

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos

Concentração de IGF1 livre e insulina no fluido folicular e a expressão folicular dos receptores de IGF1 durante a foliculogênese da égua

Lisia Schaefer Besen

Porto Alegre

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos

Concentração de IGF1 livre e insulina no fluido folicular e a expressão folicular dos receptores de IGF1 durante a foliculogênese da égua

Lisia Schaefer Besen

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

Co-Orientadora: Dra. Anita Mylius Pimentel

Porto Alegre

2016

Lisia Schaefer Besen

**Concentração de IGF1 livre e insulina no fluido folicular e a expressão folicular
dos receptores de IGF1 durante a foliculogênese da égua**

Aprovado em 30 de junho de 2016

APROVADO POR:

Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory
Presidente e Membro da Comissão

Prof Dr. Eduardo Malschitzky
Membro da Comissão

Prof. Dr, Ivan Cunha Bustamante Filho
Membro da Comissão

CIP - Catalogação na Publicação

Besen, Lisia Schaefer

Concentração de IGF1 livre e insulina no fluido folicular e a expressão folicular dos receptores de IGF1 durante a foliculogênese da égua / Lisia Schaefer Besen. -- 2016.

54 f.

Orientador: Rodrigo Costa Mattos.

Coorientadora: Anita Mylius Pimentel.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. foliculogênese. 2. égua. 3. IGF1. 4. insulina.
I. Mattos, Rodrigo Costa, orient. II. Pimentel, Anita Mylius, coorient. III. Título.

Agradecimentos

A Deus, pela vida que me deu, por tudo que colocou no meu caminho e me fez lutar para ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim, por me apoiarem incondicionalmente. Às minhas irmãs, pelos bons momentos e pela compreensão.

Ao professor Rodrigo Costa Mattos pela oportunidade, orientação e disposição. Pelos ensinamentos, incentivo e puxões de orelha.

À minha co-orientadora e amiga Anita Mylius Pimentel pelos conhecimentos compartilhados e incentivos em meus primeiros passos em pesquisa. Pelas conversas e risadas para desestressar nos momentos mais pesados desse caminho.

Às professoras Ana Meikle (Udelar) e Anamaria Esmeraldino (ULBRA) pela ajuda na realização deste trabalho e todos os esclarecimentos dados às inúmeras dúvidas que surgiram nesse processo.

Às minhas amigas Joana Gregory Luz (e a pequena Manuela) e Monalyza Cadori Gonçalves, pelo apoio, atenção e amizade constantes.

A todos os colegas do Reprolab que, de uma forma ou outra, contribuíram para que eu pudesse estar onde estou hoje.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Dinâmica Folicular	4
2.1.1. Ovários	4
2.1.2. Foliculogênese.....	4
2.1.3. Sazonalidade	6
2.1.4. Outros reguladores sistêmicos	7
2.2. Reguladores locais	8
2.2.1. Esteroides ovarianos	8
2.2.2. Sistema IGF.....	9
2.2.2.1. IGF1.....	9
2.2.2.2. Receptor de IGF1	12
2.2.3. Insulina	13
3. ARTIGO.....	17
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Interações hormonais na regulação da expressão da aromatase em folículos de ratas.....	10
Figura 2 - Interações entre os componentes do sistema regulatório ovariano relacionado à INS, que envolve INS, IGF1, IGF2 e seus receptores e IGFbps.....	15
Figure 3 - Free IGF1 (A) and INS (B) concentration in different follicular groups.....	26
Figure 4 - Photomicrographs of representative tissue sections of equine follicles showing the localization of IGF1R by immunohistochemistry.....	27
Figure 5 - Immunohistochemical score of IGF1R on granulosa and internal theca cells from equine follicular wall on different groups.....	28
Figure 6 - Free IGF1 and INS interactions on granulosa and internal theca cells of gonadotropin-dependent follicles.....	34

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Mean diameter (\pm s.e.m) and range of the largest follicle in the different experimental groups.....	25
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

µm: Micrômetro

µUI: Microunidade internacional

ABC: Complexo avidina-biotina

cAMP: Monofosfato de adenosina cíclico

CL: Corpo lúteo

CV: Coeficiente de variação

DAB: Cromógeno diaminobenzidina-3,3

E₂: Estradiol

FGF: Fator de crescimento de fibroblasto

FSH: Hormônio folículo-estimulante

G: Força da gravidade

GH: Hormônio do crescimento

GLU: Glicose

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina

IGF1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGF1R: Receptor tipo 1 de IGF

IGF2: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2

IGFBP: Proteína de ligação ao IGF de alta afinidade

IGFBP-rP: Proteína relacionada com IGFBP de baixa afinidade

IgG: Imunoglobulina G

IHQ (IHC): Imunohistoquímica

INS: Insulina

IR: Receptor de insulina

LH: Hormônio luteinizante

mRNA: Ácido desoxirribonucleico (RNA) mensageiro

ng: Nanograma

NHS: Soro normal de cavalo

P₄: Progesterona

PBS: Tampão fosfato salino

PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinase

PKA: Proteína kinase A

PKB: Proteína kinase B

RIA: Radioimunoensaio

TGF: Fator de transformação do crescimento

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular

RESUMO

Concentração de IGF1 livre e insulina no fluido folicular e a expressão folicular dos receptores de IGF1 durante a foliculogênese da égua

Autora: Lisia Schaefer Besen

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

O objetivo deste estudo foi analisar as concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) e insulina (INS) no fluido folicular durante foliculogênese em éguas, e localizar o receptor tipo 1 de IGF (IGF1R) nas paredes foliculares. Durante a estação reprodutiva, 40 éguas mestiças enviadas para abate em matadouro, com idades variando entre 6 e 16 anos foram utilizadas. As éguas foram abatidas de forma humanitária. Os tratos reprodutivos internos foram recuperados dentro de 10 min após o abate, ovários de éguas cíclicas foram separados do resto do aparelho. As éguas foram classificadas em quatro grupos: G1 – Folículo \leq 13,5 mm e CL identificável; G2 – Folículo de 13,6 - 22,5 mm e CL identificável; G3 – Folículo de 22,6 - 31,5 mm e CL identificável; G4 – Folículo \geq 31,6 mm e CL difícil de identificar. O fluido folicular (FF) foi aspirado e armazenado a -80° C até a sua utilização. Após a punção do FF, um fragmento da porção ventral da parede folicular foi removido para realizar a imunohistoquímica para localização de receptores IGF1R. O IGF1 livre foi determinado por ensaio imunoradiométrico. A INS foi determinada por um radioimunoensaio de fase líquida. A concentração de IGF1 livre e INS no FF aumentou com o crescimento folicular ($P < 0,05$). O escore imunohistoquímico de IGF1R nas células da granulosa e da teca interna da parede folicular equina em diferentes grupos aumentou ($P < 0,05$) com aumento folicular. Concluímos que as concentrações de IGF1 livre e INS no FF e de IGF1R em paredes foliculares de éguas aumentam com o crescimento folicular durante a foliculogênese, dando evidência do papel importante do IGF1 e INS no desenvolvimento folicular, e uma interação entre ambos hormônios na fisiologia reprodutiva ovariana. Sendo a égua um modelo de pesquisa para estudos comparativos na dinâmica folicular para consideração em mulheres, a conclusão deste estudo pode ser aplicada, também, a humanos.

Palavras-chave: equino, foliculogênese, teca, granulosa.

ABSTRACT

Free IGF1 and insulin concentrations in the follicular fluid and follicle IGF1 receptor expression differs according to follicle size in the mare

Author: Lisia Schaefer Besen

Adviser: Rodrigo Costa Mattos

The aim of this study was to analyze free type 1 insulin-like growth factor (IGF1) and insulin (INS) concentrations in follicular fluid during folliculogenesis in mares, and to localize type 1 IGF receptor (IGF1R) on follicular walls. During the breeding season, 40 mixed-breed mares sent to slaughter at an abattoir, with ages ranging between 6 to 16 years were used. Mares were humanely slaughtered. Internal reproductive tracts were recovered within 10 min after slaughter; ovaries of cyclic mares were separated from the rest of the tract. Mares were categorized into four groups: G1 – Follicle \leq 13.5 mm and CL identifiable; G2 – Follicle of 13.6 to 22.5 mm and CL identifiable; G3 – Follicle of 22.6 to 31.5 mm and CL identifiable; G4 – Follicle \geq 31.6 mm and CL difficult to identify. The follicular fluid (FF) was aspirated and stored at -80°C until use. After puncture of the FF, a fragment of the ventral portion of the follicular wall was removed to perform immunohistochemistry to localize IGF1R receptors. Free IGF1 was determined by immunoradiometric assay. INS was determined by a liquid phase radioimmunoassay. The concentration of free IGF1 and INS in FF increased with follicle growth ($P < 0.05$). Immunohistochemical score of IGF1R on granulosa and internal theca cells from equine follicular wall on different groups increase ($P < 0.05$) with follicular raise. We conclude that free IGF1 and INS concentrations in FF and IGF1R in follicular walls of mares increase with follicular growth during folliculogenesis, giving evidence of important role of IGF1 and INS in follicular development, and an interaction between both hormones in ovarian reproductive physiology. As the mare is a model research for comparative studies in follicular dynamics for consideration in women, the conclusion of this study can be applied to humans also.

Keywords: equine, folliculogenesis, theca, granulosa.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um oócito maduro com capacidade ótima de fertilização depende da regulação das gonadotrofinas hipofisiárias e dos esteroides ovarianos. Porém, alguns fatores de crescimento, autócrinos e parácrinos, intraovarianos (KAYA et al., 2012) têm-se revelado importantes na regulação das funções das células ovarianas durante a foliculogênese (BEG & GINTHER, 2006).

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo1 (IGF1) é um polipeptídeo pertencente à família que inclui a proinsulina, a insulina (INS) e o sistema IGF, possuindo homologia na sequência de aminoácidos e com estruturas terciárias similares (YAKAR & ADAMO, 2012). Este IGF1 estimula as células da granulosa em sinergia com as gonadotrofinas, atuando na diferenciação das células foliculares (BEG & GINTHER, 2006).

Não há correlação entre o nível de IGF1 total no fluido folicular (FF) e o tamanho folicular. A biodisponibilidade do IGF1, ou seja, o IGF1 livre, mais que sua concentração total, que se altera durante a foliculogênese (SCARAMUZZI et al., 2011). Em éguas, a concentração de IGF1 livre começa a elevar-se no futuro folículo dominante antes deste atingir o diâmetro de divergência (DONADEU & GINTHER, 2002). A correlação entre o aumento nos níveis de IGF1 livre em folículos equinos foi associado ao crescimento dos folículos ovarianos (SPICER et al., 1994; SPICER & ECHTERNKAMP, 1995; BRIDGES et al., 2002; SPICER et al., 2005; BEG & GINTHER, 2006).

A INS estimula a proliferação das células da granulosa, a produção de progesterona (P_4) pelas células da granulosa e luteais, e aumenta a esteroidogênese nas células luteais independente da espécie (DAVOREN & HSUEH, 1984; SPICER &

ECHTERNKAMP, 1995). Em bovinos da raça Brahman, a INS aumentou o diâmetro de folículos grandes, as concentrações de estradiol (E₂) no FF de folículos grandes e de IGF1 no FF de folículos pequenos e grandes (SIMPSON et al., 1994). Em ratos, a INS pode promover a transição de folículo primordial para primário (KEZELE et al., 2002).

Alguns metabólitos e nutrientes têm efeitos diretos na função folicular, sendo que destes, os mediadores intrafoliculares de influência nutricional na foliculogênese mais estudados são a leptina, a glicose-insulina (GLU-INS), o hormônio do crescimento (GH) e o IGF (SCARAMUZZI et al., 2011). Observa-se os efeitos nutricionais na foliculogênese entre animais em balanço energético negativo, onde a foliculogênese está inibida, comparados aos em balanço energético positivo, tanto em bovinos (SCARAMUZZI et al., 2011) como em folículos grandes equinos (SALAZAR-ORTIZ et al., 2014). No entanto, o comportamento fisiológico da INS no FF relacionado ao crescimento folicular e à ovulação em éguas, não foi relatado.

Os fisiologistas de reprodução humana e animal têm interesses em comum: 1) a detecção precisa do momento da ovulação e 2) o entendimento dos determinantes da fertilidade (MIHM et al., 2011). Estudos intervencionistas, principalmente em bovinos, equinos e ovinos, têm sido úteis para interpretar as relações temporais observadas em estudos do ciclo menstrual na mulher (ADAMS et al., 2012).

As similaridades nas ondas foliculares, na divergência nas taxas de crescimento do futuro folículo dominante e outros folículos da onda, nas concentrações hormonais, na qualidade do oócito, nos efeitos da idade na dinâmica folicular e oocitária entre éguas e mulheres sustentam a conclusão que a égua é um bom modelo para estudos comparativos sobre a foliculogênese na mulher (GINTHER, 2012).

Visando ampliar o conhecimento acerca dos mecanismos biológicos da foliculogênese não só na espécie equina, bem como transpô-lo à espécie humana, este trabalho objetivou analisar as concentrações de IGF1 livre e de INS no FF de éguas durante a foliculogênese, na estação reprodutiva. Também buscou localizar os receptores de IGF1 (IGF1R) na parede folicular destes mesmos folículos coletados, visando correlacionar o seu padrão de localização com as concentrações de IGF1 livre e o crescimento folicular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Dinâmica Folicular

2.1.1. Ovários

O ovário possui ambas as funções: exócrina, pela produção de gametas (oócitos) e endócrina, pela produção de hormônios (BRINSKO et al., 2011). O oócito exerce efeitos profundos nas células da granulosa, tornando a interface entre oócito e células da granulosa um local de controle mais significativo na coordenação do desenvolvimento folicular. Esta interface é de fundamental importância para a regulação do crescimento e maturação do oócito e luteinização do folículo (PALMA et al., 2012).

O fluido folicular (FF), um exsudato do plasma sanguíneo modificado pela atividade metabólica da parede folicular (PALMA et al., 2012), fornece um microambiente muito importante para o desenvolvimento dos oócitos, apresentando características bioquímicas que podem exercer papel fundamental no desenvolvimento de um oócito de qualidade e subsequente potencial para ser fertilizado e desenvolver um embrião (REVELI et al., 2009).

2.1.2. Foliculogênese

A foliculogênese é um processo que consiste no desenvolvimento de folículos primordiais até o estágio de folículos pré-ovulatórios, durante o qual ocorre crescimento oocitário e intensa proliferação das células da granulosa (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Em cada ciclo estral, o crescimento e a diferenciação do folículo dominante envolvem mecanismos complexos que levam à ovulação. Principalmente sob o controle endócrino das gonadotrofinas hipofisiárias, enquanto esteroides, fatores de

crescimento e outros fatores peptidérgicos atuam como moduladores locais, parácrinos e autócrinos das ações gonadotróficas (GÉRARD et al., 1999).

Em animais monovulares e na mulher, o desenvolvimento do folículo dominante está fortemente ligado ao diâmetro do folículo na divergência, que inicia ao final da fase de crescimento comum para os folículos da onda folicular e segue com o crescimento contínuo do folículo dominante e regressão dos subordinados (GINTHER, 2012).

Em uma onda folicular ocorrem fenômenos foliculares que seguem a seguinte sequência: recrutamento, seleção, dominância e ovulação ou atresia. Na fase de recrutamento, há um crescimento comum de um grupo de folículos antrais sensíveis ao FSH. A fase de seleção é onde um ou alguns folículos mantêm seu padrão de crescimento, enquanto os demais iniciam o processo de regressão ou atresia (GURGEL et al., 2008). Em éguas, o crescimento paralelo desses folículos encerra quando o maior deles alcança o diâmetro aproximado de 22 mm e o segundo maior folículo alcança 19 mm, dando início a fase de dominância (JACOB et al., 2009). Nesta fase, este folículo secreta quantidades elevadas de estradiol (E_2) e torna-se mais sensível ao estímulo ovulatório do pico de LH além de passarem a exercer um efeito inibitório indireto sobre os demais folículos e serem capazes de ovular (GURGEL et al., 2008).

A divergência do diâmetro provavelmente é precedida pela divergência bioquímica ou funcional relacionada às alterações ecográficas observadas na parede do maior folículo, no dia anterior à divergência de diâmetro. Assim, o futuro folículo dominante, neste período, desenvolve duas habilidades: 1) de continuar suprimindo o FSH a níveis abaixo do necessário para os demais folículos, e 2) de utilizar as baixas

concentrações de FSH no seu crescimento posterior e desenvolvimento (GINTHER et al., 2002).

As diferenças entre os dois maiores folículos, quanto à taxa de produção dos fatores no FF, estão temporariamente associadas com o desvio do diâmetro e aparentemente embasam uma maior responsividade gonadotrófica no folículo dominante em desenvolvimento do que nos outros folículos (GINTHER et al., 2004).

Fatores intrafoliculares que estão relacionados ao processo de ativação da divergência incluem o sistema IGF, hormônios esteroides, peptídeos (inibina-A e ativina-A), receptores de gonadotrofinas, fatores angiogênicos e outros fatores diversos. No entanto, aqueles que estão temporariamente ou funcionalmente implicados na divergência folicular são o IGF1 e seu sistema, estradiol e receptores de LH (BEG & GINTHER, 2006).

2.1.3. Sazonalidade

O ciclo reprodutivo anual é dividido em duas estações: estação anovulatória (períodos de transição de outono, de anestro profundo e de transição de primavera), e estação ovulatória (período de seleção folicular e desenvolvimento do folículo dominante até a ovulação). Este processo é diretamente influenciado por fatores extrínsecos como nutrição, temperatura, estresse e fotoperíodo (GURGEL et al., 2008).

O retorno da ciclicidade ovariana na égua durante a primavera requer uma série de eventos endócrinos bem determinados para controlar a foliculogênese (WATSON et al., 2002). Os fatores extrínsecos acima citados demonstraram exercer alterações sazonais na regulação na atividade do complexo sistema neuroendócrino tanto do hipotálamo quanto da hipófise, envolvendo não só a melatonina, mas também neurotransmissores como opioides e catecolaminas (NAGY et al., 2000).

No período transicional de primavera, a produção de folículos anovulatórios sequenciais é grande. A incidência desses folículos hemorrágicos anovulatórios é de 5% no início e de 20% no final da estação reprodutiva (GINTHER et al., 2008). Apesar do folículo dominante alcançar o diâmetro ovulatório, a ovulação propriamente dita está comprometida pelo subdesenvolvimento da teca, vascularização ineficiente, diminuição da expressão dos receptores de LH e diminuição da capacidade de produção de esteroides, devido a um ambiente deficiente de IGF1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) no início do desenvolvimento folicular (DOYLE et al., 2008).

Alterações qualitativas semelhantes nos níveis hormonais do FF têm sido relatadas em associação com a divergência folicular em éguas em períodos de transição e ovulação, sugerindo que existe um mecanismo de seleção folicular trabalhando durante a estação anovulatória, mesmo que parcialmente (DONADEU & WATSON, 2007).

2.1.4. Outros reguladores sistêmicos

A dopamina parece ter um efeito sazonal na égua, controlando a secreção de prolactina por inibir os lactotrófos hipofisiários, associando também a prolactina às alterações reprodutivas sazonais nesta espécie. A prolactina, presente no FF, apresenta um pico na sua concentração plasmática próximo ao período da ovulação em éguas. Apesar de não estar claro a fonte da prolactina folicular nem seu objetivo no pico periovulatório plasmático, encontrou-se uma correlação positiva entre E₂ e prolactina (KING et al., 2008).

O hormônio do crescimento (GH) é um regulador metabólico de todos os tecidos, seu efeito no ovário é descrito como uma co-gonadotrofina. Seu efeito principal é através do IGF1, o qual exerce papel nas células da granulosa sensibilizadas pelo

FSH durante o crescimento folicular terminal. Em equinos, as concentrações plasmáticas de GH são maiores, e de IGF1 menores, em animais com restrição alimentar comparados aos animais bem alimentados (PEUGENET et al., 2010).

2.2. Reguladores locais

Recentemente, tem sido estudado mais detalhadamente o papel dos supostos reguladores parácrinos do crescimento folicular em éguas. Entre eles estão os esteroides foliculares, o sistema IGF, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), inibinas e ativinas (DONADEU & WATSON, 2007), citocinas, fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de transformação do crescimento (TGF) (GÉRARD et al., 1999).

Os fatores locais que causam esse aumento diferencial de responsividade às gonadotrofinas no futuro folículo dominante pode ser o pivô do mecanismo de seleção folicular (GINTHER et al., 2002).

2.2.1. Esteroides ovarianos

O estradiol (E_2) é secretado pelos folículos em desenvolvimento e é candidato a um efeito inibitório na secreção de FSH e de LH no centro tônico do hipotálamo. No entanto, não é conhecido se o E_2 entra na circulação em concentrações adequadas para um feedback negativo com o FSH, principalmente durante a fase inicial da diminuição do FSH. O E_2 plasmático começa a aumentar um dia antes do início da seleção, parecendo não haver contribuição para o declínio do FSH até o dia anterior da divergência (GURGEL et al., 2008). Tanto a produção de E_2 , quanto a de inibina, é bloqueada se efetivada a eliminação do maior folículo e uma diminuição dos dois hormônios poderia resultar um aumento de FSH.

A secreção de E_2 , assim como a atividade da aromatase, é estimulada pela ação da ativina-A nas células da granulosa. A inibina-A também ajuda na modulação da esteroidogênese nas células da granulosa e da teca (GINTHER et al., 2002).

A progesterona (P_4) parece ter papel importante na ovulação e um papel em nível uterino no processo de implantação do embrião. A produção folicular de esteroides é baseada no modelo “duas células”, onde as células da teca produzem andrógenos em resposta ao LH, enquanto as células da granulosa metabolizam os andrógenos em E_2 em resposta ao FSH (GÉRARD et al., 1999).

2.2.2. Sistema IGF

O sistema IGF, em mamíferos, é composto por IGF1 e IGF2 e seus receptores, seis proteínas de ligação ao IGF de alta afinidade (IGFBP-1 a -6) e várias proteínas relacionadas com IGFBP de baixa afinidade (IGFBP-rP) e proteases de IGFBP (calicreínas, catepsinas e metaloproteinases de matriz). As proteases degradam as IGFBPs e, assim, regulam a biodisponibilidade e as ações dos IGFs (GINTHER et al., 2004; NANDI & PORETSKY, 2013).

Os efeitos da família IGF dependem da espécie e do estágio folicular, assim como das condições de desenvolvimento *in vivo* ou *in vitro*, começando a aumentar apenas no estágio pré-antral tardio (PALMA et al., 2012).

2.2.2.1. IGF1

O IGF1 é um polipeptídeo de cadeia simples pertencente à família que inclui a proinsulina, a insulina e o sistema IGF, possuindo homologia na sequência de aminoácidos e compartilhando estruturas terciárias similares entre si. Tanto o IGF1 quanto IGF2 exercem papel fundamental na proliferação, diferenciação e função celulares (YAKAR & ADAMO, 2012).

As células da granulosa são estimuladas pelo IGF1, que atua de forma sinérgica às gonadotrofinas para a diferenciação das células foliculares (BEG & GINTHER, 2006). Observa-se na figura 1, que o IGF1 estimula a expressão dos receptores de FSH, potencializando as ações desta gonadotrofina que ativa as vias de sinalização cAMP/PKA (Adenosina monofosfato cíclico/ Proteína kinase A) e PI3K/PKB (Fosfatidilinositol-3-kinase/ Proteína kinase B), conhecidos mediadores dos efeitos estimulatórios do FSH na expressão da aromatase, enzima aromatizadora de andrógenos em estrógenos, e provavelmente atua em sinergia com FSH na ativação da PKB (STOCCO, 2008).

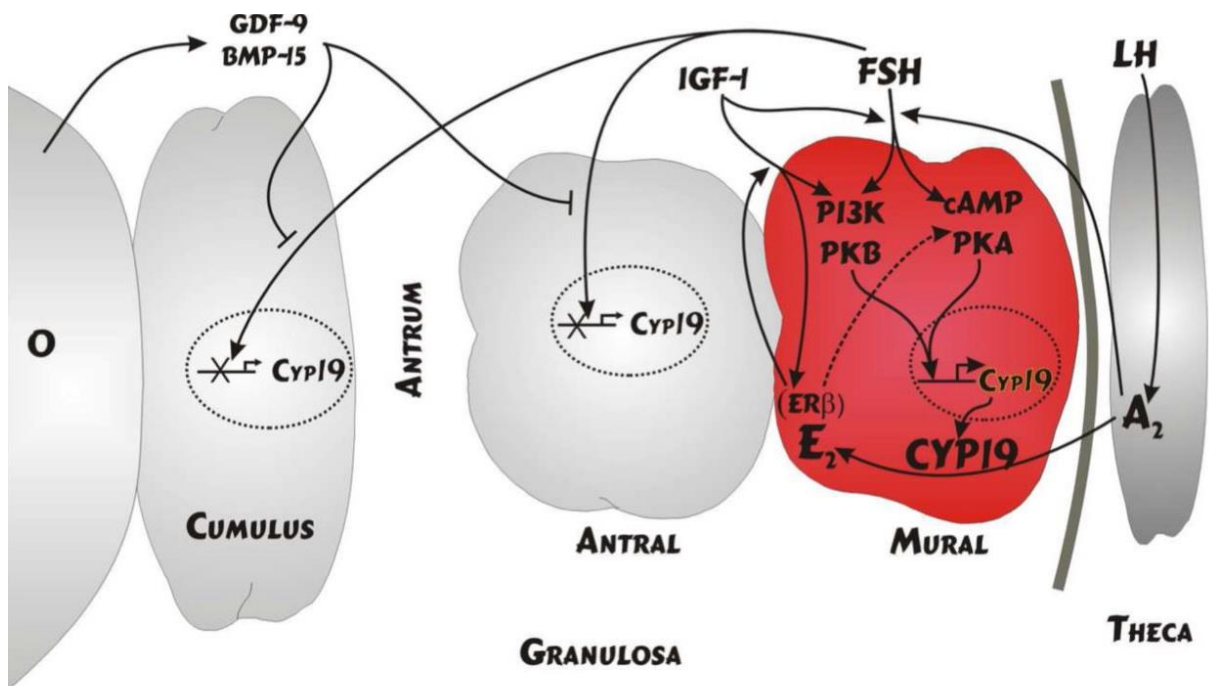


Figura 1 - Interações hormonais na regulação da expressão da aromatase em folículos de ratas. Fonte: STOCCO, 2008.

Em éguas, as concentrações de IGF1 livre no FF tornam-se mais elevadas no futuro folículo dominante do que nos demais folículos antes de alcançar o diâmetro de divergência. As concentrações de IGF2 livre no FF não são conhecidas, embora a

concentração de IGF2 total não se diferenciar entre os diversos tamanhos foliculares (GINTHER et al., 2004).

A proposta de que o IGF1 é o principal fator necessário para iniciar a divergência folicular em equinos é indicado por: 1) IGF1 livre começa a aumentar diferencialmente um dia antes do início espontâneo da divergência (DONADEU & GINTHER, 2002) e 12 horas antes de uma divergência induzida por ablação do maior folículo (GINTHER et al., 2002); 2) injeção de IGF1 recombinante humano dentro do segundo maior folículo no início esperado da divergência induz um aumento da incidência de dominância no folículo tratado (GINTHER et al., 2008); e 3) injeção de IGFBP-3 dentro do maior folículo no início esperado da divergência causa regressão do maior folículo e o segundo maior folículo torna-se dominante (GINTHER et al., 2004).

A elevação das concentrações de IGF1 livre está correlacionada ao aumento nos níveis de estradiol, progesterona, androstenediona, relação estradiol:progesterona, IGF1 total, IGF2 total, concentração total de proteínas, IGFBP-5 protease e o diâmetro folicular. A diminuição nas concentrações de IGF1 livre está correlacionada ao aumento nos níveis de IGFBP-2, -4 e -5 (SPICER et al., 2005), onde a biodisponibilidade de IGF1 no ovário é regulada pelas IGFBPs, que exercem papel inibitório na regulação da ação de IGF1 (YAKAR & ADAMO, 2012).

Quando utilizado no meio de maturação *in vitro*, o IGF1 mostrou efeitos positivos nas taxas de maturação de oócitos equinos por 36 horas, podendo desenvolver oócitos partenogeneticamente até o estágio de mórula. Porém, não se observou um aumento na maturação nuclear, mas sim promoveu a maturação citoplasmática medida pela clivagem partenogênica. A interação sinérgica entre IGF1, gonadotrofinas, estradiol e os componentes do soro fetal bovino, utilizado como meio

de cultivo base, é sugerida acerca da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos equinos (CARNEIRO et al., 2001).

2.2.2.2. *Receptor de IGF1*

O receptor de IGF1 (IGF1R) é um receptor de membrana ligado a tirosina kinase e compartilha 60% de homologia com receptores de insulina α e β , mas difere na especificidade da ligação e na transmissão dos sinais subsequentes a ligação (YAKAR & ADAMO, 2012).

A expressão dos receptores nas células da granulosa e da teca ovarianas são importantes nas ações autócrina/parácrina de fatores ovarianos locais, bem como seu papel na ação endócrina de hormônios sistêmicos (BEG & GINTHER, 2006).

Doyle et al. (2008) observaram que o aumento na expressão do IGF1R é proporcional ao crescimento folicular, sendo maior em folículos grandes (25 a 34 mm de diâmetro) no período ovulatório comparado ao período transicional. Em folículos médios (15 a 24 mm de diâmetro), essa expressão foi semelhante entre os períodos supracitados, demonstrando o papel essencial do IGF1 na seleção e posterior desenvolvimento de folículos ovulatórios.

Em ruminantes, o aumento da expressão do IGF1R de folículos primários antrais grandes é dependente de gonadotrofinas. Esse aumento precoce de IGF1R é concomitante ao aumento do folículo e dos receptores de FSH e LH, sugerindo um possível feedback positivo precoce na diferenciação folicular. Já em primatas, dados sugerem a capacidade dos andrógenos de estimular o crescimento folicular precoce, um efeito parcialmente mediado pelo IGF1 local e a expressão do IGF1R. Esses dados sugerem que o hiperandrogenismo intra e extraovarianos podem estar envolvidos no crescimento folicular excessivo e hipertrofia tecal mediado pelo IGF, observado em ovários policísticos (MONGET & BONDY, 2000).

Tratamentos de hiperestimulação ovariana controlada, com concentrações elevadas de FSH e de doses ovulatórias de hCG (gonadotrofina coriônica humana), diminuem os níveis de IGF1 no FF com o aumento do volume deste nos folículos pré-ovulatórios dessensibilizados. Esse achado imediatamente anterior a ovulação pode induzir uma mudança de direção pela ação diminuída de IGF1 em folículos grandes após a hiperestimulação (CHANG et al., 2002). Entretanto, é desconhecido o padrão da expressão dos receptores de IGF1 em relação à divergência folicular.

2.2.3. Insulina

A insulina (INS) é um hormônio polipeptídico que promove a captação de glicose (GLU) e aminoácidos e pode ter efeitos mitogênicos (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995). No ovário, atua como uma co-gonadotrofina, mediando o desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação do oócito e subsequente desenvolvimento do embrião (CHAVES et al., 2012; NANDI & PORETSKY, 2013).

Em camundongos, onde a INS e as gonadotrofinas são os principais reguladores de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular em folículos ovarianos cultivados, observou-se que a exposição a níveis elevados não fisiológicos de INS e FSH leva a diferenciação inadequada das células da granulosa, a um padrão divergente nas células do *cumulus oophorus* e síntese proteica, correlacionando com efeitos deletérios na capacidade de desenvolvimento dos oócitos (CHAVES et al., 2012).

A atividade da aromatase é estimulada por baixas doses de FSH quando a INS está presente em 0,5 a 10 ng/mL, porém esta resposta é perdida em presença de concentrações elevadas de INS (100 ng/mL). Este hormônio atua através do seu próprio receptor para modular a resposta das células da granulosa às gonadotrofinas (CHAVES et al., 2012). O tamanho do folículo também influencia a resposta da

aromatase à INS e ao IGF1, onde as células da granulosa de folículos grandes eram mais sensíveis a INS e IGF1 comparado aos folículos pequenos (SPICER et al., 2001; SERAFIM et al., 2012).

Os efeitos da INS na maturação folicular e atresia são dose-dependente e espécie-específicos (SERAFIM et al., 2012), assim como as curvas dose-resposta são similares para absorção de GLU pelo IGF1 e INS (MORA et al., 1995).

A INS, e sua relação com a GLU, está entre os mediadores intrafoliculares de influências nutricionais na foliculogênese mais estudados. Além dela, a leptina, o hormônio do crescimento (GH) e o IGF (SCARAMUZZI et al., 2011).

Em leitoas diabéticas e pré-púberes, a INS mostrou ação estimulatória na maturação folicular final quando as leitoas eram submetidas a um acréscimo nutricional, aumentando as concentrações intrafoliculares de IGF1, que pode ter sido o mediador dos efeitos estimulatórios na foliculogênese (QUESNEL et al., 2000). Esse efeito nutricional da INS na foliculogênese também foi observado em grupo de equinos bem alimentados comparados ao grupo com restrição alimentar, mostrando grande diferença entre esses grupos, mas essa diferença não se apresentou entre os níveis de INS plasmático comparado ao FF. Esta diferença é devido ao pico de INS pós-prandial (SALAZAR-ORTIZ et al., 2014).

A interação entre as concentrações de INS e IGF1 também é relatada pela diminuição na produção de IGFBP1 pelas células da granulosa e fígado, induzida pela INS, o que pode aumentar os níveis de IGF1 livre (NANDI & PORETSKY, 2013) e sua atividade pró-androgênica via seu próprio receptor em humanos (GUTMAN et al., 2009), estimulando a *Cyp19* aromatase a converter andrógenos das células da teca em estrógenos (SILVA et al., 2006; SCARAMUZZI et al., 2011).

A hipótese que o excesso de INS pode contribuir para a produção ovariana de andrógenos tem embasamento na abundância de receptores de INS e seu relativo estrutural IGF1 encontrados no ovário humano normal (GUTMAN et al., 2009).

INS e IGF1 aumentaram o número de células da granulosa bovinas, sugerindo que esses dois hormônios compartilham um mecanismo de ação comum para estimular a proliferação de células da granulosa. Sozinhas, as gonadotrofinas tiveram pouco ou nenhum efeito no número de células da granulosa, mas aumentaram a sensibilidade destas células ao efeito mitótico da INS e IGF1 (SPICER et al., 2001).

As relações entre os componentes do sistema regulatório ovariano relacionado à INS estão demonstradas na figura 2.

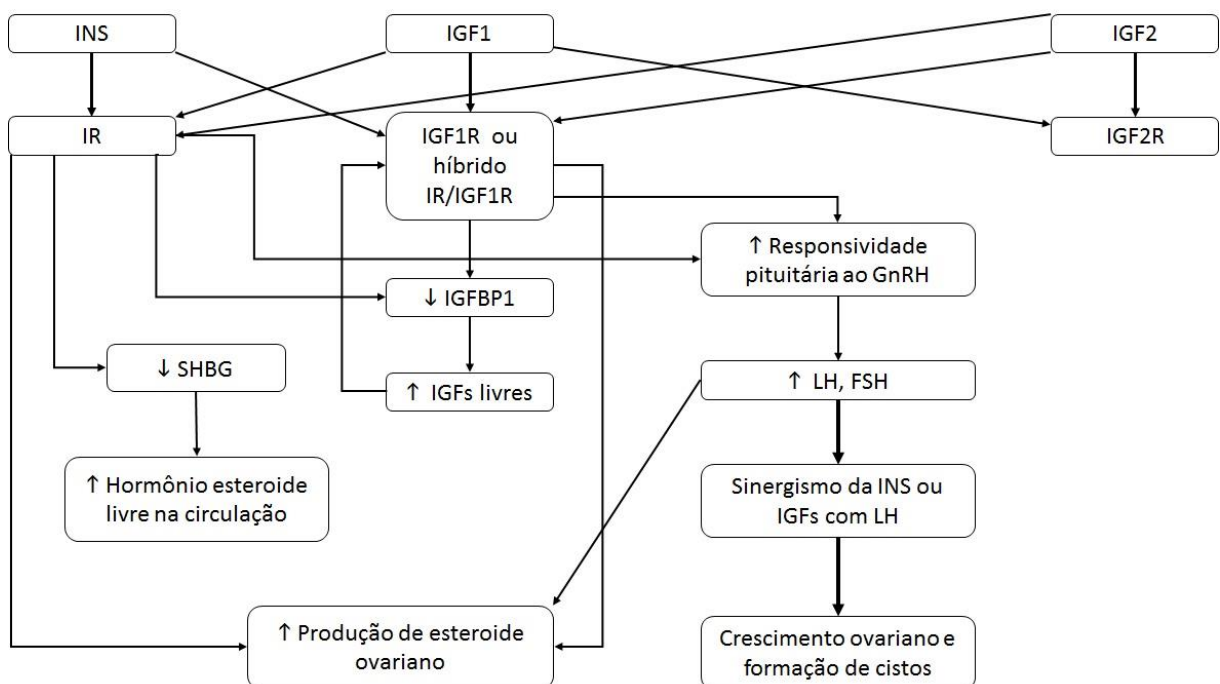


Figura 2 - Interações entre os componentes do sistema regulatório ovariano relacionado à INS, que envolve INS, IGF1, IGF2 e seus receptores e IGFBPs. Fonte: NANDI & PORETSKY, 2013.

Muitos aspectos morfológicos e regulatórios da dinâmica folicular parecem estar conservados ao ponto que a égua é um modelo comparativo de pesquisa apropriado

para mulheres (GINTHER, 2012). Essas interações entre IGF1, INS e seus receptores na dinâmica folicular da égua, mesmo com diferenças espécie-específicas e tecido-específicas nas ações destes hormônios, ampliam o conhecimento da foliculogênese sob o aspecto intrafolicular fisiológico do IGF1 e da INS na espécie equina, possibilitando que este mesmo aspecto seja estendido a espécie humana.

3. ARTIGO

FREE IGF1 AND INSULIN CONCENTRATIONS IN THE FOLLICULAR FLUID AND FOLLICLE IGF1 RECEPTOR EXPRESSION DIFFERS ACCORDING TO FOLLICLE SIZE IN THE MARE

Lisia Schaefer Besen¹, Anita Mylius Pimentel¹, Anamaria Telles Esmeraldino², Ana Meikle³, Rodrigo Costa Mattos¹

1. Reprolab, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brazil
2. ULBRA, Curso de Medicina Veterinária, Canoas, Brazil;
3. Laboratorio de Técnicas Nucleares, UDELAR, Montevideo, Uruguay

Summary

The aim of this study was to analyze free type 1 insulin-like growth factor (IGF1) and insulin (INS) concentrations in follicular fluid during folliculogenesis in mares, and to localize type 1 IGF receptor (IGF1R) on follicular walls. During the breeding season, 40 mixed-breed mares sent to slaughter at an abattoir, with ages ranging between 6 to 16 years were used. Mares were humanely slaughtered. Internal reproductive tracts were recovered within 10 min after slaughter, ovaries of cyclic mares were separated from the rest of the tract. Mares were categorized into four groups: G1 – Follicle \leq 13.5 mm and CL identifiable; G2 – Follicle of 13.6 to 22.5 mm and CL identifiable; G3 – Follicle of 22.6 to 31.5 mm and CL identifiable; G4 – Follicle \geq 31.6 mm and CL difficult to identify. The follicular fluid (FF) was aspirated and stored at -80°C until use. After puncture of the FF, a fragment of the ventral portion of the follicular wall was removed to perform immunohistochemistry to localize IGF1R receptors. Free IGF1 was determined by immunoradiometric assay. INS was determined by a liquid phase radioimmunoassay. The concentration of free IGF1 and INS in FF increased with

follicle growth ($P < 0.05$). Immunohistochemical score of IGF1R on granulosa and internal theca cells from equine follicular wall on different groups increase ($P < 0.05$) with follicular raise. We conclude that free IGF1 and INS concentrations in FF and IGF1R in follicular walls of mares increase with follicular growth during folliculogenesis, giving evidence of important role of IGF1 and INS in follicular development, and an interaction between both hormones in ovarian reproductive physiology. As the mare is a model research for comparative studies in follicular dynamics for consideration in women, the conclusion of this study can be applied to humans also.

Keywords: equine, folliculogenesis, internal theca cells, granulosa cells, IGF1, insulin

Introduction

Proliferation of the somatic cells layer surrounding the primary oocyte leads to the sequential development of primordial follicles into primary, secondary and, finally, antral follicles, a process that begins in the fetus and continues throughout post-natal life (DONADEU & PETERSEN, 2008). Endocrine, paracrine, and autocrine action of steroid hormones and growth factors from systemic or local origin coordinate the primary, preantral, and antral follicle development and ovulation (KWINTKIEWICZ & GIUDICE, 2009). The list of metabolites and nutrients that have direct effects on follicular function is extensive. The most studied of the intrafollicular mediators of nutritional influences on folliculogenesis are leptin, glucose-insulin (GLU-INS), growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) (SCARAMUZZI et al., 2011).

Insulin (INS) and type 1 insulin-like growth factor (IGF1) are closely related peptides, sharing sequence homology and have nearly identical 3-D structures (ZAPF et al., 1984). Their hormone receptors also have significant homology. INS binds to the

IGF1 receptor (IGF1R) with lower affinity than to its intrinsic receptor, but IGF1 is not able to propagate phosphorylation of the INS receptor, which maintains its specificity for INS (NANDI & PORETSKY, 2013).

The effects of INS and IGF1 on E₂ production by granulosa cells seem to vary on the species studied. In rats and primates, studies indicate that INS and IGF1 can stimulate granulosa cell E₂ production *in vitro*, via IGF1R. However, in cattle, INS is a more potent and efficacious stimulator of E₂ production than is IGF1 (SPICER & ECHTERNKAMP, 1995). Studies in animal models have shown that IGFs and INS augment the action of gonadotropins in the control of ovarian steroidogenesis and follicular maturation (YAKAR & ADAMO, 2012).

The ability of the human oocyte to fertilize has a positive correlation with IGF1 concentrations in follicular fluid (FF) (JIMENA et al., 1992). In mares (DONADEU & GINTHER, 2002), as in cattle (BEG et al., 2001), FF concentration of free IGF1 is higher in the future dominant follicle than in other follicles before diameter deviation begins. These data is consistent with the study reported by Bridges et al. (2002) where equine large follicles have 78 to 90% more IGF1 than medium and small follicles. Nevertheless, no changes in FF IGF1 concentration were observed during estrus in mares, when comparing follicles with 30 mm and 38 mm diameter (SPICER et al., 1991). However, increased concentrations in equine follicles of IGF1 were associated with increased growth of ovarian follicles (SPICER et al., 1991).

In the mare, IGF1R expression increase with follicle size (DOYLE et al., 2008), in contrast to some previous studies in which IGF1R expression in granulosa cells did not change (ARMSTRONG et al., 2000; LIU et al., 2000; HASTIE & HARESIGN, 2006; LLEWELLYN et al., 2007), or decreased (PERKS et al., 1995) during growth of antral follicles in cows and pigs or between seasons in sheep. This rise is consistent with the

essential role of IGF1 in the selection and subsequent development of ovulatory follicles (BEG & GINTHER, 2006).

Studies suggest that INS acts as a co-gonadotropin at the level of the ovary, enhancing steroidogenic responses to gonadotropins both *in vivo* and *in vitro* (NANDI & PORETSKY, 2013). INS stimulates granulosa cells proliferation and progesterone production in granulosa and theca cells, and increases steroidogenesis in luteal cells, independent of species (DAVOREN & HSUEH, 1984; SPICER & ECHTERNKAMP, 1995). In Brahman cows, INS increases follicular diameter and E₂ FF secretion in large follicles and FF IGF1 in small and large follicles (SIMPSON et al., 1994). In swine, INS reduced follicular atresia and increased intrafollicular IGF1 (MATAMOROS et al., 1991). It also stimulates glucose (GLU) uptake, general metabolism and mitosis of cultured cells (ALLEN et al., 1981; BARANAO & HAMMOND, 1984) and plays a physiological role in the growth of bovine follicles *in vivo* (PELUSO & HIRSCHHEL, 1987). In rats, INS can promote the transition from primordial to primary follicle through INSR on the oocyte demonstrating a potentially more specific role for INS in oocyte development (KEZELE et al., 2002). To date, the concentration of INS in FF related to follicular growth in horses had not been reported.

The commonality between mares and women in follicular waves, in the deviation in growth rates between the future dominant follicle and other follicles of the wave, in hormone concentrations, in oocyte quality, and age-related effects support the conclusion that the mare is a good model for comparative study of folliculogenesis in women (GINTHER, 2012).

Advancing knowledge on the mechanisms of folliculogenesis for consideration in horses and humans, the aim of this study was to analyze free IGF1 and INS

concentrations in follicular fluid in follicles of different sizes in mares, and to localize IGF1R in granulosa and theca cells.

Material & Methods

Animals

During the breeding season, mixed-breed mares with ages ranging between 6 to 16 years and body condition > 3 (MALSCHITZKY et al., 2001), were selected from a population of horses sent to slaughter at an abattoir. This study was carried out with a Research Committee-approved protocol at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (protocol number 13,378 from May, 15th, 2008).

Follicle Collection

Mares were humanely slaughtered. Internal reproductive tracts were recovered within 10 min after slaughter and examined visually to discard those from pregnant mares. In the absence of alterations, ovaries were separated from the rest of the tract and identified according to their position (right or left) and stored in plastic bags containing saline. An ultrasound B-mode instrument (Aloka SSD-500V; Aloka, Japan) equipped with a 5MHz linear-array transrectal transducer was used for evaluation of the ovaries. Diameters of the largest follicle were obtained from the average of height and width of the antrum using the apparent maximal area from each of two frozen images. The diameter of the CL was obtained from the average of height and width of the apparent maximal area from each of two frozen images. Only ovaries of cyclic mares were selected. One ovary from each mare was categorized into the following four groups (GINTHER et al., 2003; GASTAL et al., 2008):

Group 1 (Emergency) – Follicle \leq 13.5 mm and CL identifiable (\geq 20 mm).

Group 2 (Pre-Deviation) – Follicle of 13.6 to 22.5 mm and CL identifiable (15 to 20 mm).

Group 3 (Post-Deviation) – Follicle of 22.6 to 31.5 mm and CL identifiable (15 to 20 mm).

Group 4 (Dominance) - Follicle \geq 31.6 mm and CL difficult to identify ($<$ 15 mm).

Ovaries without the above mentioned characteristics were discarded. A total of 10 follicles per group were collected. The FF was aspirated with sterile needle and syringe, placed into 2 mL vials and centrifuged at 200 x G for 7 minutes to remove granulosa cells and debris. Supernatants were removed and stored at -80°C until use.

Radioimmunoassays (RIA)

Follicular fluid samples were assayed in the Laboratorio de Tecnicas Nucleares of the Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay. Free IGF1 concentration was determined by immunoradiometric assay using a commercial kit (IGF1-riact Cisbio International, Gif-Sur-Yvette, France) (ADRIEN et al., 2012). The kit contains two monoclonal antibodies against two different antigenic sites of IGF1 molecule, one was coated on the solid phase, the other radiolabeled with iodine 125. All samples were determined in one assay. The sensitivity of the assay was 0.38 ng/mL. The intraassay coefficient of variations (CVs) for control 1 (35 ng/mL) and control 2 (458 ng/mL) were 14.1% and 13.4% respectively.

INS concentration was determined by a liquid phase Radioimmunoassay (RIA) (DiaSource ImmunoAssays S.A, Belgium). The sensitivity of the assay was 2.9 $\mu\text{UI/mL}$. The intra-assay CVs for control 1 and 2 were 9.1% (17.1 $\mu\text{UI/mL}$) and 5.1% (94.2 $\mu\text{UI/mL}$) respectively, while the interassay CVs for the same controls were 10.3%, 5.5%, respectively.

Immunohistochemistry (IHC)

After puncture of the FF, a fragment (1 x 1 cm) of the ventral portion of the follicular wall, close to the ovulation fossa, was removed to perform immunohistochemistry. This tissue fragment was fixed in buffered formalin 4% and processed within 48 hours. The fixed tissues were included in paraffin.

To localize IGF1R receptors by IHC, follicular wall samples were sent to Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária, ULBRA, Canoas, Brazil. The samples were fixed in 4% buffered formalin, embedded in paraffin, cut into 5µm and mounted onto silanized slides (Starfrost®, Knittel Glass). Then sections were deparaffinized in xylene, rehydrated with ethanol at different dilutions. The slides were treated by unmasking procedure using microwave heating in 0,01M citrate buffer (pH 6.0); the peroxidase activity was inhibited by 3% H₂O₂ in methanol.

Blocking of non-specific binding sites was performed with normal horse serum – NHS (Vectastain Elite ABC Kit Standard*, Vector Laboratories) diluted 1:200 in phosphate buffered saline (PBS). Thereafter the slides were incubated for 30min at room temperature with primary antibody (monoclonal Anti-IGF1R antibody produced in mouse, Sigma Aldrich) diluted 1: 200 in NHS and then washed with PBS plus 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich).

The slides were incubated for 30min at room temperature with biotinylated secondary antibody (Anti-Mouse IgG, Vector Laboratories) diluted 1:220 in NHS and then washed with PBS plus 0.1% Triton X-100. The samples were added to the ABC-Elite (Vectastain Elite ABC Kit Standard*, Vector Laboratories) and washed with PBS plus 0.1% Triton X-100. The slides were developed in DAB (diaminobenzidine 3,3-

chromogen, Spring Bioscience) and counterstained with hematoxylin. Negative control reaction included sections incubated with diluent without primary antibody.

To compare IGF1R intensities, the estrogen receptor Quickscore proposed by Detré et al. (1995) modified by Esmeraldino et al. (2010) was used. The proportion of granulosa and theca cells staining positively throughout the section was assigned a subjective score from 1 to 6 (1 = 0–4%; 2 = 5–19%; 3 = 20–39%; 4 = 40–59%; 5 = 60–79%; 6 = 80–100%). The section was observed in ten fields (magnification of 400 X) to gauge the general level of intensity throughout the section. The average intensity, corresponding to the presence of negative (0), weak (1), intermediate (2) or strong (3) staining was evaluated and a multiplicative index (proportion of cells stained × stain intensity) was calculated. The score range from 0 (no cells stained) to 18 (> 80% of the granulosa or theca cells stained with a strong average intensity).

Statistical Analysis

All statistical analysis was performed using Prism 6 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA). A one-way ANOVA was performed to evaluate the FF free IGF1 and INS concentrations and immunohistochemical IGF1R score data as dependent factors and the follicular size groups as independent variables. The non-parametric Kruskal-Wallis Test was used to locate differences $P < 0.05$ regarded as significant and probabilities between $P > 0.05$ and $P < 0.08$ were considered to be approaching significance.

Results

The mean diameter of the largest follicle from mares of the different experimental groups is depicted in Table 1. No differences ($P > 0.05$) in body condition were observed between mares of the different groups.

Table 1 - Mean diameter (\pm S.E.M) and range of the largest follicle in the different experimental groups

Experimental groups	Diameter (mm)	Range (mm)
Group 1	11.7 ^a \pm 0.3	10 - 13.5
Group 2	18.4 ^b \pm 0.9	14 - 22
Group 3	27.6 ^c \pm 1.0	23 – 31.5
Group 4	38 ^d \pm 1.2	32 - 44

a, b, c, d ($P < 0.001$) different letters represent significant differences.

In figure 3, free IGF1 and INS concentrations in FF on the different experimental groups are shown. The concentration of free IGF1 in FF increased with follicle growth ($P < 0.001$). Large follicles – Group 4 (30.6 ± 5.1 ng/mL) contained 2-11 -fold greater ($P < 0.05$) levels of free IGF1 than follicles of Group 3 (12.9 ± 4.1 ng/mL), Group 2 (4.2 ± 1.6 ng/mL) or Group 1 (2.8 ± 0.9 ng/mL) (Figure 3A). Follicles in Group 3 have more free IGF1 than those in Group 1 ($P = 0.03$) and tended to have more than in Group 2 ($P = 0.08$)

The concentration of INS in FF was also affected by follicle size ($P = 0.047$). Large follicles – Group 4 (10.3 ± 2.6 μ UI/mL) contained 2 to 2.5-fold greater levels of INS ($P < 0.05$) than follicles of Group 2 ($5.1 \pm 0,9$ μ UI/mL) or Group 1 (4.0 ± 0.8 μ UI/mL) (Figure 3B).

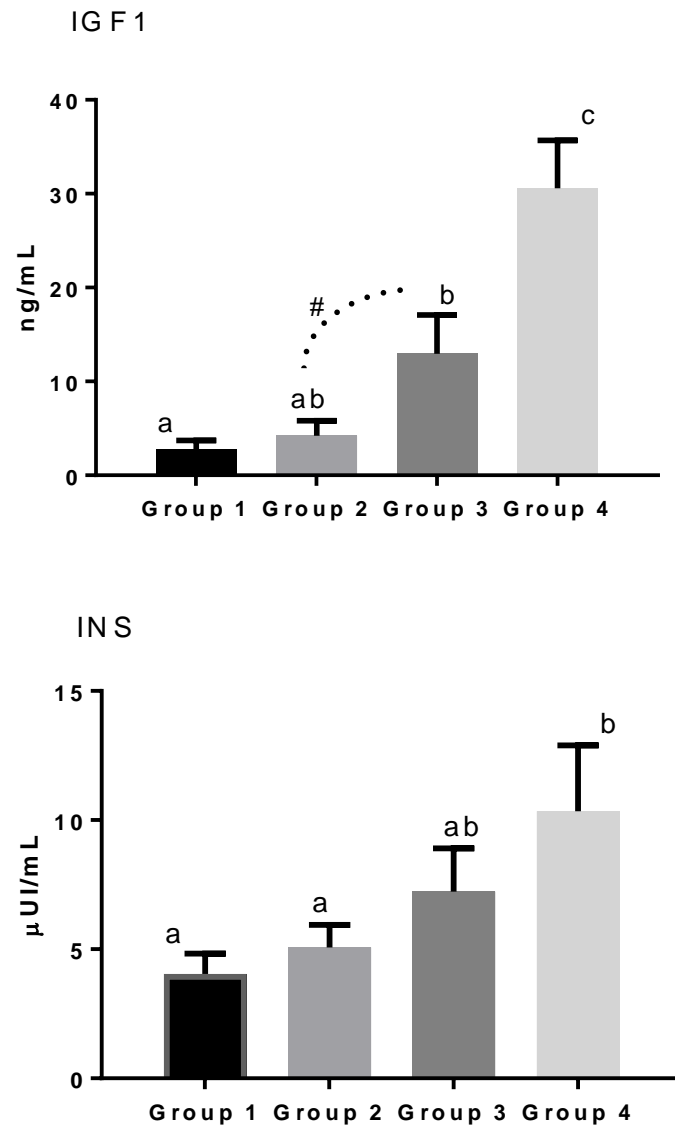


Figure 3 - Free IGF1 (\pm S.E.M) and INS (\pm S.E.M) FF concentration in different follicular groups. a, b ($P < 0.05$): different letters represent significant differences. A pound mark (#) encompassed by a dotted line indicate a difference ($P > 0.05$ and $P < 0.08$). Group 1 – Follicle with 5 to 13.5 mm and CL identifiable (≥ 27 mm); Group 2 – Follicle with 13.6 to 22.5 mm and CL identifiable (17 to 26 mm); Group 3 – Follicle with 22.6 to 31.5 mm and CL identifiable (< 16 mm); Group 4 - Follicle ≥ 31.6 mm and CL difficult to identify (< 16 mm).

Figures 4 and 5 depict the IHQ score of IGF1R on granulosa and internal theca cells from equine follicular wall on different follicular size groups. Granulosa cells of large follicles (Group 4) have a higher staining score than Group 2 ($P = 0.04$) and a tendency with Group 1 ($P = 0.06$) but did not differ from Group 3. No theca cells of the

Group 1 follicles were stained. Theca cells from Group 2 had lower score ($P = 0.05$) than follicles of Group 4.

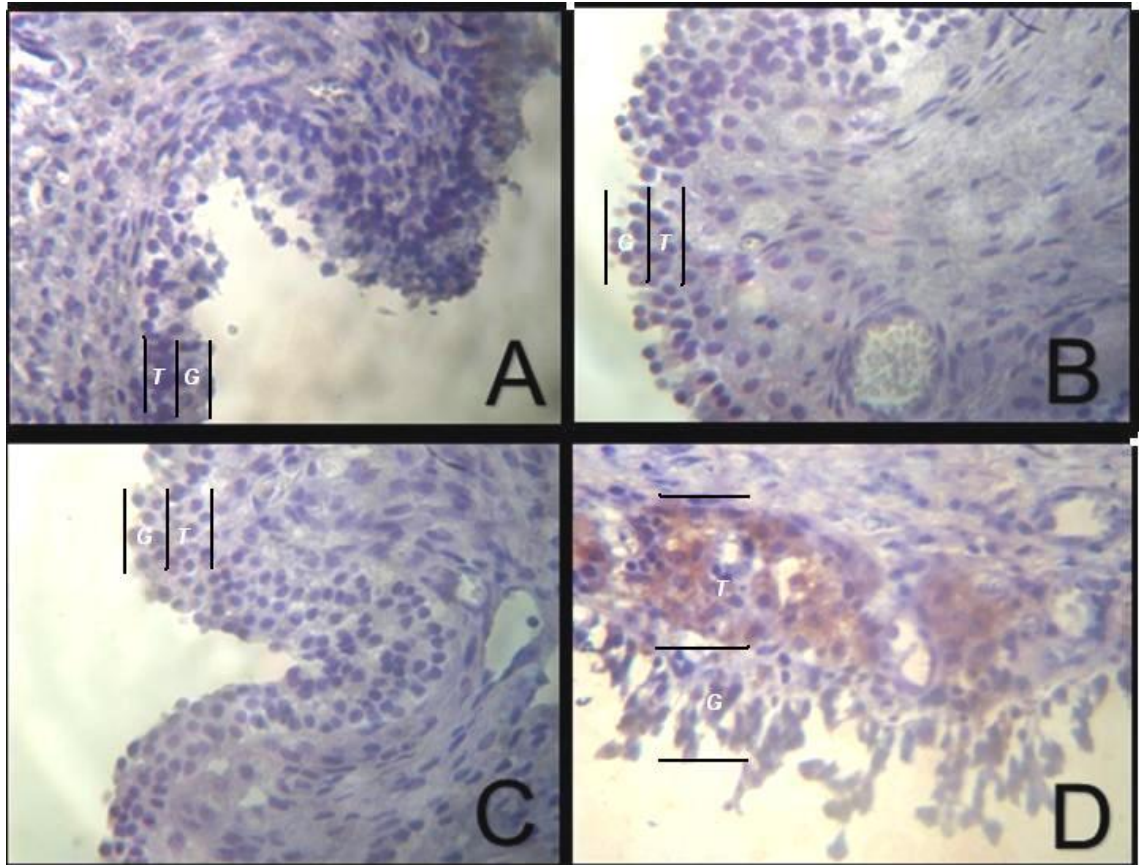


Figure 4 - Photomicrographs of representative tissue sections of equine follicles showing the localization of IGF1R by immunohistochemistry. **A.** Granulosa and theca cells with negative IGF1R staining. **B.** Granulosa and theca cells with diffuse weak IGF1R staining. **C.** Granulosa and theca cells showing diffuse intermediate IGF1R staining. **D.** Granulosa and theca cells showing strong IGF1R staining. G: granulosa cell layers; T: theca cell layers. Magnification 400X.

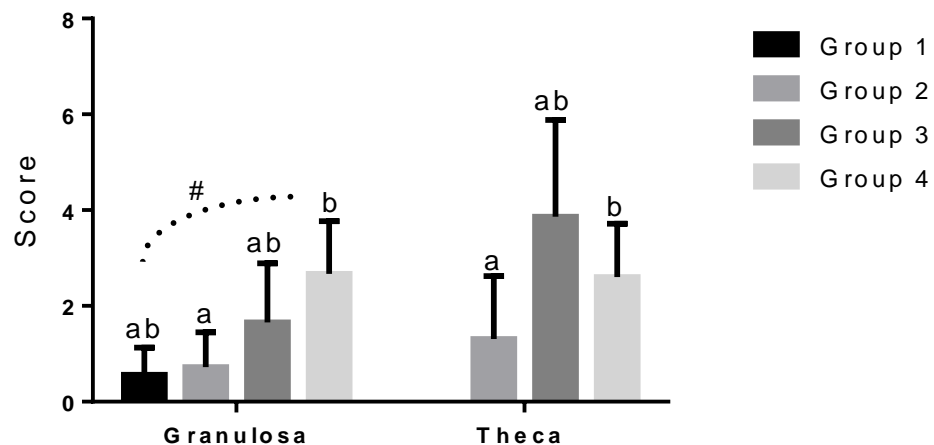


Figure 5 - Immunohistochemical score of IGF1R (\pm S.E.M) on granulosa and internal theca cells from equine follicular wall on different groups. Immunohistochemical score of IGF1R (\pm S.E.M) on granulosa and internal theca cells from equine follicular wall on different groups. a, b ($P < 0.05$): different letters in the line represent significant differences. A pound mark (#) encompassed by a dotted line indicate a difference ($P > 0.05$ and $P < 0.08$). Group 1 – Follicle with 5 to 13.5 mm and CL identifiable (≥ 27 mm); Group 2 – Follicle with 13.6 to 22.5 mm and CL identifiable (17 to 26 mm); Group 3 – Follicle with 22.6 to 31.5 mm and CL identifiable (< 16 mm); Group 4 – Follicle ≥ 31.6 mm and CL difficult to identify (< 16 mm).

Discussion

The present study reports higher INS and free IGF1 FF concentrations in dominant follicles compared to smaller ones. Immunohistochemical IGF1R score in granulosa and theca cells also increased with follicular size.

IGF1 concentrations rising with follicular growth were also reported in other studies in the mare and cattle (SPICER et al., 1991; SPICER & ECHTERNKAMP, 1995; BRIDGES et al., 2002; SPICER et al., 2005; BEG & GINTHER, 2006), suggesting that IGF1 can exert profound effects on the later stages of folliculogenesis and steroidogenesis, and that both high and low levels of IGF1 activity are probably deleterious to the follicle and its oocyte (SCARAMUZZI et al., 2011). A recent study demonstrated a continuous increase of FF free IGF1 with follicular growth until a

diameter of 25 to 35 mm and thereafter, a novel decrease was observed in FF free IGF1 during the final stages of follicle development (40 mm) and before ovulation (BASHIR et al., 2016).

In the present study, the free IGF1 and INS levels increase took place when the largest follicle achieved a diameter > 23 mm. This stage occurs when the largest follicle inhibits the subordinate (GASTAL et al., 1997). IGF1 is the main factor required for the initiation of the follicular deviation process in horses (CHECURA et al., 2010; DONADEU & GINTHER, 2002; GINTHER et al., 2002; 2004; 2008) consistent with the results of our study. However, to our knowledge, changes in INS concentration in FF during follicular development have not previously been reported in the horse.

In the mare, the granulosa cells of the future dominant follicle acquire LH receptors immediately before the beginning of diameter deviation (GOUDET et al., 1999). This can probably be an effect of INS because in the rat, pig and human, INS has been shown to facilitate FSH-dependent steroid production and LH/hCG receptor induction in co-cultured granulosa cells (AMSTERDAM et al., 1988). In all compartments of the ovary, INS mediates steroidogenesis via its own receptor and acts as a co-gonadotropin to sensitize follicular cells to the action of FSH and LH (PORETSKY et al., 1999; NANDI & PORETSKY, 2013).

In bovine, IGF1 is essential for the growth of the dominant follicle, stimulating estradiol-17 β secretion, whereas INS is needed to promote follicular maturation (KAWASHIMA et al., 2007). Therefore, estradiol-17 β enhanced by IGF1 and modulated by INS levels induces an LH surge with the consequent ovulation of the dominant follicle (HEIN et al., 2015). The increase of INS concentration after deviation observed in this experiment allows suggesting that INS has a similar role in the mare than in cattle (follicular maturation and modulation of estradiol production).

IGF1 derived from granulosa cells increase theca cell proliferation, enhance androstenedione production in theca cells, stimulate the expression of LH receptors and steroidogenic enzymes (CYP11A1 and HSD3B), and acts synergistically with LH to increase these enzymes, and hence androgen synthesis in theca cells (SHIOMI-SUGAYA et al., 2015; SILVA et al., 2009; SPICER, 2001; SPICER & STEWART, 1996; YOUNG & McNEILLY, 2010).

In bovine, antral follicles during final growth, the IGF1R mRNA is present in the internal theca and granulosa cells, with increasing levels during final development in granulosa cells (SCHAMS et al. 2002). In the present study, IHC score in granulosa and theca cells increased progressively with follicular growth. The increase in IGF1R with follicular growth was also observed by mRNA expression in granulosa cells during the ovulatory period (DOYLE et al., 2008) and in equine oocytes (WISCHRAL et al., 2012). This result is consistent with the essential role of IGF1 in the selection and subsequent development of ovulatory follicles (BEG & GINTHER, 2006).

IGF1R was also observed in granulosa and theca cells in bovine (ARMSTRONG et al., 2000). The high activity of theca cells with a higher expression of IGF1R was suggested to produce steroids precursors for E₂ and to promote a high content of testosterone and progesterone in FF of bovines (SCHAMS et al., 2002). It is important to note that direct visualization of IGF1R on follicles ensures successful receptor presence in the cell membrane regions (BOSSAERT et al., 2010) and quantification of mRNA levels may not adequately reflect the real levels of functional IGF1R in follicles (DOYLE et al., 2008).

Permeability changes in key points of follicular development, such as LH surge, enabling to regulate two-way exchange of endocrine factors between granulosa and thecal layers (CAMPBELL et al., 2013). Histological evidences show disruption of the

basal lamina between granulosa and theca cells, allowing vascularization of granulosa layer during the follicular growth in mares (SPICER et al., 1991). This can be an IGF1 indirect effect stimulating granulosa cells VEGF production (SILVA et al., 2009). The thecal layer vascularization provide nutritional support to avascular follicle within the basal lamina (CAMPBELL et al., 2013).

An increase in the number of follicular cell IGF1R is thought to occur with follicular differentiation (SPICER & STEWART, 1996). In the process of differentiation, the number of receptors IGF1R may be decreased and replaced by IR, despite continue to express high levels of IGF1 (LEROITH & YAKAR, 1996). Associated with the differentiation, other growth factors (bFGF and EGF/TGF α) may impeding the IGF1R formation in antral follicles, but the CL regression decrease intrafollicular levels of these growth factors and supports the antral follicle responding to gonadotropins and IGF1/INS stimulation and differentiate and ovulate (SPICER & STEWART, 1996).

The IGF and GLU-INS systems are usually listed among the potential mediators of nutritional effects on folliculogenesis. Circulating IGF1 is produced primarily by the liver in response to growth hormone (GH) (JONES & CLEMMONS, 1995) and this relationship forms the basis of the GH-IGF axis. In mares, as in other species, the plasma concentrations of INS, IGF1 and GH are influenced by individual body condition and food intake (SALAZAR-ORTIZ et al., 2011; 2014). However, mares in the present study did not have a diet influence because at least 12 hours before slaughter they only had access to water.

Hepatocytes secrete 75% of IGF1 circulating, regulated by GH. Extrahepatic tissues may be regulated by tissue-specific factors also (YAKAR & ADAMO, 2012). In mares, 69-86% of plasma IGF1 was measured in FF and both IGF1 were correlated significantly (SPICER et al., 1991), indicating that FF is a product of blood exudate and

secretory activity of granulosa and theca cells (REVELLI et al., 2009). Pancreatic β -cells produce INS and secrete it into the blood in response to glucose levels (BOLLHEIMER et al., 1998), and via diffusion gradient between blood and FF added the metabolic activity of granulosa and theca cells in proliferation INS would come to FF as IGF1.

The major functional differences between INS and IGF1 are caused by two key factors: (1) the tissue-expression pattern of their cognate receptors (IR and IGF1R are expressed almost in all tissues), and (2) the diversity in the intracellular domains of the receptors in the different tissue leads to different biological actions (LEROITH & YAKAR, 2007). Other significant difference is the ability to access extravascular tissues and to equilibrate with cell surface receptors due to more than 99% of IGF1 circulating is bound to protein, whereas INS is largely in a free form (CLEMMONS, 2006).

The subtle balance between E_2 and androgen in the follicular microenvironment is crucial to its future development. It appears that the most important factor in this delicate equilibrium is the amount of androgen. That may inhibit aromatase in higher concentrations but may stimulate it in lower concentrations. This critical relationship between androgen and E_2 in and around the follicle is further regulated by “modifiers”, the most significant of which is INS (GUTMAN et al., 2009). INS reduces hepatic production of sex hormone-binding globulin, which leads to increased levels of free and bioactive circulating androgens. Furthermore, the theca cell membrane incorporates two receptors: one for INS and the other for IGF1. Both provoke androgen production when activated and INS binds to both receptors (SPEROFF & FRITZ, 2005). Thereafter, INS inhibits production of IGFBP1 in the liver resulting in reduced circulating levels of IGFBP1. INS also inhibits IGFBP1 production in ovarian granulosa

cells through activation of the INS receptor (NANDI & PORETSKI, 2013). Therefore, INS decreases the level of IGFBP1 and thus increases the free IGF1 levels with its pro-androgenic activity through its own receptor (SPEROFF & FRITZ, 2005) and stimulate enzyme cytochrome P450 aromatase to convert androgens from theca cells into estrogens (SILVA et al., 2006). IGF1 and INS interactions on folliculogenesis, as shown in figure 6, integrated and functionally cooperating to cell proliferation, differentiation and maturation, as well as steroidogenesis, for follicular development and ovulation of an oocyte with optimum capacity of fertilization. This pathway can probably explain the increase in FF concentration of INS and free IGF1 and the rise in IHC score of IGF1R in granulosa and theca cells that occurs as follicles grow and become dominant.

In summary, this study concludes that free IGF1 and INS concentrations in FF and IGF1R in follicular walls of mares increase with follicular growth during folliculogenesis, giving evidence of important role of IGF1 and INS in follicular development, and an interaction between both hormones in ovarian reproductive physiology. As the mare is a model research for comparative studies in follicular dynamics for consideration in women, the conclusion of this study can be applied to humans also.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. P.; SINGH, J. & BAERWALD, A. R.. *The use of domestic animals as biomedical models: Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women.* **Theriogenology.** v. 78. p. 1733–1748, 2012.
- ADRIEN, M. L.; MATTIAUDA, D. A.; ARTEGOITIA, V.; CARRIQUIRY, M.; MOTTA, G.; BENTANCUR, O. & MEIKLE, A.. *Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters.* **Animal.** v. 6. ed. 2. p. 292- 299, 2012.
- ALLEN, W. R.; NILSEN-HAMILTON, M. & HAMILTON, R. T.. *Insulin and growth factors stimulate rapid post-translational changes in glucose transport in ovarian granulosa cells.* **Journal of Cell Physiology.** v. 108. n. 1. p. 15-24, 1981.
- AMSTERDAM, A.; MAY, J. V. & SCHOMBERG, D. W.. *Synergistic effect of insulin and follicle-stimulating hormone on biochemical and morphological differentiation of porcine granulosa cells in vitro.* **Biology of Reproduction.** v. 39. n. 2. p. 379-390, 1988.
- ARMSTRONG, D. G.; GUTIERREZ, C. G.; BAXTER, G.; GLAZYRIN, A. L.; MANN, G. E.; WOAD, K. J.; HOGG, C. O. & WEBB, R.. *Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles.* **Journal of Endocrinology.** v. 165. p. 101–113, 2000.
- BARANAO, J. L. S. & HAMMOND, J. M.. *Comparative effects of insulin and insulin-like growth factor on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells.* **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 124. n. 2. p. 484-490, 1984.
- BASHIR, S. T.; ISHAK, G. M.; GASTAL, M. O.; ROSER, J. F. & GASTAL, E. L.. *Changes in intrafollicular concentrations of free IGF-1, activin A, inhibin A, VEGF, estradiol, and prolactin before ovulation in mares.* **Theriogenology.** v. 85. n. 8. p. 1491-1498, 2016.
- BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; WILTBANK, M. C. & GINTHER, O. J.. *Follicular fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle.* **Biology of Reproduction.** v. 64. n. 2. p.432-441, 2001.
- BEG, M. A. & GINTHER, O. J.. *Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors.* **Reproduction.** v.132. p.365-377, 2006.
- BOSSAERT, P.; DE COCK, H.; LEROY, J. L. M. R.; DE CAMPENEERE, S.; BOLS, P. E. J.; FILLIERS, M. & OPSOMER, G.. *Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo.* **Theriogenology.** v. 73. n. 9. p. 1210-1219, 2010.
- BOLLHEIMER, L. C.; SKELLY, R. H.; CHESTER, M. W.; MCGARRY, J. D. & RHODES, C. J.. *Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic β cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation.* **Journal of Clinical Investigation.** v. 101. n. 5. p.1094-1101, 1998.

- BRIDGES, T. S.; DAVIDSON, T. R.; CHAMBERLAIN, R. D.; GEISERT, R. D. & SPICER, L. J.. *Changes in follicular fluid steroids, insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding protein concentration, and proteolytic activity during equine follicular development.* **Journal of Animal Science.** v. 80. n. 1. p. 179-190, 2002.
- BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K. & HARTMAN, D.. *Manual of equine reproduction.* 3 ed. **Mosby Elsevier.** Chapter 1. p. 3-4, 2011
- BUTLER, S. T.; MARR, A. L.; PELTON, S. H.; RADCLIFF, R. P.; LUCY, M. C. & BUTLER, W. R.. *Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A.* **Journal of Endocrinology.** v. 176. p. 205-217, 2003.
- CAMPBELL, L.; TRENDLELL, J. & SPEAR, N. *Identification of cells migration from the thecal layer of ovarian follicles.* **Cell and Tissue Research.** v. 353. n. 1. p. 189-94, 2013.
- CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M. BALL, B.; ANDERSON, G. & LIU, I.. *Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes.* **Biology of Reproduction.** v. 65. n. 3. p. 899-905, 2001.
- CHANG, S. Y.; TSAI, M.-Y.; HUANG, F.-J. & KUNG, F.-T.. *Expression of Insulin-like growth factor (IGF), IGF receptor, and IGF-binding protein messenger ribonucleic acids in luteinized granulosa cells from different size follicles after controlled ovarian hyperstimulation.* **Journal of Assisted Reproduction and Genetics.** v. 19. n. 3. p. 121-126, 2002.
- CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; RODRIGUES, G. Q.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, G. M.; LOPES, C. A. P.; ALMEIDA, A. P.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; MOURA, A. A. A.; LOBO, C. H.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.. *The effects of insulin and follicle-stimulating hormone (FSH) during in vitro development of ovarian goat preantral follicles and the relative mRNA expression for insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles.* **Biology of Reproduction.** v. 87. n. 3. p. 69-80, 2012.
- CHECURA, C. M.; BEG, M. A.; PARRISH, J. J. & GINTHER, O. J.. *Functional relationships among intrafollicular insulin-like growth factor 1, circulatory gonadotropins, and development of the dominant follicle in mares.* **Animal Reproduction Science.** v. 118. n. 2-4. p. 270-278, 2010.
- CLEMMONS, D. R.. *Involvement of insulin-like growth factor-I in the control of glucose homeostasis.* **Current Opinion in Pharmacology.** v. 6. p. 620-625, 2006.
- DAVOREN, J. B. & HSUEH, V.. *Insulin enhances FSH-stimulated steroidogenesis by cultured rat granulosa cells.* **Molecular and Cellular Endocrinology.** v. 35. n. 2-3. p. 97, 1984.
- DETRE, S.; JOTTI, G. S. & DOWSETT, M. A.. *A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas.* **Journal of Clinical Pathology.** v. 48. n. 9. p. 876-878, 1995.

- DONADEU, F. X. & GINTHER, O. J.. *Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares.* **Biology of Reproduction.** v. 66. n. 4. p. 1111-1118, 2002.
- DONADEU, F. X. & WATSON, E. D.. *Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse.* **Animal Reproduction Science.** v. 100. n. 3-4. p. 225-242, 2007.
- DONADEU, F. X. & PETERSEN, H. G.. *Follicle development in mares.* **Reproduction in Domestic Animals.** v. 43. p. 224-231, 2008. Supplement 2.
- DOYLE, L. K.; HOGG, C. O.; WATSON, E. D. & DONADEU, F. X.. *Seasonal effects on the response of ovarian follicles to IGF-1 in mares.* **Reproduction.** v. 136. p. 589-598, 2008.
- ESMERALDINO, A. M. T.; MALSCHITZKY, E.; FIALA, S. M. E.; SANTARÉM, L.; WOLF, C. A.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M. & MATTOS, R. C.. *Immunohistochemical identification of luteinizing hormone receptors in the extra-gonadal reproductive tract of the mare.* **Animal Reproduction Science.** v. 121. p. 38-39, 2010.
- GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R. & GINTHER, O. J.. *Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares* **Biology of Reproduction.** v. 57. n. 6. p. 1320-1327, 1997.
- GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; NEVES, A. P.; PETRUCCI, B. P. L.; MATTOS, R. C. & GINTHER, O. J.. *Miniature ponies: similarities and differences from larger breeds in follicles and hormones during the estrous cycle.* **Journal of Equine Veterinary Science.** v. 28. n. 9. p. 508-517, 2008.
- GÉRARD, N.; DUCHAMP, D. & MAGISTRINI, M.. *Relationships between follicular fluid composition and follicular/oocyte quality in the mare.* **Livestock Production Science.** v. 60. n. 2-3. p. 243-253, 1999.
- GINTHER, O. J.; MEIRA, C.; BEG, M. A. & BERGFELT, D. R.. *Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares.* **Biology of Reproduction.** v. 67. n. 3. p. 862-867, 2002.
- GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X. & BERGFELT, R. D.. *Mechanism of follicle deviation in monovular farm species.* **Animal Reproduction Science.** v. 78. n. 3-4. p. 239-257, 2003.
- GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O. & BEG, M. A.. *Critical role of insulin-like growth factor system in follicle selection and dominance in mares.* **Biology of Reproduction.** v. 70. n. 5. p. 1374-1379, 2004.
- GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O. & BEG, M. A.. *Intrafollicular effect of IGF-1 on development of follicle dominance in mares.* **Animal Reproduction Science.** v. 105. n. 3-4. p. 417-423, 2008.
- GINTHER, O. J.. *The mare: a 1000-pound guinea pig for study of the ovulatory follicular wave in women.* **Theriogenology.** v. 77. n. 5. p. 818-828, 2012.
- GOUDET, G.; BELIN, F.; BEZARD, J. & GERARD, N.. *Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, a-inhibin, and aromatase in relation to follicular growth,*

*estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Biology of Reproduction.** v. 60. n. 5. p. 1120-1127, 1999.*

GURGEL, J. R. C.; VIANA, C. H. C.; PEREZ, E. G. A. & NICHI, M.. *Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v. 32. n. 2. p. 122-132, 2008.*

GUTMAN, G.; BARAK, V.; MASLOVITZ, S.; AMIT, A.; LESSING, J. B. & GEVA, E.. *Recombinant luteinizing hormone induces increased production of ovarian follicular adiponectin in vivo: implications for enhanced insulin sensitivity. **Fertility and Sterility.** v. 91. n. 5. p. 1837-1841, 2009.*

HASTIE, P. M. & HARESIGN, W.. *Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science.** v. 92. n. 3-4. p. 284-299, 2006.*

HEIN, G. H.; PANZANI, C. G.; RODRÍGUEZ, F. M.; SALVETTI, N. R.; DÍAZ, P. U.; GAREIS, N. C.; BENÍTEZ, G. A.; ORTEGA, H. H. & REY, F.. *Impaired insulin signaling pathway in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. **Animal Reproduction Science.** v. 156. p. 64-74, 2015.*

JACOB, J. C.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; CARVALHO, G. R.; BEG, M. A. & GINTHER, O. J.. *Temporal relationships and repeatability of follicle diameters and hormone concentrations within individuals in mares. **Reproduction in Domestic Animals.** v. 44. n. 1. p. 92-99, 2009.*

JIMENA, P.; CASTILLA, J. A.; PERAN, F.; MOLINA, R.; RAMIREZ, J. P.; ACEBAL, M.; VERGARA, F. & HERRUZO, A.. *Insulin and insulin-like growth factor I in follicular fluid after induction of ovulation in women undergoing in vitro fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility.** v. 96. p. 641-647, 1992.*

JONES, J. I. & CLEMMONS, D. R.. *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews.** v. 16. n. 1. p. 3-34, 1995.*

KAWASHIMA, C.; FUKIHARA, S.; MAEDA, M.; KANEKO, E.; MONTOYA, C. A.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; MATSUNAGA, N.; KIDA, K.; MIYAKE, Y.-I.; SCHAMS, D. & MIYAMOTO, A.. *Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. **Reproduction.** v. 133. p. 155-163, 2007.*

KAYA, A.; ATABEKOGLU, C. S.; KAHRAMAN, K.; TASKIN, S.; OZMEN, B.; BERKER, B. & SONMEZER, M.. *Follicular fluid concentrations of IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, VEGF, AMH and inhibin-B in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation using GnRH agonist or GnRH antagonist. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.** v. 164. n. 2. p. 167-171, 2012.*

KEZELE, P. R.; NILSSON, E. E. & SKINNER, M. K.. *Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology.** v. 192. n. 1-2. p. 37-43, 2002.*

KING, S. S.; ROSER, J. F. & JONES, K. L.. *Follicular fluid prolactin and the periovulatory prolactin surge in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science.** v. 28. n. 8. p. 468-472, 2008.*

KWINTKIEWICZ, J. & GIUDICE, L. C.. *The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function.* **Seminars in Reproductive Medicine.** v. 27. n. 1. p. 43-51, 2009.

LEROITH, D. & YAKAR, S.. *Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1.* **Nature.** v. 3. n. 3. p. 302-310, 2007.

LIU, J.; KOENIGSFELD, A. T.; CANTLEY, T. C.; BOYD, C. K.; KOBAYASHI, Y. & LUCY, M. C.. *Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system.* **Biology of Reproduction.** v. 63. n. 3. p. 942-952, 2000.

LLEWELLYN, S.; FITZPATRICK, R.; KENNY, D. A.; MURPHY, J. J.; SCARAMUZZI, R. J. & WATHES, D. C.. *Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows.* **Reproduction.** v. 133. p. 627–639, 2007.

MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MEIRELLES, L. S.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M. & MATTOS, R. C.. *Artificial photoperiod in pregnant mares and its effect on pregnancy length and postpartum reproductive performance.* **Pferdheilkunde.** v. 17. n. 6. p. 565-569, 2001.

MATAMOROS, I. A.; COX, N. M. & MOORE, A. B.. *Effects of exogenous insulin and body condition on metabolic hormones and gonadotropin-induced follicular development in prepuberal gilts.* **Journal of Animal Science.** v. 69. n. 5. p. 2081-2091, 1991.

MIHM, M.; GANGOOLY, S. & MUTTUKRISHNA, S.. *The normal menstrual cycle in women.* **Animal Reproduction Science.** v. 124. p. 229–236, 2011.

MONGET, P. & BONDY, C.. *Importance of the IGF system in early folliculogenesis.* **Molecular and Cellular Endocrinology,** v. 163. n. 1-2. p. 89-93, 2000.

MORA, S.; KALIMAN, P.; CHILLARÓN, J.; TESTAR, X.; PALACÍN, M. & ZORZANO, A.. *Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate GLUT4 glucose transporter translocation in Xenopus oocytes.* **Biochemical Journal.** v. 311. n.1. p. 59-65, 1995.

NAGY, P.; GUILLAUME, D. & DAELS, P.. *Seasonality in mares.* **Animal Reproduction Science.** v. 60-61. p. 245-262, 2000.

NANDY, A. & PORETSKY, L.. *Diabetes and the female reproductive system.* **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.** v. 42. n. 4. p. 915-946, 2013.

PALMA, G. A.; ARGANÁRAZ, M. E.; BARRERA, A. D.; RODLER, D.; MUTTO, A. A. & SINOWATZ, F.. *Biology and Biotechnology of Follicle Development.* **The Scientific World Journal.** v. 2012. 14p.

PELUSO, J. J. & HIRSCHHEL, M. D.. *Roles of gonadotropins and insulin in controlling steroidogenesis and growth of antral bovine follicles in perifusion culture.* **Theriogenology.** v. 28. n. 4. p. 503-12, 1987.

PERKS, C. M.; DENNING-KENDALL, P. A.; GILMOUR, R. S. & WATHES, D. C.. *Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I),*

IGF-II, and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. **Journal of Endocrinology.** v. 136. n. 12. p. 5266–5273, 1995.

PEUGENET, P.; DUCHAMP, G.; REIGNER, F.; DUPONT, J.; BARREY, E. & GUILLAUME, D.. *Effect of growth hormone treatment on follicular growth in well-fed or feed-restricted mares.* **Animal Reproduction Science.** v. 121. n. 1-2. p. 42-44, 2010.

PORETSKY, L.; CATALDO, N. A.; ROSENWAKS, Z. & GIUDICE, L. C.. *The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease.* **Endocrine Reviews.** V. 20. n. 4. P. 535-582, 1999.

QUESNEL, H.; PASQUIER, A.; JAN, N. & PRUNIER, A.. *Influence of insulin treatment and feed restriction on follicular development in cyclic gilts.* **Animal Reproduction Science.** v. 64. n. 1-2. p.77-87, 2000.

REVELI, A.; PIANE, L. D.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M. & RINAUDO, P.. *Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics.* **Reproductive Biology and Endocrinology.** v. 7. n. 40, 2009. 13p.

SALAZAR-ORTIZ, J.; CAMOUS, S.; BRIANT, C.; LARDIC, L.; CHESNEAU, D. & GUILLAUME, D.. *Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (Equus caballus).* **Reproductive Biology Endocrinology.** v. 9. n. 1. p. 130-146, 2011.

SALAZAR-ORTIZ, J.; MONGET, P. & GUILLAUME, D.. *The influence of nutrition on the insulin-like growth factor system and the concentrations of growth hormone, glucose, insulin, gonadotropins and progesterone in ovarian follicular fluid and plasma from adult female horses (Equus caballus).* **Reproductive Biology and Endocrinology.** v. 12. n. 72, 2014. 12p.

SCARAMUZZI, R. J.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DRIANCOURT, M. A.; DUPONT, J.; FORTNE, J. E.; GILCHRIST, R. B.; MARTIN, G. B.; McNATTY, K. P.; McNEILLY, A. S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIÑOLES, C. & WEBB, R.. *Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants.* **Reproduction, Fertility and Development.** v. 23. n. 3. p. 444-467, 2011.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; KOSMANN, M. & AMSELGRUBER, W. M.. *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.** v. 22. p. 51–72, 2002.

SERAFIM, M. K. B., SILVA, G. M., DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, T. F. P.; LIMA, A. K. F.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, L. D. M. & FIGUEIREDO, J. R.. *High insulin concentrations promote the in vitro growth and viability of canine preantral follicles.* **Reproduction, Fertility and Development.** v. 25. n. 6. p. 927-934, 2012.

SHIOMI-SUGAYA, N.; KOMATSU, K.; WANG, J.; YAMASHITA, M.; KIKKAWA, F. & IWASE, A.. *Regulation of secondary follicle growth by theca cell and insulin-like growth factor 1.* **Journal of Reproduction and Development.** v. 61. n. 3. p. 161-168, 2015.

- SILVA, J. M.; HAMEL, M.; SAHIM, M. & PRICE, C. A.. *Control of oestradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by FSH involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro.* **Reproduction.** v. 132. n. 6. p. 909-917, 2006.
- SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. & VAN DEN HURK, R.. *Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis.* **Theriogenology.** v. 71. p. 1193-1208, 2009.
- SIMPSON, R. B.; CHASE JR., C. C.; SPICER, L. J.; VERNON, R. K.; HAMMOND, A. C. & ERA, D. O.. *Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows.* **Journal of Reproduction and Fertility.** v. 102. p. 483-492, 1994.
- SPEROFF, L. & FRITZ, M. A.. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* 7 ed. **Lippincott Williams & Wilkins.** Baltimore, 2005. p. 480-482.
- SPICER, L. J.; TUCKER, K. E.; HENDERSON, K. A. & DUBY, R. T.. *Concentrations of Insulin-like growth factor-1 in follicular fluid and blood plasma of mares during early and late oestrus.* **Animal Reproduction Science.** v.25. n.1. p. 57-65, 1991.
- SPICER, L. J.; ALPIZAR, E. & VERNON, R. K.. *Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cell: effect of follicle size and hormones.* **Molecular and Cellular Endocrinology.** v. 102. n. 1-2. p. 69-76, 1994.
- SPICER, L. J. & ECHTERNKAMP, S. E.. *The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals.* **Domestic Animal Endocrinology.** v.12. n.3. p. 223-245, 1995.
- SPICER, L. J. & STEWART, R. E.. *Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors.* **Biology of Reproduction.** v. 54. p. 255-263, 1996.
- SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S. & MACIEL, S. M.. *Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells.* **Domestic Animal Endocrinology.** v. 22. n. 4. p. 237-254, 2001.
- SPICER, L. J.; SANTIAGO, C. A.; DAVIDSON, T. R.; BRIDGES, T. S. & CHAMBERLAIN, C. S.. *Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares.* **Domestic Animal Endocrinology.** v. 29. p. 573-581, 2005.
- STOCCO, C.. *Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation.* **Steroids.** v. 73. n. 5. p. 473-487, 2008.
- VAN DEN HURK, R. & ZHAO, J.. *Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles.* **Theriogenology.** v. 63. n. 6. p. 1717-1751, 2005.
- WATSON, E. D.; THOMASSEN, R.; STEELE, M.; HEALD, M.; LEASK, R.; GROOME, N. P. & RILEY, S. C.. *Concentrations of inhibin, progesterone and estradiol in fluid from dominant and subordinate follicles from mares during spring*

transition and the breeding season. Animal Reproduction Science. v. 74. n. 1-2. p.55-67, 2002.

WISCHRAL, A.; ADRIAO, M.; HAAG, K. T.; FONSECA, G. R.; GASTAL, M. O. & GASTAL, E. L.. *Cumulus cell and oocyte mRNA expression of hormone and growth factor receptors in mares. Journal of Equine Veterinary Science.* v. 32. n. 7. p. 411, 2012. 8º ISEET Abstracts.

YAKAR, S. & ADAMO, M. L.. *Insulin-like growth factor physiology: lessons from mouse Models. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* v. 41. n. 2. p. 231-247, 2012.

YOUNG, J. M. & McNEILLY, A. S.. *Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. Reproduction.* v. 140 p. 489–504, 2010.

ZAPF, J.; SCHMID, C. H. & FROESCH, E. R.. *Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) I and II. Clinics in Endocrinology and Metabolism.* v. 13. n. 1. p. 3-30, 1984.