

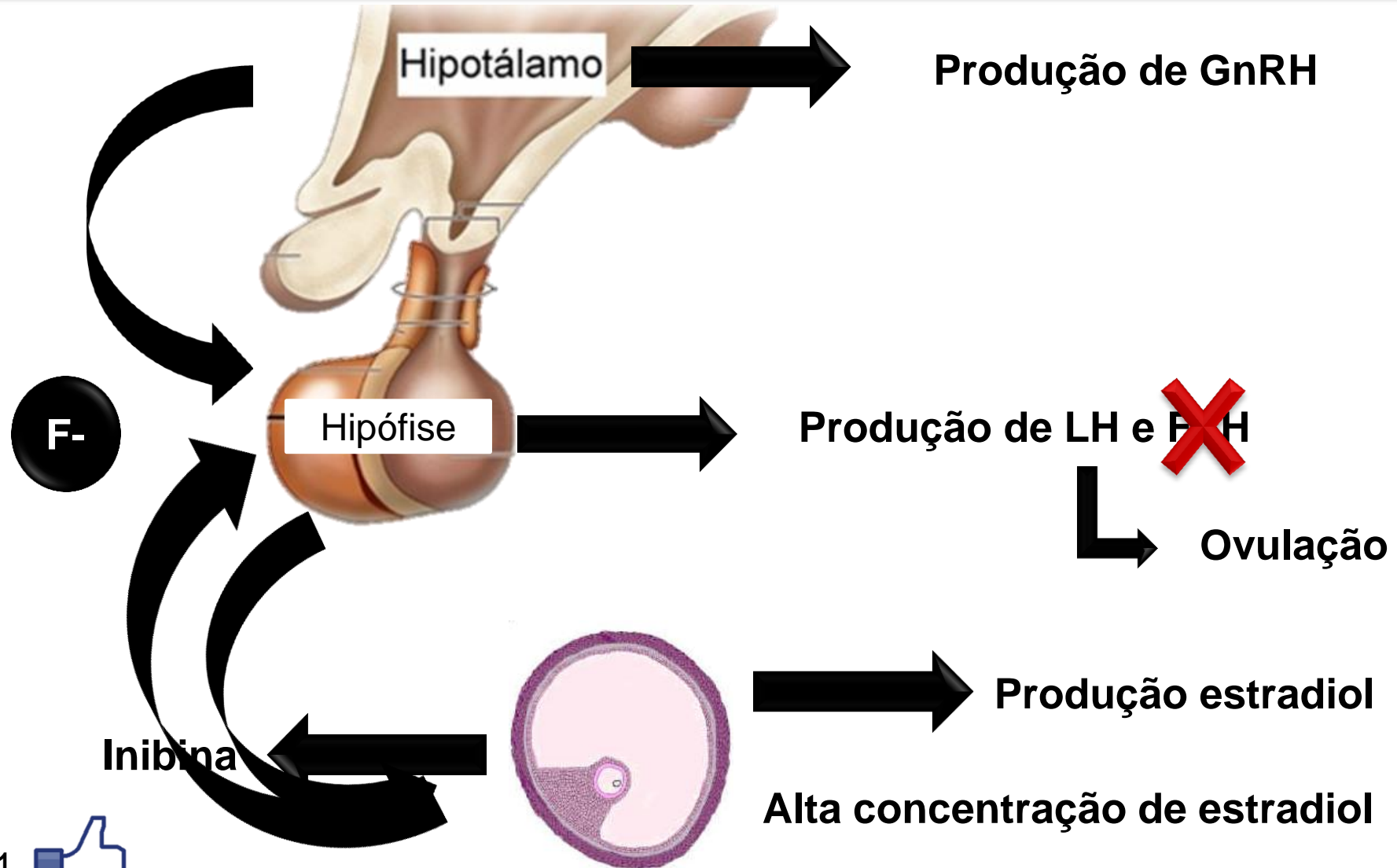
“Regulação da foliculogênese e determinação da taxa de ovulação em ruminantes”

Lucas Hax e Patrícia Mattei

Pelotas, 18 de setembro de 2014

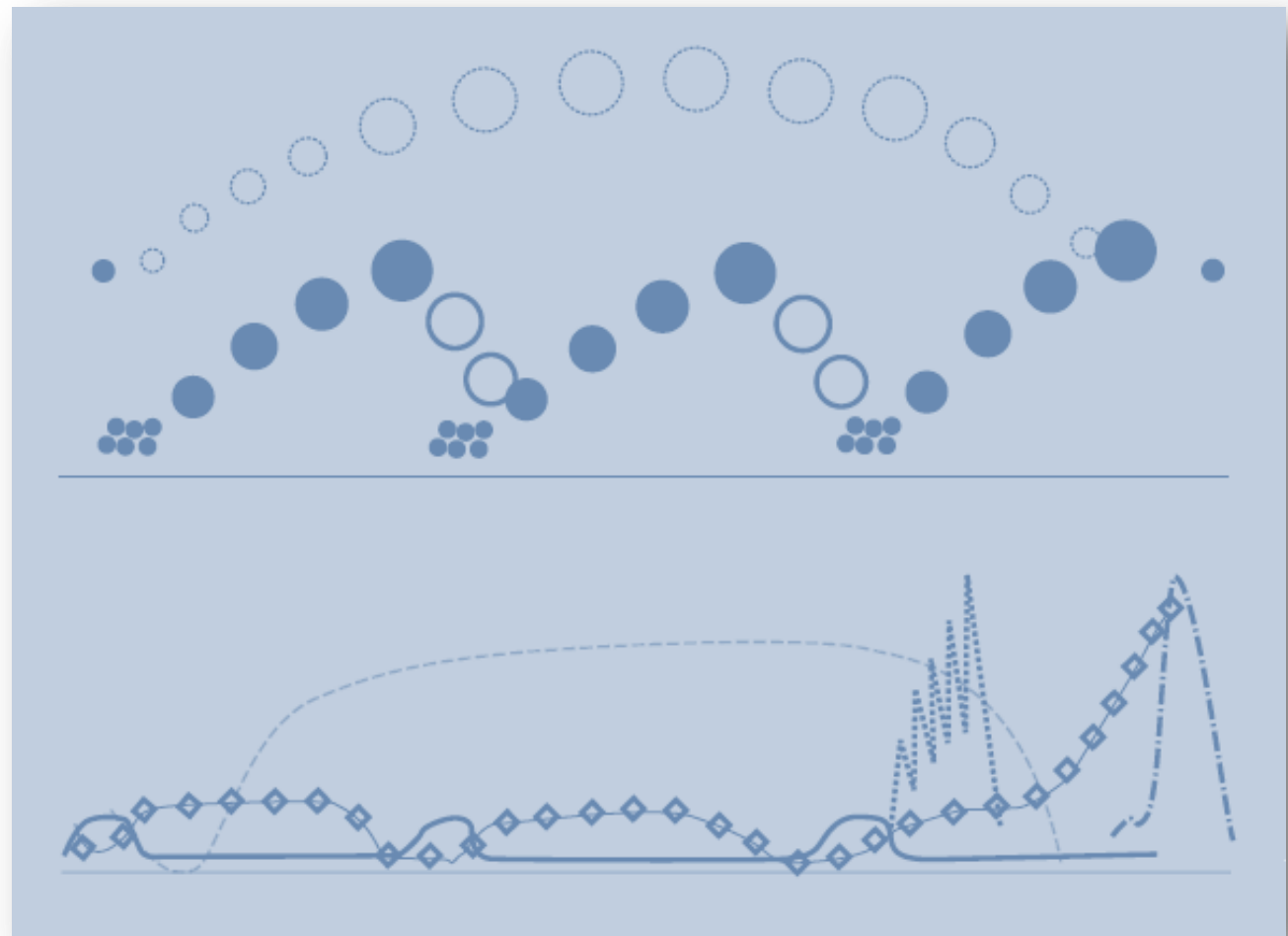
- História do conhecimento;
- Padrão de onda;
- Classes de folículos;
- Gonadotrofinas
- Eixo hipotalâmico-gonadal-hipofisiário

Introdução



- Sumarização dos conhecimentos – Workshop 1991

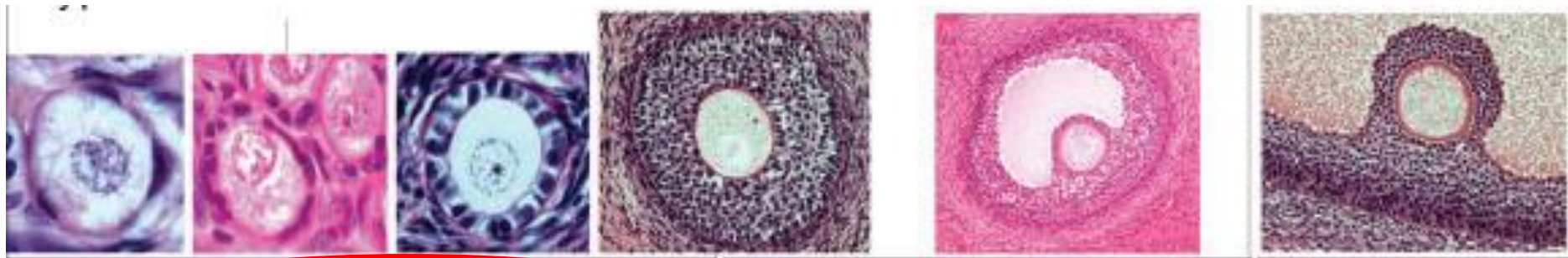
Consenso



- Avanços nas últimas décadas
 - ✓ Ultrassonografia
 - ✓ Métodos de dosagens hormonais
 - ✓ Biologia molecular
 - ✓ Cultivo celular

Teorias confirmadas Teorias refutadas Dúvidas

■ Classes de folículos



✓ Primordial - quiescência

✓ Primário

✓ Pré-antral (secundário) – responsivo à gonadotrofinas

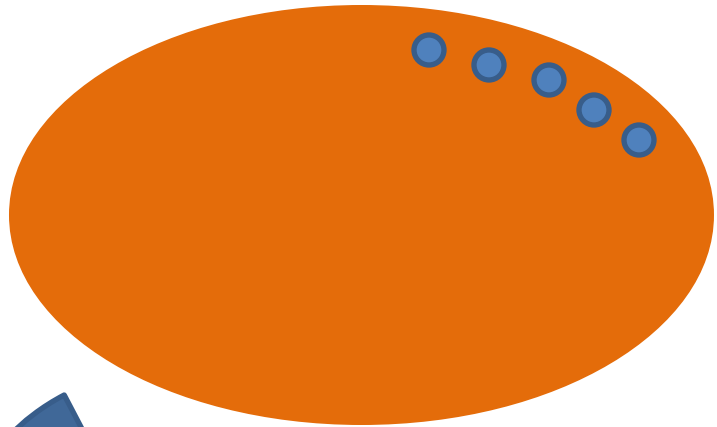
✓ Pequeno-médio antral

✓ Médio-grande antral – pré-ovulatório – gonadotrofina dependente

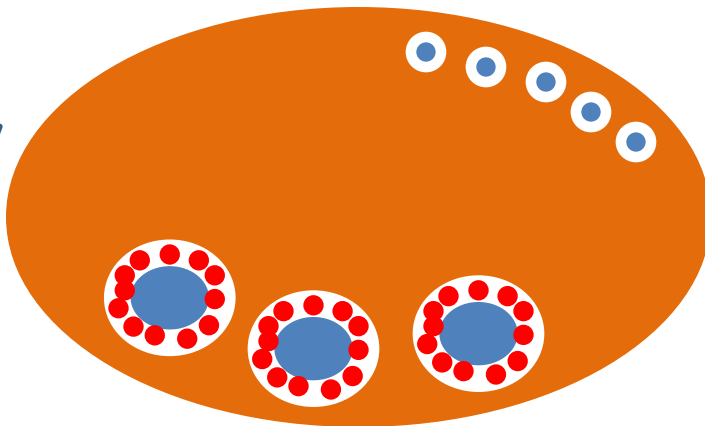
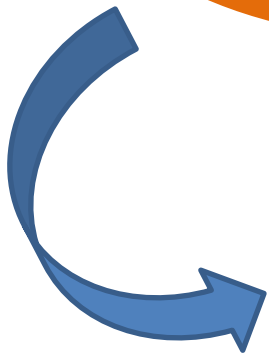
Ovelhas

- Formação dos folículos na vida fetal logo após a diferenciação sexual. ~ 35 dias após a concepção.
- Expressão gênica nos folículos durante essa fase.

Formação dos folículos primordiais e comprometidos



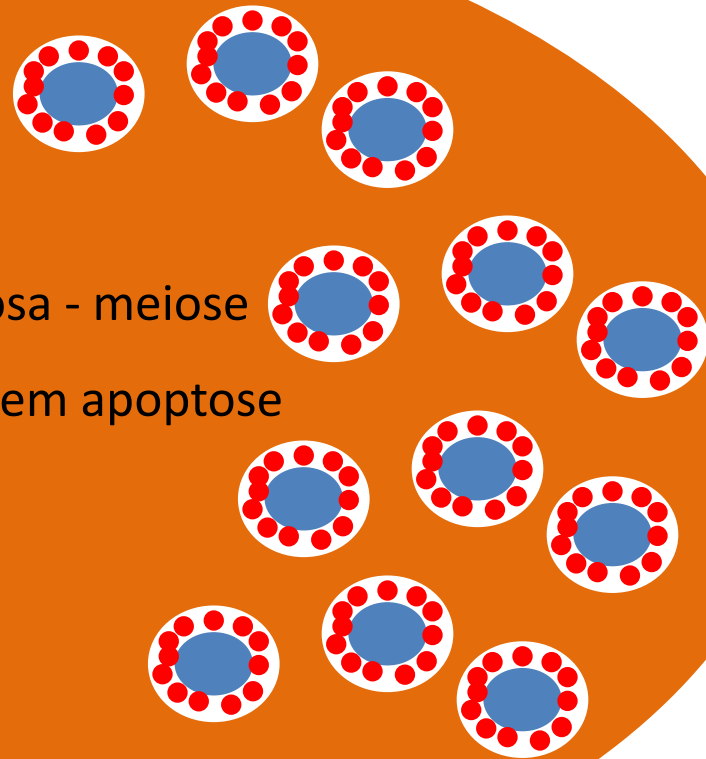
- Região Cortical
- Atividade mitótica das oogônias
- C-Kit
- Interação com céls. Mesonéfricas (Kit ligand)
- Formação do cordão ovífero



- Oogônia forma pré-celulas da granulosa
- Céls. Epitélio de superfície
- Céls mesonéfricas

- Oogônia com pré-células da granulosa - meiose
- ~ 80% das céls germinativas entram em apoptose
- Função da granulosa
- ~ 16 céls da granulosa

Processo dinâmico



- ~ 2500 sequências de genes expressas no oócito
- Funções sinalizadoras
- Receptores para estradiol
- Receptores para fatores de crescimento (TGF- β)
- Inibição e estimulação do crescimento
- Folículos primordiais *in vitro*
- Hormônio Anti-Mulleriano (inibição)

- Folículos comprometidos
- Independentes de gonadotrofinas

▪ Classes de folículos



- Folículos comprometidos

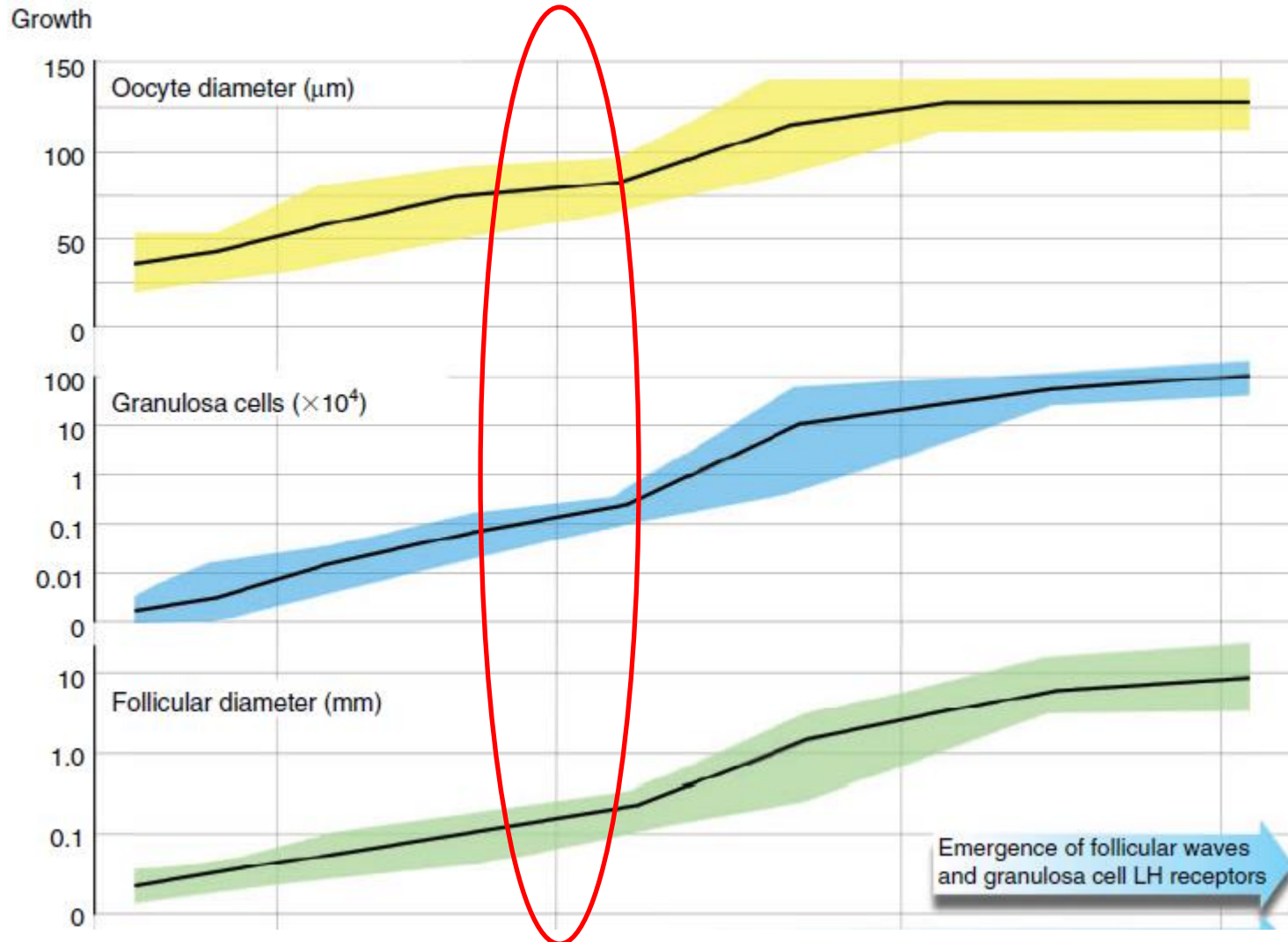
- Alterações nas células da granulosa
- Crescimento do oócito
- Zona pelúcida

Formação dos folículos pré-antrais

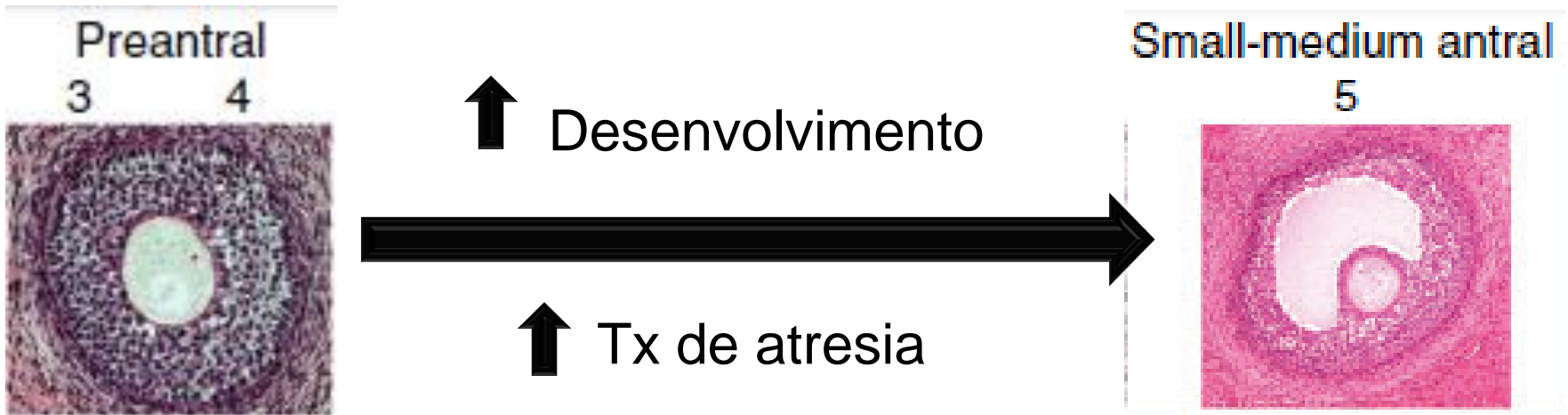


- Desenvolvimento dos folículos até pré-antrais
- Múltiplas camadas de células da granulosa (1000-3500 céls)
- Oócito com 70-120 μm
- Zona pelúcida e teca interna com LH-R
- Aquisição de enzimas para síntese de andrógenos (teca)
- Baixa taxa de atresia
- 7-8 duplicações da população da granulosa antes de formar o antrum

Formação dos folículos pré-antrais



Formação dos folículos pré-antrais



- Remodelação vascular da granulosa para formar o antrum
- Necessidade de manutenção da comunicação granulosa-oócito

Desenvolvimento do oócito – Visão tradicional

- Oócito é passivo
- Regulação endócrina
- Células foliculares

Errado!

**Fatores de crescimento
produzidos pelo oócito.**



O folículo como regulador do desenvolvimento do oócito

- Competência meiótica e de desenvolvimento – evolução do folículo
- Diferenciação da granulosa – parede e cumulus
- **Pouco conhecimento a respeito**

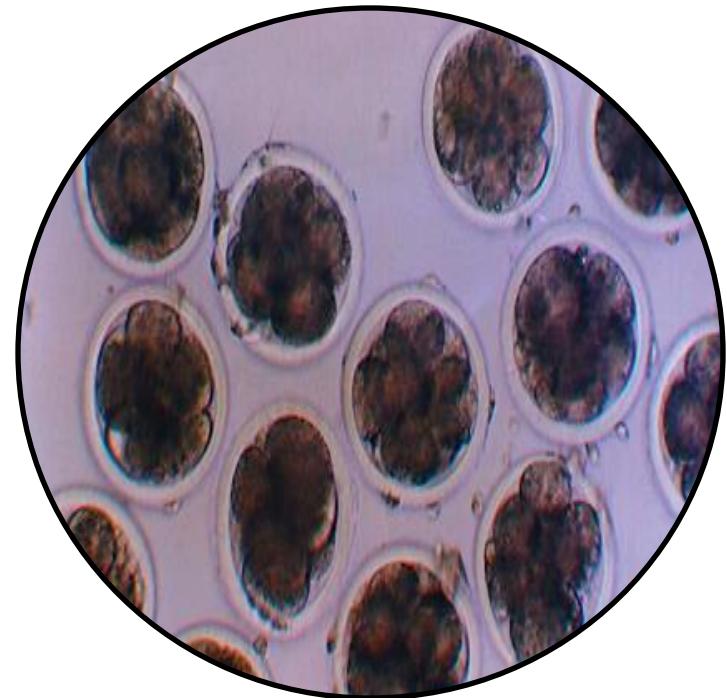
O oócito como regulador do desenvolvimento do folículo

- Fatores de crescimento secretados pelo oócito
- Granulosa
- Diferenciação das células do cumulus
- Taxa de ovulação
- Tamanho do folículo

O oócito como regulador do desenvolvimento do folículo

▪ Regulação do oócito na diferenciação das células da granulosa

- Luteinização da granulosa (LH)
- Células do cumulus ???
- Função crítica do oócito
- Experimentos *in vitro*
- Qualidade embrionária

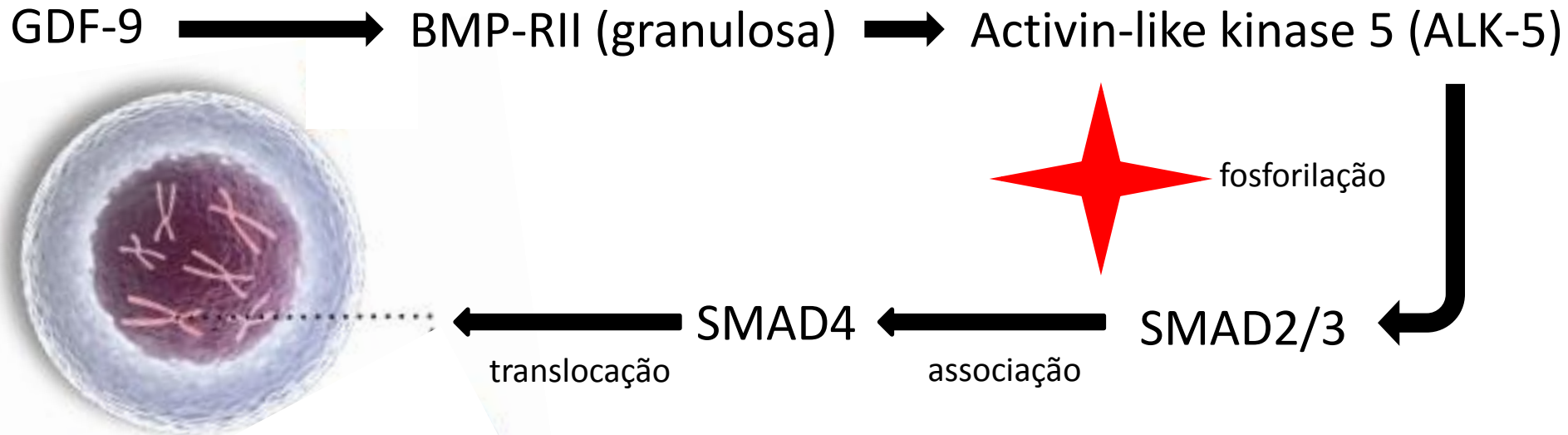


O oócito como regulador do desenvolvimento do folículo

- Regulação do oócito na diferenciação das células da granulosa
 - Growth differentiation factor 9 (GDF-9)
 - Bone morphogenetic protein 15 (BMP-15)
 - Super família TGF- β
 - Sinalizam céls. do cumulus e granulosa

O oócito como regulador do desenvolvimento do folículo

- Regulação do oócito na diferenciação das células da granulosa



Fatores derivados do oócito que afetam a foliculogênese

- ✓ Mutações no BMP15, GDF9 e ALK6 afetam a taxa de ovulação (ovinos)

Regulação da foliculogênese através do sistema IGF



- O papel do IGF na foliculogênese
 - ✓ Organogênese ovariana
 - ✓ Recrutamento de folículos primordiais
 - ✓ Crescimento de folículos gonadotrofina independentes

IGF não é necessário

Regulação da foliculogênese através do sistema IGF



- O papel do IGF na foliculogênese
 - ✓ Sensibilidade à gonadotrofina em folículos antrais pequenos
 - ✓ Estimula a transição de folículo gonadotrofina responsivo para dependente
 - ✓ Esteroidogênese – Teca
 - ✓ Proliferação e diferenciação – Granulosa
 - ✓ Esteroidogênese – Granulosa
 - ✓ Estágio de desenvolvimento

Regulação da foliculogênese através do sistema IGF-I



- As IGF binding proteins (IGFBPs) como moduladores da atividade do IGF no folículo

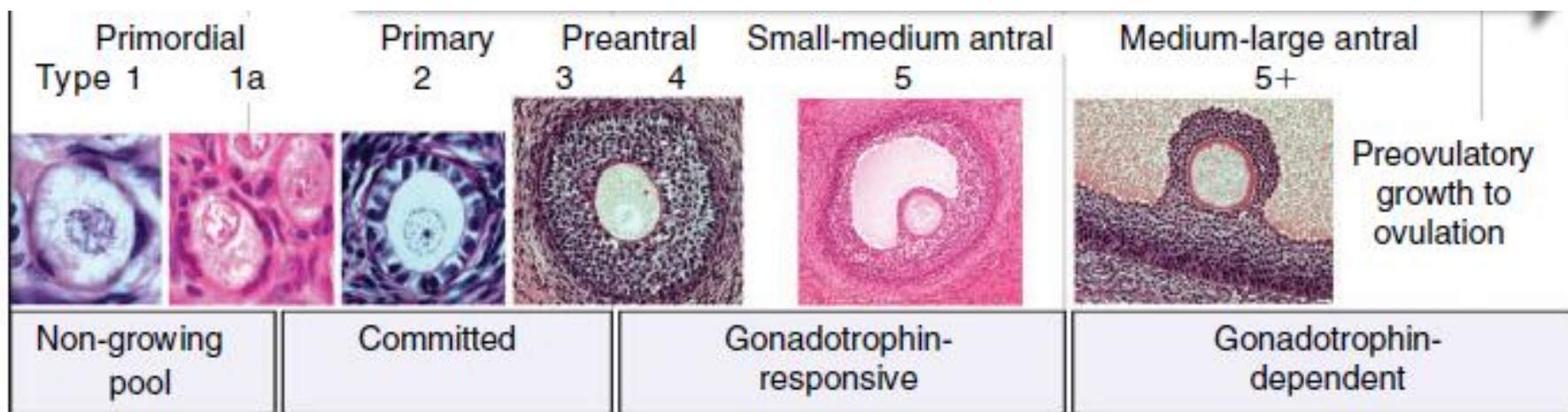
- ✓ IGF fundamental na esteroidogênese e foliculogênese
- ✓ Concentração
- ✓ Regulação do IGF
- ✓ Fatores intra ovarianos – IGFBPs
- ✓ Se liga ao IGF
- ✓ Impede a ligação do IGF ao seu receptor

Regulação da foliculogênese através do sistema IGF-I



- As IGF binding proteins (IGFBPs) como moduladores da atividade do IGF no folículo

- ✓ Concentração de IGFBPs
- ✓ Folículos em crescimento
- ✓ Folículos em atresia



Regulação da foliculogênese através do sistema IGF-I



- A função da pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) na regulação do sistema IGF

- ✓ Concentração de IGFBPs
- ✓ Proteólise

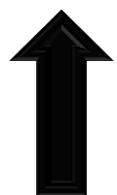
Gonadotrofinas  Expressão de PAPP-A

Regulação da foliculogênese através do sistema IGF-I



- A função da pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) na regulação do sistema IGF

✓ Ação do FSH nos folículos dominantes



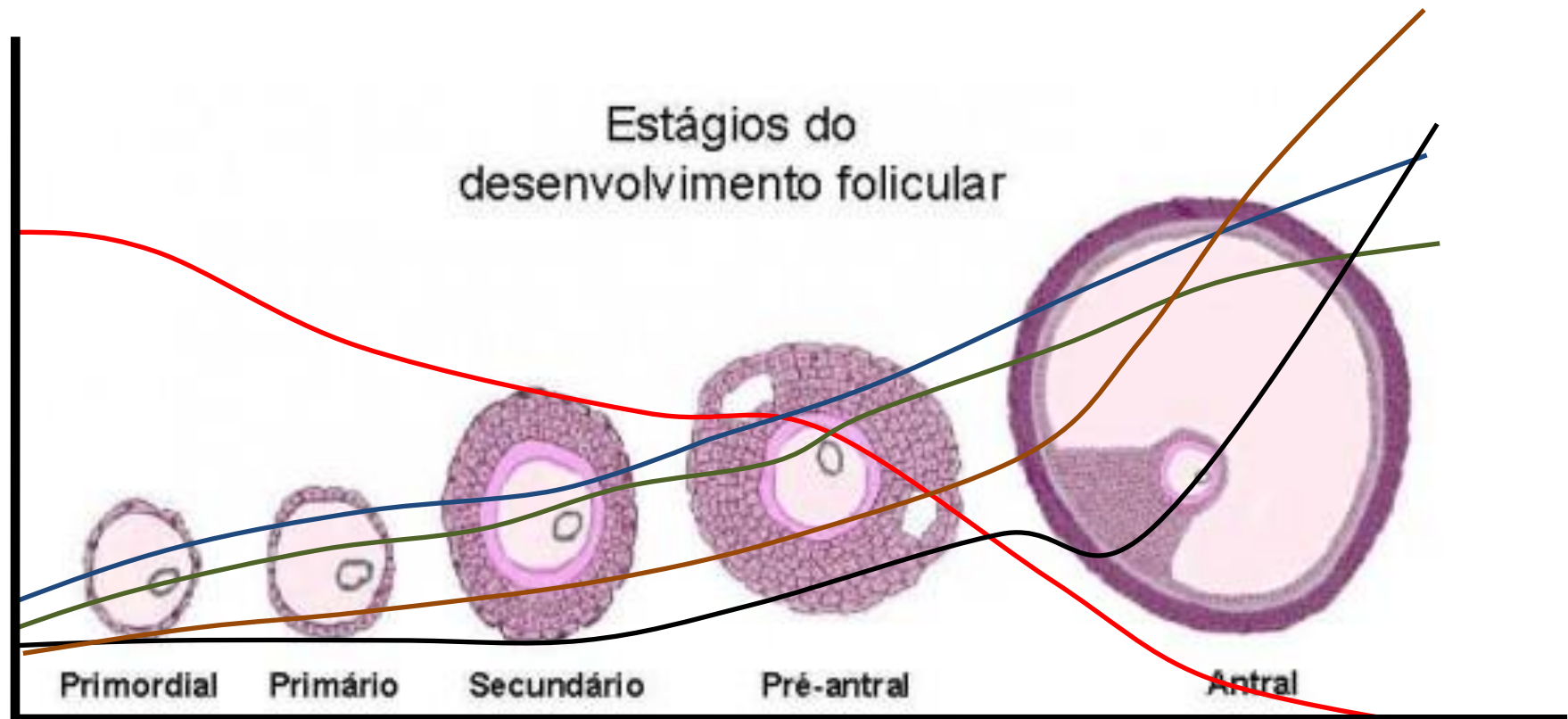
Atividade de PAPP-A



Detectado antes de diferenças no diâmetro, [estradiol] e [IGFBPs]

!!Em bovinos!!

Regulação da foliculogênese através do sistema IGF-I



FSH

■ PAPP-A

■ IGFBPs

• IGF

• E₂

• Diâmetro

- ✓ Ação direta através de nutrientes
- ✓ Ação através de metabólitos intermediários

Em nível hipotalâmico

Hipocalcemia

BEN



Inibição da pulsatilidade de LH

- Pouco reversível a curto prazo
- Energia
- BEP



Em nível de ovário

- ✓ Situação reversível
- ✓ Aumento de energia estimula a foliculogênese
- ✓ Nutrientes e sinalizadores metabólicos
- ✓ Sensibilidade intra folicular aos nutrientes

☐ Pontos a considerar...

- ✓ Energia demandada na foliculogênese
- ✓ Status energético como regulador
- ✓ Papel do efeito estimulatório da energia – efeito quadrático
- ✓ Efeito da nutrição é ligado ao peso corporal
- ✓ Não há um único fator com efeito isolado - sinergia

??????

- Sistema de sensibilidade metabólica no folículo

- ✓ Existe
- ✓ Qual o mecanismo?
- ✓ Identificação de mediadores metabólicos e nutricionais da foliculogênese



- O sistema leptina nos folículos

- ✓ Bovinos – leptina e seu RNA em células da teca e no oócito
- ✓ Fracamente expressa nas células da granulosa
- ✓ Receptor nas céls. da teca, granulosa e oócito

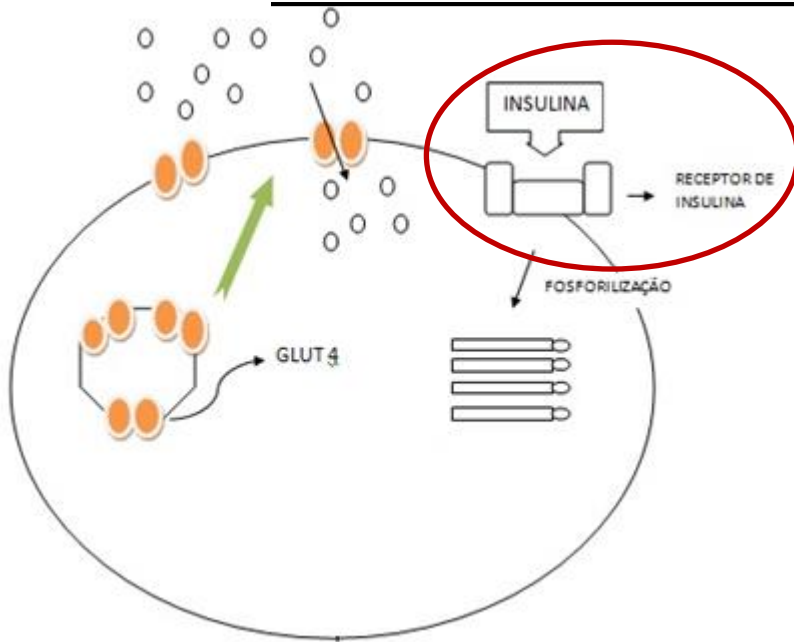
▪ O sistema leptina nos folículos

- ✓ Estímulo ovulatório
- ✓ Diminuição da secreção de estradiol
- ✓ Imunização contra IGF-I X secreção de estradiol
- ✓ Leptina – IGF-I – Granulosa – Estradiol
- ✓ Leptina – IGF-I – Estímulo do LH – Teca
- ✓ Efeito endócrino



Puberdade???

Sistema de insulina-glicose totalmente funcional



✓ Proteínas do substrato receptor de insulina, fosfatases

✓ GLUT4 (sugere absorção de glicose mediada pela insulina)

✓ Células da granulosa e teca: proteínas de transporte de glicose insulino-dependentes

Qual é o papel do sistema glicose-insulina na foliculogênese e no desenvolvimento do oócito?

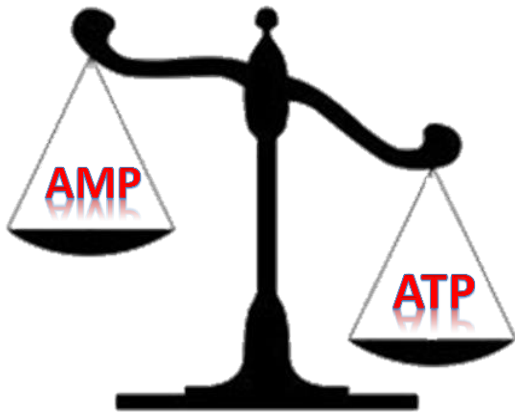


Hipóteses...

- ✓ Sistema ou só a insulina: funções não específicas na manutenção da saúde e da integridade celular

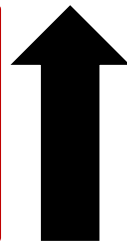
- ✓ Funções específicas que afetam células da granulosa e a teca
 - Estimula o kit-ligante
 - Regula a síntese de neurotransmissores de GnRH
 - Controla a transição de folículo primordiais para primários
 - Controla a liberação de LH pela hipófise

Ativada em resposta à uma mudança na homeostase energética



Suprimento reduzido de nutrientes
(estresse nutricional e ambiental)

Transporte de glicose
Ativa a glicólise
Ativa ox. ácidos graxos



Síntese de ác. Graxos
Colesterol
Proteínas



- ✓ Células da teca, células da granulosa e oócitos
- ✓ Ovário: influência metabólica na foliculogênese e maturação do oócito
 - ✓ Modulador de interações entre BEN e foliculogênese

Vias de integração local e crosstalk e sinalização de gonadotrofina



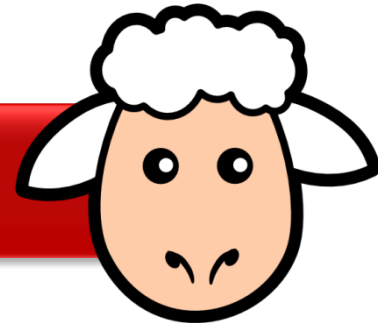
Interações entre as vias de sinalização

Gonadotrofinas estimulam células foliculares:

Ativação de uma cascata divergente de vias de sinalização intracelular

Estimulação nutricional de curto prazo pode modificar a função folicular estimulada por gonadotrofina

Infusão de glicose 10mM/h: aumento do número total de folículos > 1mm de diâmetro



- ✓ Diminuição da AMPK
- ✓ Diminuição da AKT (aumenta a proliferação e sobrevivência celular, estimulando o desenvolvimento do oócito)

- ✓ 1991: padrões temporais de secreção bem definidos
- ✓ Descrições mais precisas do padrão de secreção

Inibinas: Feedback negativo – inibe FSH

Inibina A → Secretada pelo corpo lúteo, sob controle do LH

Inibina B → Estimulada pelo FSH (folículos pré-antrais em desenvolvimento)

- ✓ Estudos iniciais: inibina como regulador do sistema endócrino de FSH
 - ✓ Aumenta a produção de LH

Questões técnicas: medição de inibina e FSH



Falta de dados sobre o efeito da nutrição sobre a inibina
Sensibilidade e especificidade baixa dos testes hormonais

Papel do feedback ovariano na mediação de efeitos nutricionais...?



Aumento do número de folículos pequenos e médios

FSH não aumenta



Nutrição estimula a secreção de inibina

Paradoxo do feedback da taxa de ovulação



Eixo hipotálâmico-hipófisário-gonadal: sistema homeostático
tende a neutralizar efeitos de fatores externos na foliculogênese



Se o nº de folículos ovulatórios aumenta a inibição das Gs necessárias ao crescimento...levando à redução do crescimento folicular...como esses folículos ovulam?



Hipóteses mutuamente incompatíveis (1991):

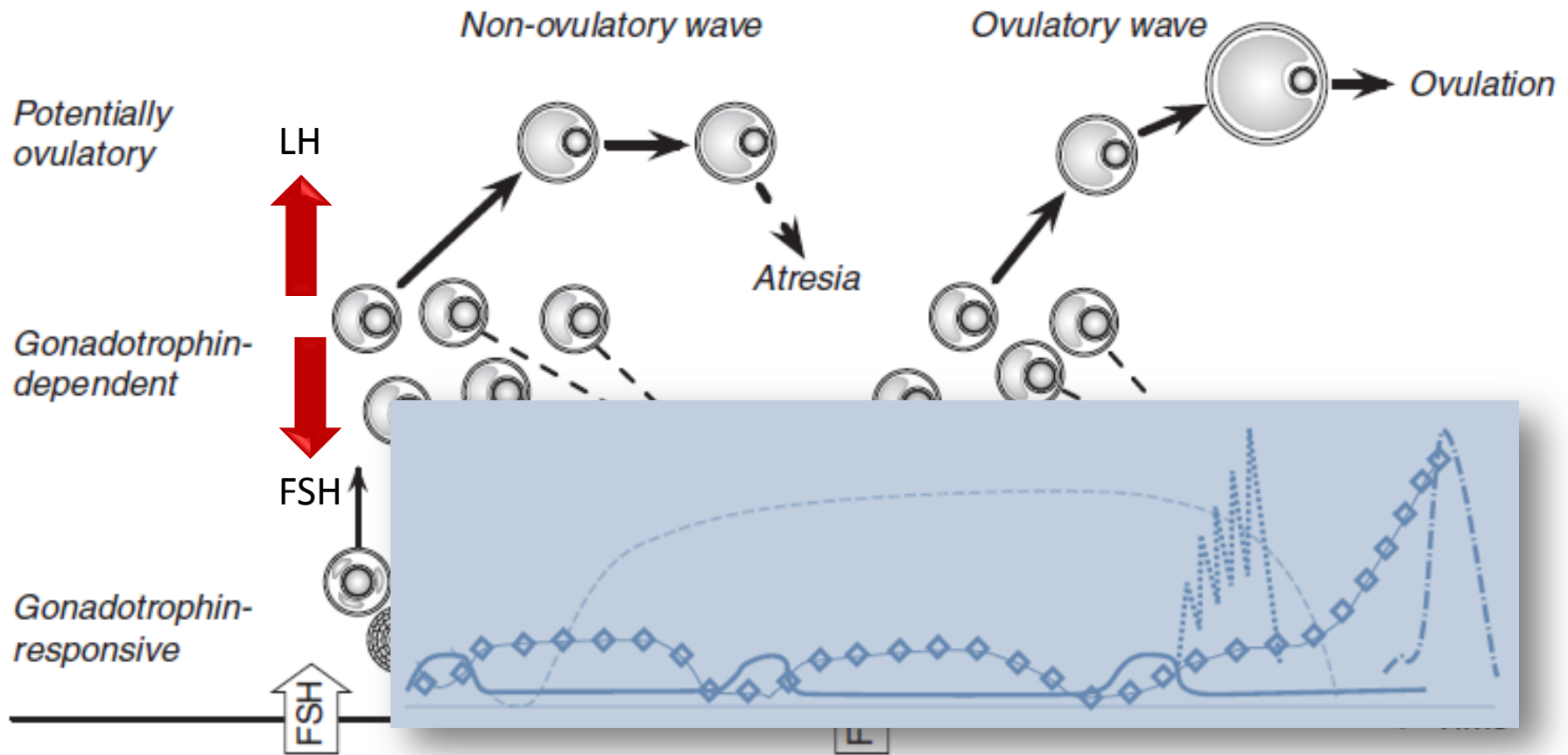
1

- É necessário um aumento na secreção de FSH para estimular a foliculogênese

2

- O aumento da foliculogênese leva a baixas concentrações de FSH

Paradoxo do feedback da taxa de ovulação



Hormônio anti-mulleriano

- ✓ Bloqueia/inibe a ativação do folículo primordial e o crescimento do folículo antral

- ✓ Ausente em folículos primordiais

- ✓ Presente em folículos comprometidos e responsivos (antrais peq.)

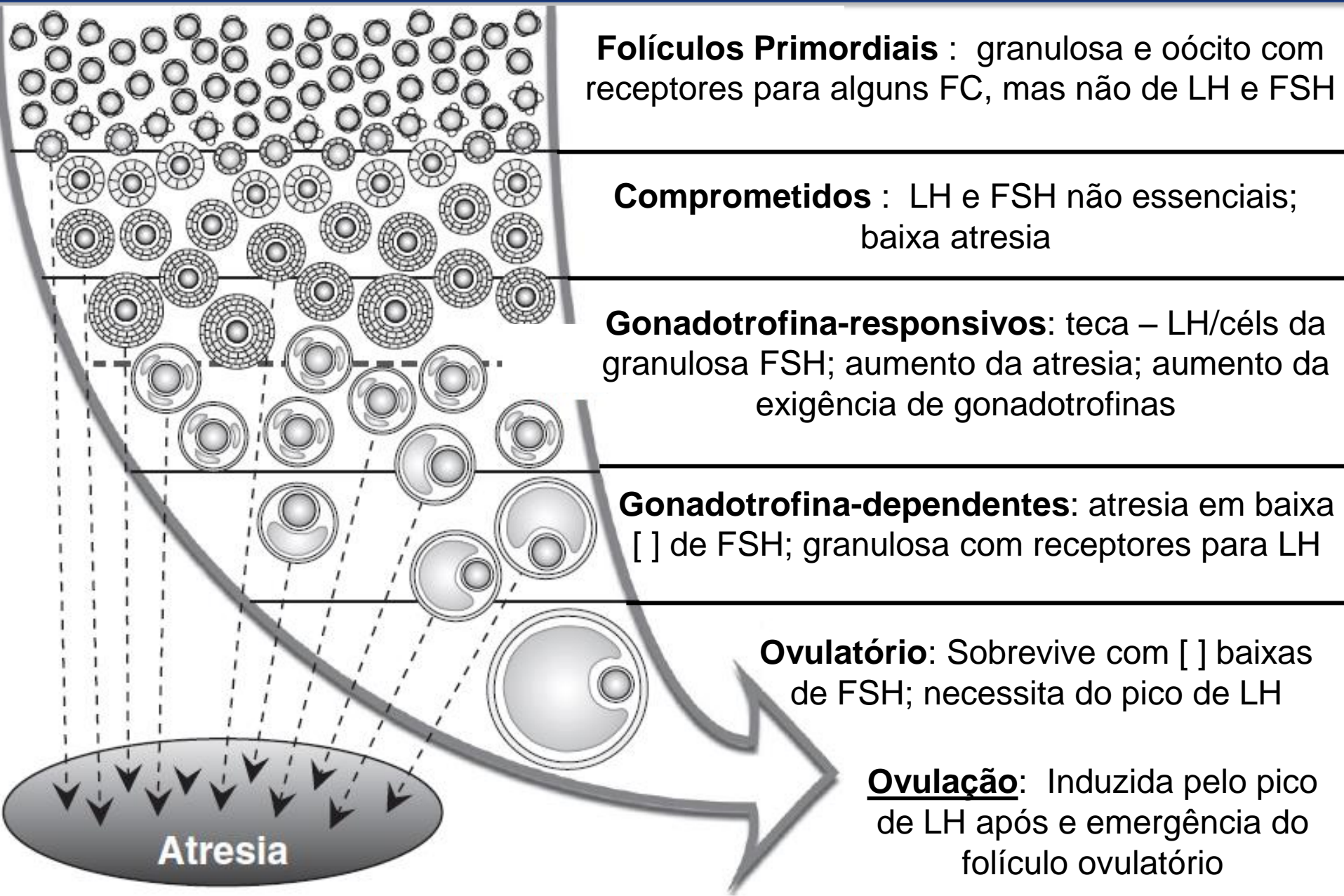
- ✓ Ausente em gonadotrofina-dependentes

Folículos em crescimento: feedback inibitório sobre os primordiais

Regula a resposta dos folículos ao FSH
(reduz receptores de LH?)



Modelo de foliculogênese em 1991



1. Interações oócito/células da granulosa

2. Início do crescimento e desenvolvimento do folículo primordial
(desenvolvimento de folículos comprometidos)

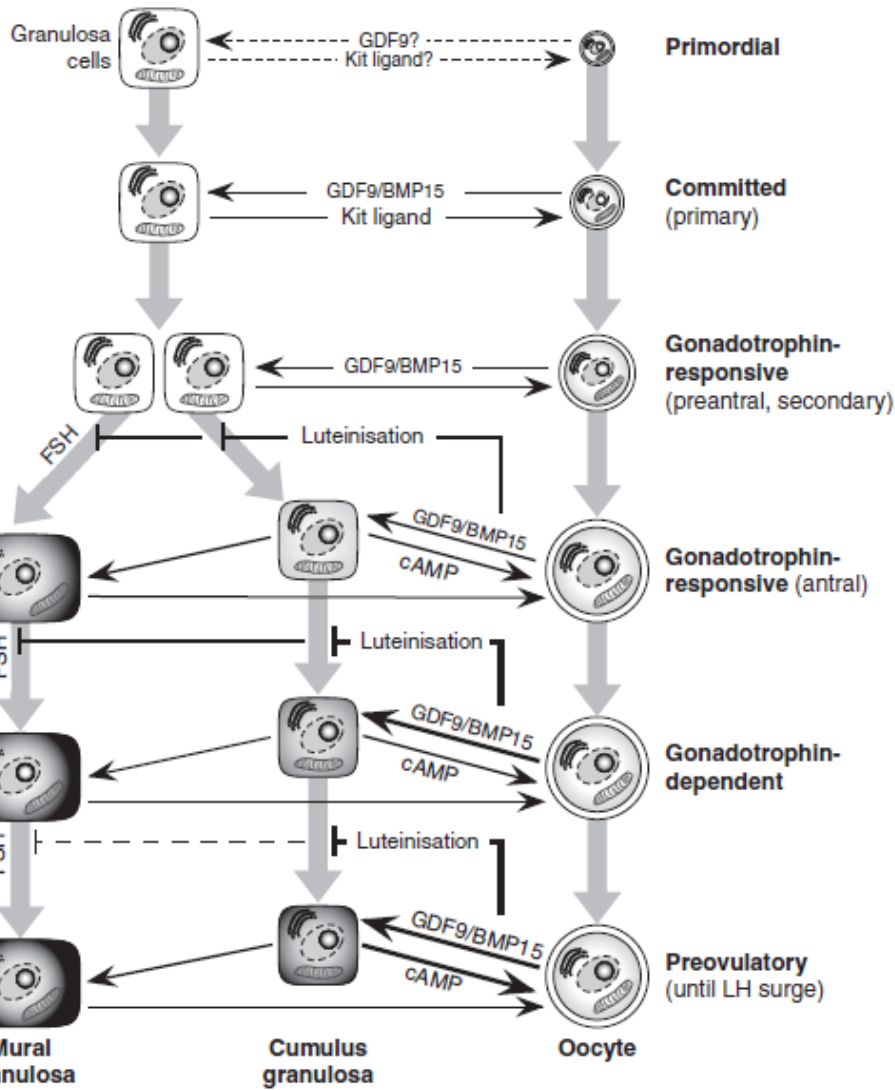
3. Fisiologia e crescimento de folículos antrais

Diferenciação dos folículos:

gonadotrofina responsivos → dependentes → ovulatórios

4. Confirmação: fatores metabólicos podem influenciar diretamente o desenvolvimento folicular e assim a taxa de ovulação

Baseado na inter-relação do folículo com as gonadotrofinas



✓ Oócito: maior regulador do crescimento folicular antral e precoce pré-antral

✓ Ovulatório: capaz de ovular dado o ambiente endócrino (alto estradiol, baixa progesterona, picos de LH)

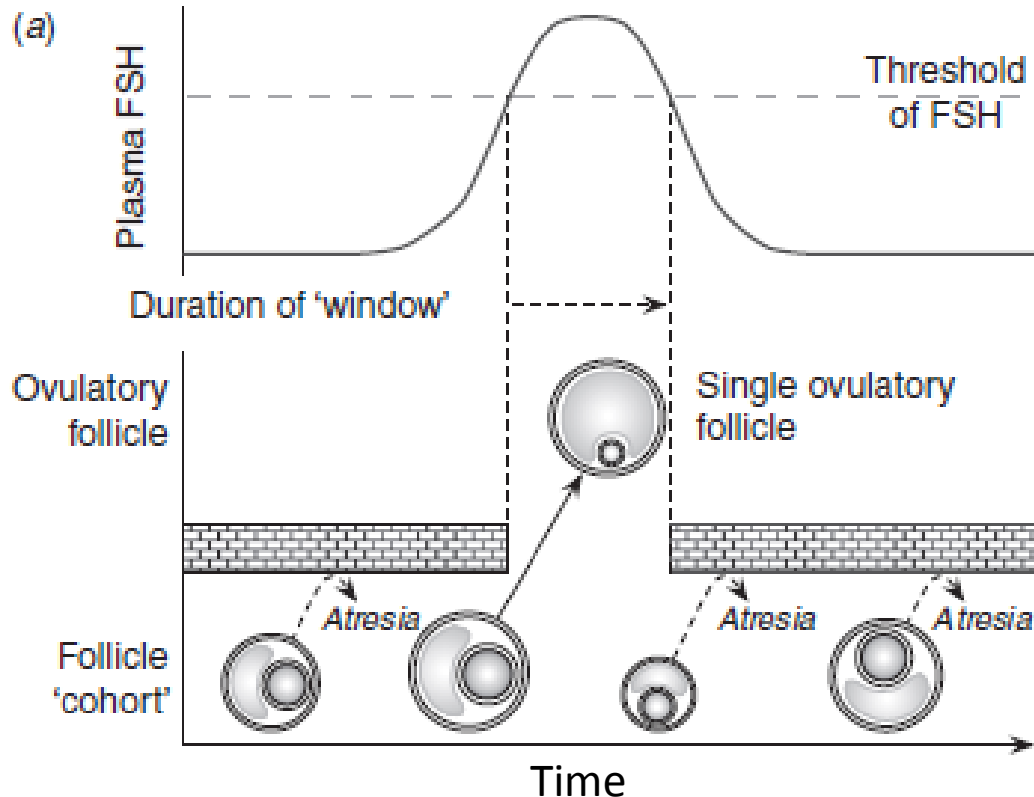
✓ Dominante: Descrição morfológica (folículo maior)
Duvidosa em pequenos ruminantes: nem sempre o maior é ovulatório (atrésico)

Modelo para a regulação da taxa de ovulação



Portão: folículos gonadotrofina-dependentes “entram”, evitam atresia e ovulam

Portão = período de tempo durante a onda folicular em que o FSH permanece acima do limiar requerido pelos GD para evitar atresia

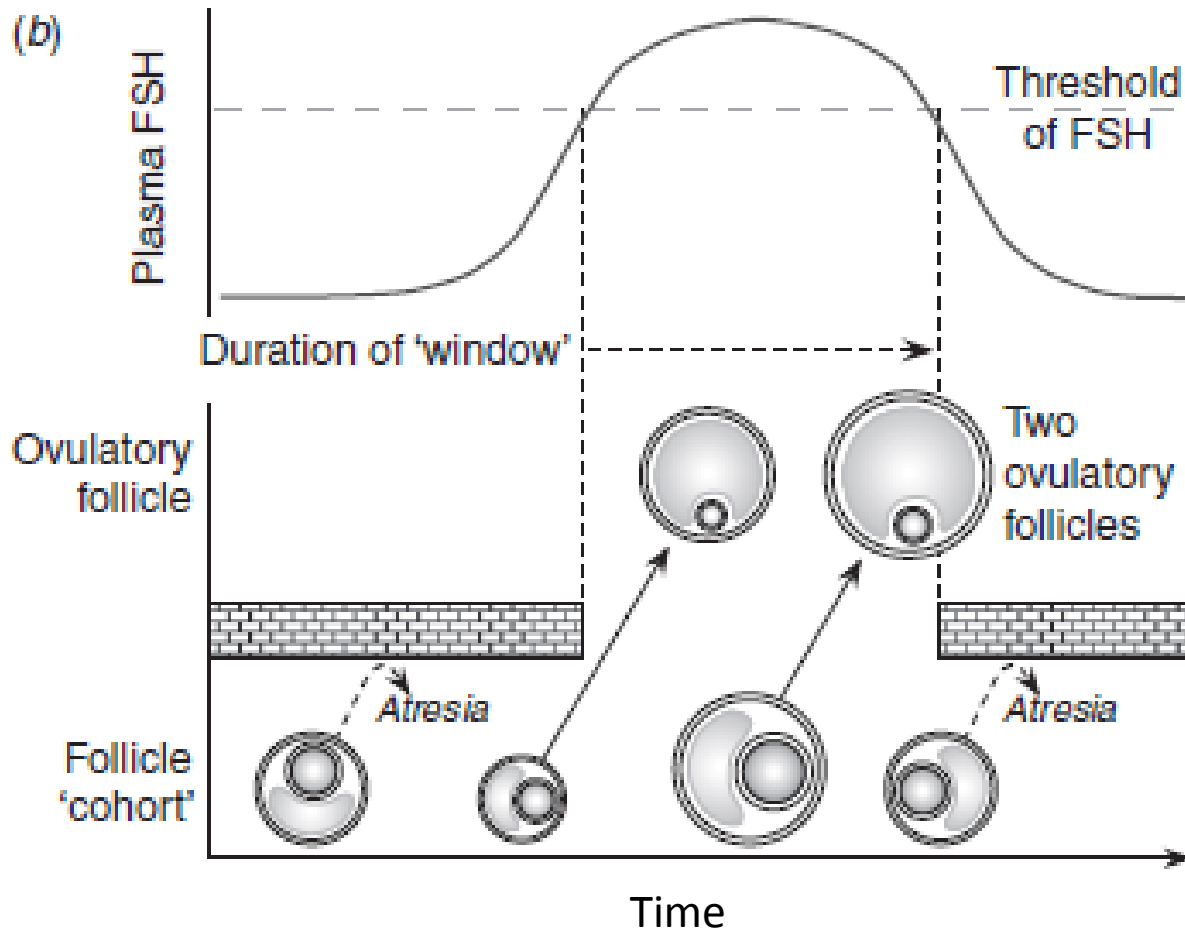


Portão estreito

Apenas um folículo evita atresia e em condições corretas ovula

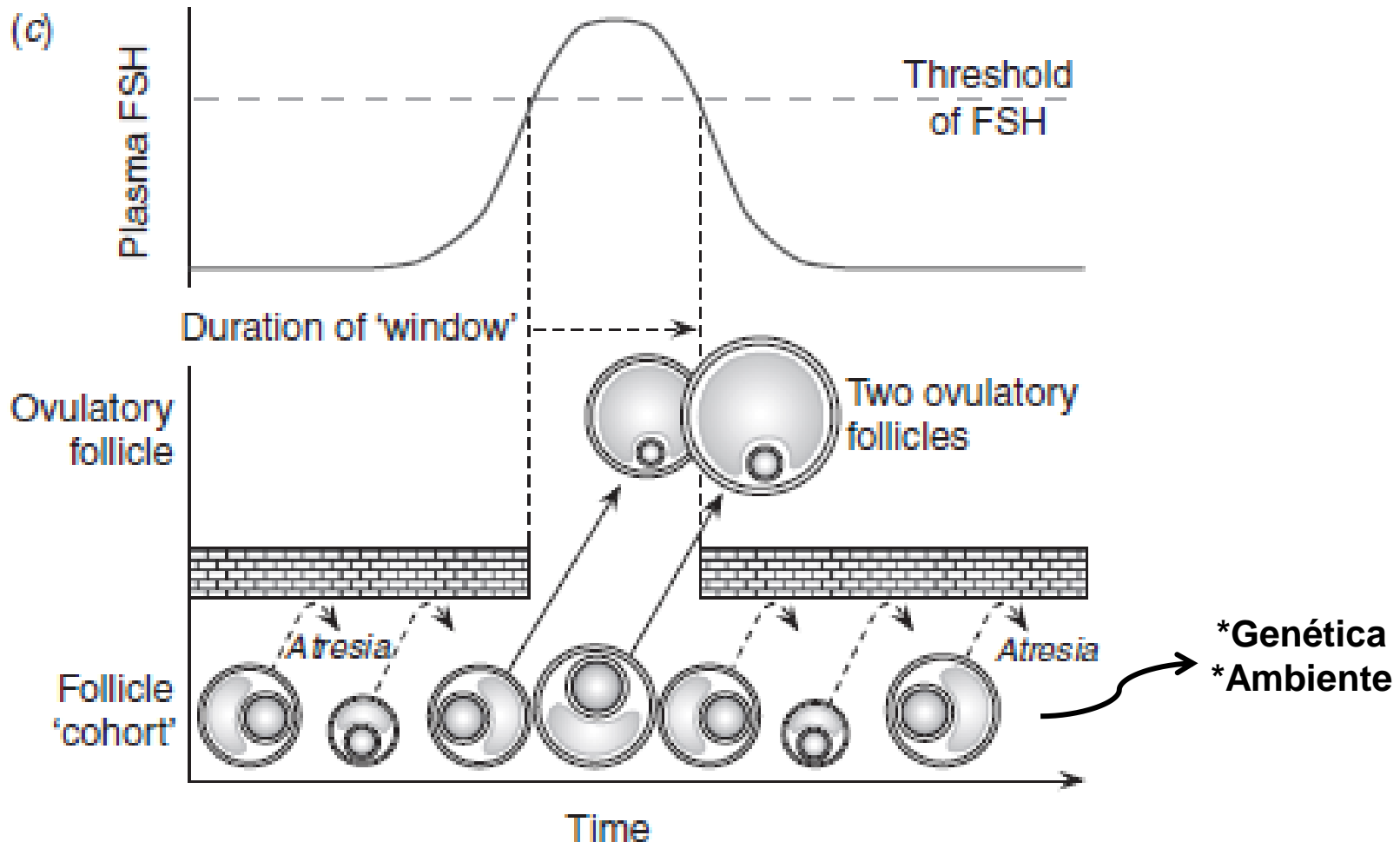
Portão largo

Permite múltiplas ovulações



Portão de largura fixa

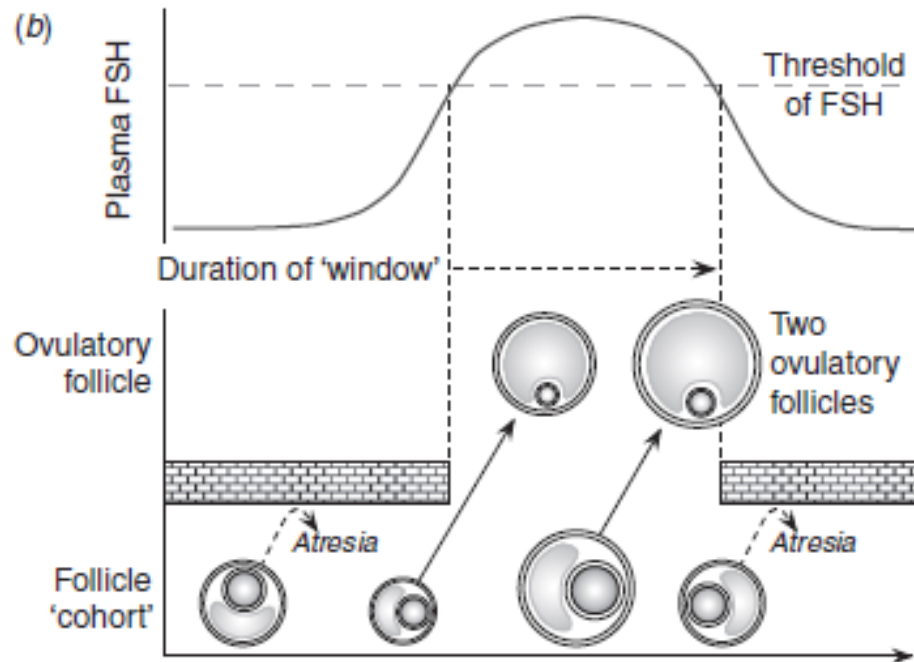
Número de folículos aptos e no mesmo momento



Existe forma de aumentar o número de folículos pré-ovulatórios?



1. “Alargamento do portão – aumentando o FSH”



Mantendo [FSH] acima do limiar por mais tempo



- ✓ Diminuição da sensibilidade do eixo H-H-G ao feedback negativo
- ✓ Aplicação de FSH exógeno

2. Alargamento do portão através da redução do limiar de FSH

Folículos mais sensíveis ao FSH: desenvolvimento precoce

Evidência direta: não existe...limiar de FSH não é bem definido

Cada ovelha tem seu próprio limiar...? Raça, idade, genótipo

Evidências indiretas: Insulina e IGF-I

Alteração da sensibilidade de células da granulosa para uma produção de estradiol estimulada por FSH

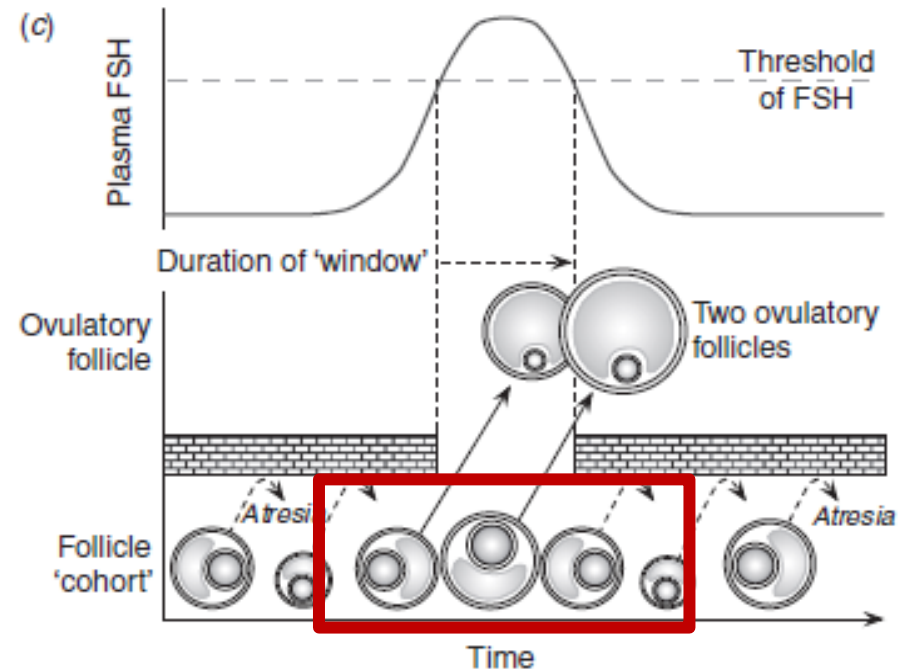
Reduzem a dose de FSH necessária para a máxima estimulação da produção de estradiol

3. Aumento do número de folículos dependentes de gonadotrofinas

Redução do tamanho em que eles se tornam GR (Boroola)

Aumento da população de folículos GR e GD sem alteração do tamanho
(raça Romanov)

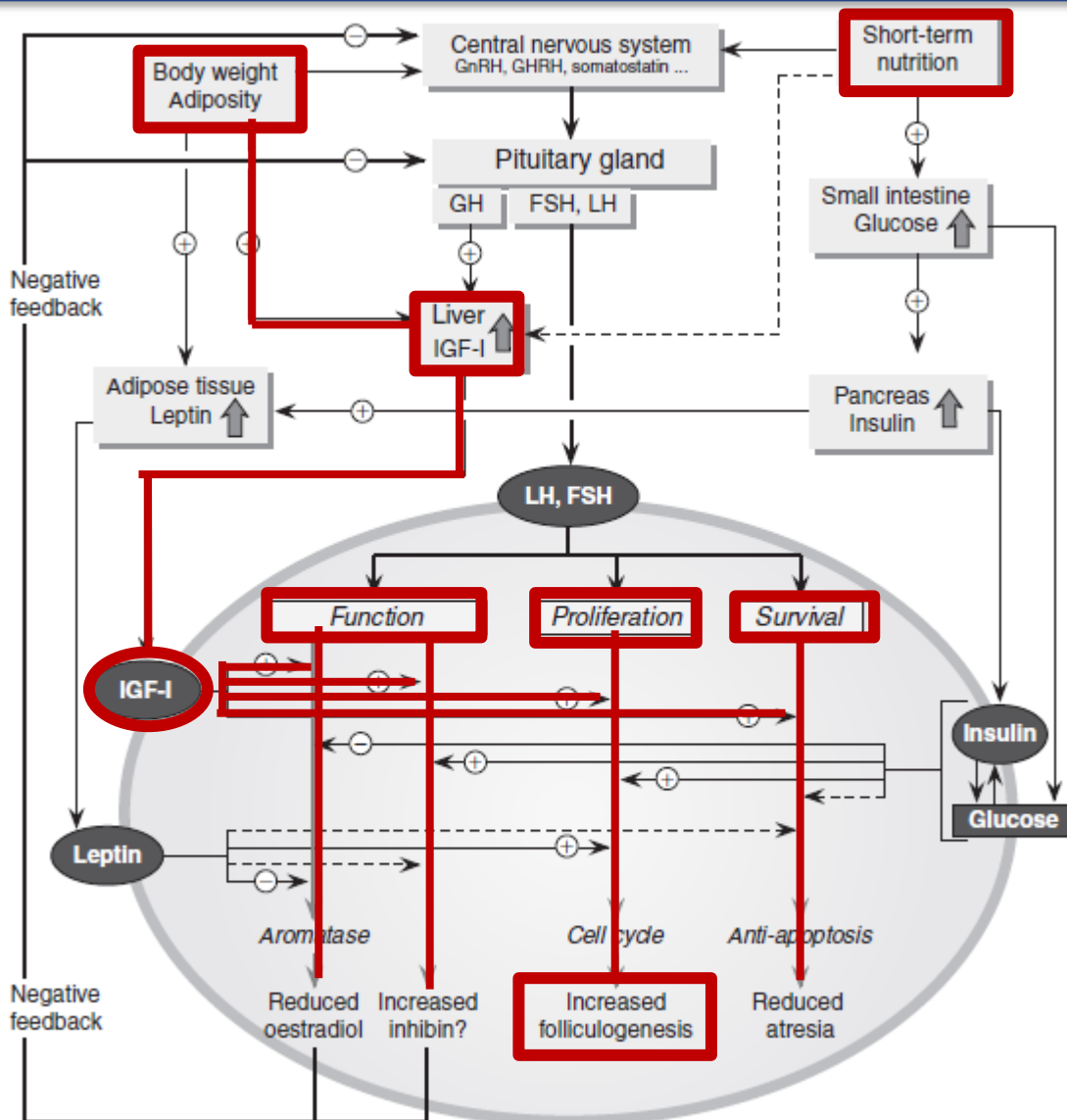
3x + folículos em crescimento
> População de cél. da granulosa
[] 3x maiores



Modelo para as influências nutricionais e metabólicas na foliculogênese



Oócito é alvo direto das influências nutricionais e de condição corporal com efeitos metabólicos significativos na foliculogênese?
 2 efeitos nutricionais



Reagentes biologicamente ativos, relevantes e confiáveis

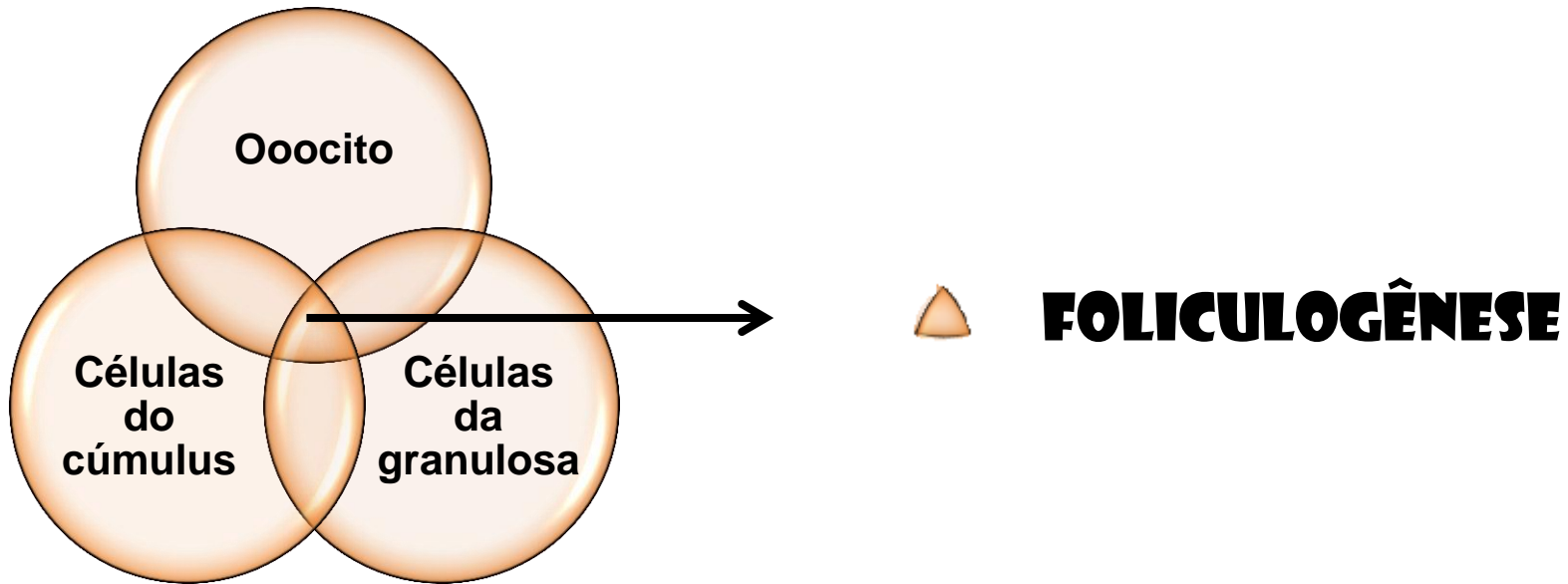
- ✓ Inibina, FSH, fatores de crescimento...

Aprimoramento das tecnologias

- ✓ Tecnologias de imagem (acompanhamento do desenvolv. folicular)
 - ✓ Microarranjo, análise genômica, proteômica

Aprimoramento dos sistemas in vitro

- ✓ Folículos individuais e células do ovário



- ✓ Equipamentos
- ✓ Técnicas
- ✓ Metabolismo celular
- ✓ Genômica funcional



SIMON '98

Muito Obrigado!