



Universidade Federal de Pelotas

Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária



Subnutrição periconcepcional em ovelhas normais e com excesso de peso leva a um aumento do crescimento adrenal e alterações epigenéticas no gene IGF2/H19 da glândula adrenal na prole

The FASEB Journal

IF - 7.049

Apresentadoras: Maíra Scheid e Patrícia Mattei

Orientadora: Carolina Bespalhok Jacometo

Pelotas, 03 de fevereiro de 2011

INTRODUÇÃO



Embrião, feto ou recém-nascido



Estressores ambientais:
Subnutrição, disfunção
placentária...



Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal



INTRODUÇÃO



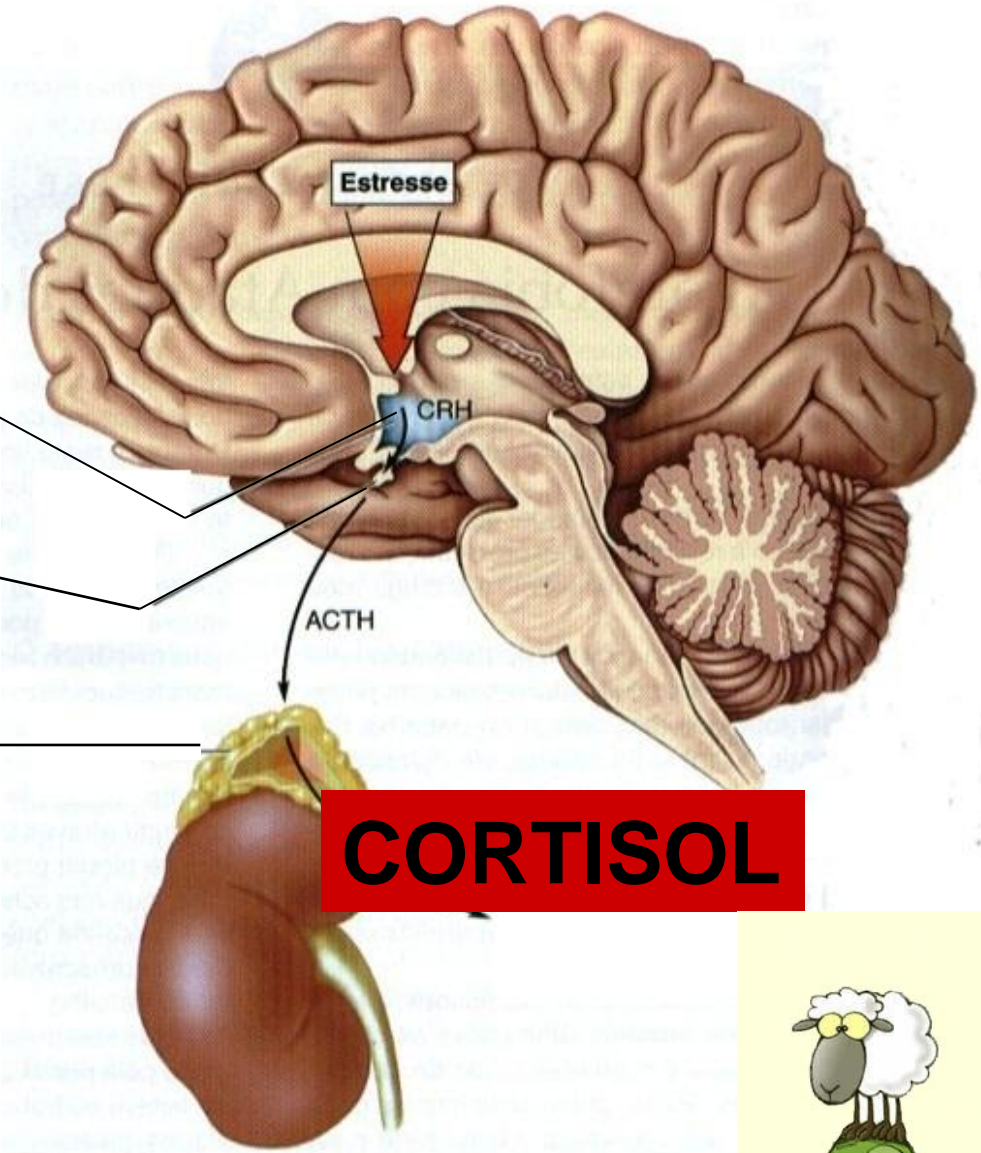
Hipotálamo

Hipófise

Glândula Adrenal

Feedback negativo

Controle da homeostase



INTRODUÇÃO



OVINOS

**Ativação do eixo
HPA**

**Transição da vida
intra-uterina para
extra-uterina**

**Exposição de oócitos e
embriões à subnutrição
materna**

**ALTERAÇÕES NO
DESENVOLVIMENTO DO
EIXO HPA FETAL,
crescimento adrenal,
parto prematuro, aumento
dos níveis de cortisol
basal**

INTRODUÇÃO



Subnutrição periconcepcional

Alterações epigenéticas

IGF2



IGF2R



Expresso paternalmente

Expresso maternalmente



H19

Expresso maternalmente

INTRODUÇÃO



Região codificadora

Lugar onde se ativam os genes

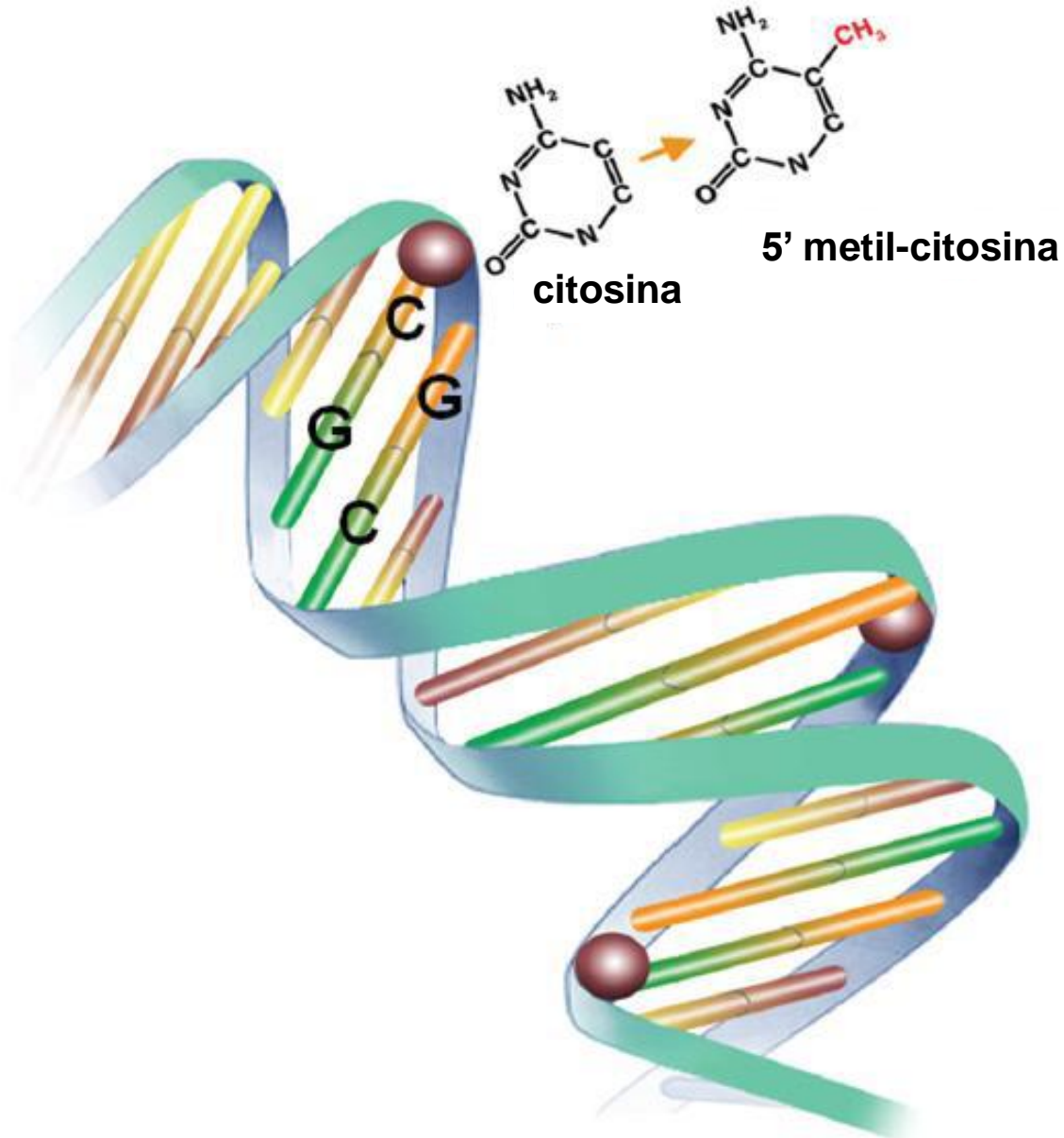
Região diferentemente metilada

Diferença no nível de metilação define qual gene é expresso

METILAÇÃO



INTRODUÇÃO



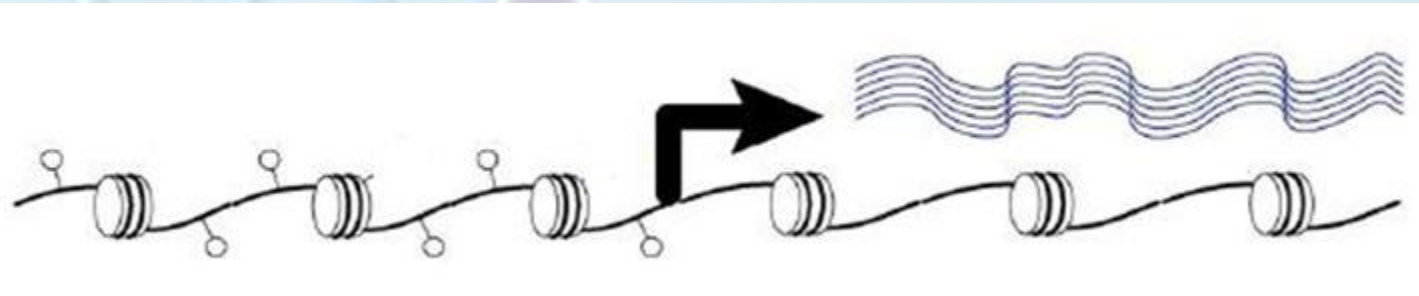
INTRODUÇÃO



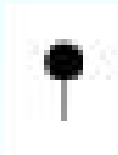
RDM é metilada – expressa IGF2



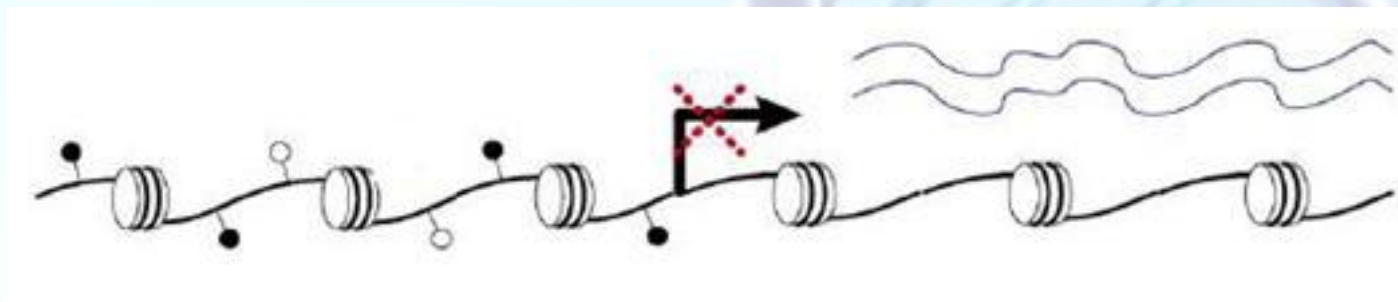
Metilou



Não-metilada – expressão de IGF2 é reprimida pela ativação do H19



Não-metilou



OBJETIVOS



“Testar a hipótese de que a subnutrição no período periconcepcional de ovelhas resulta em um aumento do crescimento e da capacidade esteroidogênica da adrenal e em uma alteração epigenética no IGF2 e IGF2R da adrenal da prole.”



MATERIAIS E MÉTODOS



Animais e Regime Nutricional

23 ovelhas doadoras

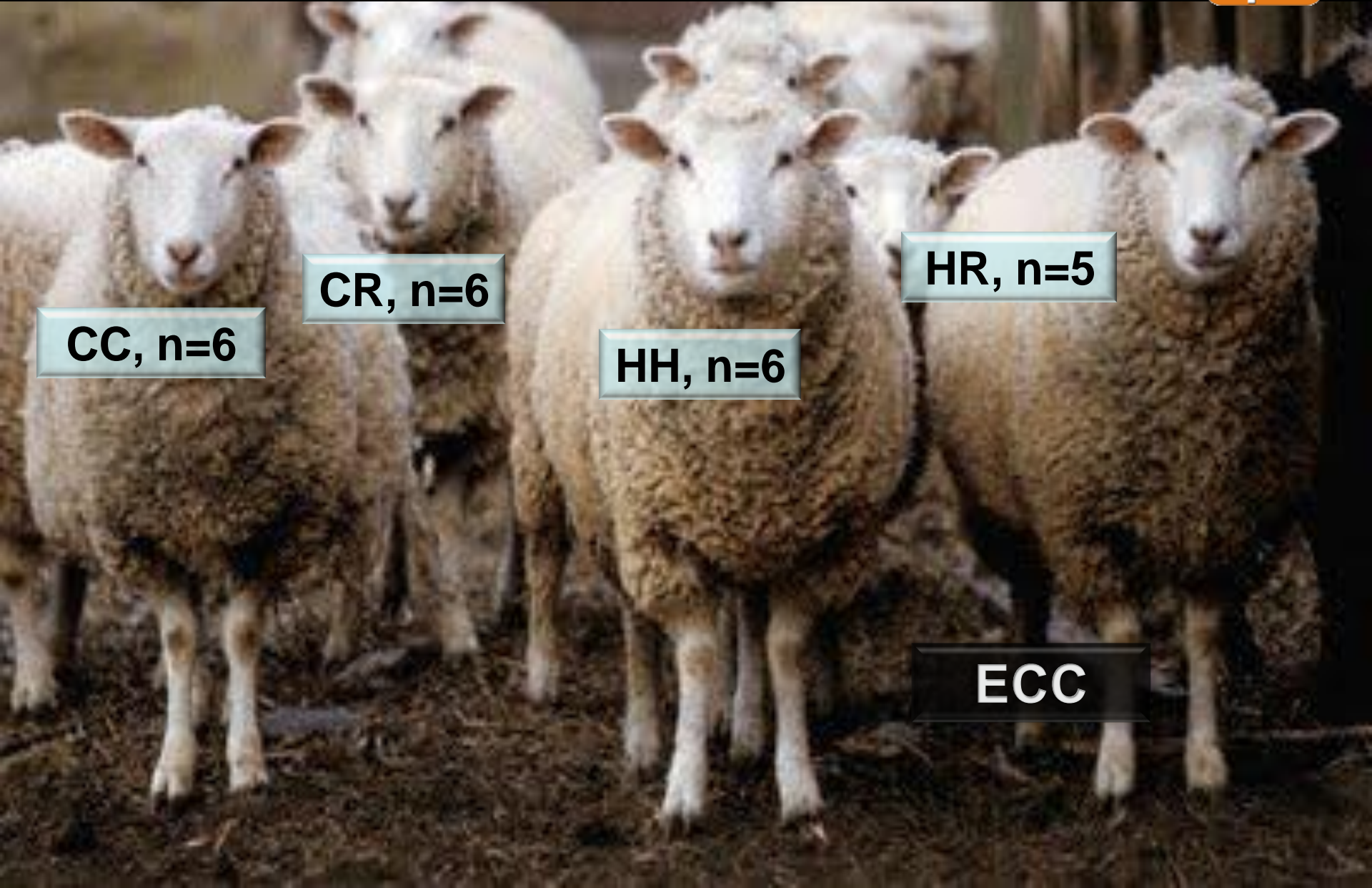
Período de aclimação de 20 dias

→ Ração peletizada, 9,5 Mj/Kg, 120g/kg de proteína bruta, 90,6% de matéria seca

ECC

100% a exigência para manutenção de uma ovelha não-grávida de acordo com o peso

MATERIAIS E MÉTODOS



CC, n=6

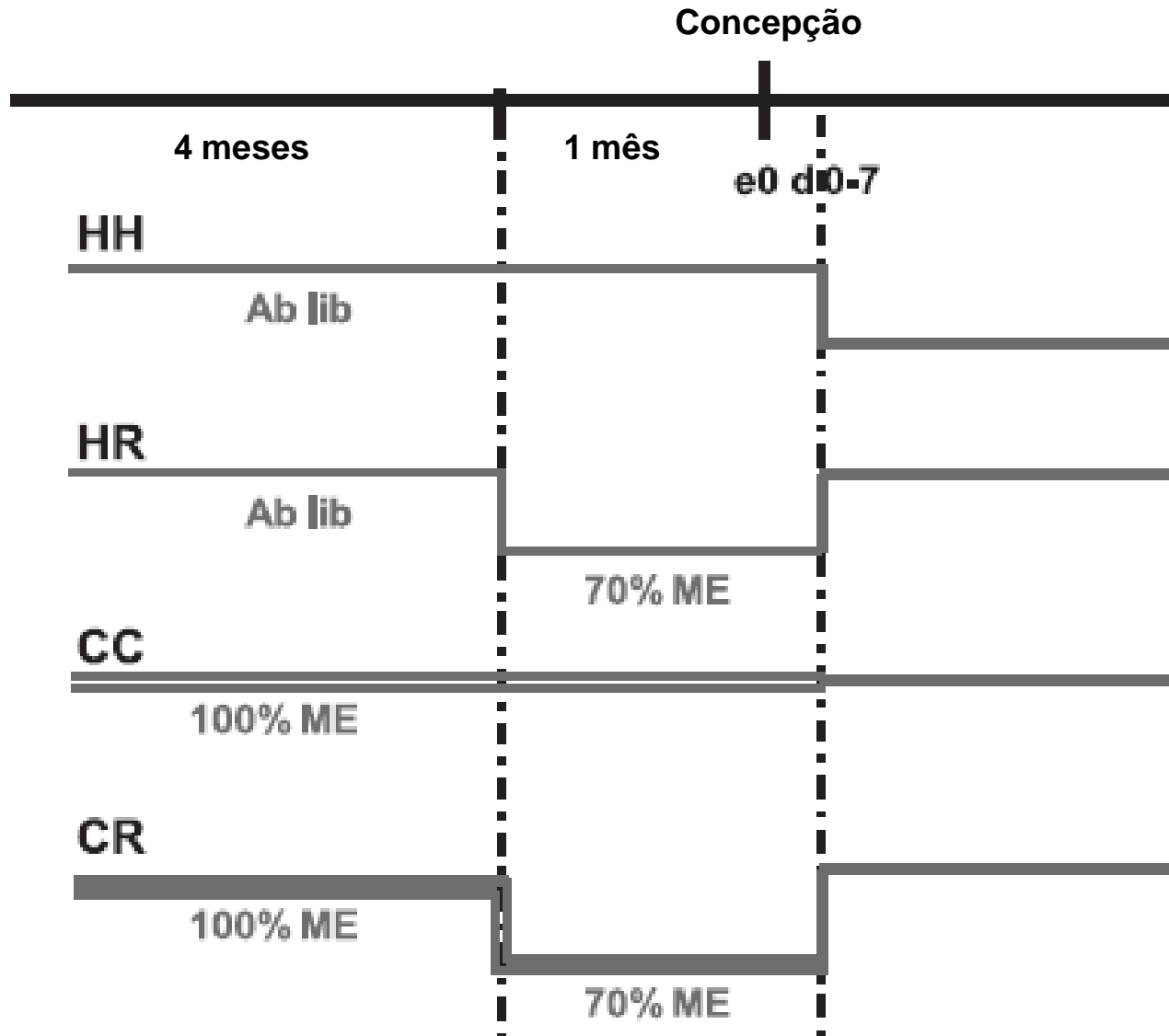
CR, n=6

HH, n=6

HR, n=5

ECC

Regime Nutricional

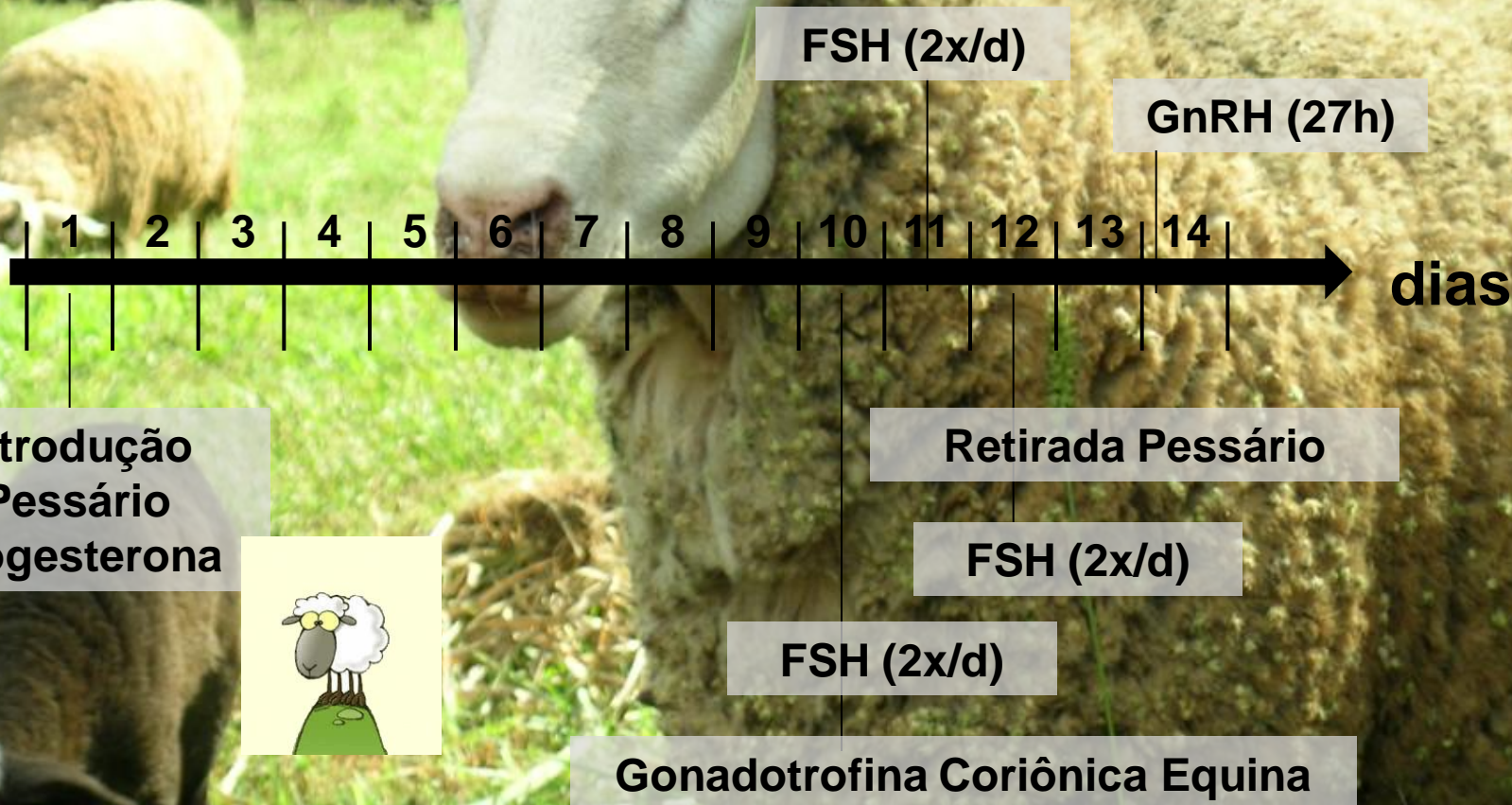
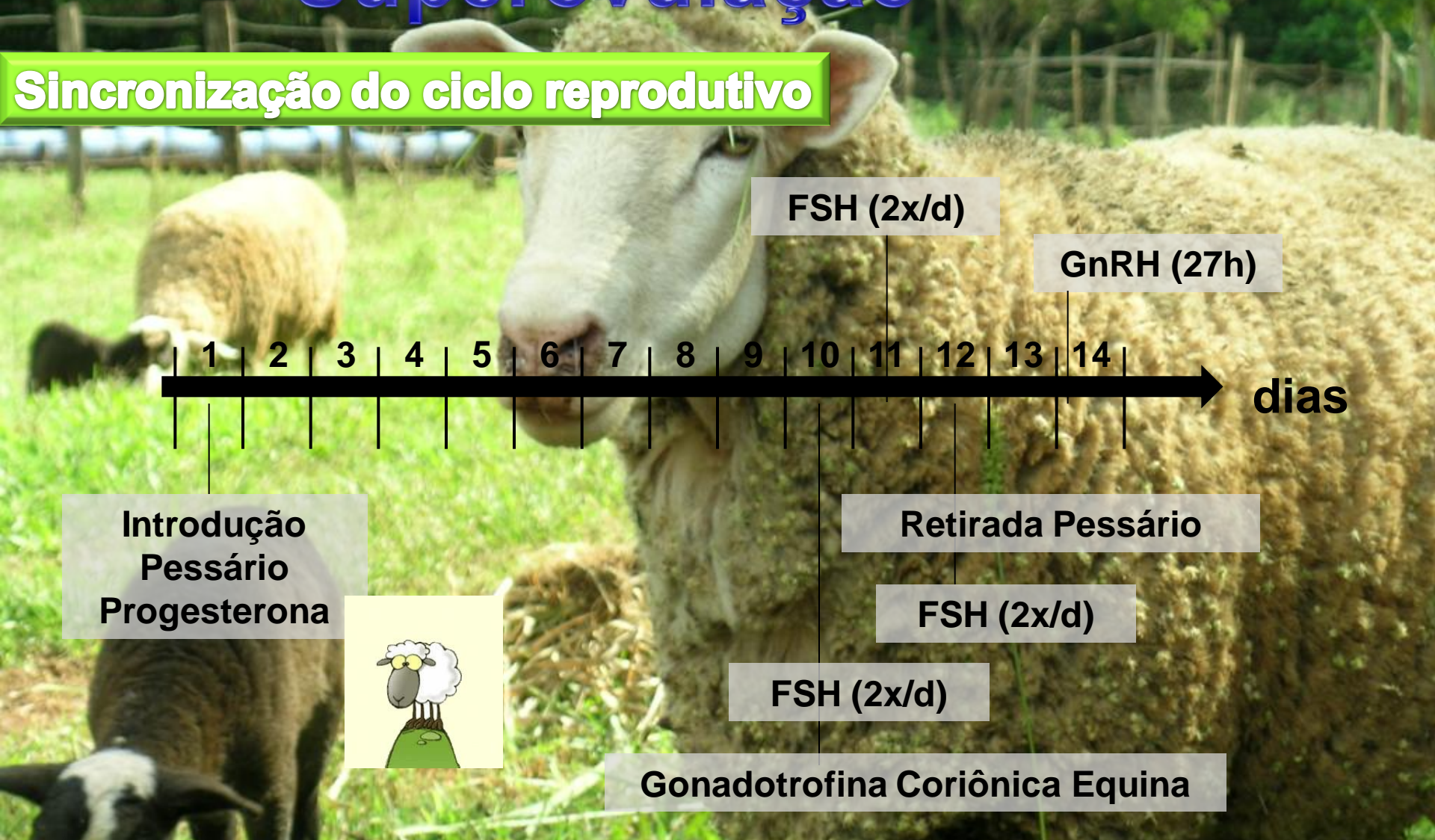


MATERIAIS E MÉTODOS



Superovulação

Sincronização do ciclo reprodutivo



MATERIAIS E MÉTODOS



Inseminação Artificial e Coleta de Embriões

**IA por
laparoscopia**



**Coleta por
lavagem, através
de laparoscopia,
6-7 dias após a IA**

**Armazenagem à
38,5°C em um oviduto
sintético**

**Transferência dos
embriões para as ovelhas
receptoras NO MESMO
DIA**

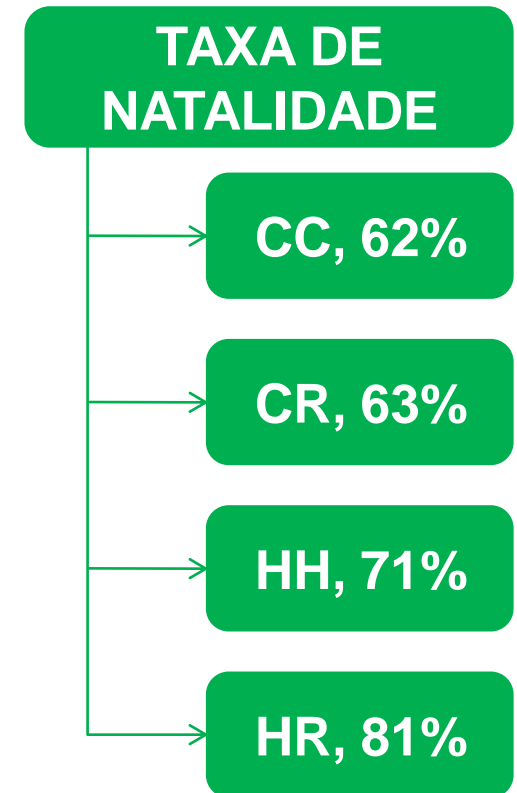
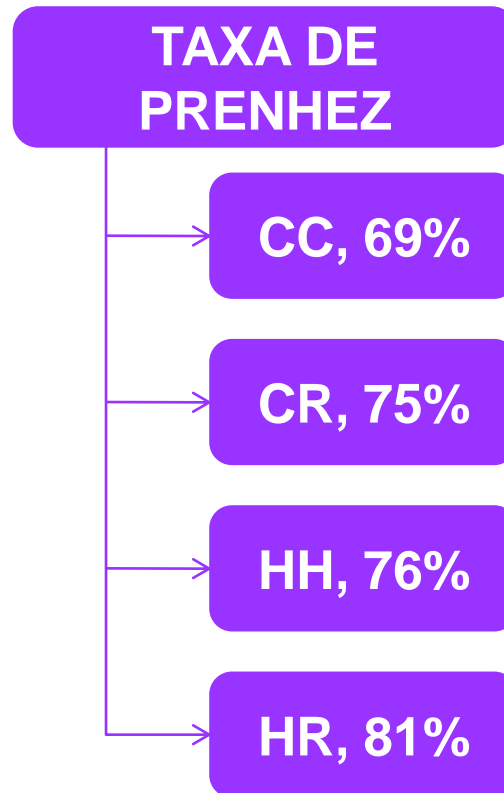
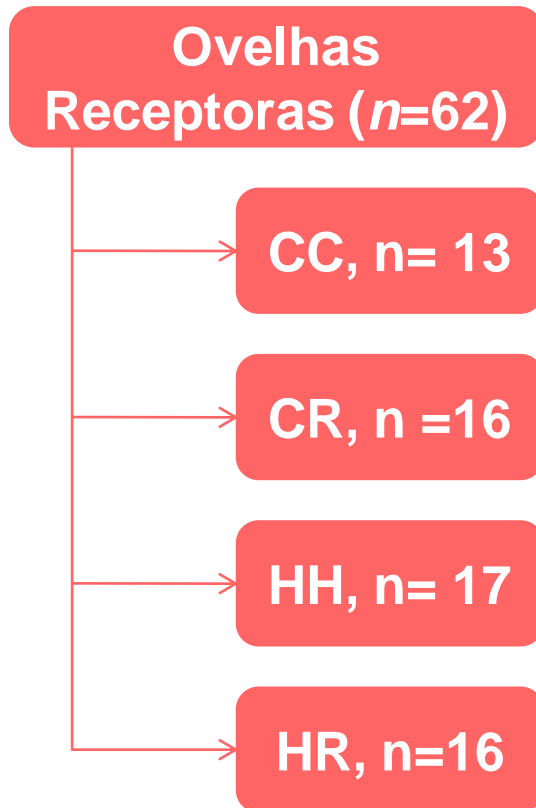


Transferência de Embriões

100% EM

Dieta Controle (100% EM)

1 EMBRIÃO
PARA CADA
OVELHA



Coletas Sanguíneas



**Primeiros 4 dias
após o
nascimento**

**1 vez por semana
Semanas 3, 6 e 8**

Resposta ao Estresse



29 cordeiros
(12 sem. de idade)

X

NOITE

Privação
Alimentar

MANHÃ
Cateterismo

45/60 min.

Coleta
Sanguínea

Análise do
Cortisol e do
ACTH

MATERIAIS E MÉTODOS



Coleta de Tecidos

4 meses → cordeiros abatidos

CC, n=7

CR, n=10

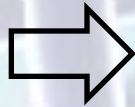
HH, n=12

HR, n=12

Glândulas adrenais retiradas, pesadas e congeladas

PCR em tempo real

ADRENAL



Extração do RNA
(reagente TRIZOL)



Síntese de cDNA por
transcrição
reversa (Sobrescrito III)

11-hidroxiesteróide desidrogenase (HSD) 2

receptor glicocorticóide (GR)

receptor de ACTH (MC2R)

citocromo P-450 17-hidroxilase (CYP17)

3 β HSD

TGF β 1

IGF1

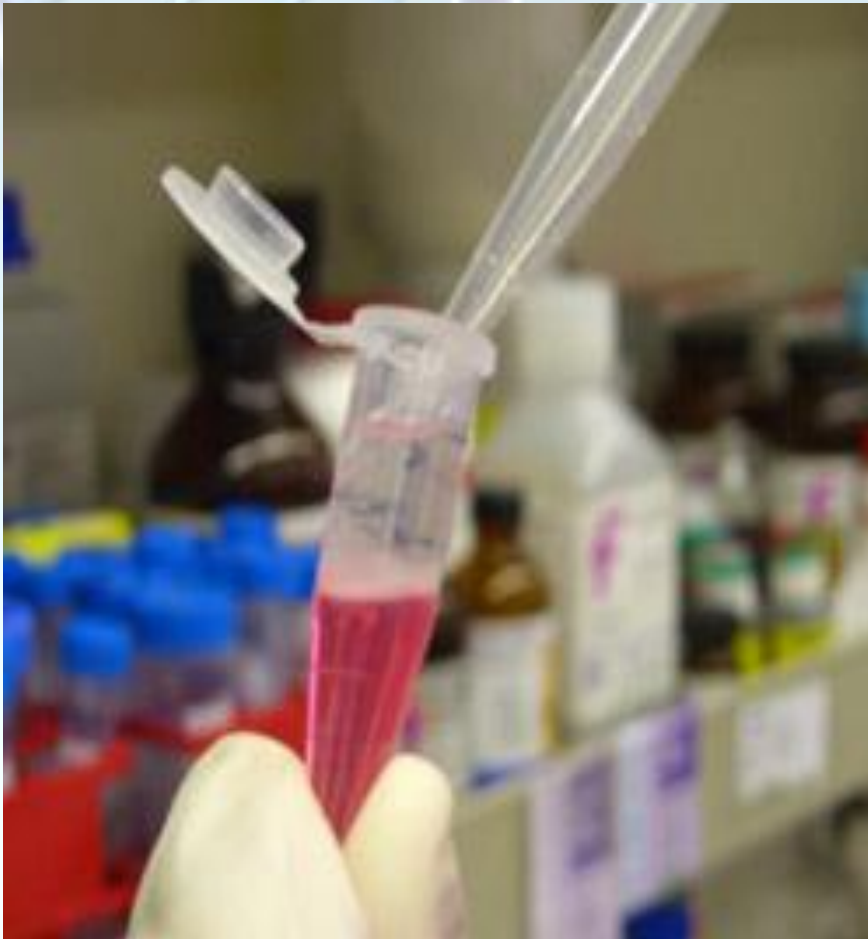
IGF1R

IGF2

IGF2R

Software de Análise Q-Gene

Análise de metilação



IGF2

IGF2R

Enzimas de restrição

Primers específicos

Regime Nutricional

Superovulação Transferência de Embriões

Gestação

Após a morte

4 meses

1 mês

e0 d10-7

Nascimento

Cordeiros com 4 meses de idade

HH

Ab lib

100% ME

HR

Ab lib

100% ME

70% ME

CC

100% ME

100% ME

CR

100% ME

100% ME

70% ME

Ovelhas doadoras

Ovelhas receptoras

Análise Estatística

Statistical Package for the Social Sciences (version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

STATA10: Data Analysis and Statistical Software para medidas repetidas (Stata- Corp LP, College Station, TX, USA)

**ANOVA (analise of variance)
One-way ANOVA
Two-way ANOVA**

Média \pm SE (erro padrão)

A probabilidade de 5% ($P < 0,05$) foi considerado como o nível de significância para todas as análises

ANOVA (para medidas repetidas):

Efeito do regime nutricional sobre os pesos e os ECCs das ovelhas doadoras

ONE-WAY ANOVA

Comparação da taxa de prenhez, da taxa de natalidade entre os grupos

TWO-WAY ANOVA

Efeito do regime nutricional e do sexo no peso dos cordeiro ao nascer, peso corporal e peso das adrenais aos 4 meses de idade, no cortisol plasmático, na concentração de ACTH em resposta ao estresse, e na expressão de mRNA nas glândulas adrenais.

RESULTADOS



Peso das ovelhas doadoras e receptoras

Fig. 01) Peso (em Kg) das ovelhas doadoras, 1 mês antes da concepção.
($P < 0,001$)

Ovelhas doadoras	Peso (kg) mês antes da concepção
CC (n=6)	58,8±1,1
CR (n=6)	58,8±1,0
HH (n=6)	72,7±2,6
HR (n=5)	73,0±1,4

Doadoras – antes do início do regime de alimentação:

NÃO APRESENTOU DIFERENÇA SIGNIFICATIVA

RESULTADOS



Fig. 02) Ganho de peso (em Kg) das ovelhas durante o período experimental ($P < 0,001$)

Ovelhas doadoras dos grupos	Ganho de peso (kg)
CC (n=6)	6,2±0,8
CR (n=6)	3,2±0,9
HH (n=6)	17,6±0,8
HR (n=5)	13,7±0,8

RESULTADOS



Fig. 03) ECC das doadoras de 1 mês antes da concepção até a transferência dos embriões, 6-7 dias após a concepção. ($P < 0,001$)

Ovelhas doadoras	ECC (escala de 1 a 5)
CC (n=6)	3.13 ± 0.09 a
CR (n=6)	3.00 ± 0.06 a
HH (n=6)	4.08 ± 0.08 b
HR (n=5)	4.35 ± 0.10 c

RESULTADOS



Duração da gestação e peso dos cordeiros

Fig. 04) Duração da gestação nos diferentes grupos de tratamento nutricional

GRUPO	CC (n=7)	CR (n=10)	HH (n=12)	HR (n=12)
Duração da Gestação (d)	149,7±0,7	150,1±0,4	150,8±0,3	150,5±0,6

Tratamento Nutricional



Duração da Gestação

RESULTADOS



Fig. 05) Relação entre o peso de machos e fêmeas, ao nascer e aos 4 meses

	MACHOS (n=21)	FÊMEAS (n=20)	P
peso ao nascer (kg)	6,1±0,1	5,2±0,1	P<0,001
peso aos 4 meses (kg)	33,6±0,7	30,0±0,5	P=0,001

Peso relativo da adrenal



Sexo X Peso da adrenal

RESULTADOS



Concentrações de ACTH plasmático

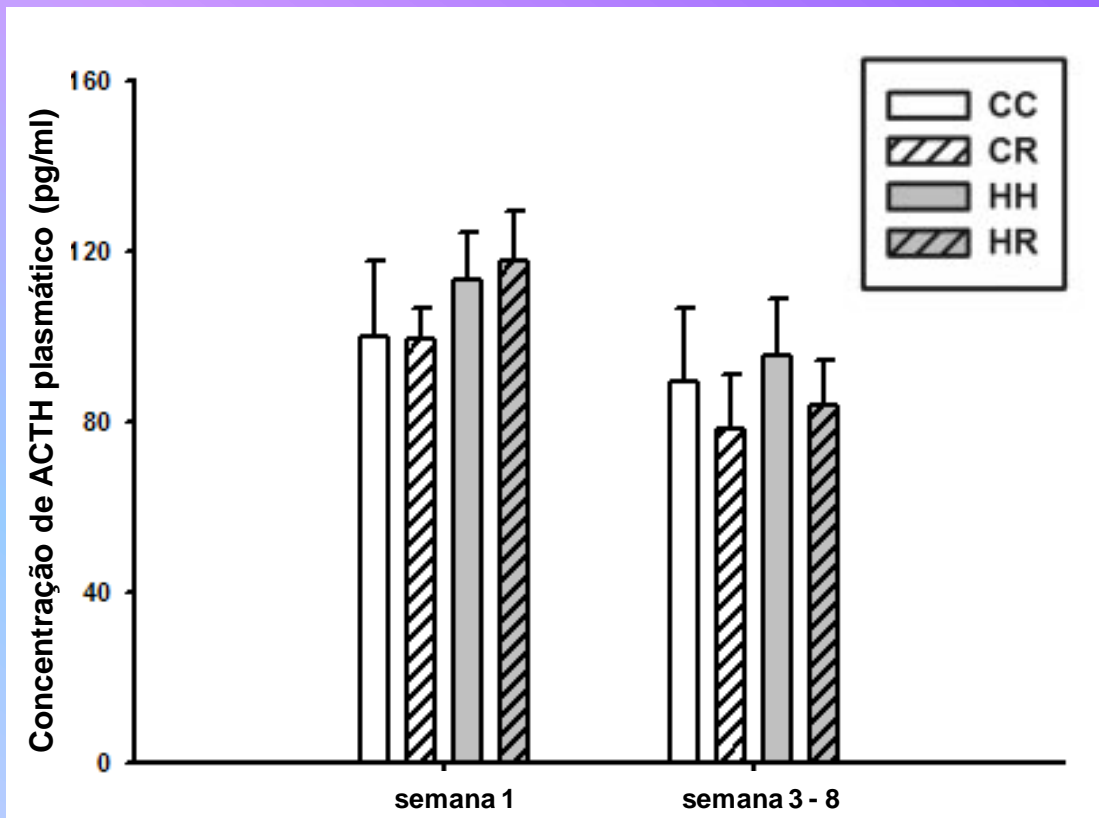


Fig. 06) Concentrações plasmáticas de ACTH (em pg/ml) na semana 1 e na semana 3-8 após o nascimento nos cordeiros, CC CR, HH e HR. ($P < 0,01$).

RESULTADOS



Concentrações de cortisol plasmático

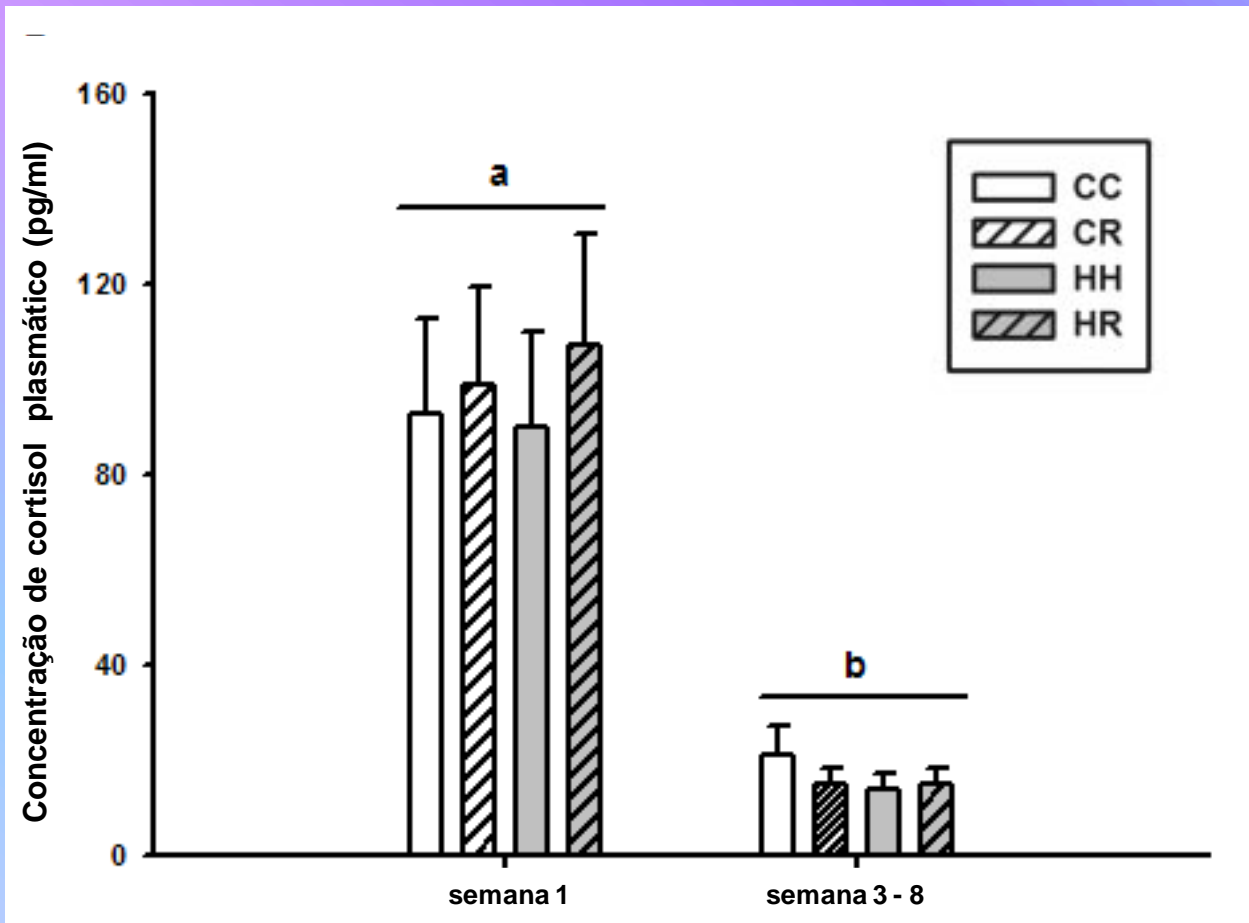


Fig. 07) Concentrações plasmáticas de cortisol (em nmol/L) na semana 1 e na semana 3-8 após o nascimento nos cordeiros, CC CR, HH e HR. Sobrescritos diferentes, incluindo *a* e *b* denotam os grupos de tratamento que são significativamente diferentes entre si, em concentrações de cortisol plasmático ($P < 0,01$).

RESULTADOS



Cortisol plasmático em resposta ao estresse na 12ª semana

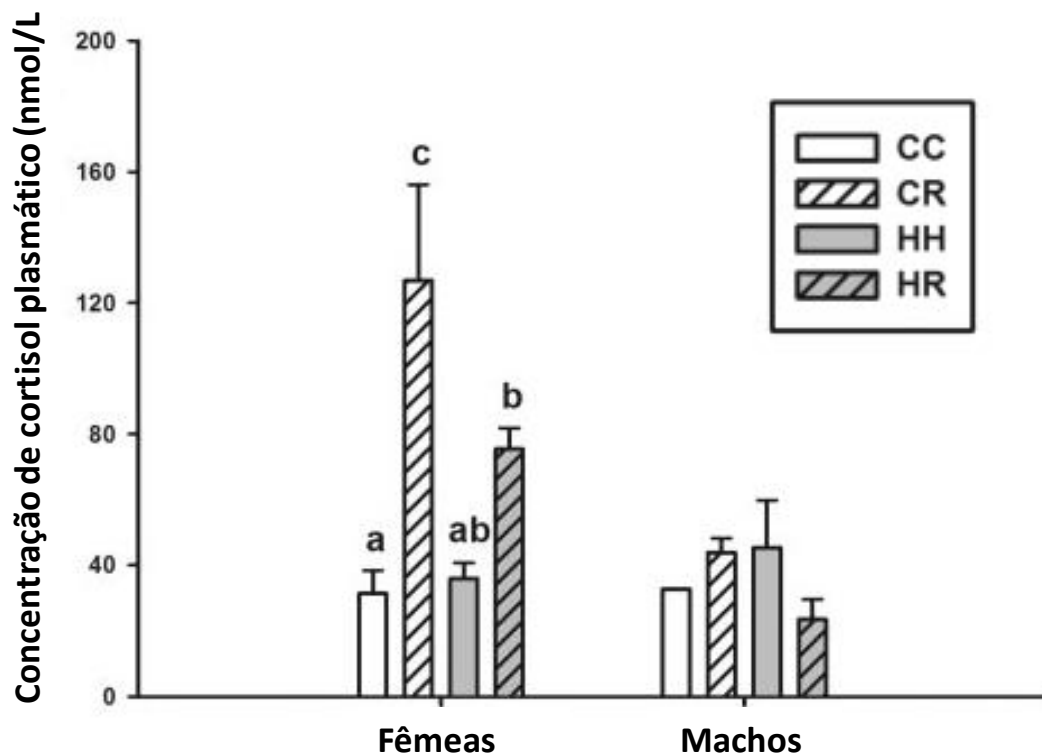


Fig. 08) Concentração de cortisol plasmático em resposta ao estresse dos cordeiros na 12ª semana, nos grupos CC, CR, HH e HR. Os sobrescritos (a, b, c) denotam grupos de tratamentos que foram significativamente diferentes uns dos outros em cordeiros fêmeas, mas não em cordeiros machos ($P < 0,05$).

Tratamento /sexo X Cortisol plasmático

RESULTADOS



ACTH plasmático em resposta ao estresse na 12ª semana

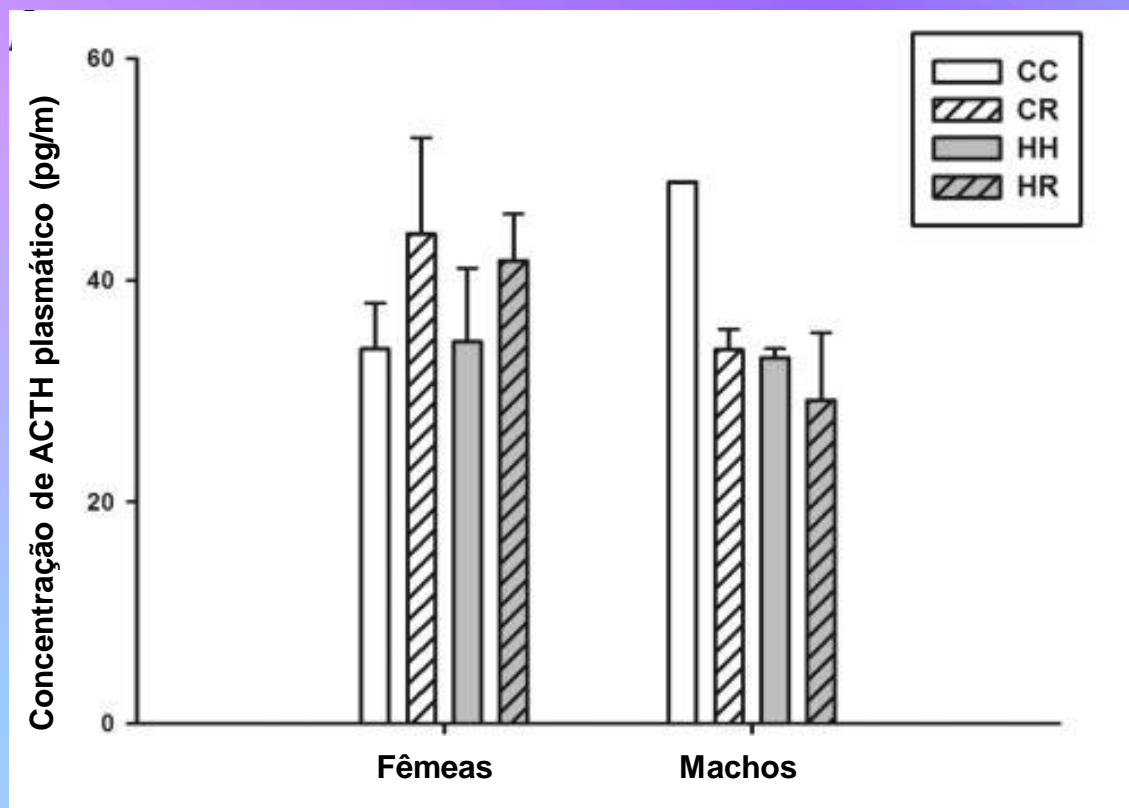


Fig. 09)
Concentração de ACTH plasmático em resposta ao estresse dos cordeiros na 12ª semana

Tratamento /sexo X ACTH plasmático

RESULTADOS



Efeito da nutrição, no período periconcepcional, na expressão de mRNA de IGF1 na glândula adrenal

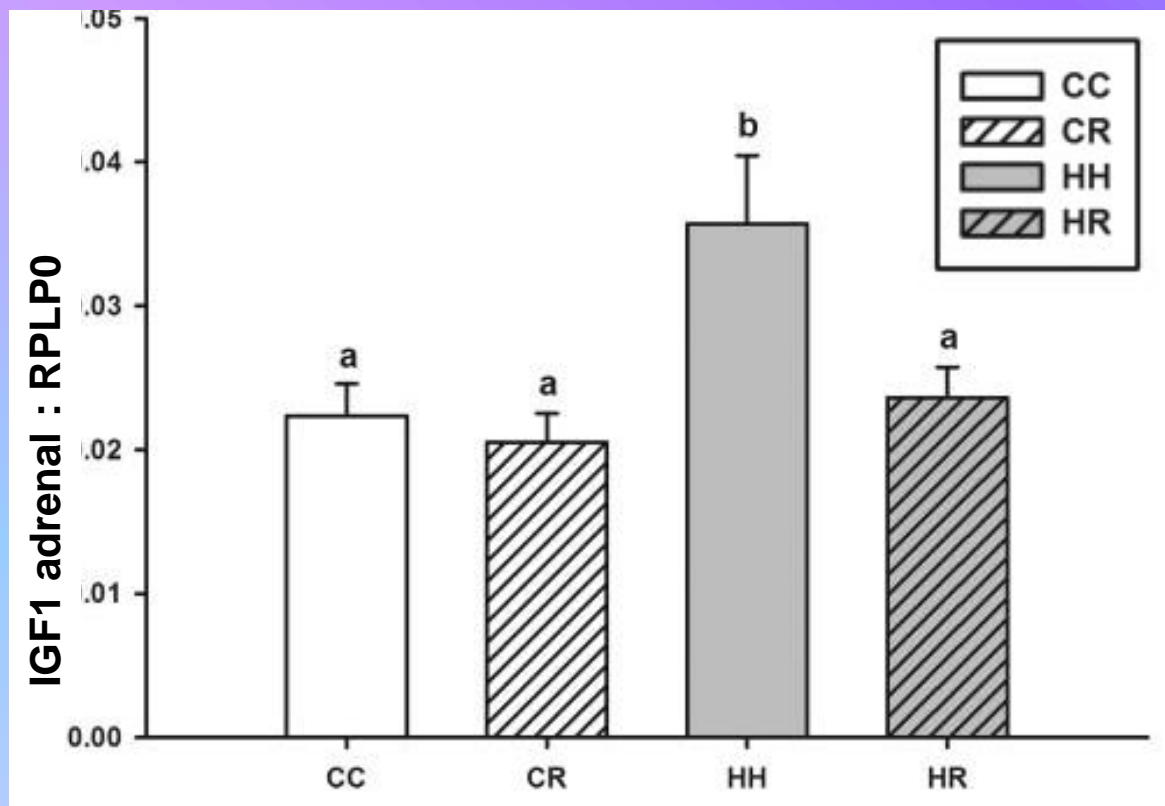


Fig. 11) Expressão de mRNA de IGF1 adrenal nos cordeiros ($P < 0,05$)

RESULTADOS



Efeito da nutrição, no período periconcepcional, na expressão de mRNA de IGF1R na glândula adrenal

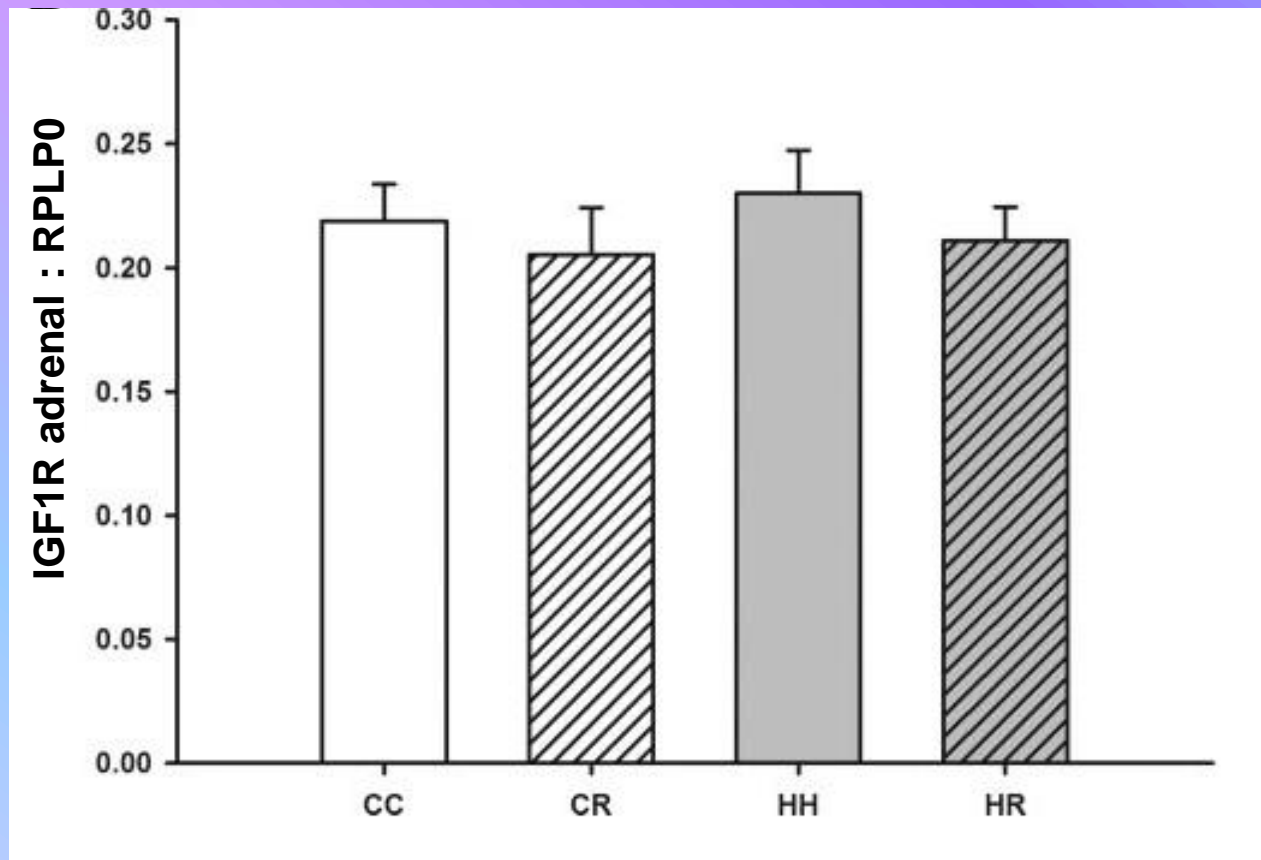


Fig. 12) Expressão de mRNA de IGF1R adrenal nos cordeiros ($P < 0,05$)

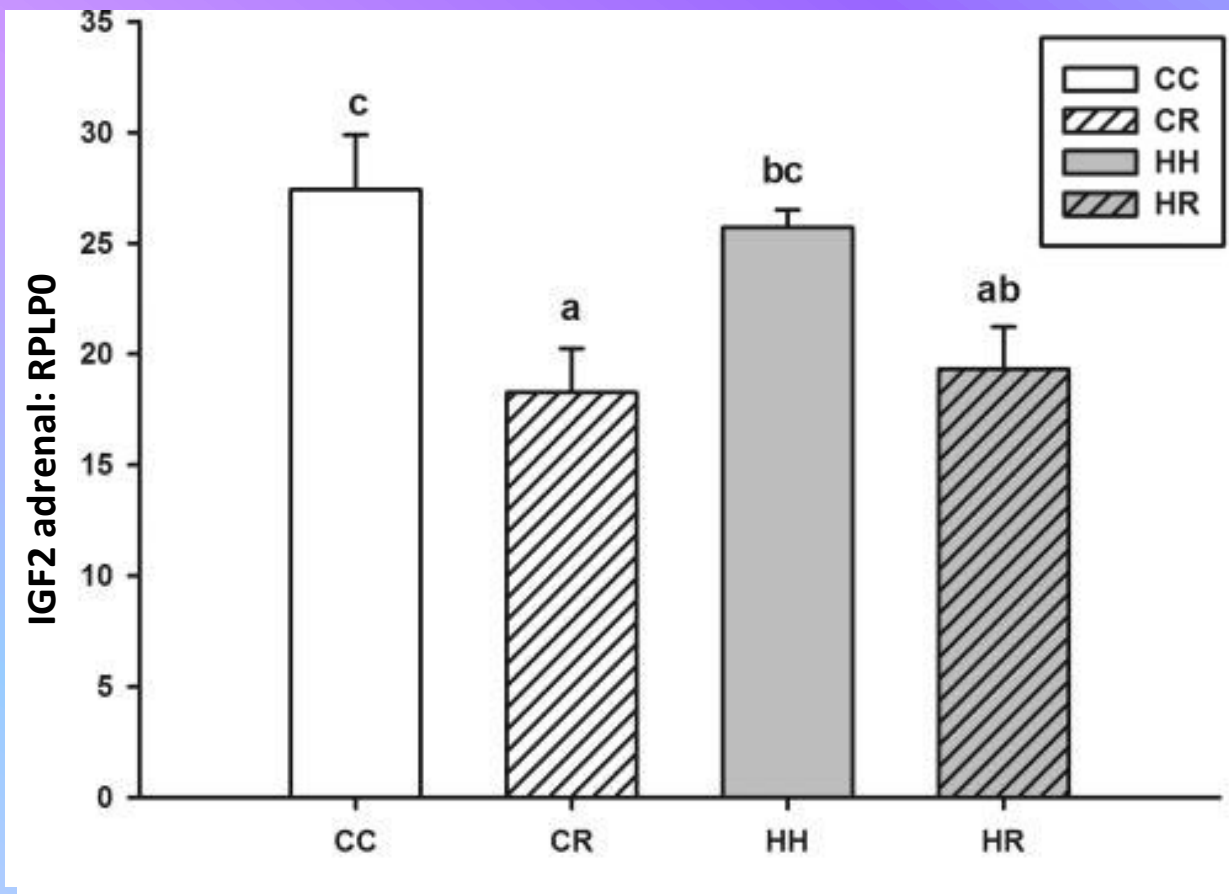
Subnutrição e/ou restrição alimentar X IGF1 adrenal

RESULTADOS



Efeito da nutrição, no período periconcepcional, na expressão de mRNA de IGF2 na glândula adrenal

Fig. 13) Expressão de mRNA de IGF2 adrenal nos cordeiros ($P < 0,05$)



RESULTADOS



Efeito da nutrição no período periconcepcional na metilação do IGF2/H19 adrenal e metilação de IGF2R

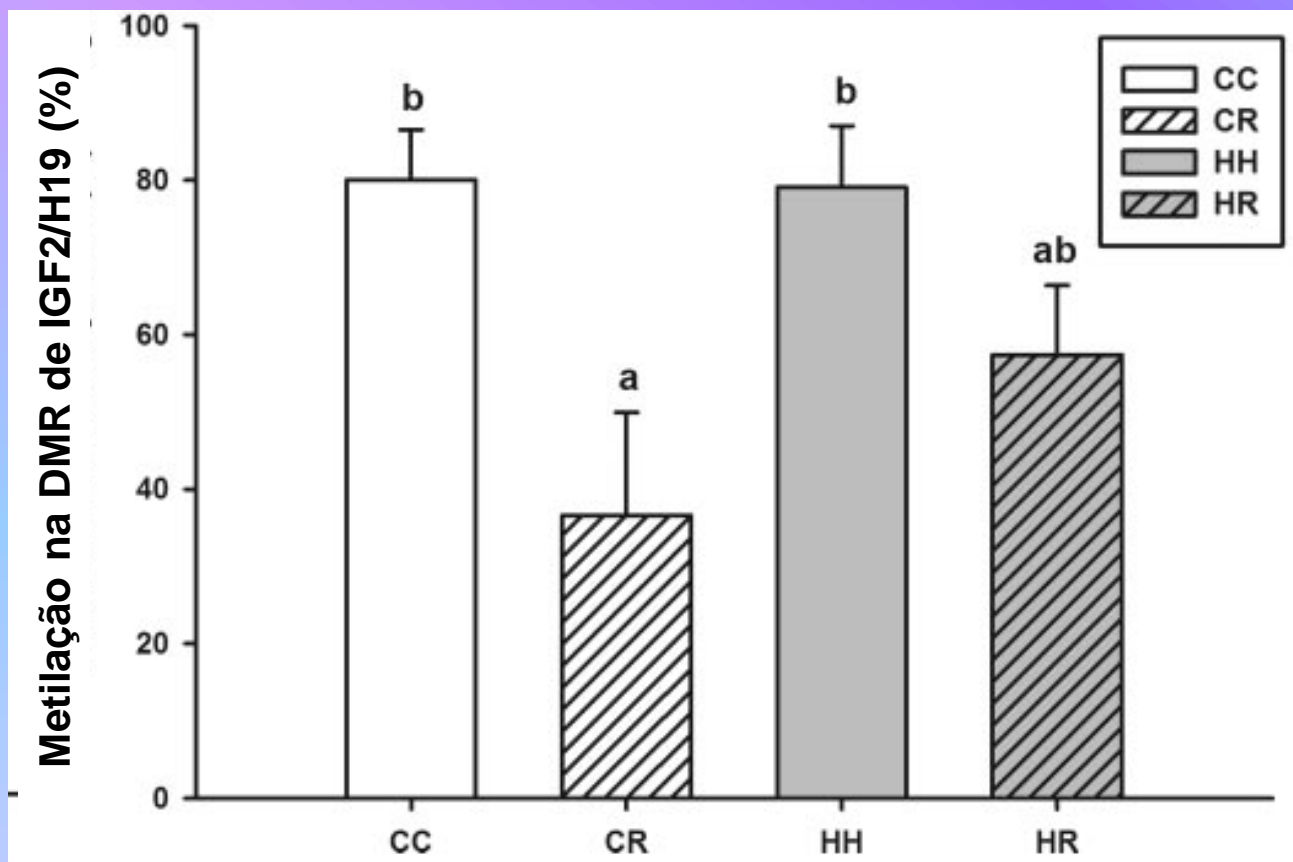
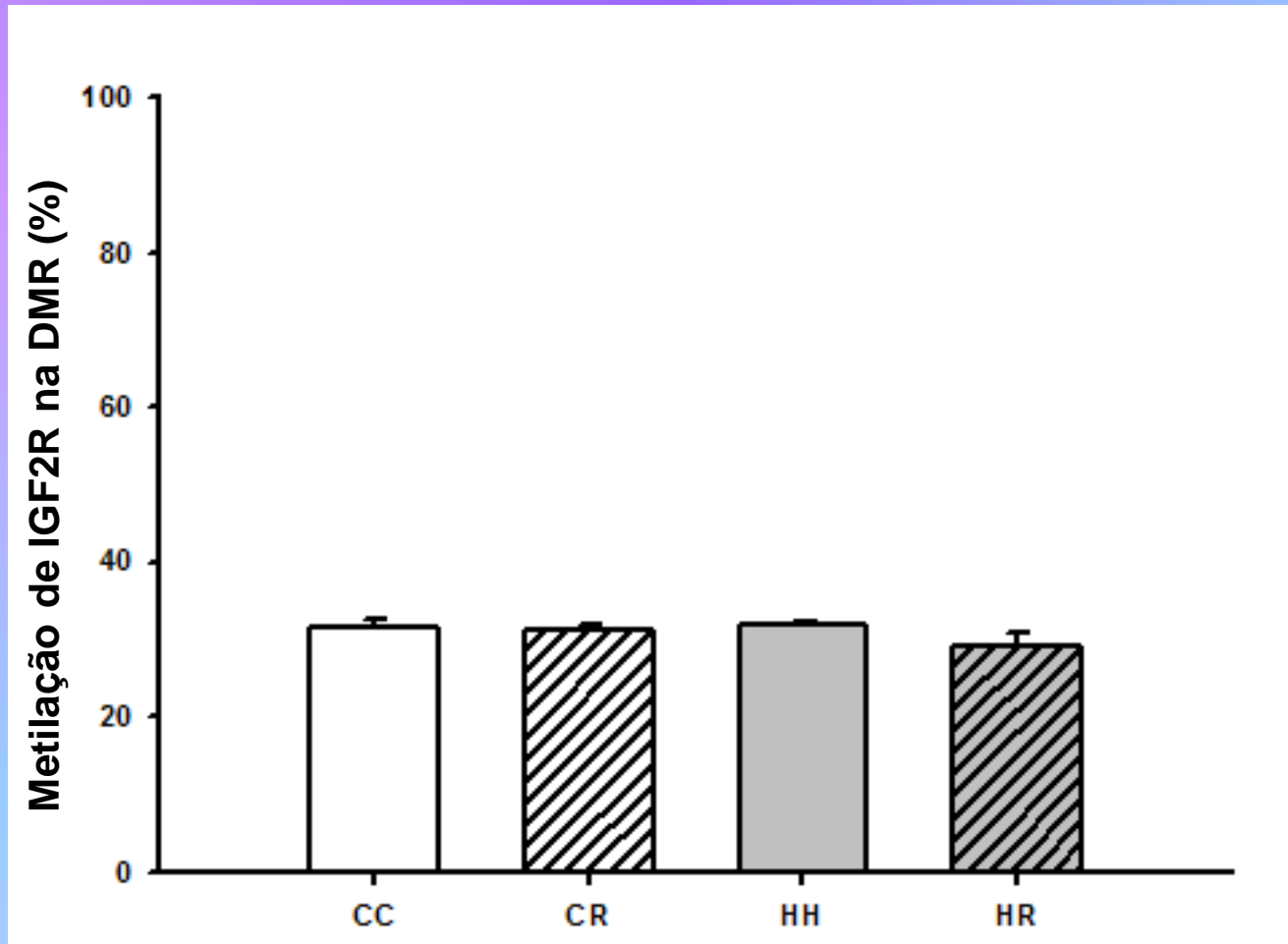


Fig. 14) Percentual de metilação na DMR do gene IGF2/H19 ($P < 0,05$)

RESULTADOS



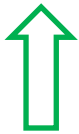
Fig.15) Percentual de metilação da DMR do gene IGF2R



DISCUSSÃO



RESTRIÇÃO DE CONSUMO DE ENERGIA NO PERÍODO PERICONCEPCIONAL, EM OVELHAS COM SOBREPESO OU OBESAS



crescimento adrenal em machos e fêmeas



resposta do cortisol ao estresse em fêmeas



DISCUSSÃO



SUPERNUTRIÇÃO OU SUBNUTRIÇÃO MATERNA NO PERÍODO PERICONCEPCIONAL:



Duração da gestação



Ativação pré-parto mais cedo do eixo HPA fetal



PESO DA ADRENAL



em cordeiros com 4 meses

- expostos à subnutrição no período periconcepcional
- nascidos de ovelhas normalmente nutridas



DISCUSSÃO



AUMENTO DO PESO DAS ADRENAIS, NOS GRUPOS CR e HR



expressão de mRNA de IGF2 adrenal



nível de metilação dos genes IGF2/H19

*IGF2 é expresso nas células esteroidogênicas 60 dias após a gestação

*IGF1 e IGF2 são mitógenos para as células adrenais

Em cordeiros com crescimento fetal restrito:



expressão de IGF2 adrenal



peso das adrenais



*IGF2 adrenal (*in vivo*) inibe o crescimento adrenal

DISCUSSÃO



EXPOSIÇÃO DO EMBRIÃO, FETO OU RECÉM NASCIDO A CONDIÇÕES AMBIENTAIS ADVERSAS



Alteração no desenvolvimento do eixo HPA



Alteração das respostas ao estresse na prole

- O crescimento da adrenal (através da mudança no estado epigenético de IGF2) desencadeia alterações da resposta do HPA ao estresse



DISCUSSÃO



EXPOSIÇÃO DO EMBRIÃO AO AMBIENTE NUTRICIONAL *IN VITRO*



metilação de IGF2R



expressão de mRNA de IGF2R nos tecidos fetais

Nas glândulas adrenais dos cordeiros CR e HR

NÃO HOUE mudanças nos padrões de metilação ou na expressão de IGF2R

HOUE uma relação direta entre os níveis de expressão de IGF2 e mRNA de IGF2 adrenal (o que não ocorreu nos cordeiros CC e HH)

↓ expressão de mRNA de IGF2 (abaixo da limiar de expressão)

→ ↓ expressão de IGF2R



DISCUSSÃO



EXPOSIÇÃO DO OVÓCITO e/ou EMBRIÃO À SUPERNUTRIÇÃO MATERNA NO PERÍODO PERICONCEPCIONAL (HH)



↑ expressão de IGF1 adrenal, após o nascimento

→ NÃO foi associado com o aumento do peso da adrenal

***IGF1 em fetos estimula o aumento no peso das adrenais**



DISCUSSÃO



NOS GRUPOS CR e HR

Massa adrenal aumentada

apesar disso

[] ACTH/cortisol basal plasmático, não foram maiores em comparação aos grupos CC e HH

EM FÊMEAS



[] cortisol plasmático



NÃO houve uma resposta maior do ACTH ao estresse

** Diferença no tempo de resposta do cortisol ao estresse*



DISCUSSÃO



EM FÊMEAS (CR e HR)



resposta do cortisol ao estresse

NÃO foi associado a expressão aumentada de MC2R, 3 β HSD, CYP17, GR ou 11 β HSD2



resposta esteroidogênica adrenal ao estresse



massa adrenal


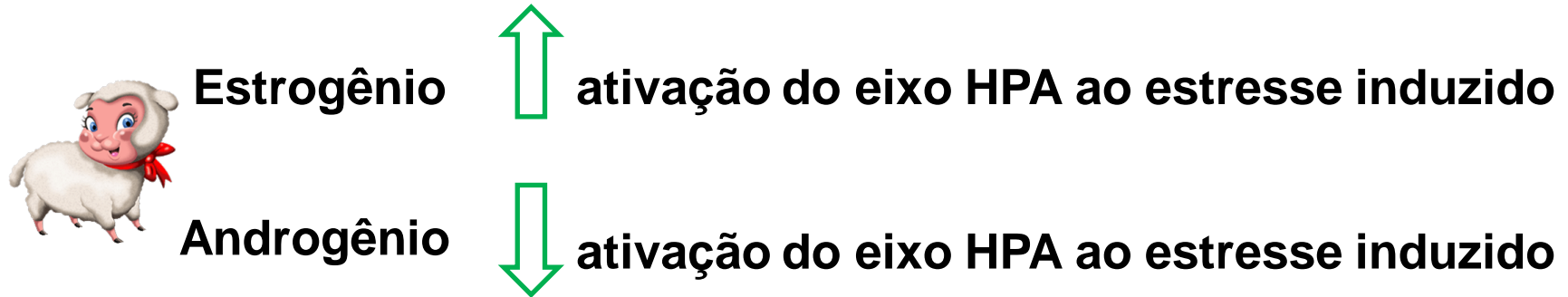
mudança no estado epigenético de IGF2 adrenal



DISCUSSÃO




DIFERENÇA DO SEXO NA REGULAÇÃO DO EIXO HPA



Em fêmeas, a resposta adrenal e esteroidogênica*, é aumentada

*devido a diferenças nas últimas fases da esteroidogênese



Em fêmeas, a produção de cortisol basal é menor, enquanto que a resposta do cortisol ao ACTH, é maior



CONCLUSÃO



O estudo fornece evidências de que a restrição alimentar no período imediatamente antes e após a concepção, resultaram em crescimento adrenal nos machos e nas fêmeas, e crescimento da resposta ao estresse para o cortisol em fêmeas de 3-4 meses de idade. Essas mudanças são associadas à alterações epigenéticas do gene IGF2, na glândula adrenal do cordeiro.





OBRIGADA!!!