proteger os foliculos dos efeitos adversos destes hormônios, prevenindo o excesso de reações inflamatórias associadas com a ovulação, já referidas por Andersen (2002), através de mecanismos de *down-regulation* sobre estes esteróides, por seu aumento local temporário. No presente experimento não foi possível evidenciar este efeito através de modificações nas concentrações de cortisol em diferentes tamanhos foliculares.

Desta forma, torna-se necessária a execução de outros experimentos, em distintos grupos de ovelhas, a fim de definir-se os perfis endócrinos em cada um deles.

Conclusões

Conclui-se que os folículos ovarianos de ovelhas mestiças Pantaneiras possuem níveis decrescentes de insulina e constantes de cortisol, em relação ao seu tamanho e desenvolvimento até o padrão ovulatório.

Referências Bibliográficas

- Acosta, T.J.; Tetsuka, M.; Matsui, M.; et al. In vivo evidence that local cortisol production increases in the preovulatory follicle in the cow. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, n.4, p.483-489, 2005.
- Andersen, C.Y. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. **Journal of Endocrinology**, v.173, p.211-217, 2002.
- Cunningham, J.G.; Klein, B.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier Science Publishers, 2008. 710p.
- Murdoch, W.J. Follicular determinants of ovulation in the ewe. **Domestic Animal Endocrinology**, v.2, n.3, p.105-21, 1985.
- Murdoch, W.J.; Colgin, D.C.; Ellis, J.A. Role of tumor necrosis factor-alpha in the ovulatory mechanisms of ewes. **Journal of Animal Science**, v.75, n.6, p.1601-5, 1997.
- Sharma, G.T.; Majumdar, A.C. Control of follicular steroidogenesis in early- and late-luteal phase goat ovaries. **Small Ruminant Research**, v.34, n.2, p.111-117, 1999.
- Shimizu, T.; Murayama, C.; Sudo, N.; et al. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. **Animal Reproduction Science**, v.106, n.1-2, p.143-152, 2008.
- Somchit, A.; Campbell, B.K.; Khalid, M.; et al. The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid. **Theriogenology**, v.68, p.1037-1046, 2007.
- Szymanski, L.A.; Schneider, J.E.; Friedman, M.I.; et al. Changes in insulin, glucose and ketone bodies, but not leptin or body fat content precede restoration of luteinising hormone secretion in ewes. **Journal of Neuroendocrinology**, v.19, n.6, p.449-460, 2007.
- Terranova, P.F. Potential roles of tumor necrosis factor- α in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, v.14, n.1, p.1-15, 1997.
- Viñoles, C.; Forsberg, M.; Martin, G.B.; et al. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. **Reproduction**, v.129, p.299-309, 2005.
- Wagenmaker, E.R.; Breen, K.M.; Oakley, A.E.; et al. Cortisol interferes with the estradiol-induced surge of luteinizing hormone in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.80, p.458-463, 2009.
- Webb, R.; Garnsworthy, P.C.; Gong, J.G.; et al. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82, E-suppl., p.E63-E74, 2004.