



Envolvimento da insulina e do hormônio do crescimento (GH) durante o desenvolvimento folicular no ovário bovino *T. Shimizu et al. 2008*

*Apresentadores: Vinícius Boechel Barcelos
Igor Santa Bárbara Araújo
Orientador: Eduardo Schmitt*

INTRODUÇÃO



PERFORMANCE REPRODUTIVA

- ✓ Retorno a Ciclicidade
- ✓ Otimização Eficiência Reprodutiva
- ✓ Biotécnicas Reprodutivas
- ✓ Retorno econômico

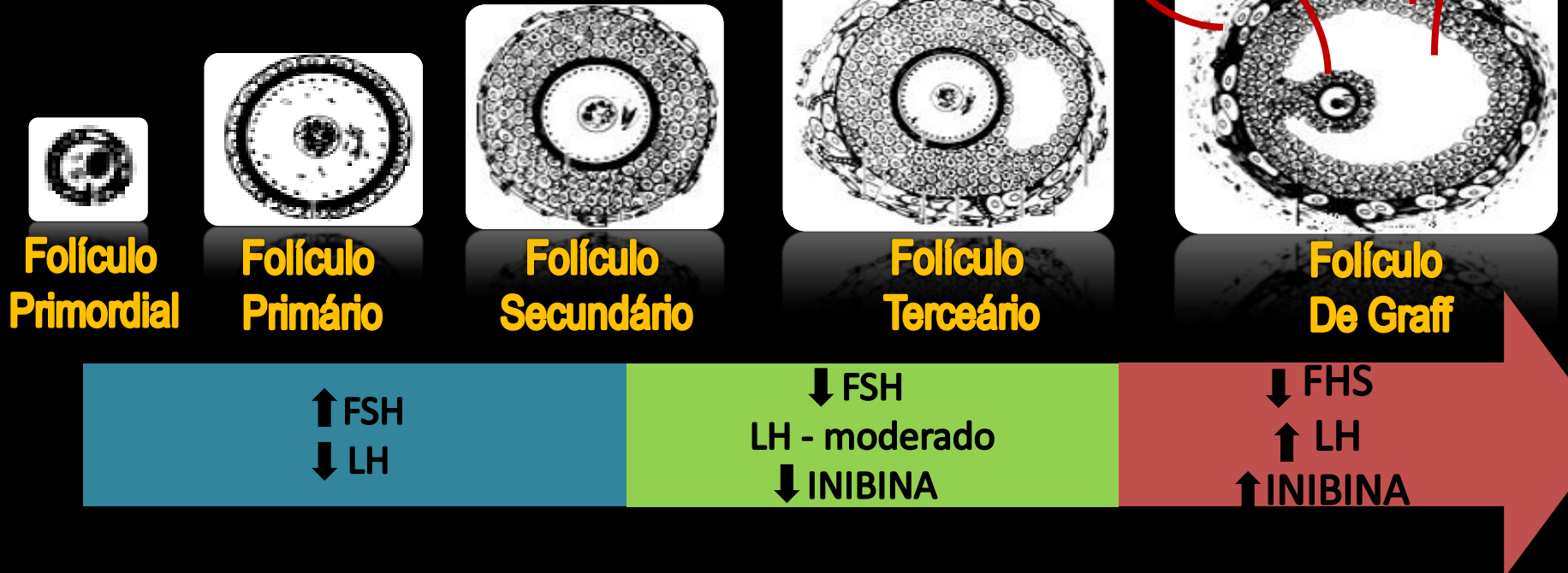
INTRODUÇÃO



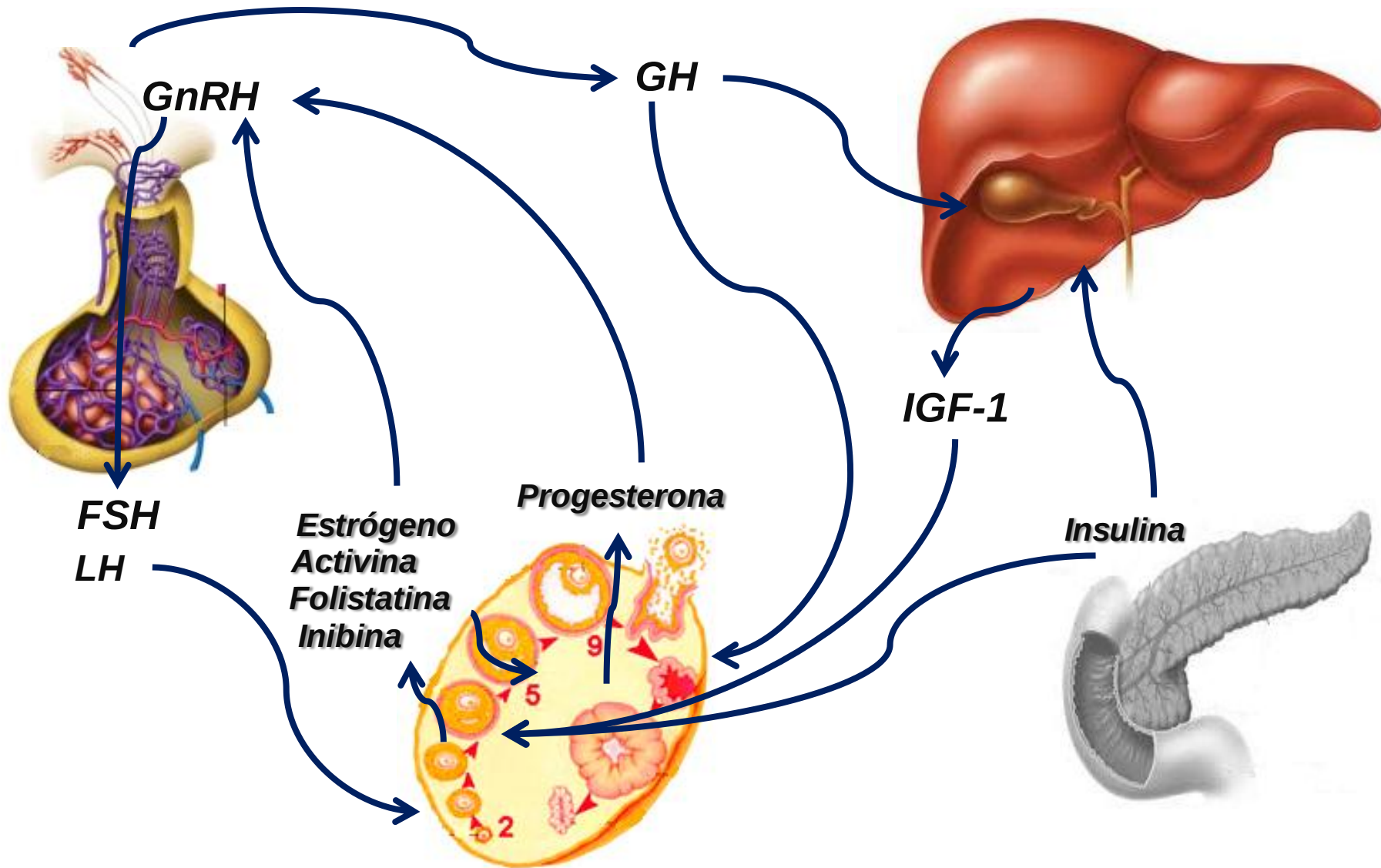
RECRUTAMENTO

SELEÇÃO

DOMINÂNCIA



INTRODUÇÃO

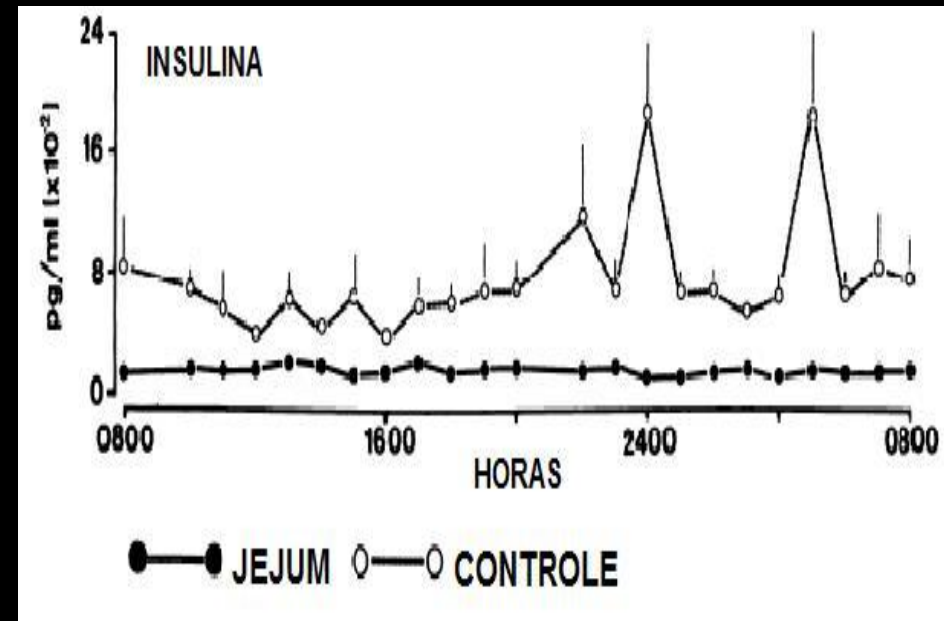
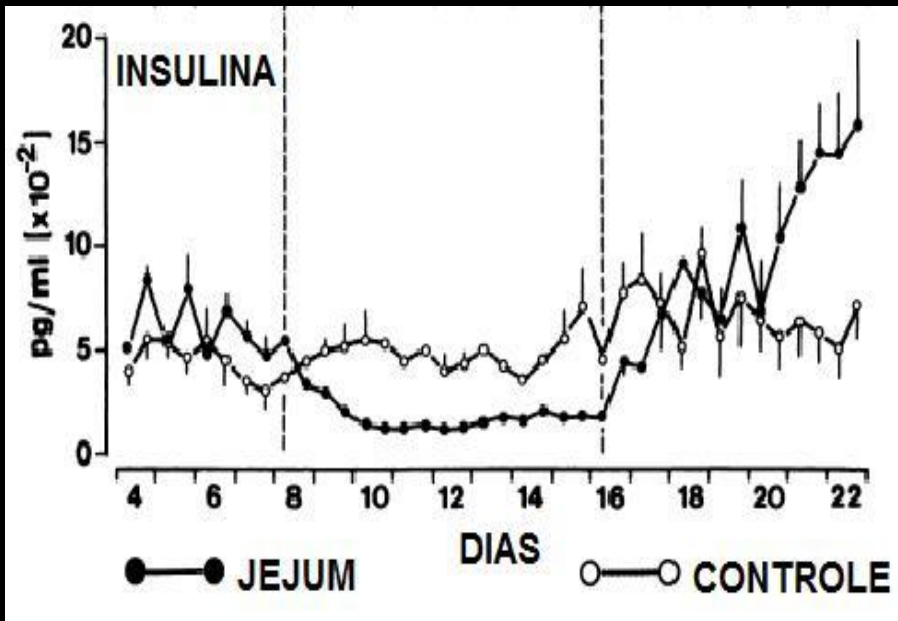


INTRODUÇÃO



CONCENTRAÇÕES DE INSULINA CIRCULANTE

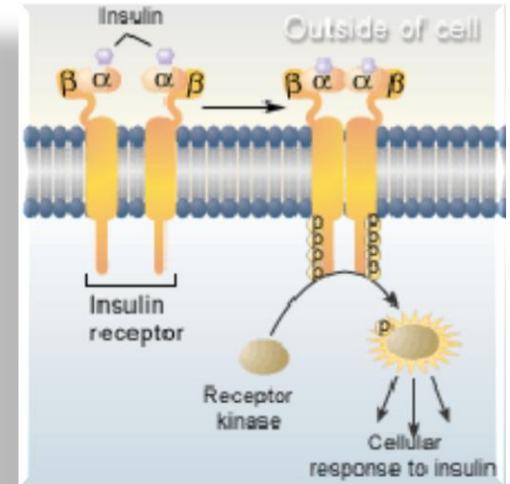
- ✓ VARIAÇÃO DURANTE O DIA
- ✓ VARIAÇÃO DURANTE O CICLO ESTRAL
- ✓ AUMENTAM SIGNIFICATIVAMENTE NO PERÍODO PRÉ-OVULATÓRIO



INTRODUÇÃO

Insulina

- ✓ **Fator mitogênico**
- ✓ **Estimula esteroidogênese**



CÉLULAS DA GRANULOSA
CÉLULAS DA TECA
ESTROMA

DIÂMETRO FOLICULAR

INTRODUÇÃO



HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH)

Estimula populações foliculares seletivamente



Inibe o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios



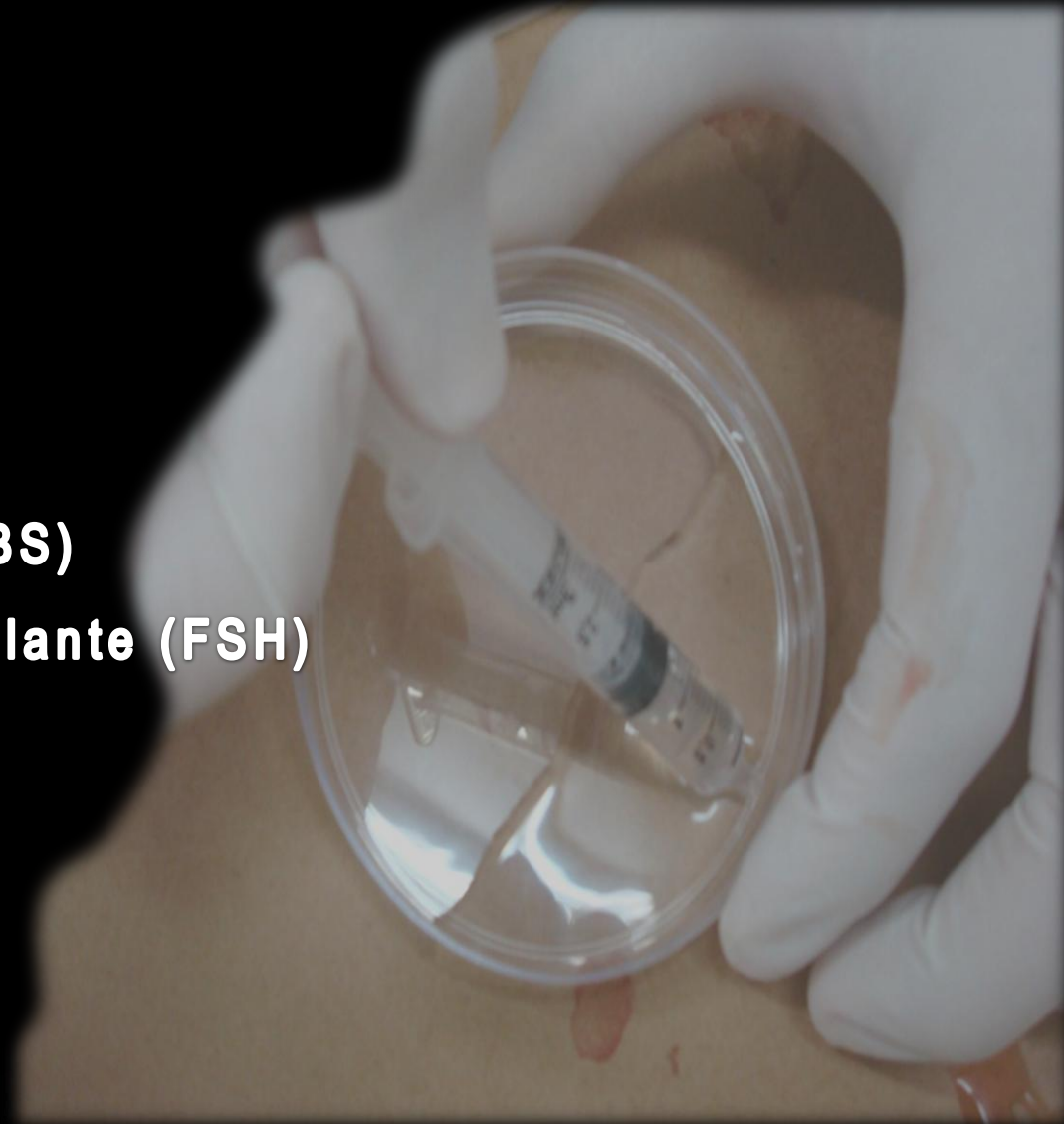
Estimula o crescimento do 2º maior folículo em novilhas

OBJETIVO 1: investigar a expressão de mRNAs para IR e GHR em células da granulosa (GCs) e tecidos da teca (TC) nos diferentes estágios de desenvolvimento dos folículos.

OBJETIVO 2: avaliar os efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e do estradiol (E2) na expressão de genes para IR e GHR em culturas de CGs de bovinos.

Materiais

- ✓ **Sarkosyl**
- ✓ **Meio DMME/F12**
- ✓ **Soro fetal bovino (FCS)**
- ✓ **Tampão fosfato salina (PBS)**
- ✓ **Hormônio folículo-estimulante (FSH)**
- ✓ **17 β -estradiol (E2)**
- ✓ **Anfotericina B**
- ✓ **Gentamicina**



MATERIAIS E MÉTODOS



Holandês X Japonês Black F1

21-26 meses de idade

Ovários:

Coletados em frigorífico

Congelados a - 20 ° C

Descongelados em temperatura ambiente

Folículos ovarianos:

Fluído folicular (FF) aspirado

Armazenados a - 20 ° C

Células da Teca (CTs) e Células da Granulosa (CGs)

Amostras de tecido do FF

Colocados em RNALater

Armazenados a - 30 ° C



Classificação dos folículos:

PARÂMETROS:

- [] de E2 no FF
- Relação E2/PG no FF

✓ Diâmetro dos folículos
determinados pelo peso do FF

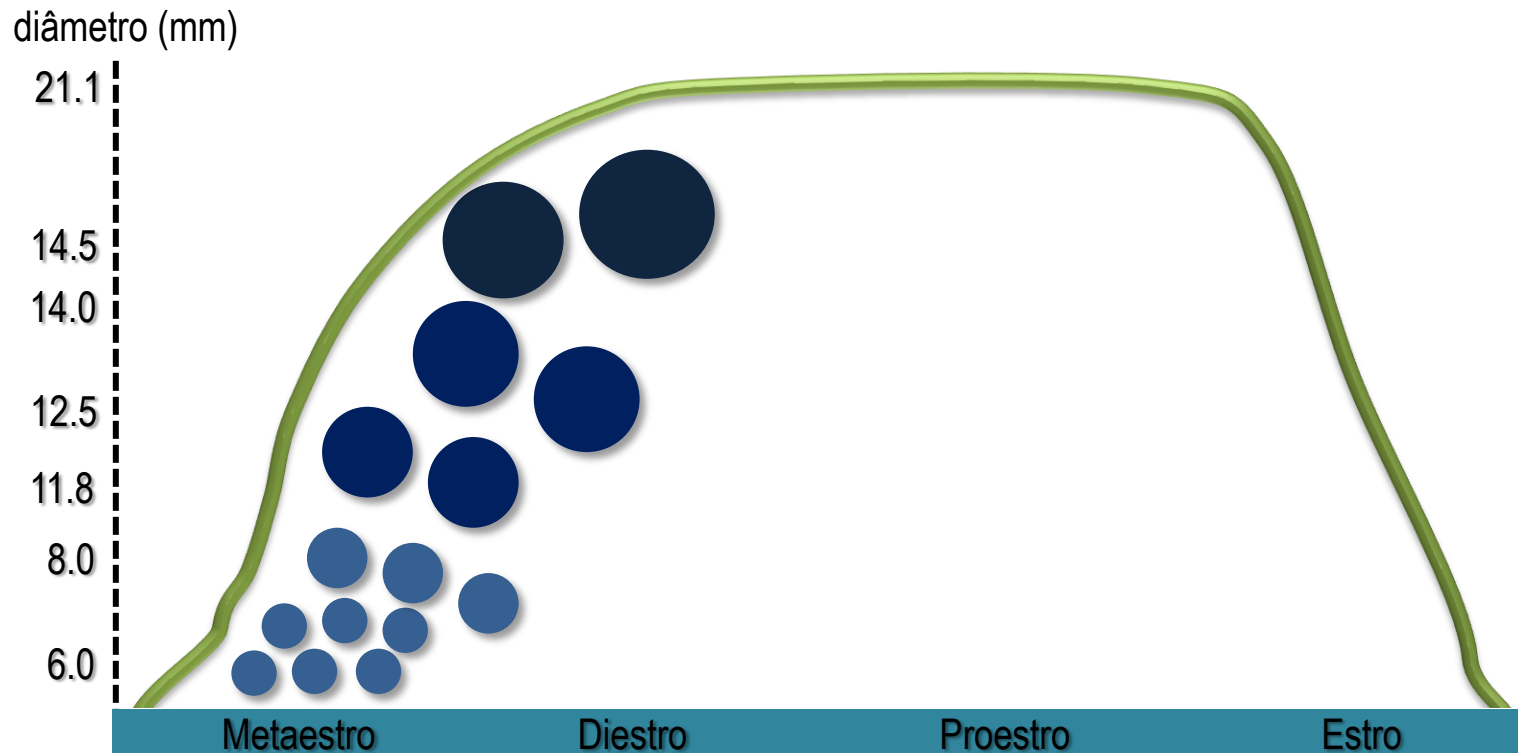
POF – Folículo pré-ovulatório

EID – Folículo estrógeno inativo $E2/P4 < 1$

EAD – Folículo estrógeno ativo $E2/P4 \geq 1$

SF – Vários folículos pequenos

Principais conclusões:



Cultura das células da Granulosa:

- ❖ Folículos pequenos de GCs (4-7 mm) aspirados
- ❖ Filtrados
- ❖ Células centrifugadas
- ❖ Lavadas duas vezes em meio DMEM/F12 + anfotericina B + gentamicina
- ❖ Cultivadas em SFB 10%, 24 horas a 37 ° C em 5% de CO₂
- ❖ Poços foram lavados com PBS (tampão fosfato salina)
- ❖ Meio de cultura : soro livre + E2 ou FSH tempo de cultivo 6 h.

MATERIAIS E MÉTODOS



MENSURAÇÃO DO GH E INSULINA

- FF: Ensaio Imunoenzimático (ELISA);

MENSURAÇÃO DA EXPRESSÃO DE mRNA para IR e GHR

- PCR Quantitativo

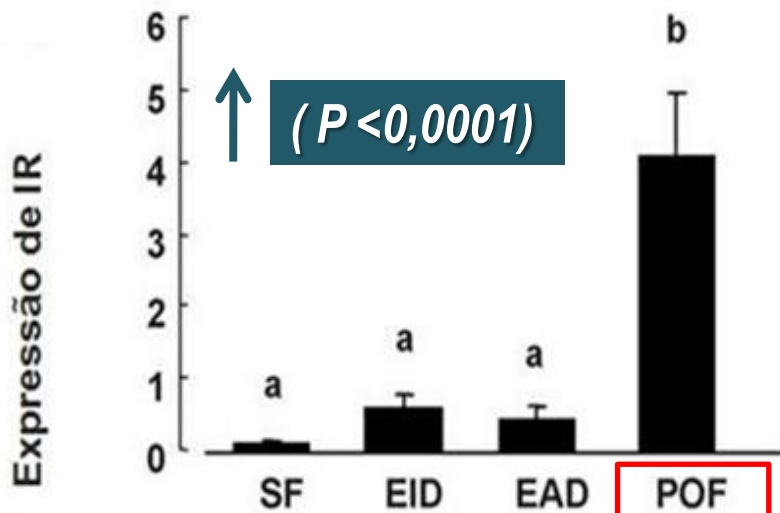
- Extração de mRNA com Trizol® e transcrição reversa

RESULTADOS E DISCUSSÃO

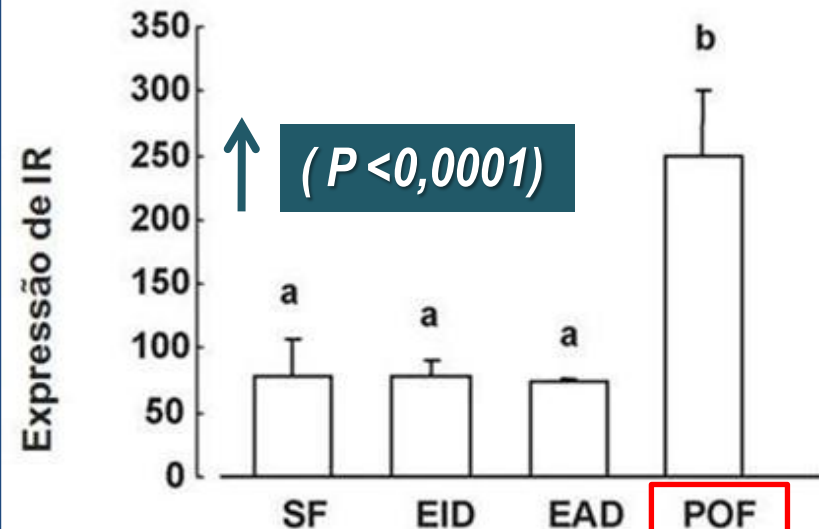


Expressão de IR

CÉLULAS DA GRANULOSA



CÉLULAS DA TECA



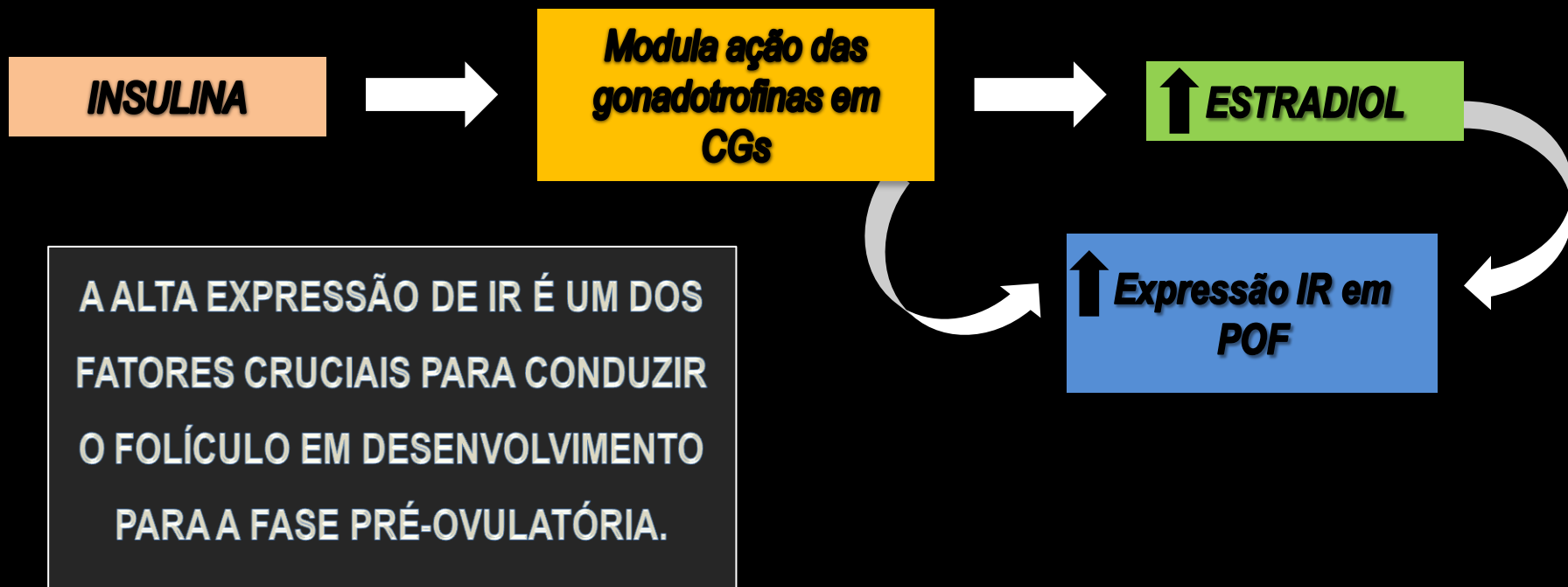
***Maior
expressão de IR
no POF***

RESULTADOS E DISCUSSÃO

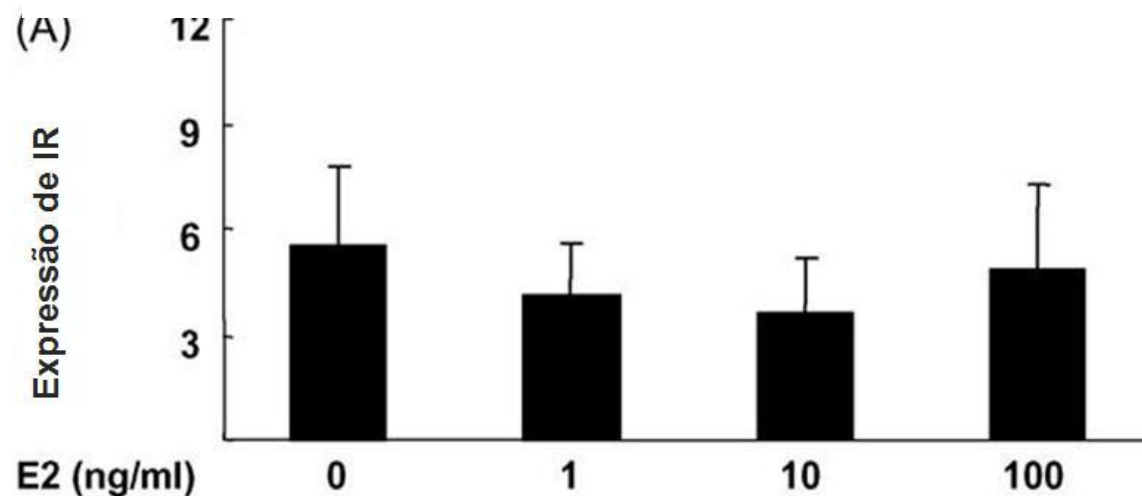
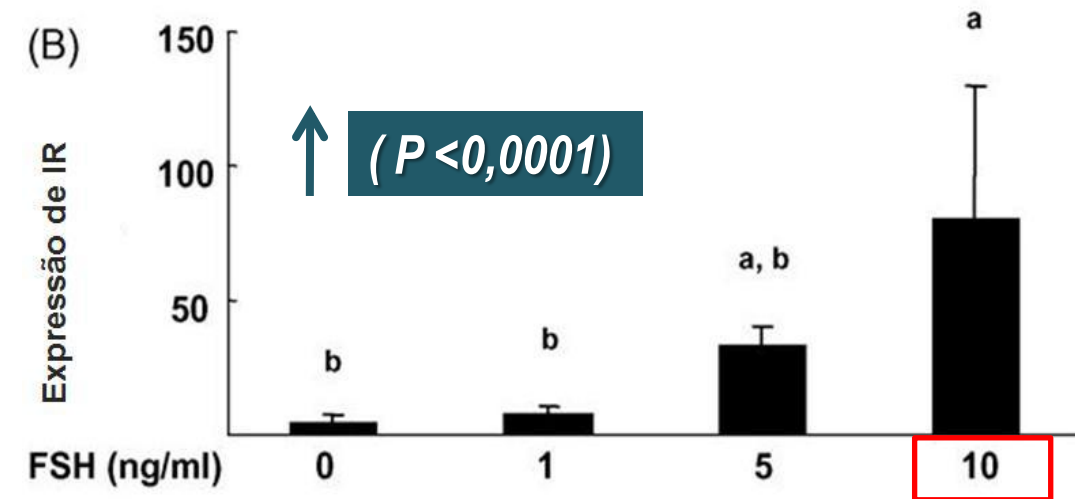


A expressão de IR foi maior nas CGs e CTs do POF, entretanto a [] de insulina não diferiu nos diferentes estágios dos folículos.

Níveis elevados de E2 no fluido folicular do POF



RESULTADOS E DISCUSSÃO



O E2 isoladamente
não possui a
capacidade de
estimular a
expressão de IR em
folículos pequenos
(4-7mm)

E2 não estimulou a expressão do gene para IR nas CGs

RESULTADOS E DISCUSSÃO



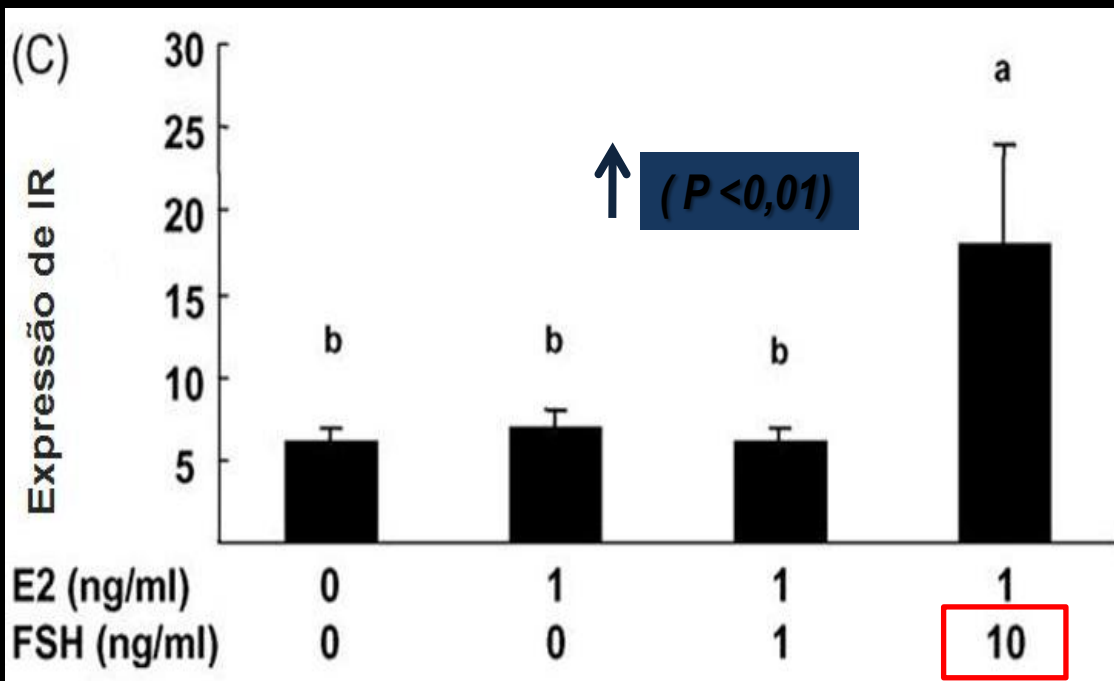
Expressão de mRNAs para receptores IR em meio E2 e FSH

FSH

FSH + E2



Estimulam a expressão de IR em cultura de CGs

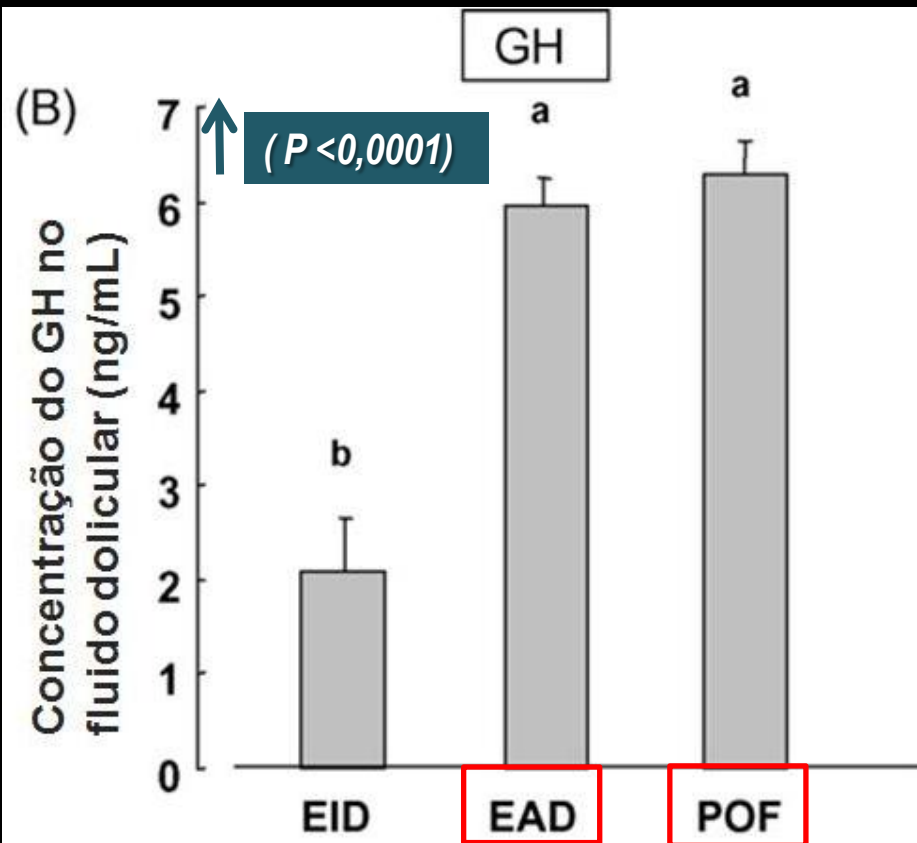


**↑ expressão de
IR nas CGs**

**Necessária para o
desenvolvimento da fase
ovulatória**

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentrações de GH no FF



RESULTADOS E DISCUSSÃO

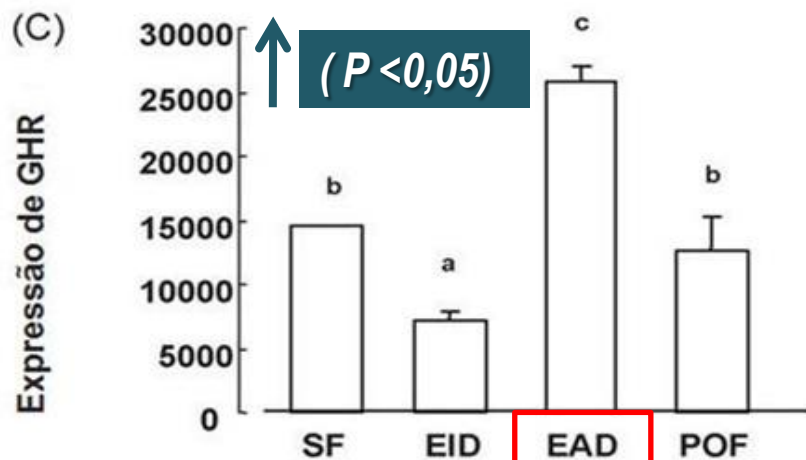


Expressão de GHR

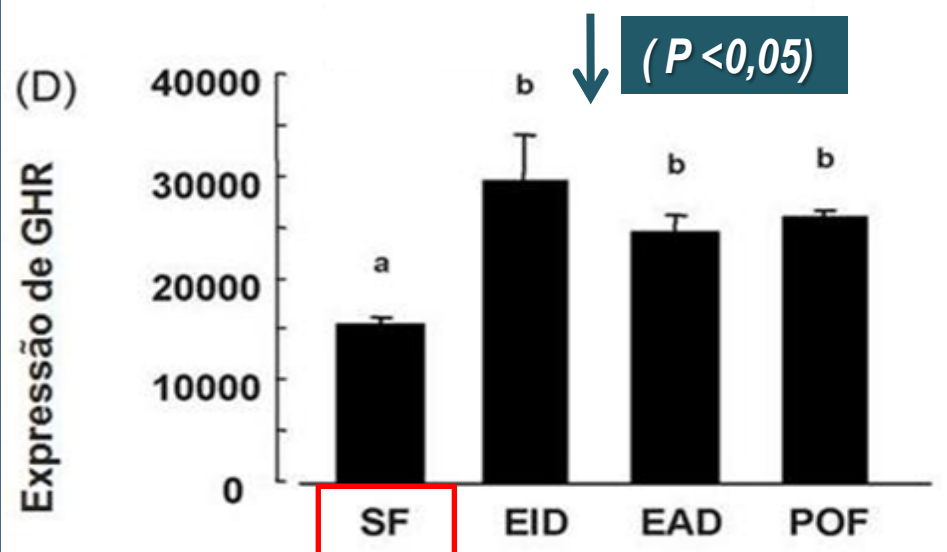
***Maior
expressão GHR
no EAD***

**↑ [] de GH no
FF do EAD e do
POF**

CÉLULAS DA GRANULOSA



CÉLULAS DA TECA

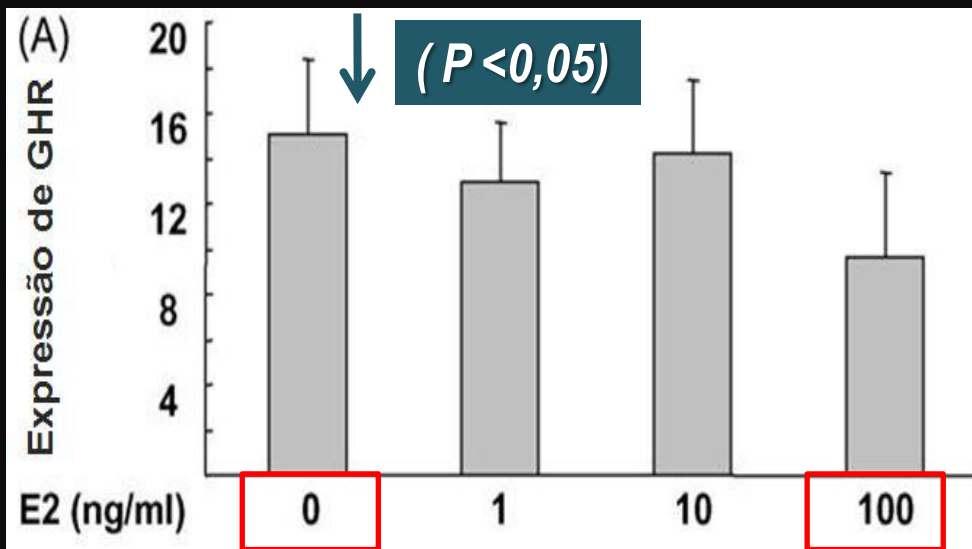


***Menor
expressão GHR
no SF***

RESULTADOS E DISCUSSÃO



O nível de E2 atua regulando a expressão de GHR??



Possivelmente outros fatores atuem regulando a expressão de GHR em folículos pequenos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

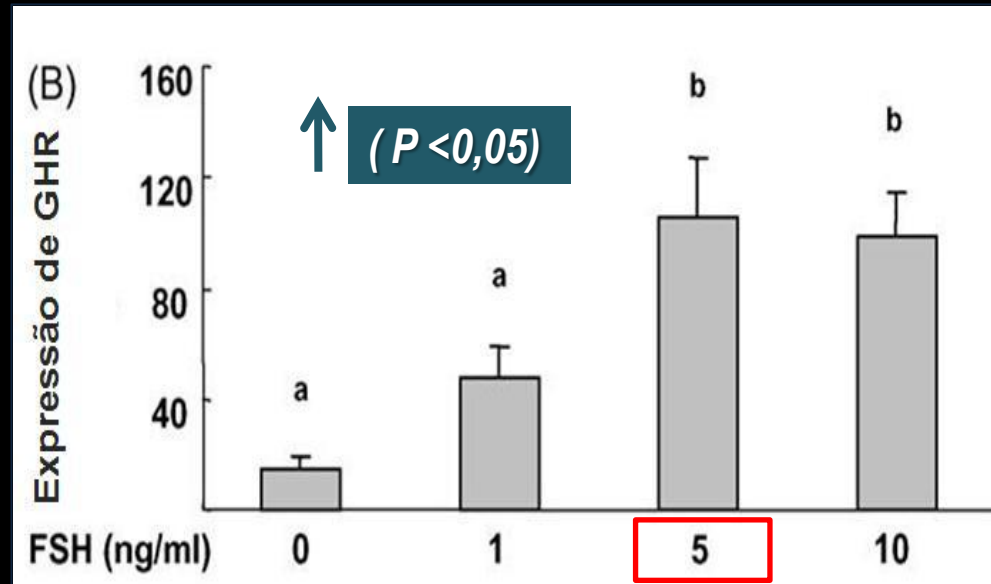


EXPRESSÃO DE GHR EM FSH

**5 ng/mL de FSH estimulam
a expressão do gene para
GHR em CGs**

**Nível de FSH
para o
recrutamento de
uma nova onda:
5 – 6 ng/mL**

Ginther et al., 2001



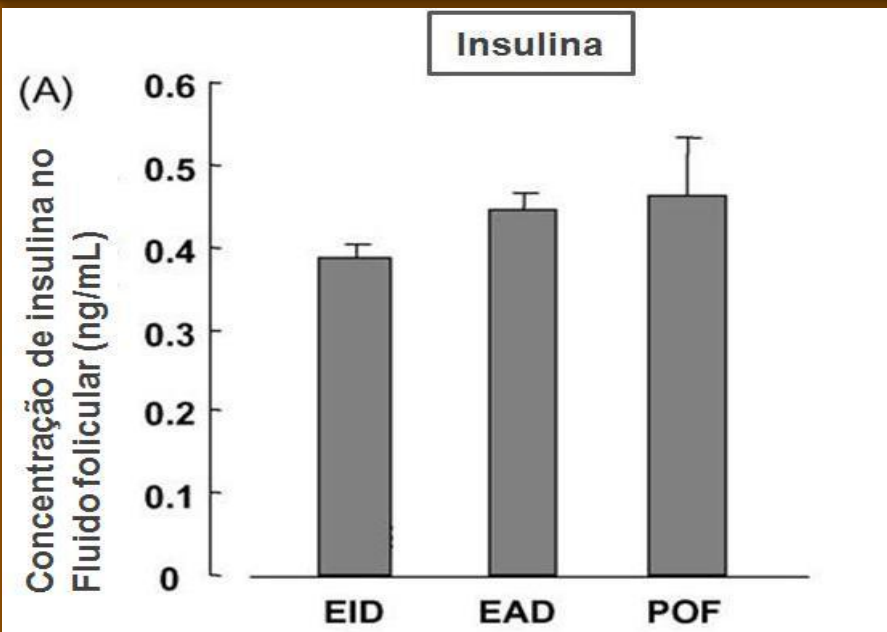
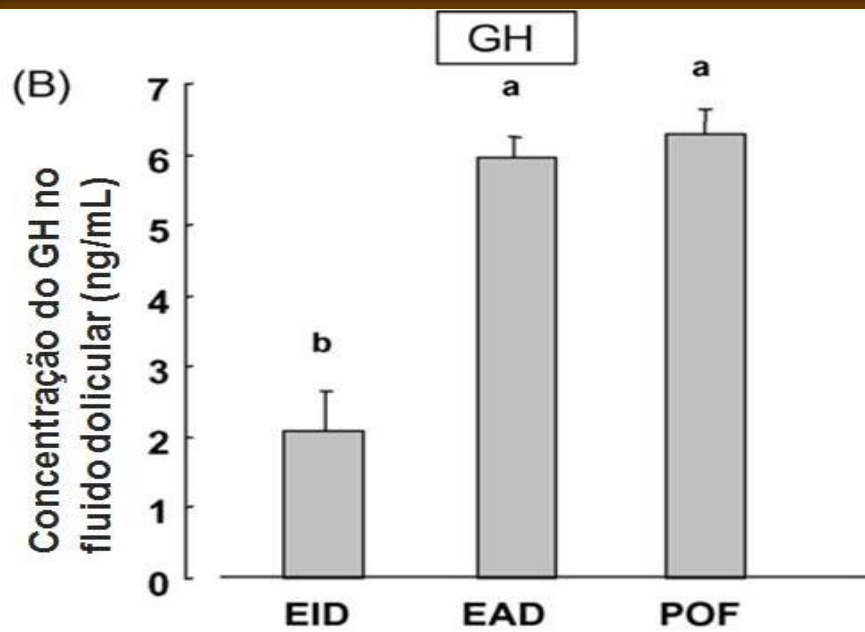
E2 + FSH



Não induziram a expressão de GHR em culturas de CGs

RESULTADOS E DISCUSSÃO

GH E INSULINA NO FF



PRODUÇÃO LOCAL OU SISTÊMICA??

Considerações Finais



O aumento da expressão de GHR pode ser um ponto de transição para os folículos entrarem na fase ovulatória durante o desenvolvimento folicular dos bovinos;

O sistema IR-insulina pode apoiar o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios.



Muito Obrigado!



nuppec

igor_sba@hotmail.com

viniciusboechel@hotmail.com