

REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DO HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO EM VACAS: UM ESTUDO COMPARATIVO EM NÍVEL ENDÓCRINO, OVARIANO, FOLÍCULAR E DE CÉLULAS DA GRANULOSA

Douglas Perazzoli & Francielle Bado

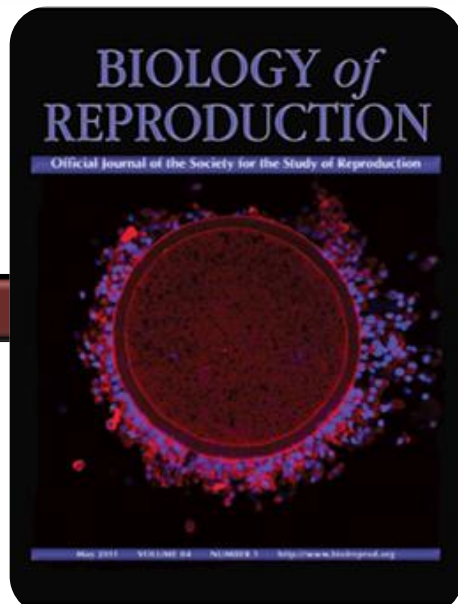
Augusto Schneider

BIOLOGY OF REPRODUCTION **84**, 560–571 (2011)
Published online before print 10 November 2010.
DOI 10.1095/biolreprod.110.088187

Regulation of Anti-Müllerian Hormone Production in the Cow: A Multiscale Study at Endocrine, Ovarian, Follicular, and Granulosa Cell Levels¹

Charlène Rico,³ Claire Médigue,⁴ Stéphane Fabre,³ Peggy Jarrier,³ Martine Bontoux,³ Frédérique Clément,⁴ and Danielle Monniaux^{2,3}

*Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 85/INRA-UMR 6175, CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux,³ Centre INRA de Tours, Nouzilly, France
Centre de Recherche INRIA Paris-Rocquencourt,⁴ Domaine de Voluceau, Le Chesnay, France*



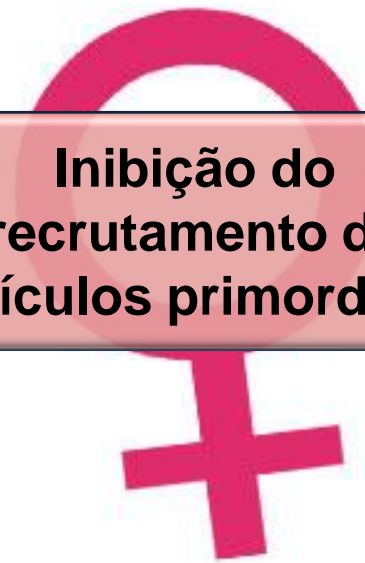
FI: 3.300

INTRODUÇÃO

**Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) ou
Substância Inibidora Mülleriana (MIS)**

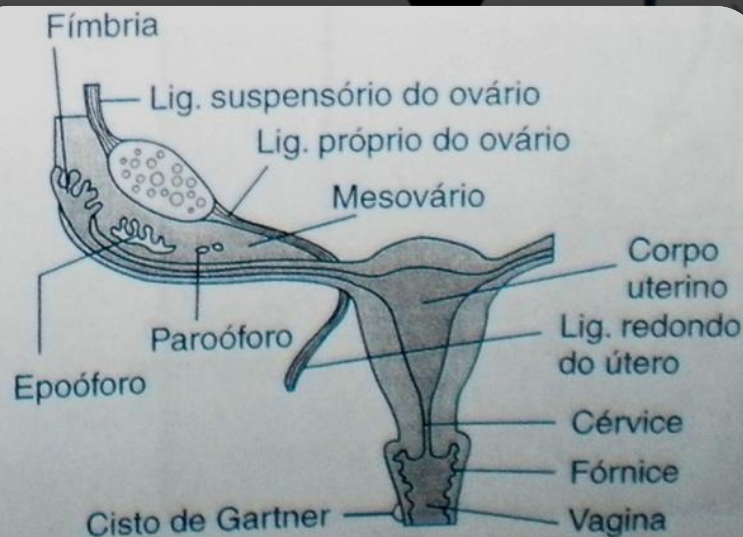
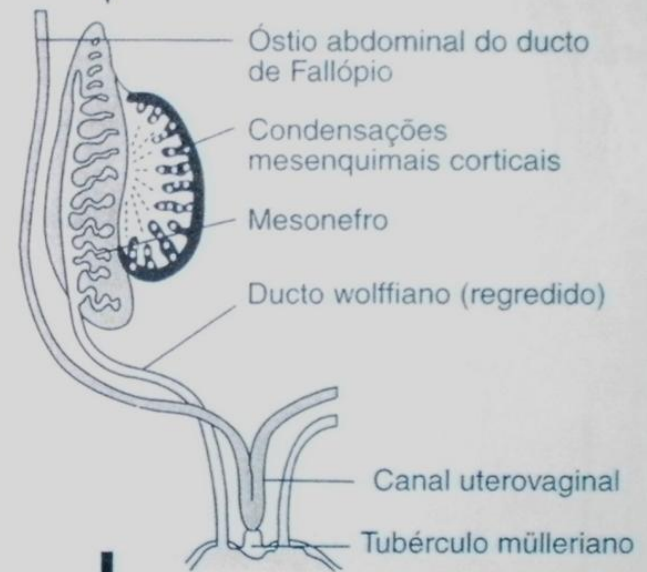
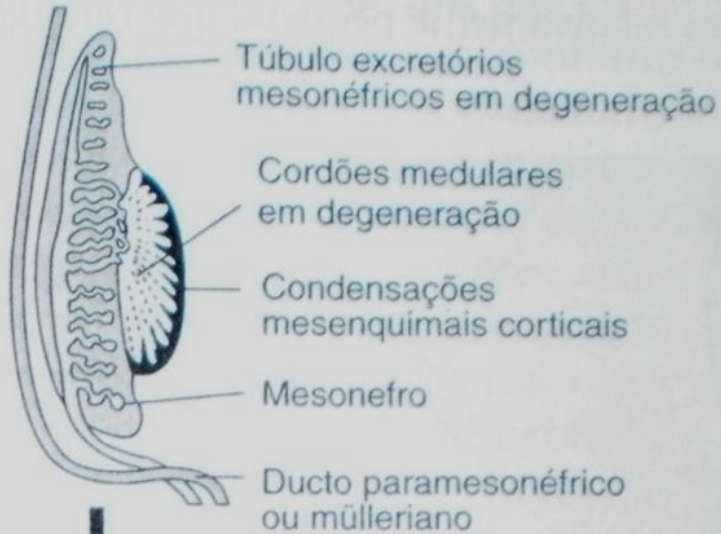


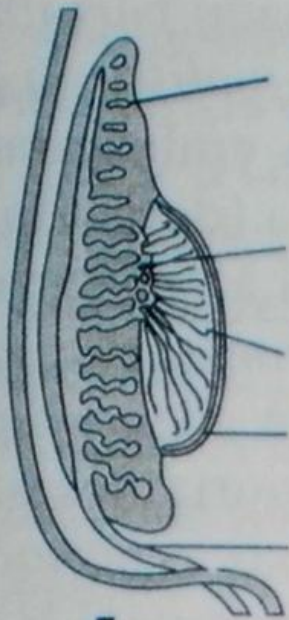
**Regressão dos ductos
müllerianos**



**Inibição do
recrutamento de
folículos primordiais**

INTRODUÇÃO





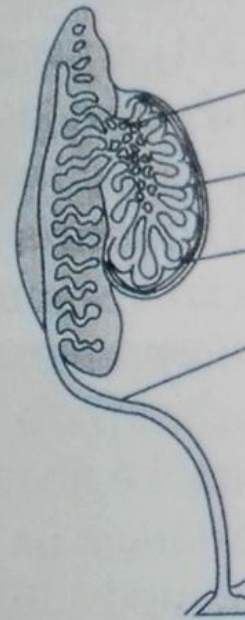
Túbulos excretórios mesonéfricos em degeneração

Rete testis

Cordões seminíferos

Túnica albugínea

Ducto mesonéfrico ou wolffiano



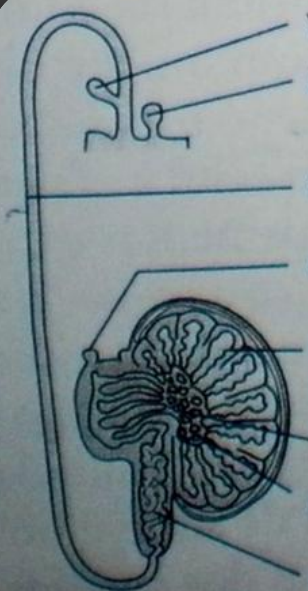
Rete testis

Cordões seminíferos

Túnica albugínea

Ducto mesonéfrico ou wolffiano

Tubérculo mülleriano



Vesícula seminal

Utrículo prostático

Canal deferente

Apêndice testicular

Cordões seminíferos

Vaso eferente

Rete testis

Epidídimo

OBJETIVO

Estabelecer relações concentrações plasmáticas AMH durante um ciclo estral natural e da dinâmica de ondas de crescimento folicular ovariano;

Caracterizar o diâmetro de folículos nos ovários que produzem AMH.

Estudar a regulação dos AMH expressão e secreção de FSH e AMH BMP em células da granulosa

PARA...

MATERIAIS E MÉTODOS



42 vacas de raça Holandês

Análises hormonais

Teste de estimulação ovariana

Cultura de células da granulosa

Análise histológica e Imunohistoquímica de AMH

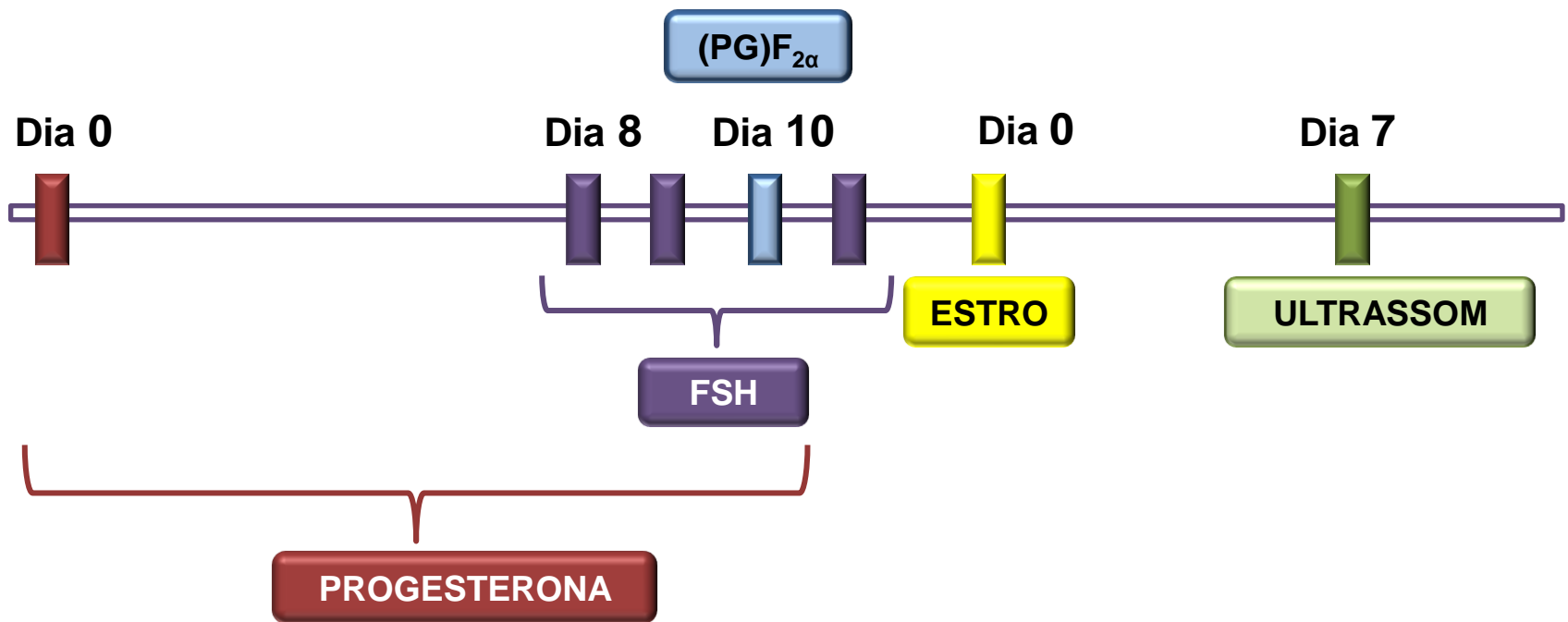
Monitoramento do ciclo estral e onda folicular (FW)

PCR e Transcrição reversa

Análise de fluídos celulares ovarianos

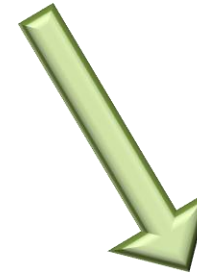
MATERIAIS E MÉTODOS

TESTE DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA



MATERIAIS E MÉTODOS

TESTE DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA



**GRUPO H
(High)**

**(nº CL > 15)
n = 10**

**GRUPO L
(Low)**

**(nº CL < 10)
n = 12**

MATERIAIS E MÉTODOS

MONITORAMENTO DO CICLO ESTRAL E ONDA FOLICULAR (FW)

ULTRASSOM 3 VEZES POR SEMANA

- Diâmetro da cavidade antro dos folículos
- Contados e medidos folículos com antrum \uparrow 3 mm
 - Mapeamento dos folículos \uparrow ue 5 mm
 - divisão de dois períodos:



First FW

Emergência dos primeiros folículos em crescimento $>$ 5 mm de diâmetro, até o folículo dominante atingir seu tamanho máximo

Last FW

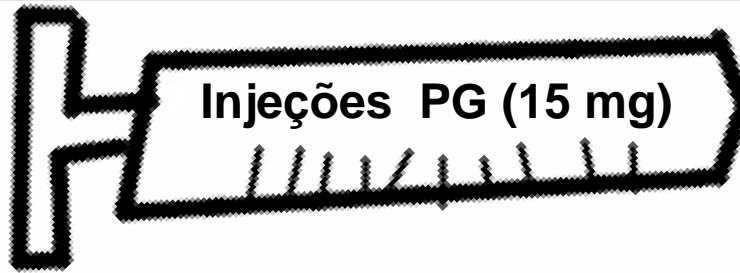
Até a ovulação

COLETAS DE SANGUE DIÁRIAS

Estradiol
Progesterona
AMH

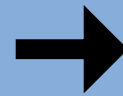
MATERIAIS E MÉTODOS

OVÁRIOS, CÉLULAS GRANULOSAS E COLEÇÃO DE FLUÍDO FOLICULAR



ABATE
(6 dias depois da 2ª PG)

Pedaços de ovários sem folículos maiores que 4 mm de diâmetro



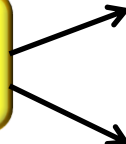
AMH
imunohistoquímica

Fluído de folículos >5 mm



Análise AMH

Células da granulosa dos folículos



3 - 5 mm

5 - 10 mm

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura Celular

Cultivo In vitro



Folículos de 3-5mm e 5-10 mm

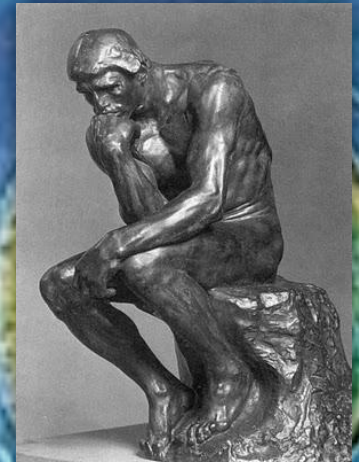
Isolar e incubar

- AMH
- BMP4
- BMP6

O que é BMP???

Oócito
Teca

Proteína morfogênica óssea



MATERIAIS E MÉTODOS

Análise Histológica



Fragmentos



Processados e
Imunomarcados



Classificação

HE



O que observar?

MATERIAIS E MÉTODOS

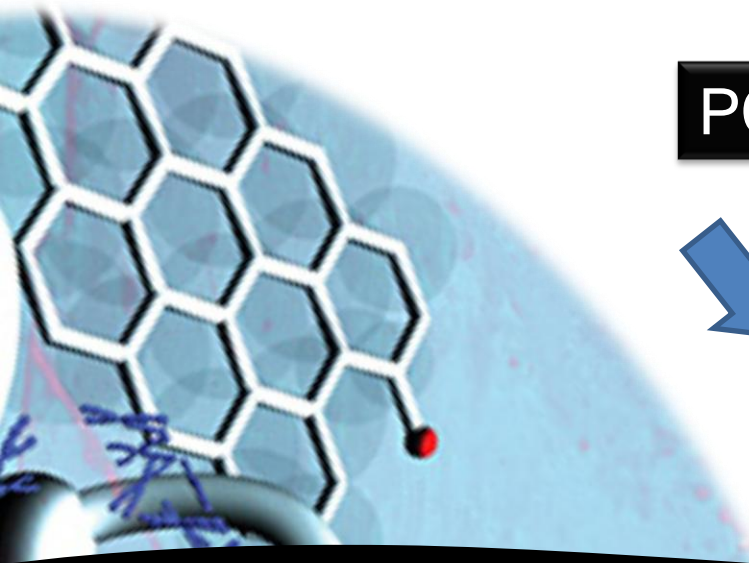
Análise Molecular

Analisar a concentração de mRNA no cultivo

AMH

PCR

Quantificar o mRNA do AMH



MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio Hormonais

O que analisar?

Progesterona
AMH

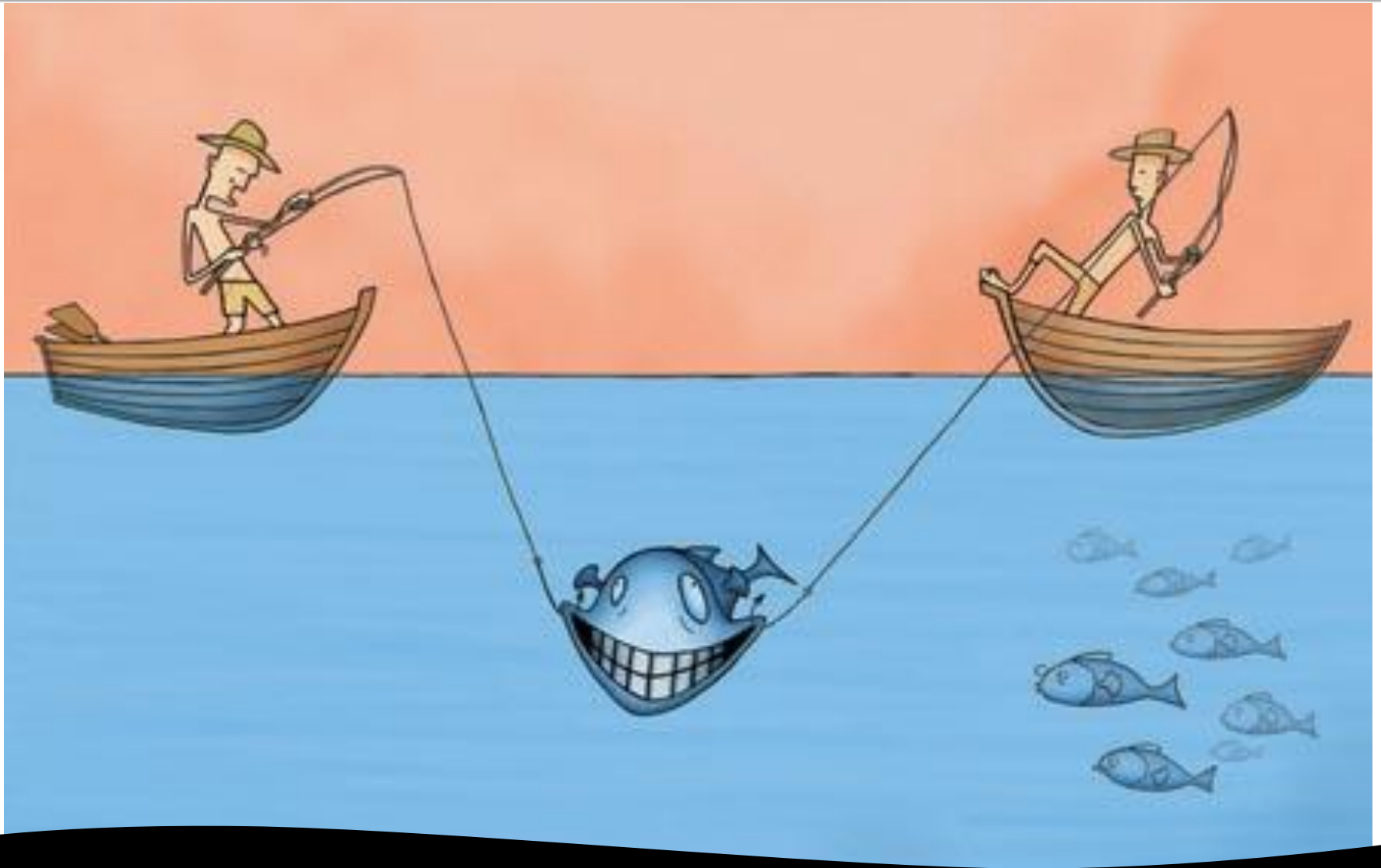
ELISA

Estradiol 17-beta

Radioimunoensaio



RESULTADOS E DISCUSSÕES



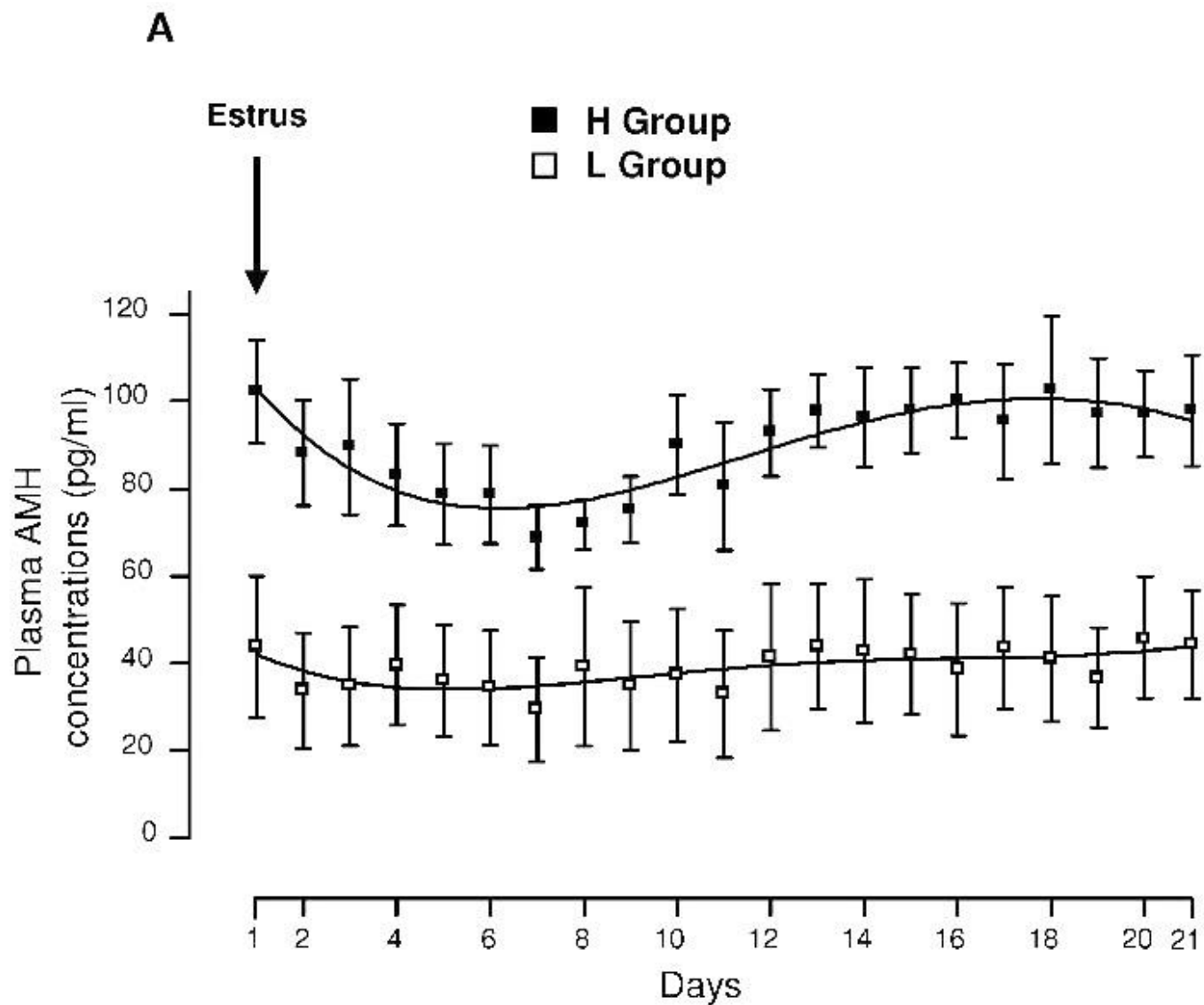


Figura 01: Os níveis de AMH endócrino durante os 20 dias de um ciclo estral.

A: Alterações diárias de concentrações de AMH no plasma durante o ciclo

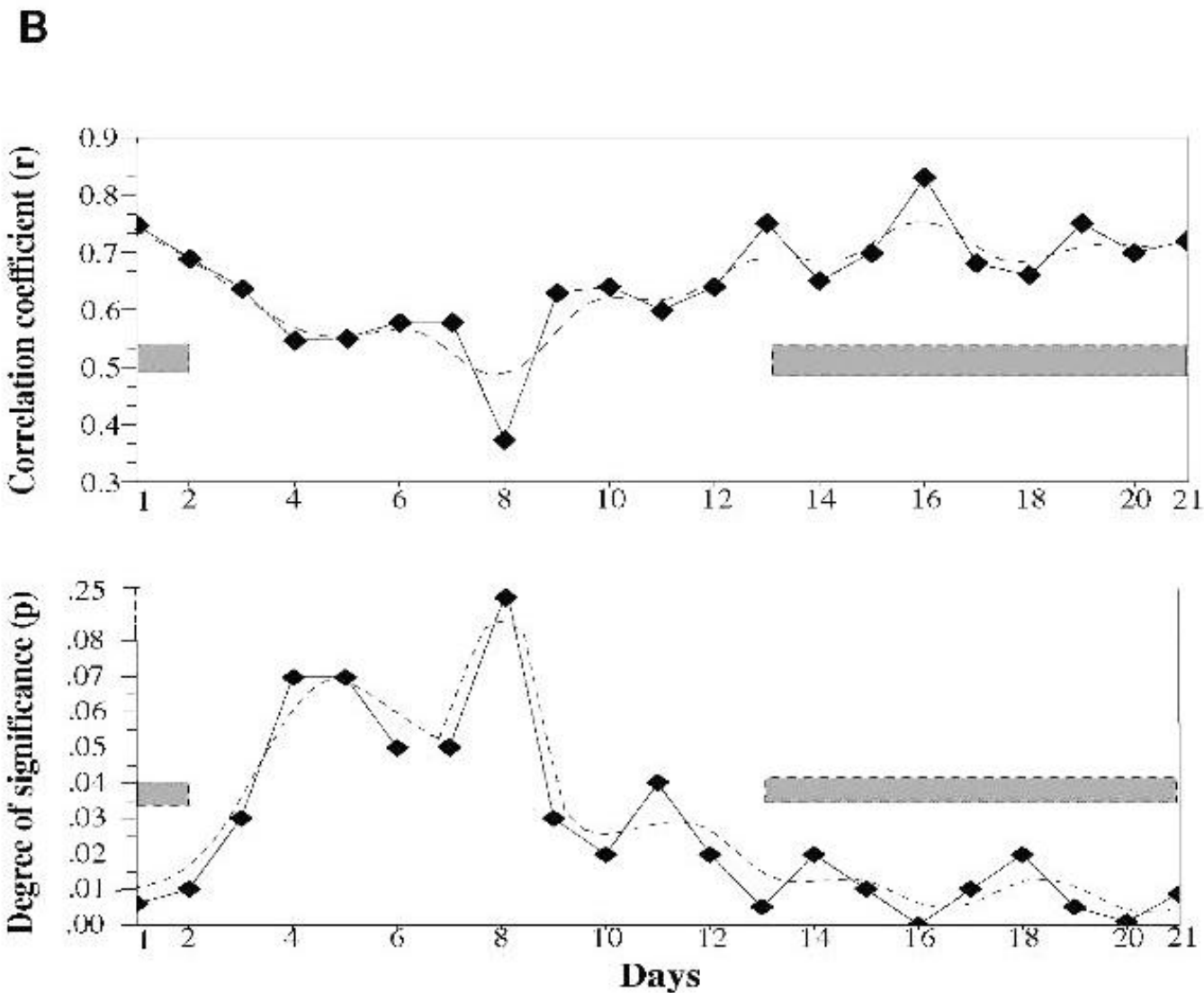


Figura 01: Os níveis de AMH endócrino durante os 20 dias de um ciclo estral.

B: Coeficiente de correlação entre concentrações plasmáticas de AMH e o número de ovulações. ($r > 0,70$, $P < 0,02$)

Tabela 1: AMH, estradiol-17 β e população folicular durante a primeira onda folicular (First FW) e última onda folicular (Last FW) do ciclo estral do grupo H (H group) e grupo L (Lgroup) de vacas.

Parameter	First FW		Last FW	
	H group	L group	H group	L group
AMH (pg/ml)	<u>79,9 \pm 10,4^a</u>	<u>37,3 \pm 14,1^b</u>	119,7 \pm 20,8 ^{a*}	48,4 \pm 16,6 ^b
Estradiol-17 β (pg/ml)	2,06 \pm 0,18	1,61 \pm 0,35	3,62 \pm 0,38 ^{**}	2,71 \pm 0,51
N ^o of follicles 3-5 mm	13,7 \pm 2,0	9,9 \pm 1,7	17,0 \pm 1,8 ^{a*}	10,5 \pm 1,3 ^b
N ^o of follicles > 5 mm	4,2 \pm 0,7	4,3 \pm 0,9	3,2 \pm 0,8	4,1 \pm 0,6
FW length (days)	8,6 \pm 0,6	8,2 \pm 1,1	7,6 \pm 1,0	7,2 \pm 0,8

^{a,b} significa diferença significativa entre os dois grupos ($P < 0,05$).

^{*,**} no grupo H, ($*P < 0,05$, $**P < 0,01$), indica diferença significativa na primeira onda folicular (first FW).

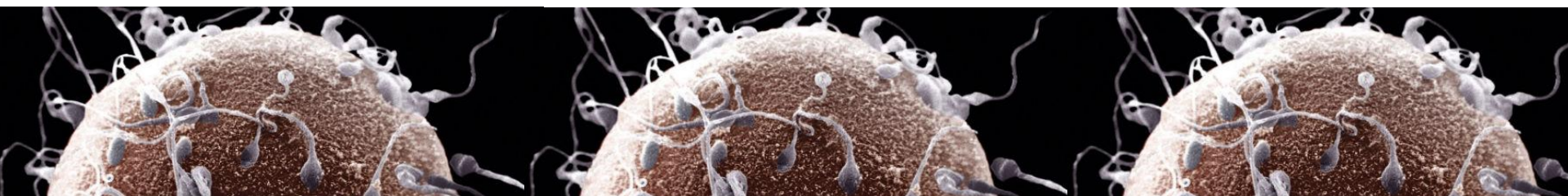


TABELA 2: Variação na concentração de AMH no plasma durante o ciclo estral do grupo H (n=6) e do grupo L (n=5) de vacas.

Parameter	H group		L group	
	Estrus 1	Dmin [†]	Estrus 1	Dmin [†]
AMH (pg/ml)	102,3 ± 11,8 ^a	64,8 ± 6,0 ^{a**}	43,8 ± 16,1 ^b	27,4 ± 12,4 ^b
Normalized AMH [‡]	1.10 ± 0,09	0,69 ± 0,03 ^{**}	1.03 ± 0,11	0,50 ± 0,12 ^{**}
Nº of follicles 3-5 mm	16,8 ± 1,6	15,4 ± 1,2 ^a	11,8 ± 2,4	8,7 ± 1,5 ^b

Parameter	H group	L group
	Estrus 2	Estrus 2
AMH (pg/ml)	130,1 ± 21,8 ^a	42,6 ± 14,8 ^b
Normalized AMH [‡]	1,24 ± 0,17	1,20 ± 0,15
Nº of follicles 3-5 mm	18,9 ± 2,8 ^a	10,0 ± 0,9 ^b

† Dia de ocorrência de concentração mínima de AMH para cada vaca.

‡ Taxa AMH: média AMH.

^{a,b} Para cada tempo do ciclo, diferentes letras significam diferenças entre os grupos (P<0,05).

^{**} (P<0,01) indicando diferença significativa com AMH no estro 1 e estro 2 dentro de cada grupo.

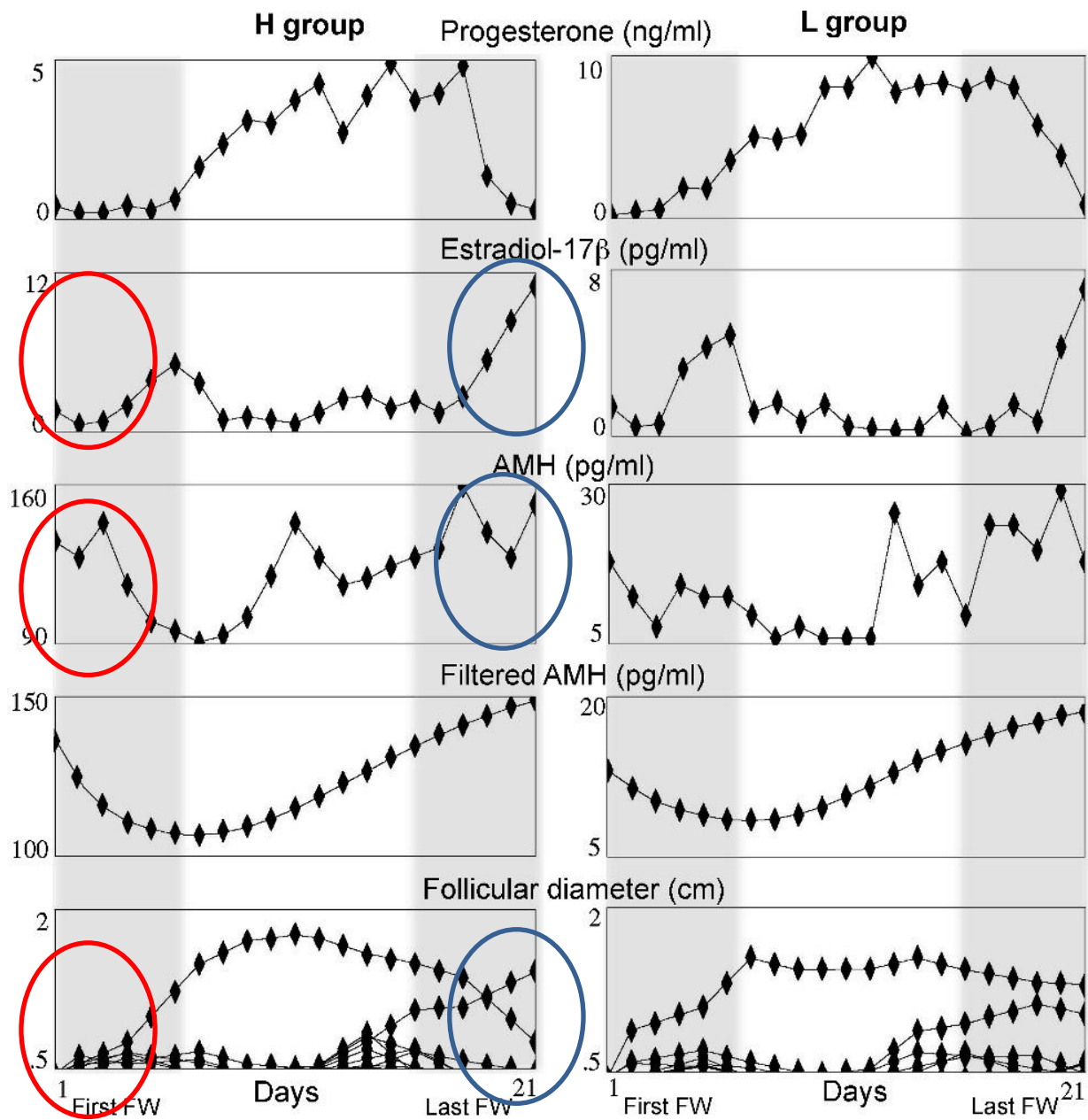


Figura 02: Análise representativa da dinâmica hormonal e folicular dos grupos vacas H e L frente a FW.

Relações Temporais

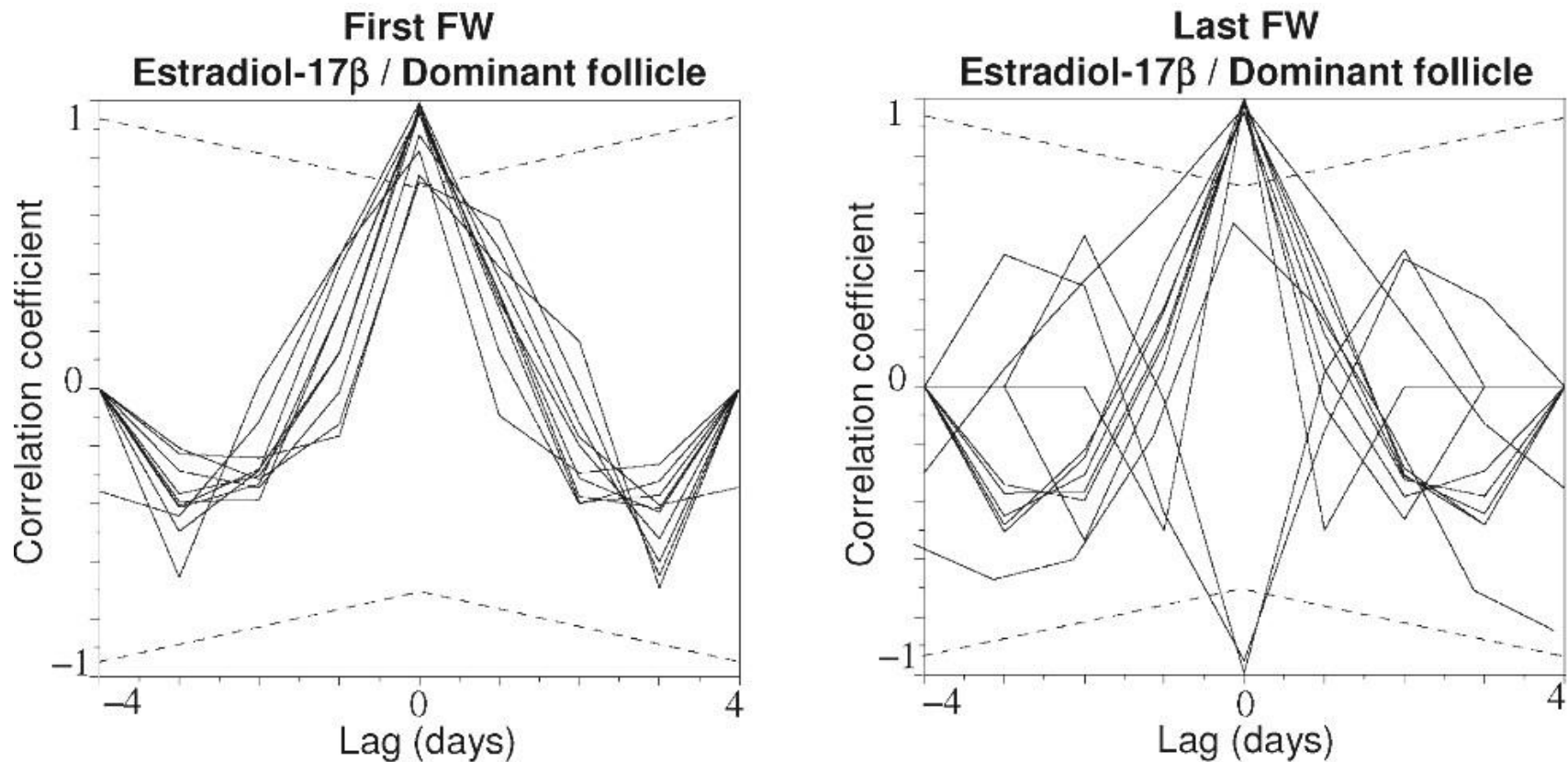


Figura 03: Correlação entre estradiol - 17 β e folículos dominantes

Relações Temporais

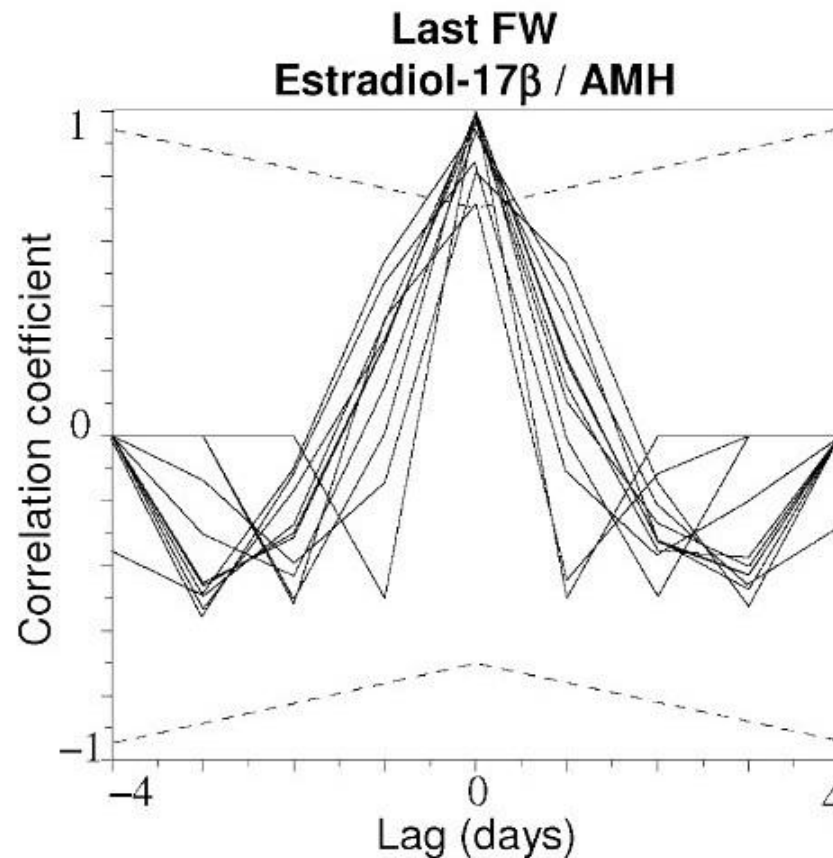
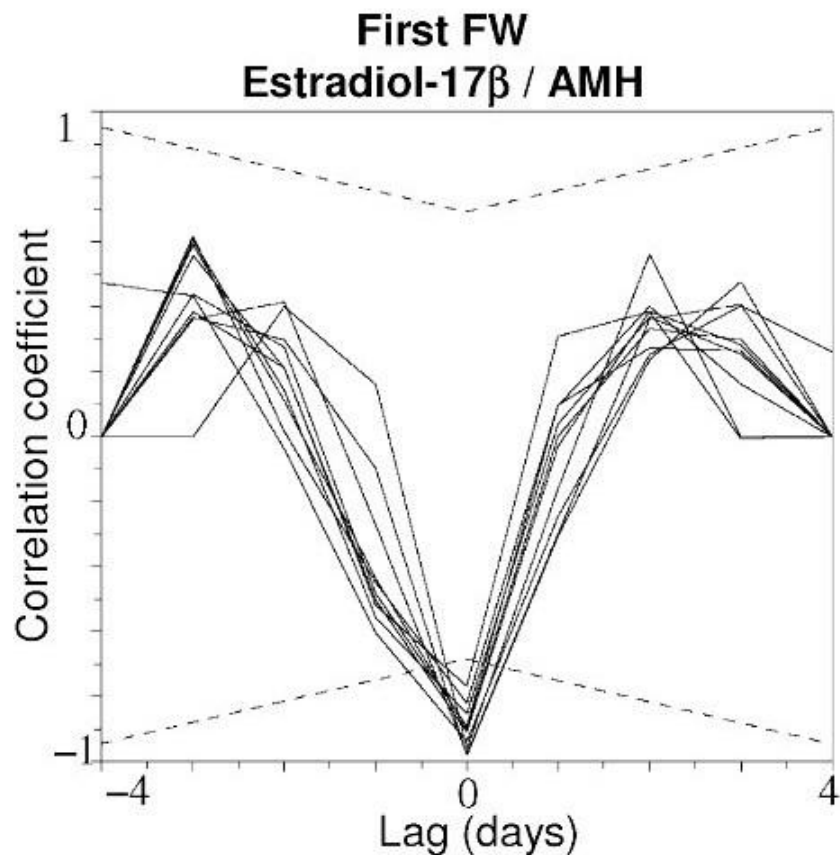


Figura 04: Correlação entre estradiol – 17 β e AMH no primeiro e segundo estro respectivamente. (P < 0,05)

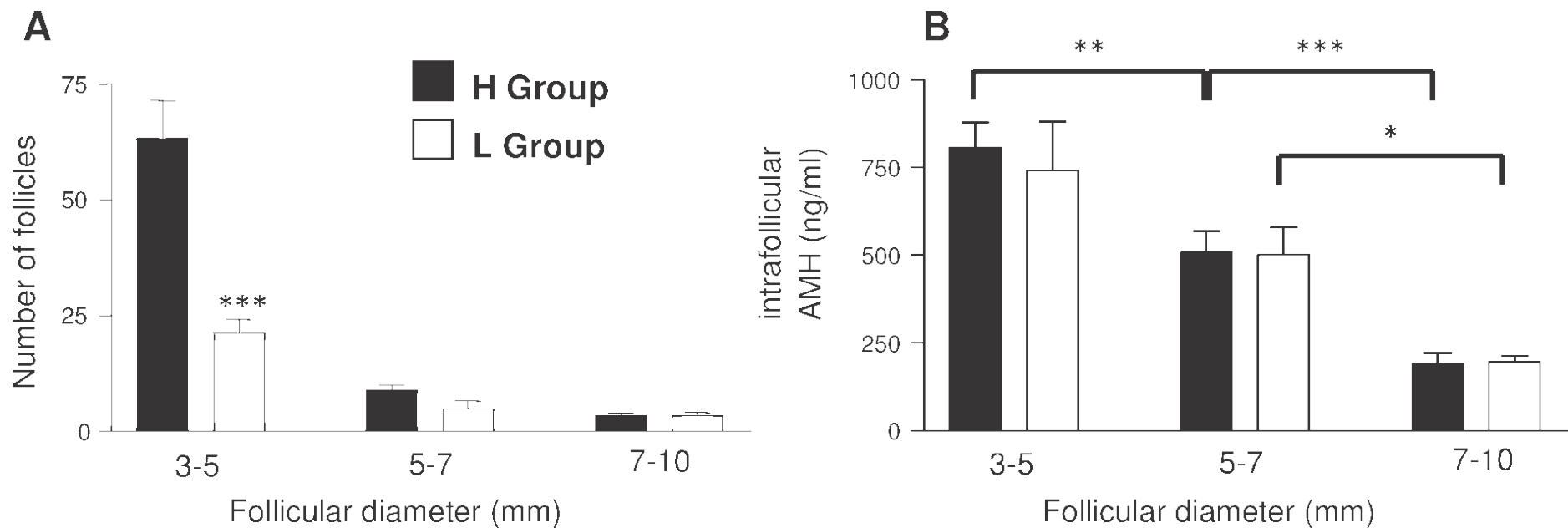


Figura 05: Número de folículos antrais presentes e as concentrações de AMH intrafollicular.

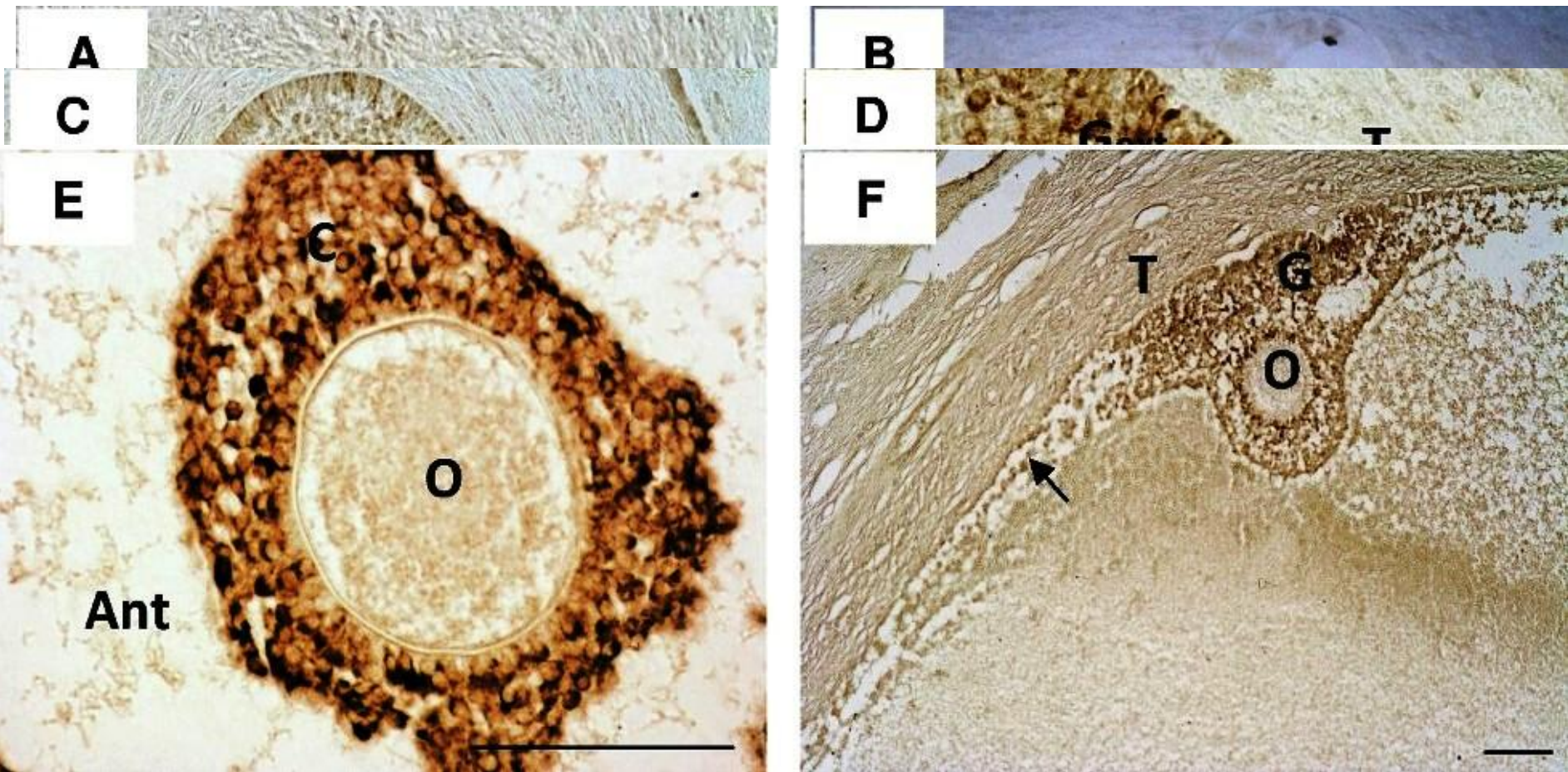


Figura 06: Imunohistoquímica visando Imunodiferenciação de locais com AMH.

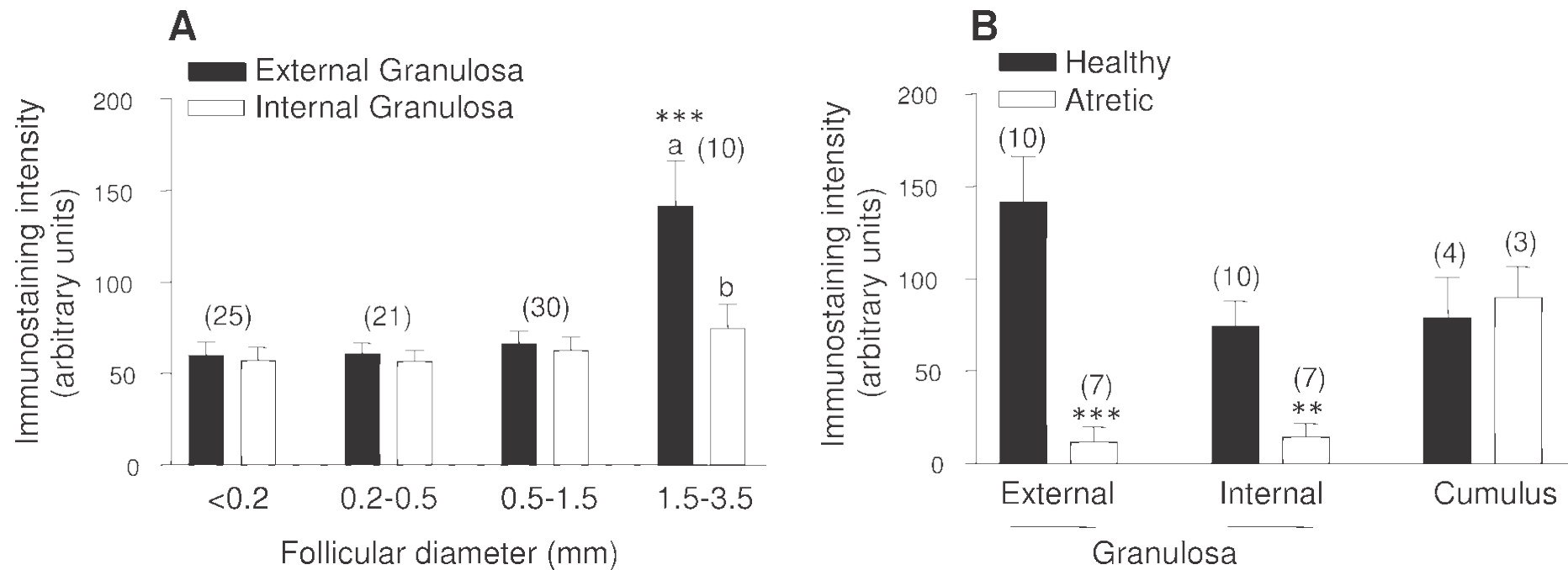


Figura 07: Alterações quantitativas de imunomarcção de AMH nas células da granulosa durante o crescimento folicular e atresia.

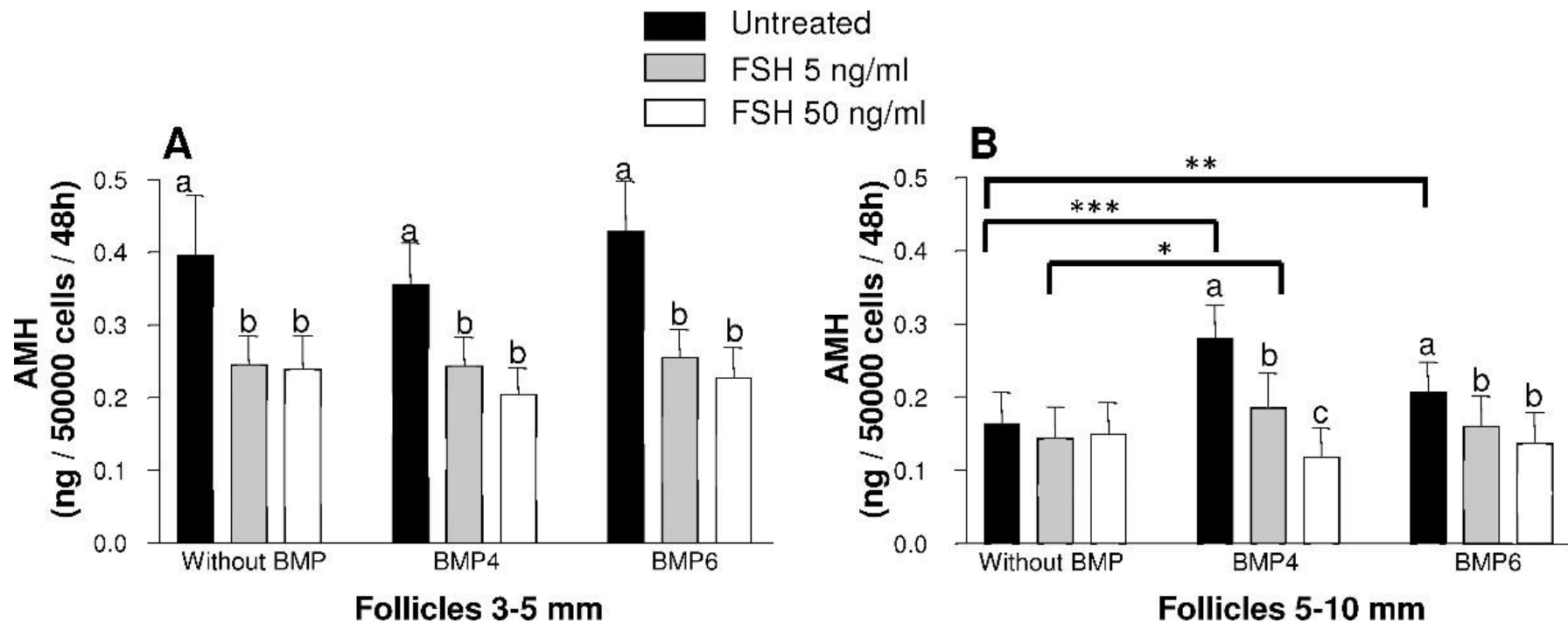


Figura 08: Efeitos do FSH, BMP4 e BMP6 in vitro sobre a secreção do AMH pelas células da granulosa

*P<0,05; **P<0,01 ; ***P<0,001 (Efeitos significativos do BMP).

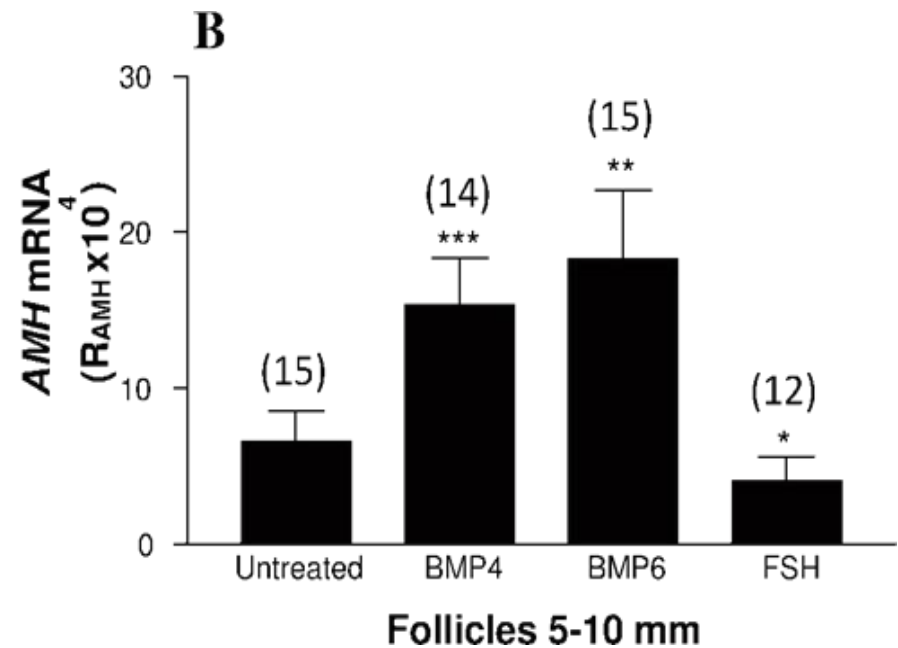
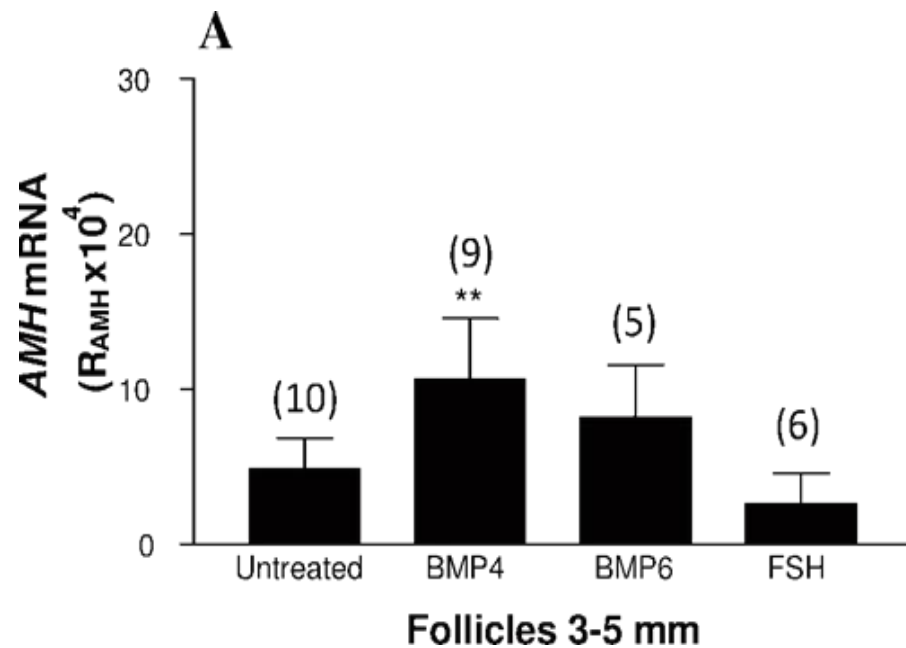


Figura 09: Efeitos do FSH, BMP4 e BMP6 in vitro sobre a expressão do mRNA do AMH pelas células da granulosa.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

CONCLUSÃO

Tamanho da população
x
AMH

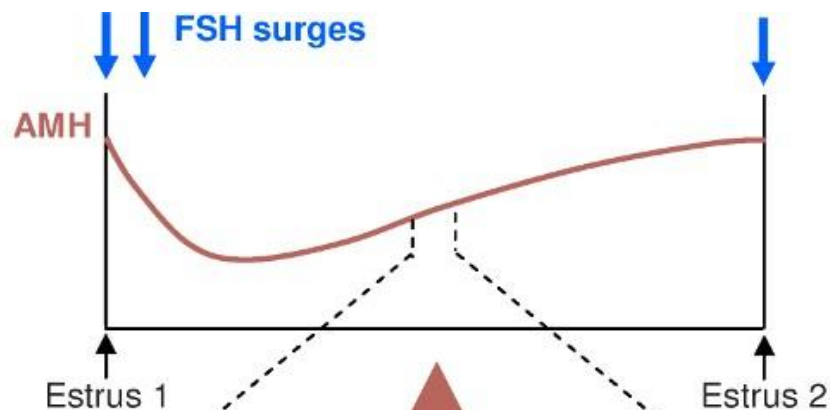
Diâmetro folicular
x
AMH

Variações de AMH

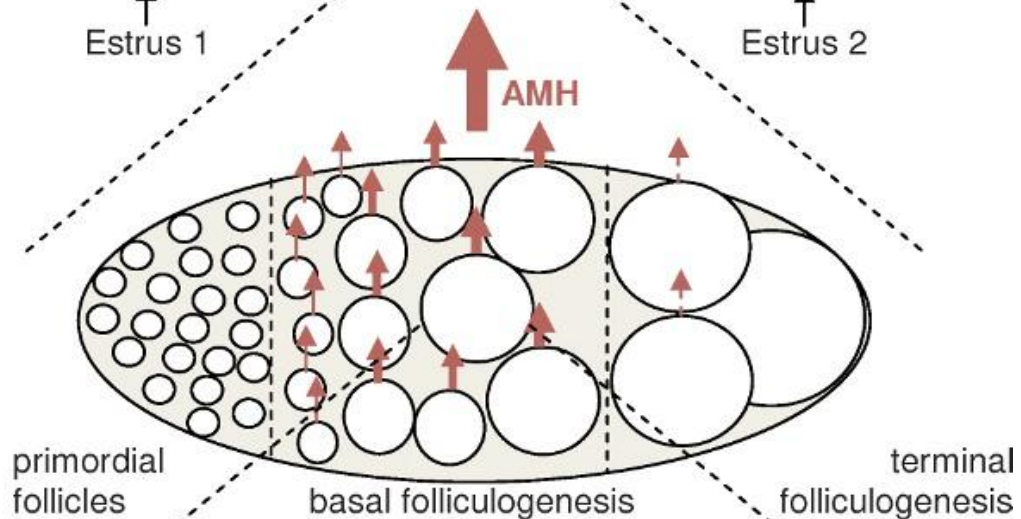
FSH x AMH x BMP

Estudar a variação
individual
x
oócitos viáveis

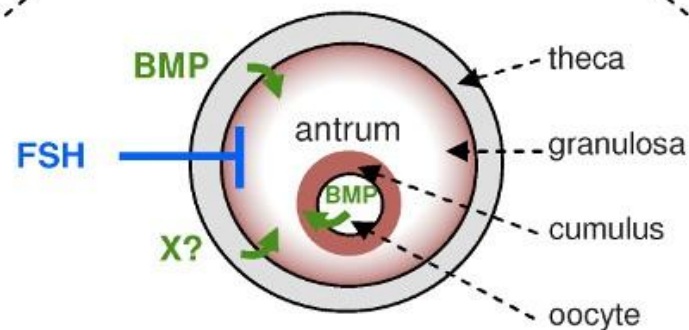
BLOOD

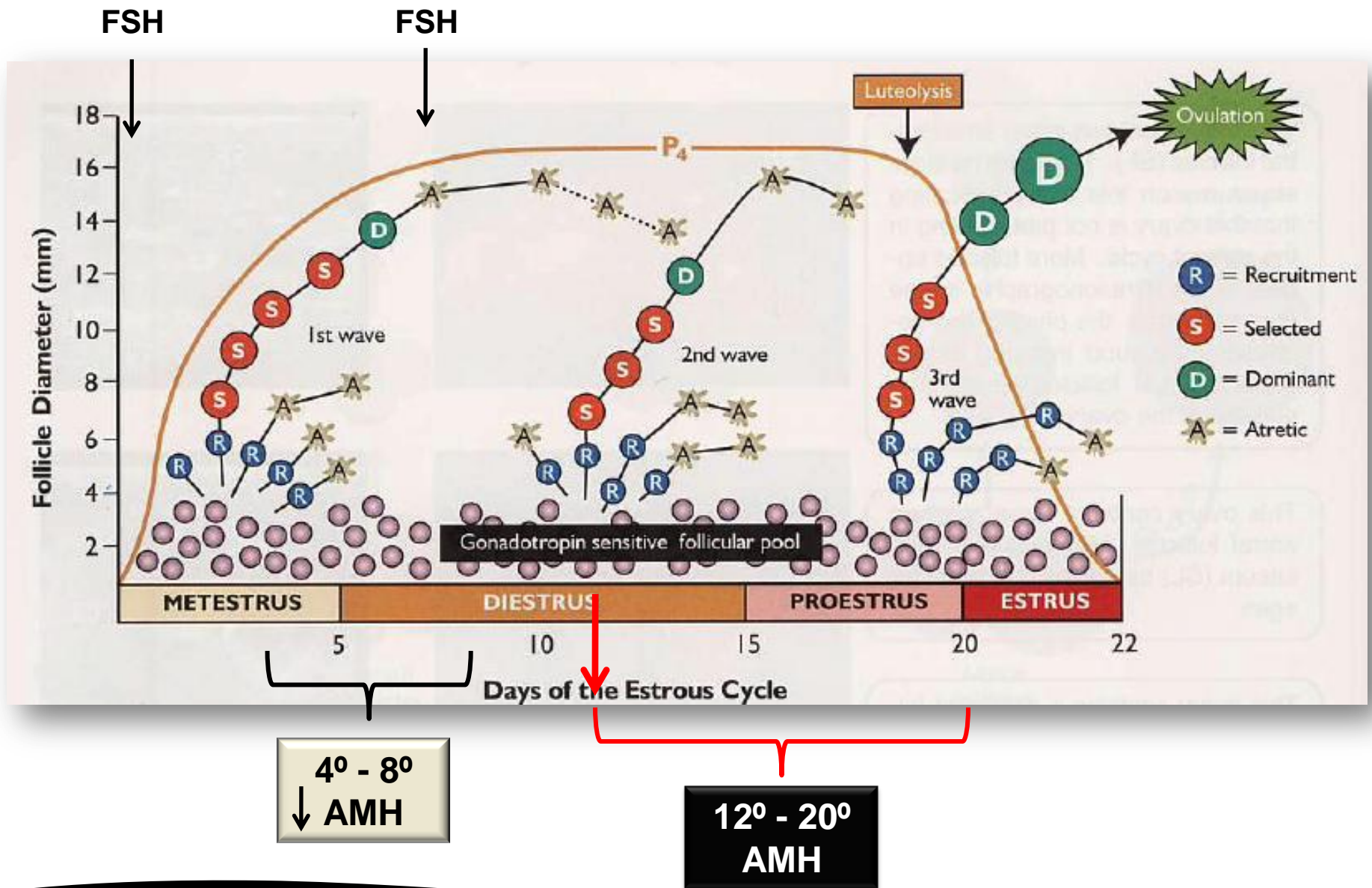


OVARY



FOLLICLE





Considerações Finais

