

Embriologia

Prof. Dr. Klaus Hartfelder

Depto. Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos

Faculdade de medicina de Ribeirão Preto

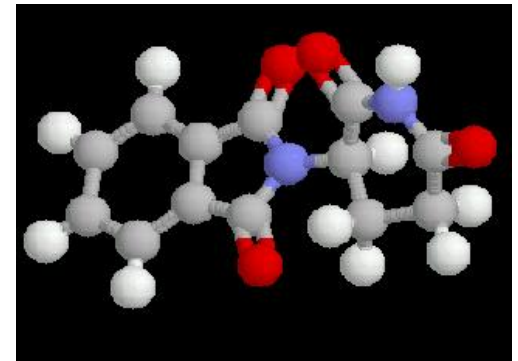
email: klaus@fmrp.usp.br

Bibliografia

- Moore KL & Persaud TVN – Embriologia Clínica, 9ª ed., 2012, Elsevier
- Moore KL & Persaud TVN – Embriologia Básica, 9ª ed., 2012, Elsevier
- Schoenwolf GC et al. – Larsen Embriologia Humana, 5 ed, 2016, Elsevier
- Sadler TW – Langman, Fundamentos da Embriologia Médica, 2007,
Guanabara-Koogan
- Gilbert SF – Developmental Biology, 10ª ed, Sinauer, 2013

Objetivos

- Obter conhecimento básico dos processos mais importantes do desenvolvimento humano
- Conhecer a importância do desenvolvimento embrionário para forma e função de órgãos e sistemas do corpo humano no contexto das áreas multiprofissionais da saúde
- Ser capacitado de discutir de forma informada tópicos atuais da sociedade civil, tais como: infertilidade, reprodução assistida, clonagem reprodutiva e terapêutica, células tronco e influência de fatores ambientais e teratogênicos no desenvolvimento embrionário



Porquê estudar Embriologia?

A Embriologia conecta com todas as demais áreas de conhecimento da Saúde:

- Bioquímica, Genética, Biologia Celular (vias de sinalização, erros inatos)
- Fisiologia (controle hormonal da gravidez, construção dos órgãos e sistemas e erros de formação)
- Ginecologia (gravidez e parto)
- Nutrição e Metabolismo (crescimento na gravidez)
- Fonoaudiologia e Fisioterapia (malformações congênitas)
- Neurologia, Cardiologia, Urologia, Imunologia, Oftalmologia (malformações congênitas)
- Pediatria
- Patologia (abortos)
- Medicina Social (epidemiologia e consequências sociais de teratôgenos, exemplo Zika, álcool, substâncias ilícitas)

Dificuldades frequentes no ensino/estudo da Embriologia

Um organismo complexo é formado a partir de uma célula diploide (zigoto)

Nas fases embrionárias (até 10^a semana) o embrião ainda possui pouca similaridade com o corpo do ser humano

Os órgãos e sistemas passam por grandes transformações a partir de um **plano básico do corpo de vertebrado**

Estas transformações precisam ser compreendidas em termo de 4 dimensões (as 3 dimensões espaciais e a linha do tempo)

FASES GERAIS DO DESENVOLVIMENTO HUMANO

Conceptus: do latim, derivados do zigoto (ovo fertilizado), inclui todos os elementos do desenvolvimento (embrião e anexos membranas extraembrionárias (âmnio, saco vitelínico e placenta);

Geralmente usado como denominador do desenvolvimento das 3 primeiras semanas

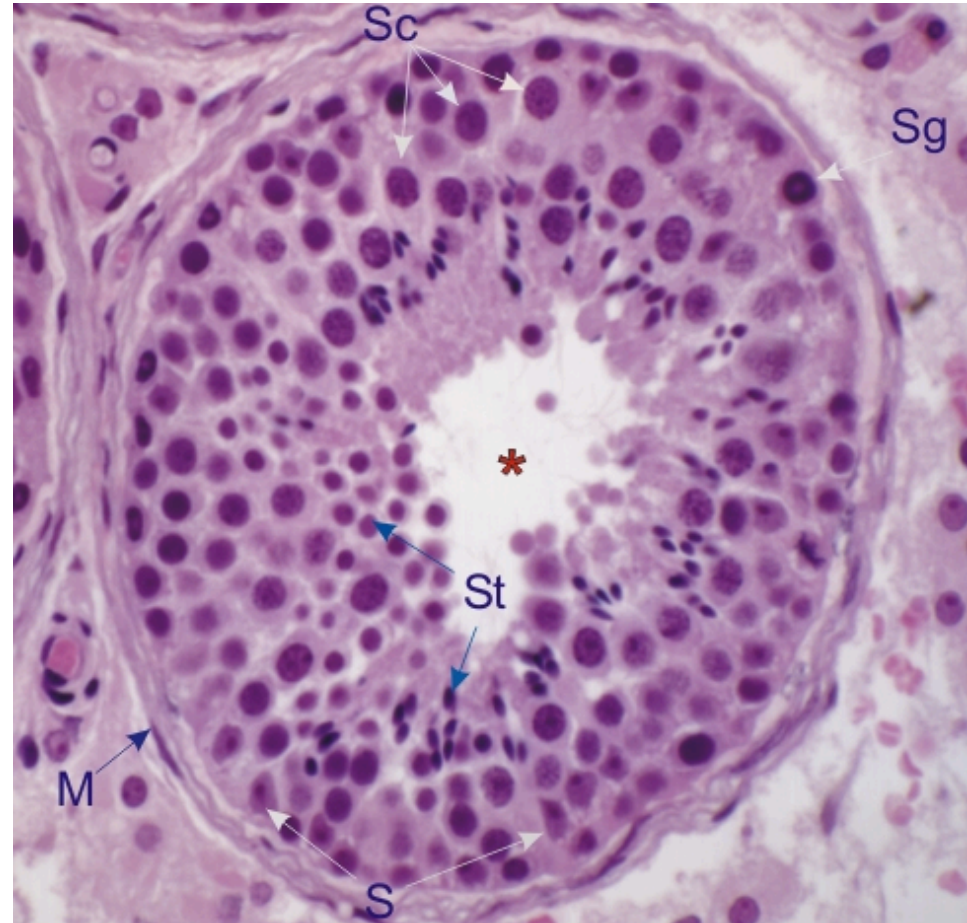
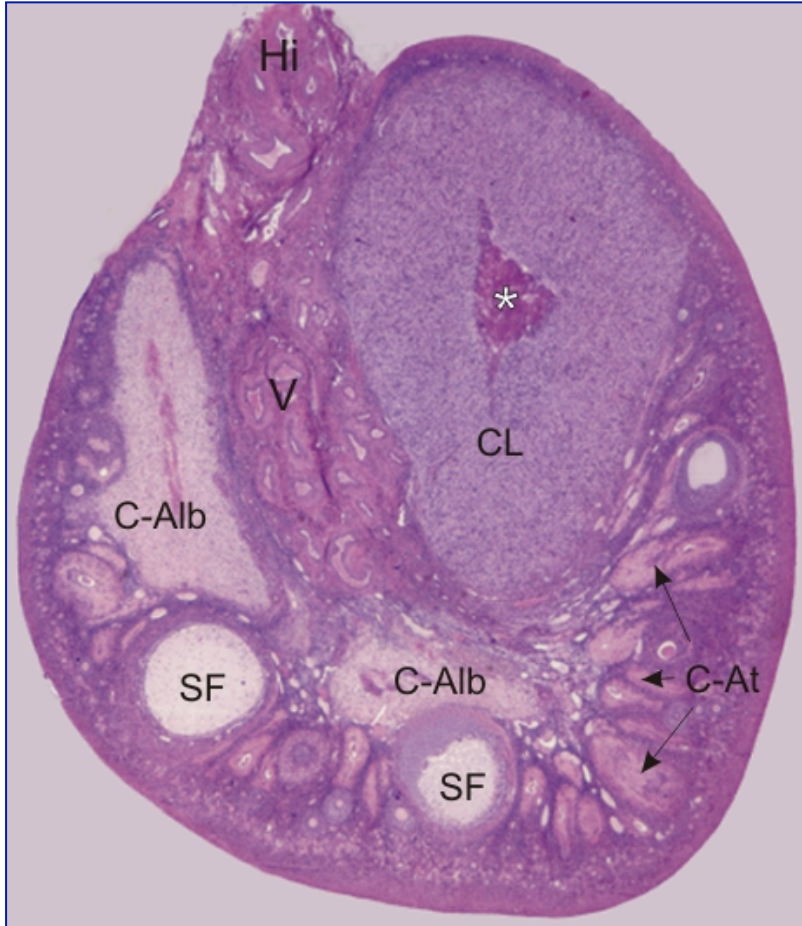
Embrião: se refere ao embrião propriamente dito a partir da fase de gastrulação.

Geralmente usado como denominador da fase do desenvolvimento da semana 4 a 9/10. Nessa fase todos os órgãos e sistemas do corpo humano são definidos.

Feto: se refere à fase do desenvolvimento durante qual os órgãos e sistemas ganham as características especificamente humanas (10 semana até o parto)

Tópico 1

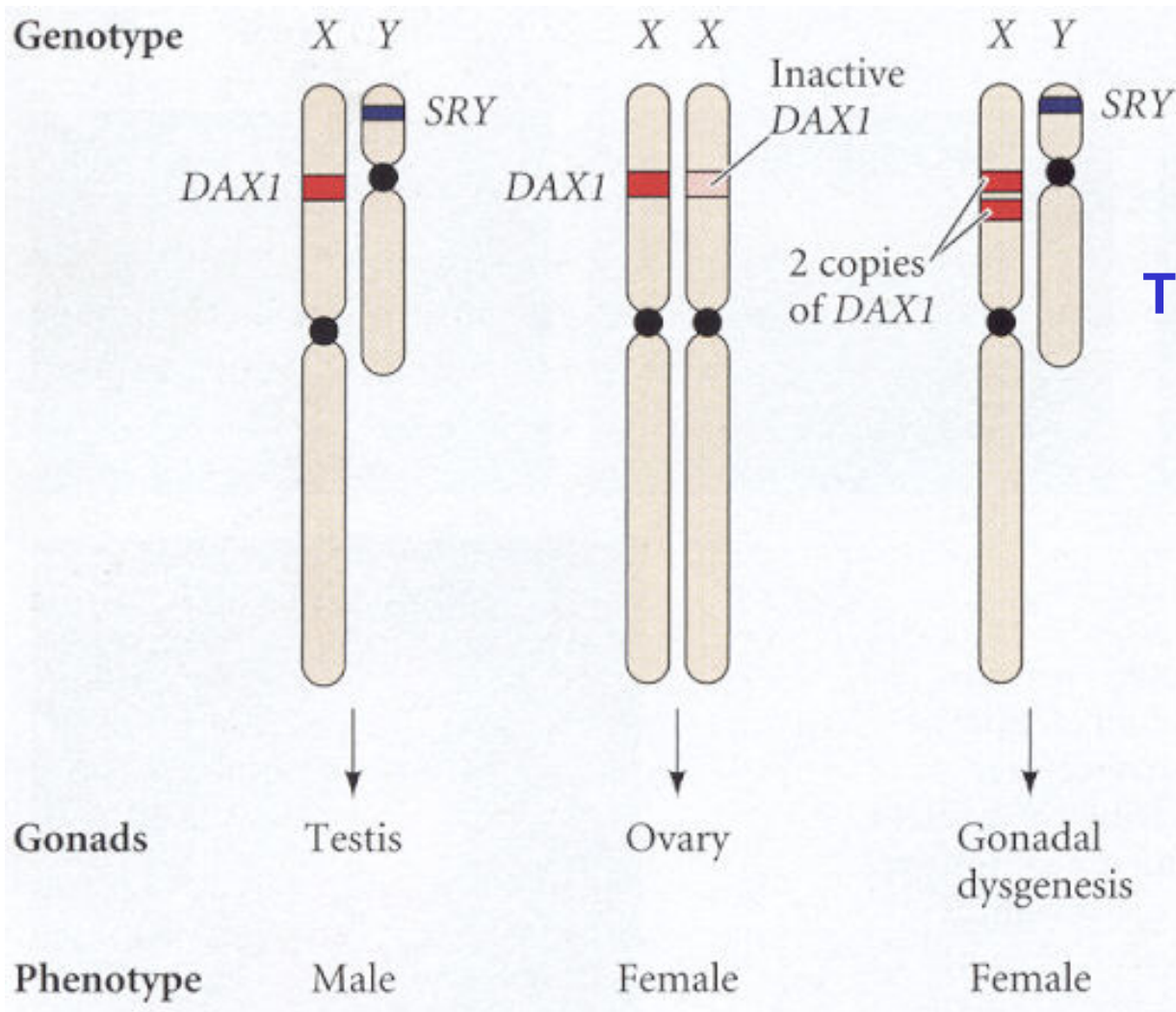
Gametogênese



Gônadas e determinação de sexo

determinação primário: cromossômico TDF no Y - sexo gonadal

determinação secundário: controle hormonal do fenótipo



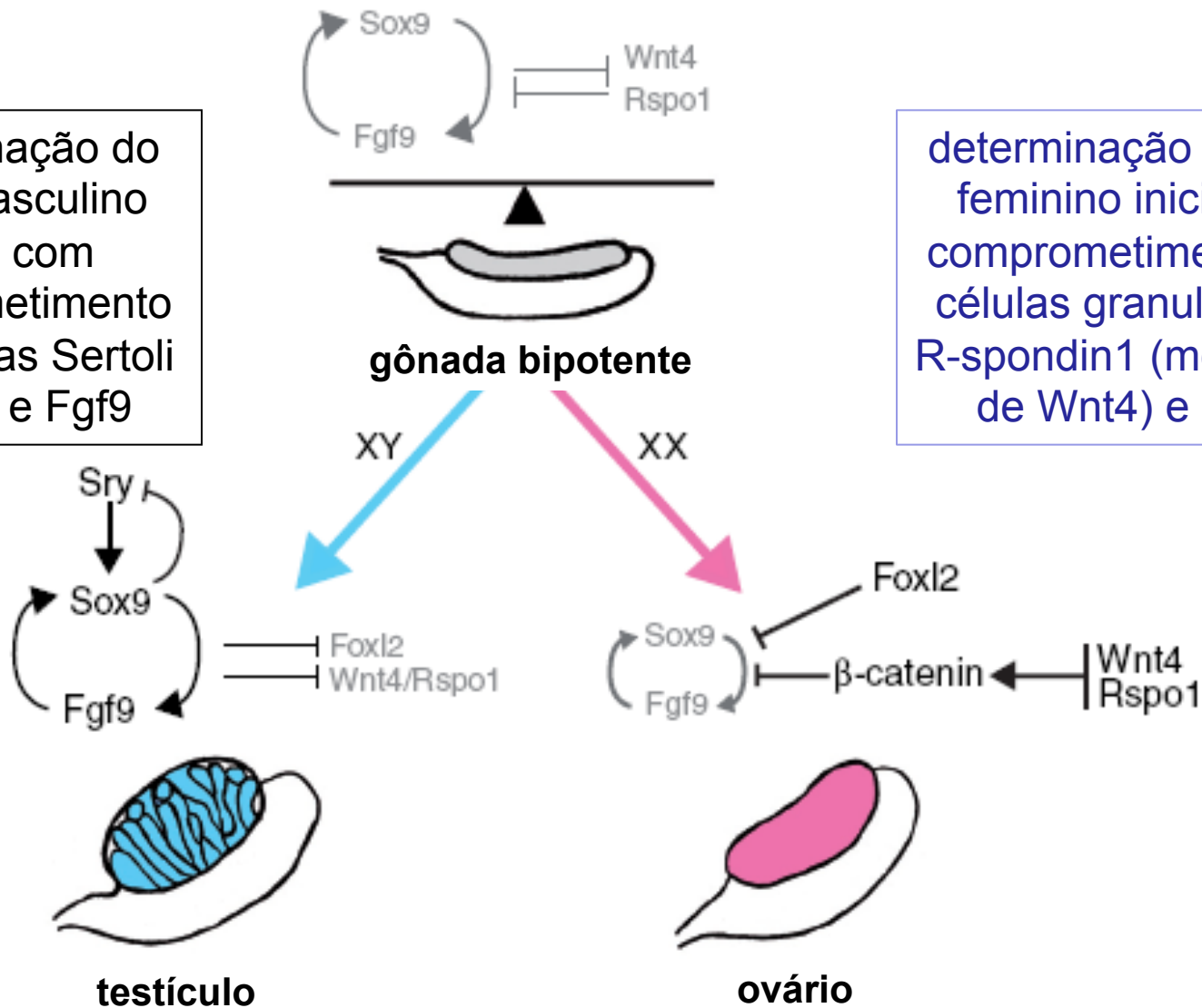
TDF no Y humano: SRY

**em dose única SRY
é epistático sobre
DAX1 (fator de
diferenciação de
ovário**

cascata gênica de determinação primário do sexo gonadal na fase embrionária (6^a-7^a semana)

determinação do sexo masculino inicia com comprometimento das células Sertoli via Sry e Fgf9

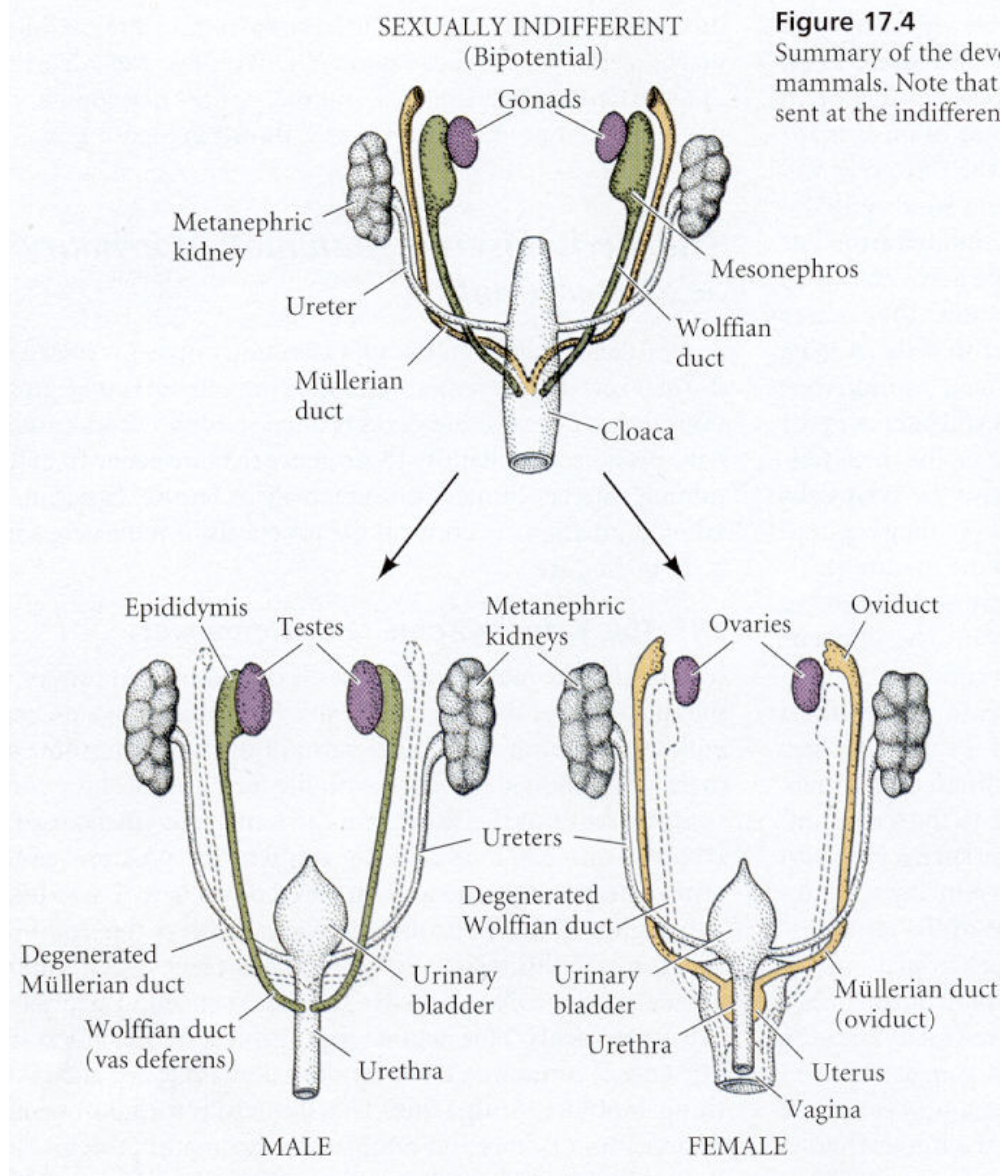
determinação do sexo feminino inicia com comprometimento das células granulosa por R-spondin1 (modulador de Wnt4) e Foxl2



testículo

ovário

determinação sexual secundário: regulação hormonal do fenótipo



Fase 1: embrionária (10^a - 12^a semana)

diferenciação da gônada bipotencial e dos ductos

- AMH (células Sertoli) causa degeneração do ducto Mülleriano

- testosterona (células Leydig) manutenção do ducto Wolffiano

- testosterona convertido em dihidroxi testosterona (DHT) causa masculinização da genitália externa (12^a-13^a semana)

Fase 2: puberdade

SEX REDEFINED

THE IDEA OF TWO SEXES IS SIMPLISTIC. BIOLOGISTS NOW THINK THERE IS A WIDER SPECTRUM THAN THAT.

As a clinical geneticist, Paul James is accustomed to discussing some of the most delicate issues with his patients. But in early 2010, he found himself having a particularly awkward conversation about sex.

A 46-year-old pregnant woman had visited his clinic at the Royal Melbourne Hospital in Australia to hear the results of an amniocentesis test to screen her baby's chromosomes for abnormalities. The baby was fine — but follow-up tests had revealed something astonishing about the mother. Her body was built of cells from two individuals, probably from twin embryos that had merged in her own mother's womb. And there was more. One set of cells carried two X chromosomes, the complement that typically makes a person female; the other had an X and a Y. Halfway through her fifth decade and pregnant with her third child, the woman learned for the first time that a large part of her body was chromosomally male. "That's kind of science-fiction material for someone who just came in for an amniocentesis," says James.

Sex can be much more complicated than it at first seems. According to the simple scenario, the presence or absence of a Y chromosome is what counts: with it, you are male, and without it, you are female. But doctors have long known that some people straddle the boundary — their sex chromosomes say one thing, but their gonads (ovaries or testes) or sexual anatomy say another. Parents of children with these kinds of conditions — known as intersex conditions, or differences or disorders of sex development (DSDs) — often face difficult decisions about whether to bring up their child as a boy or a girl. Some researchers now say that as many as 1 person in 100 has some form of DSD¹.

THE SEX SPECTRUM

A typical male has XY chromosomes, and a typical female has XX. But owing to genetic variation or chance events in development, some people do not fit neatly into either category. Some are classed as having differences or disorders of sex development (DSDs), in which their sex chromosomes do not match their sexual anatomy.

- Chromosomes
- Gonads
- Genitals
- Other characteristics/examples

	Typical male	Subtle variations	Moderate variations	46,XY DSD	
● Chromosomes	● XY	● XY	● XY	● XY	
● Gonads	● Testes	● Testes	● Testes	● Testes	
● Genitals	● Male internal and external genitals	● Male internal and external genitals	● Male external genitals with anatomical variations such as urethral opening on underside of penis.	● Often ambiguous	
● Other characteristics/examples	● Male secondary sexual characteristics	● Subtle differences such as low sperm production. Some caused by variation in sex-development genes.	● Affects 1 in 250–400 births.	● The hormonal disorder persistent Müllerian duct syndrome results in male external genitals and testes, but also a womb and Fallopian tubes.	
	Ovotesticular DSD	46,XX testicular DSD	Moderate variations	Subtle variations	Typical female
● Chromosomes	● XX, XY or mix of both	● XX	● XX	● XX	● XX
● Gonads	● Both ovarian and testicular tissue	● Small testes	● Ovaries	● Ovaries	● Ovaries
● Genitals	● Ambiguous	● Male external genitals	● Female internal and external genitals	● Female internal and external genitals	● Female internal and external genitals
● Other characteristics/examples	● Rare reports of predominantly XY people conceiving and bearing a healthy child.	● Usually caused by presence of male sex-determining gene <i>SRY</i> .	● Variations in sex development such as premature shutdown of ovaries. Some caused by variation in sex-development genes.	● Subtle differences such as excess male sex hormones or polycystic ovaries.	● Female secondary sexual characteristics

O que é meiose e
quando a mesma inicia
nos sexos masculinos e
femininos?

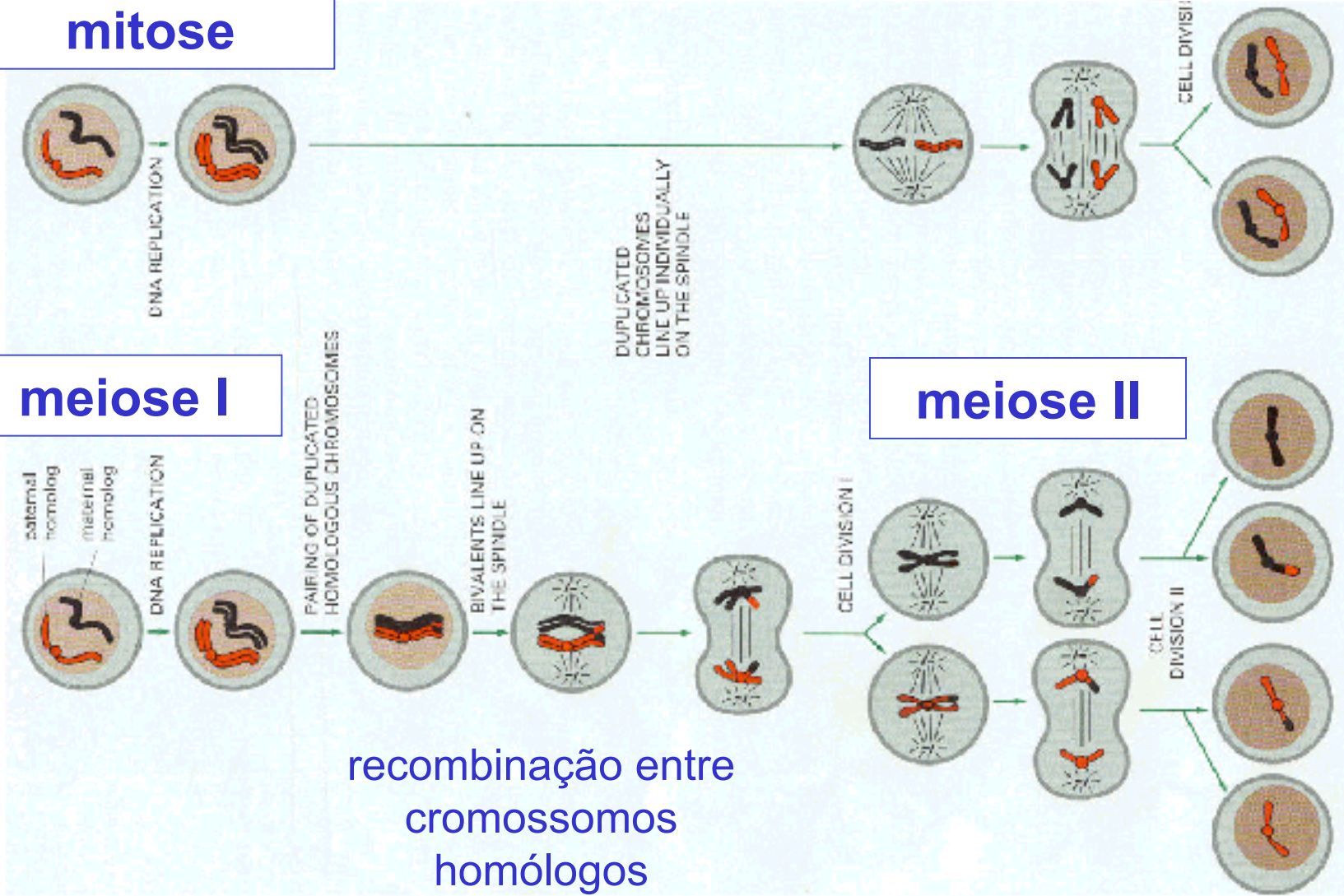
meiose em vez de mitose - uma grande decisão na linhagem germinativa

2 células $2n$ idênticas

mitose

meiose I

meiose II



recombinação entre cromossomos homólogos

4 gametas n diferentes

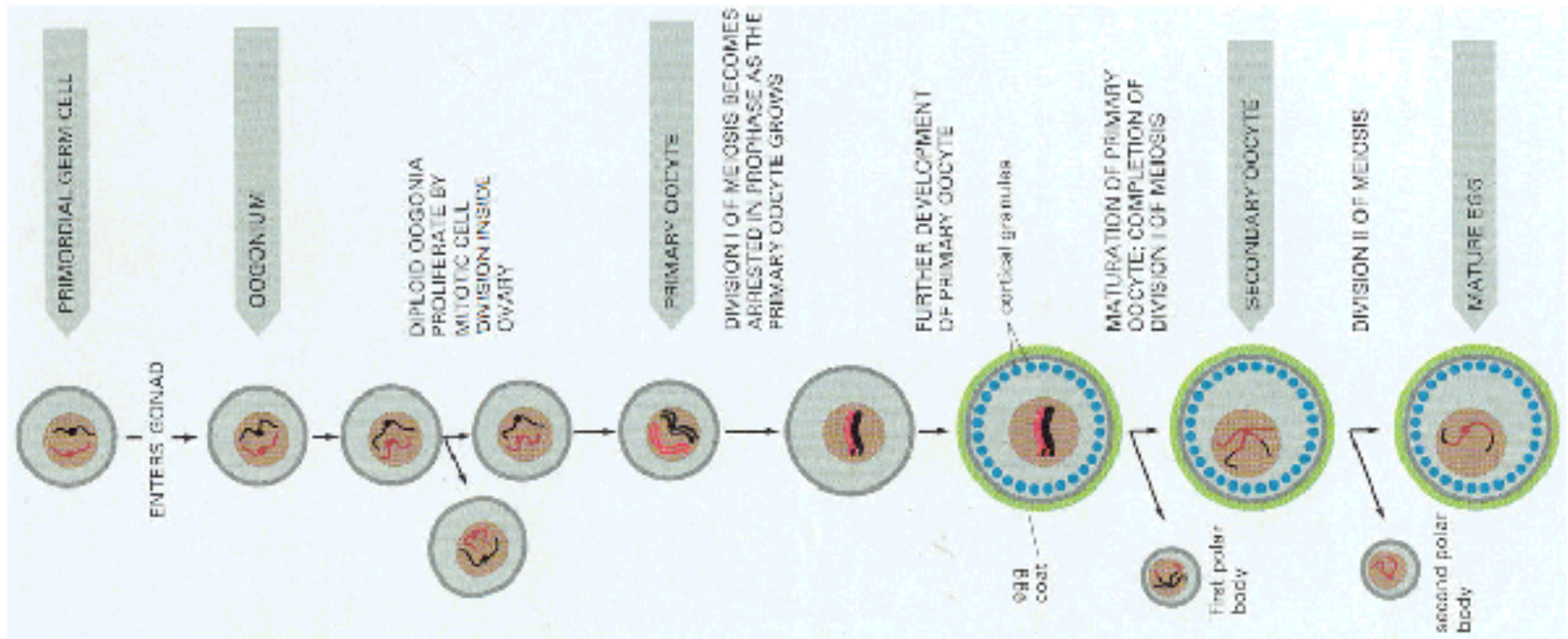
ovogênese

Descrição detalhada da foliculogênese: Reinier de Graaf (1641-1673)

Descoberta do óvulo humano - Karl Ernst von Baer, em 1827

- proliferação mitótica de células germinativas primordiais (**ovogônias**), seguida por alta taxa de morte celular programada
- entrada em prófase de meiose (**ovócito primário**) já na fase embrionária
- bloqueio meiótico persiste até ovulação
- controle hormonal garante e sincroniza desenvolvimento do **folículo dominante** e do endométrio uterino em cada ciclo ovariano a partir da menarca

meiose no sexo feminino e ovogênese



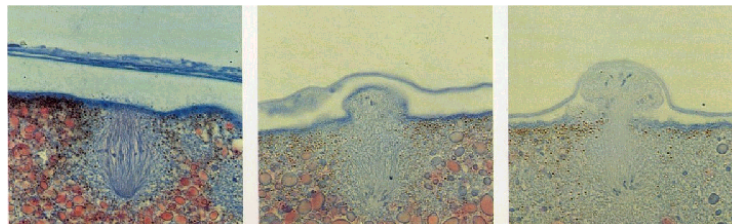
mitose em ovogônias

ovócito primário em
meiose I:

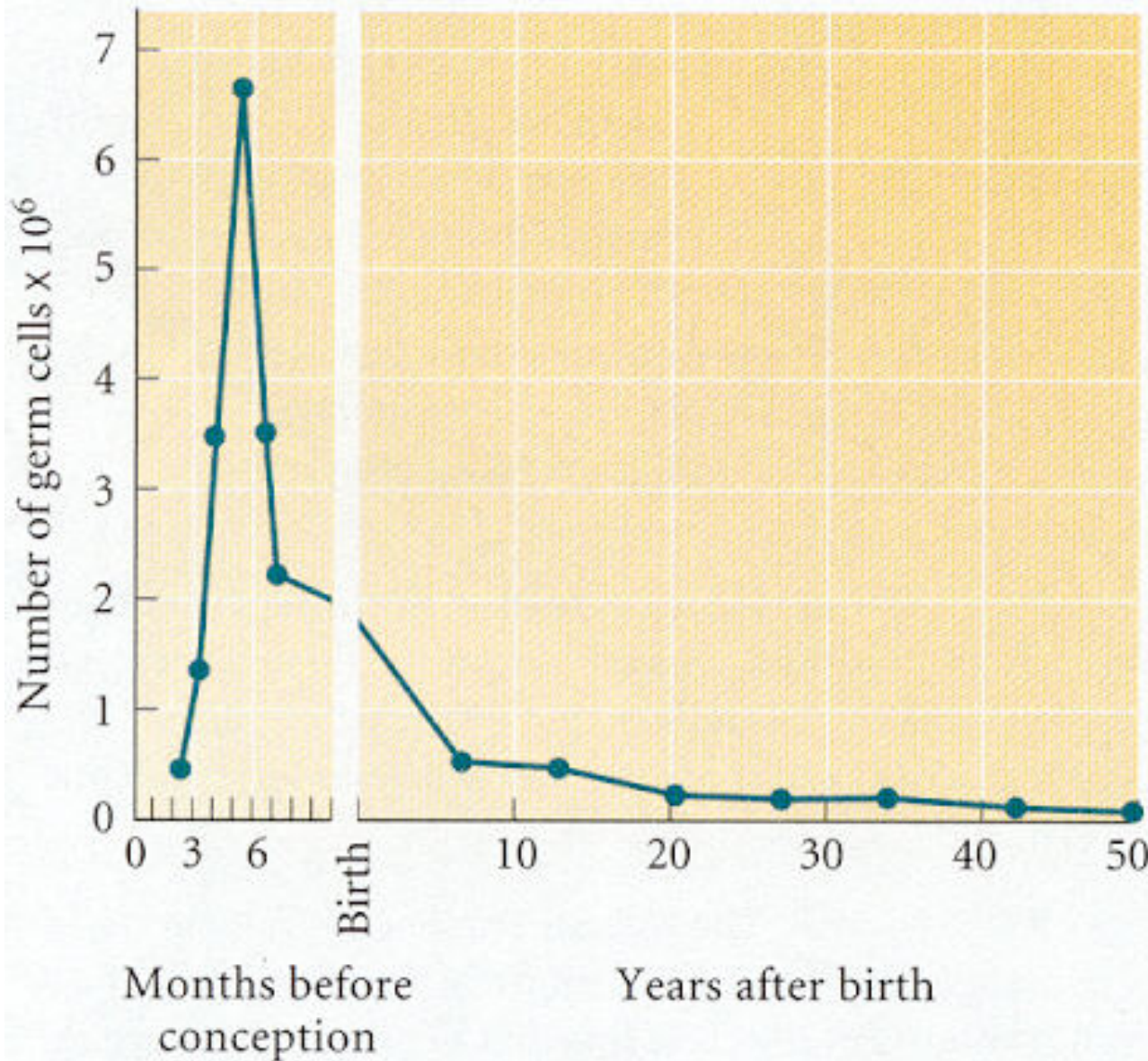
gera ovócito secundário e
corpusculo polar I

ovócito secundário
em meiose II:

gera óvulo maduro e
corpusculo polar II



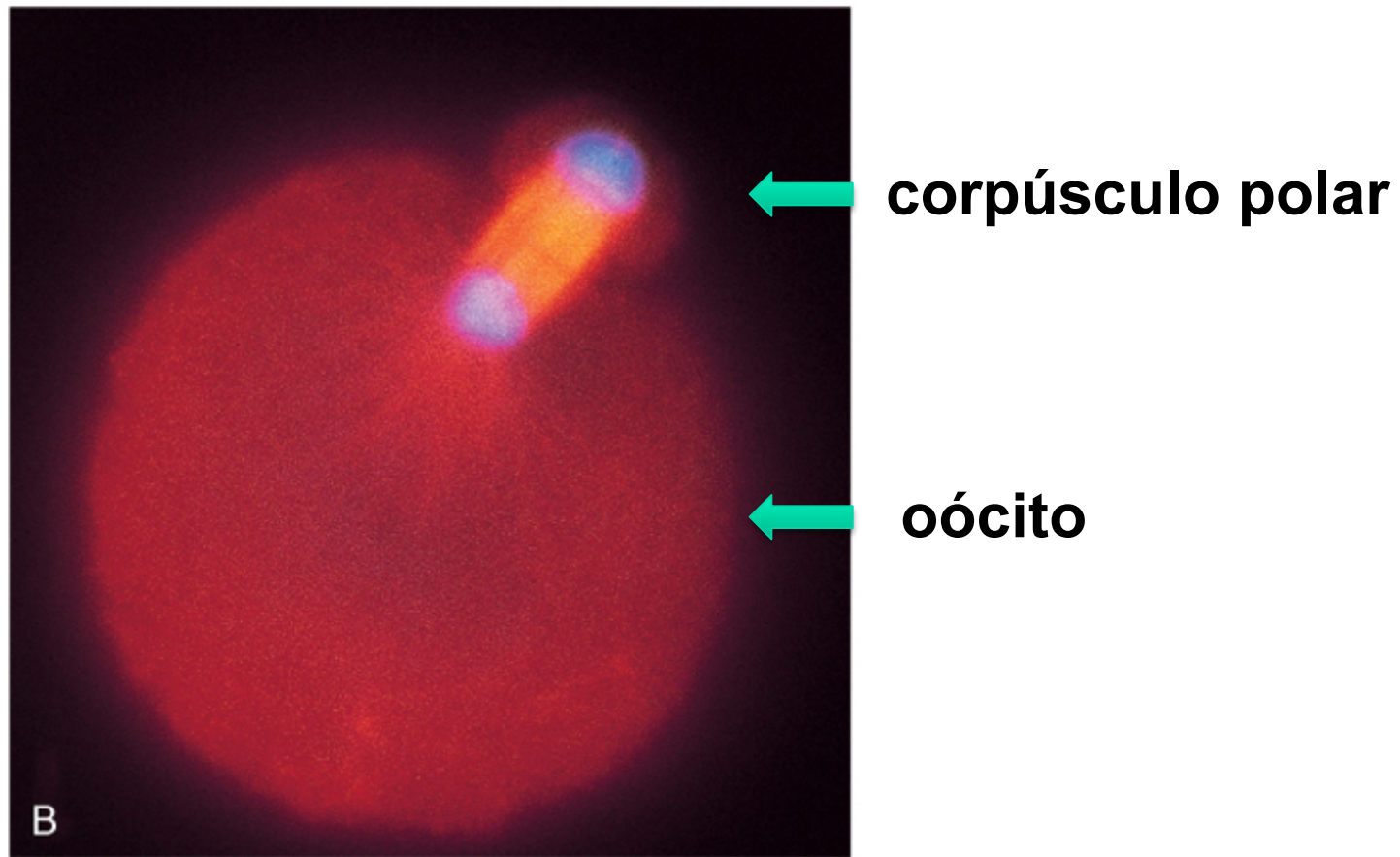
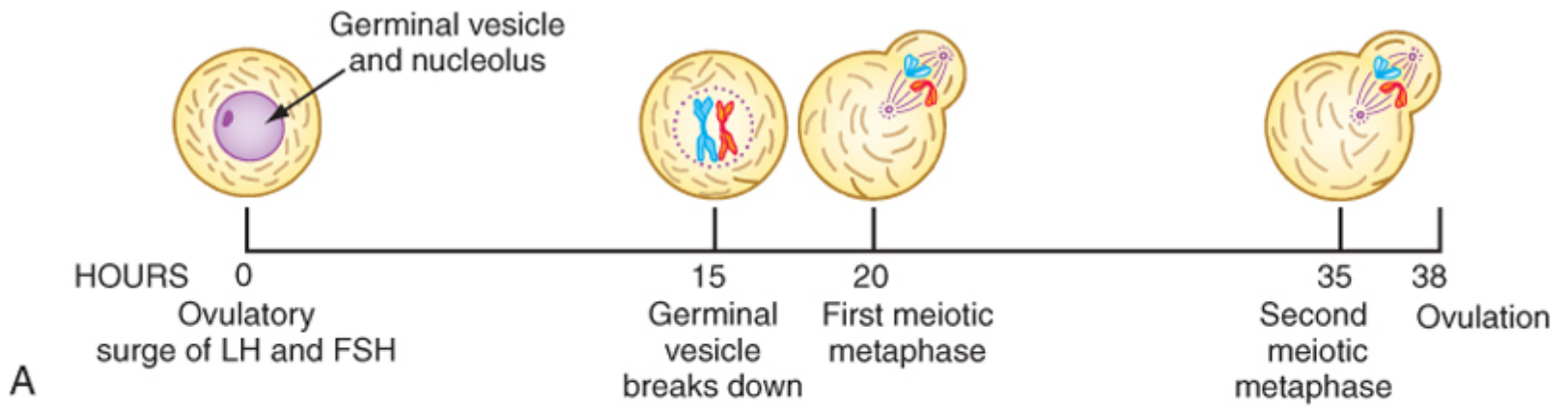
ovogônias e oócitos primários



proliferação de
células
germinativas
primordiais

apoptose da
maioria até fase
perinatal

na entrada da
puberdade:
400.000 - 500.000
oócitos primários



desenvolvimento de folículos no ciclo ovariano

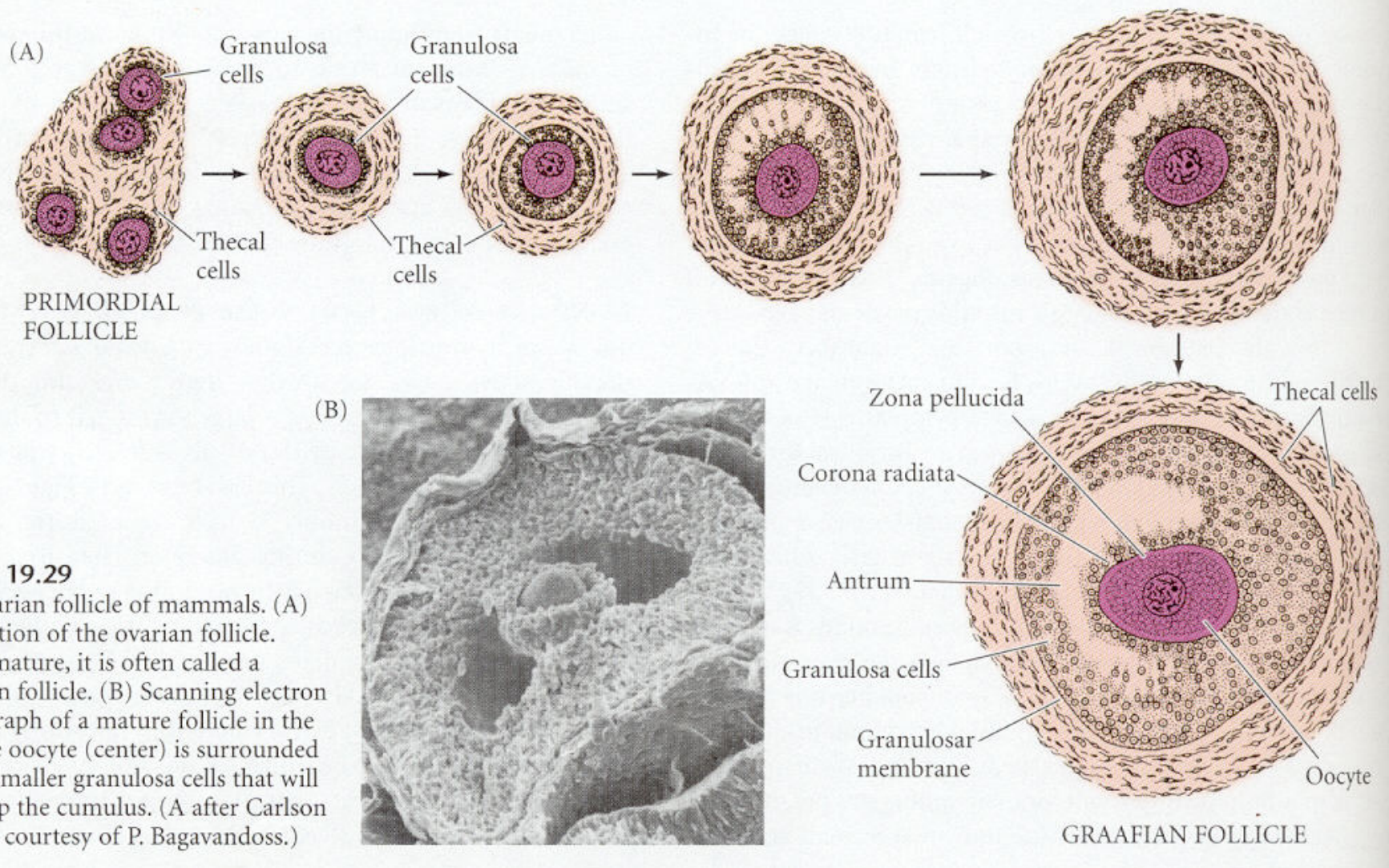


Figure 19.29

The ovarian follicle of mammals. (A) Maturation of the ovarian follicle. When mature, it is often called a Graafian follicle. (B) Scanning electron micrograph of a mature follicle in the rat. The oocyte (center) is surrounded by the smaller granulosa cells that will make up the cumulus. (A after Carlson 1981; B courtesy of P. Bagavandoss.)

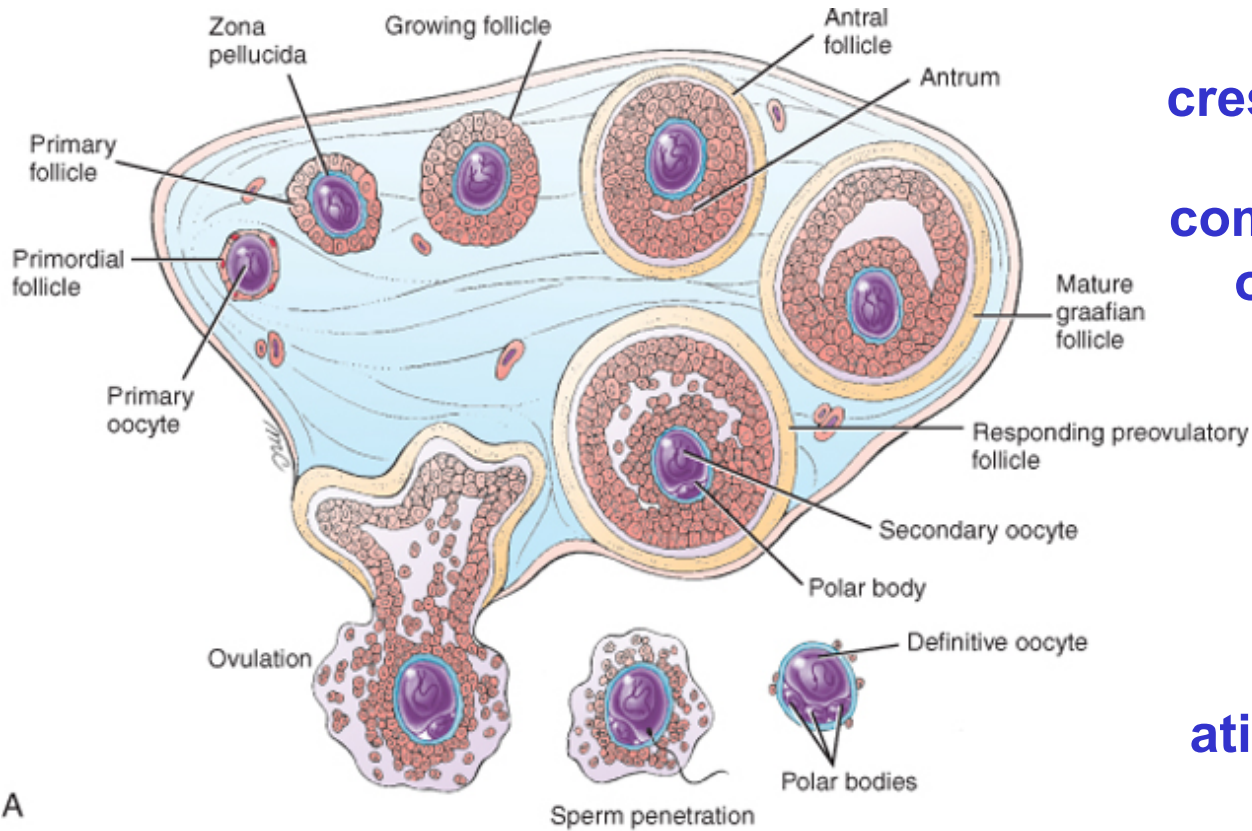
**folículo: oócito primário com zona pelúcida (matriz extracelular)
camadas celulares somáticas: granulosa e tecas**

crescimento de folículos

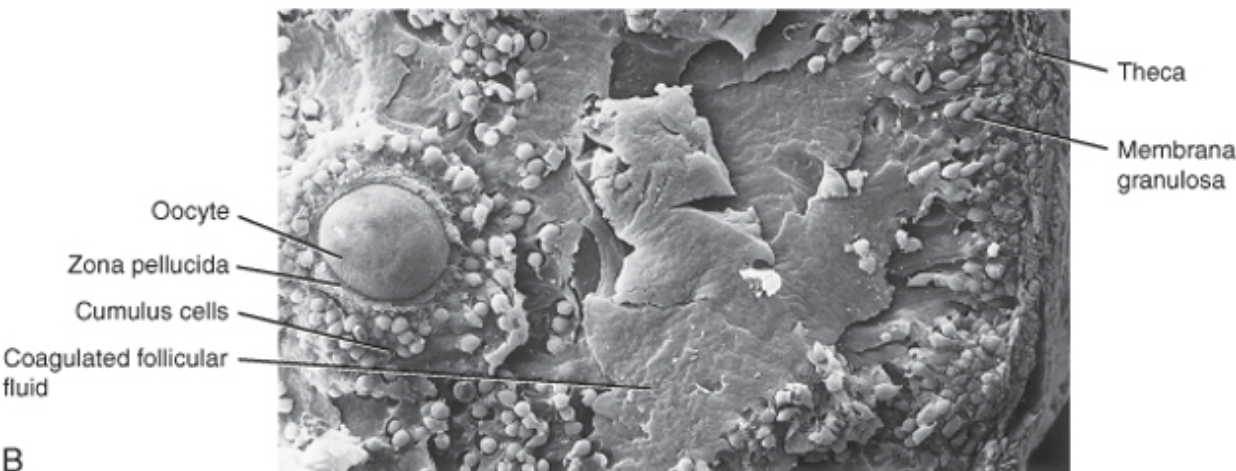
competição entre folículos,
o “folículo dominante”

ovulação

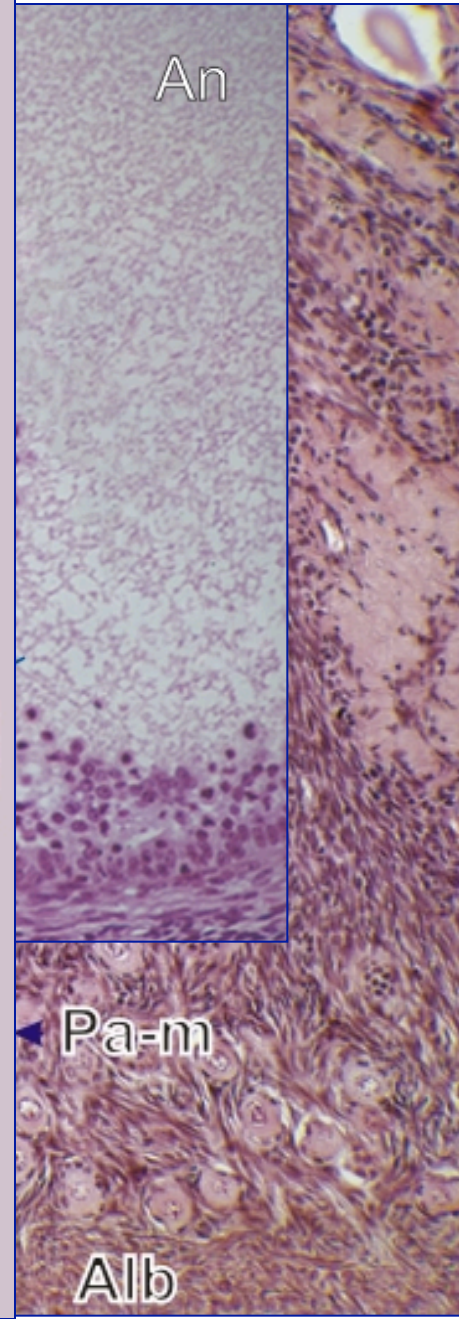
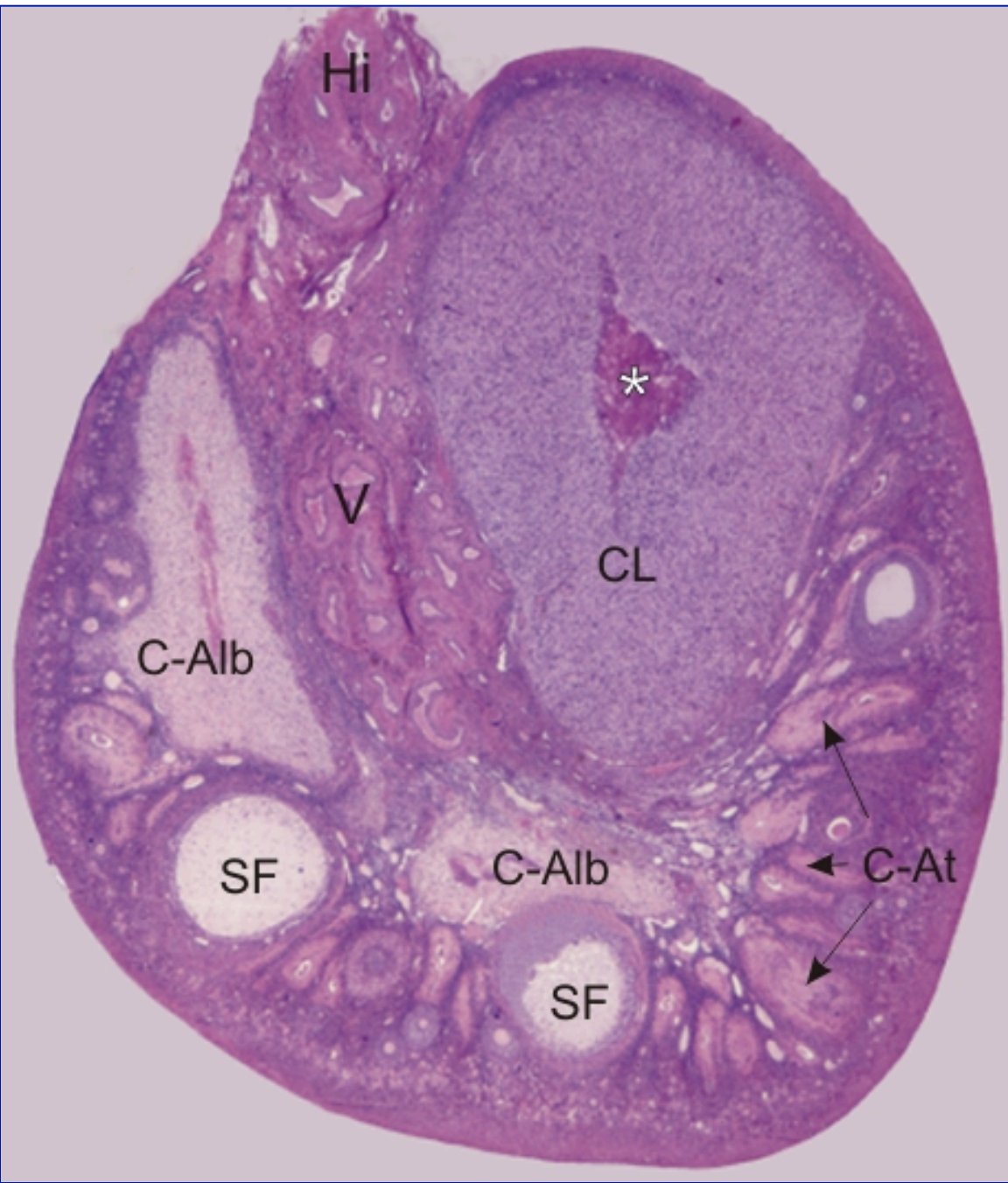
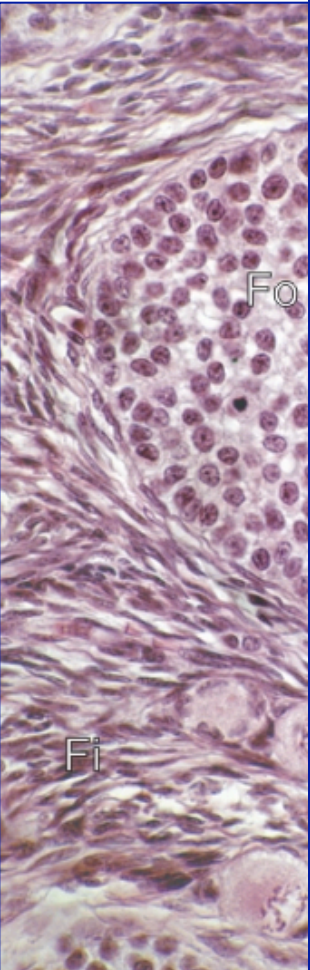
atividade do corpo lúteo



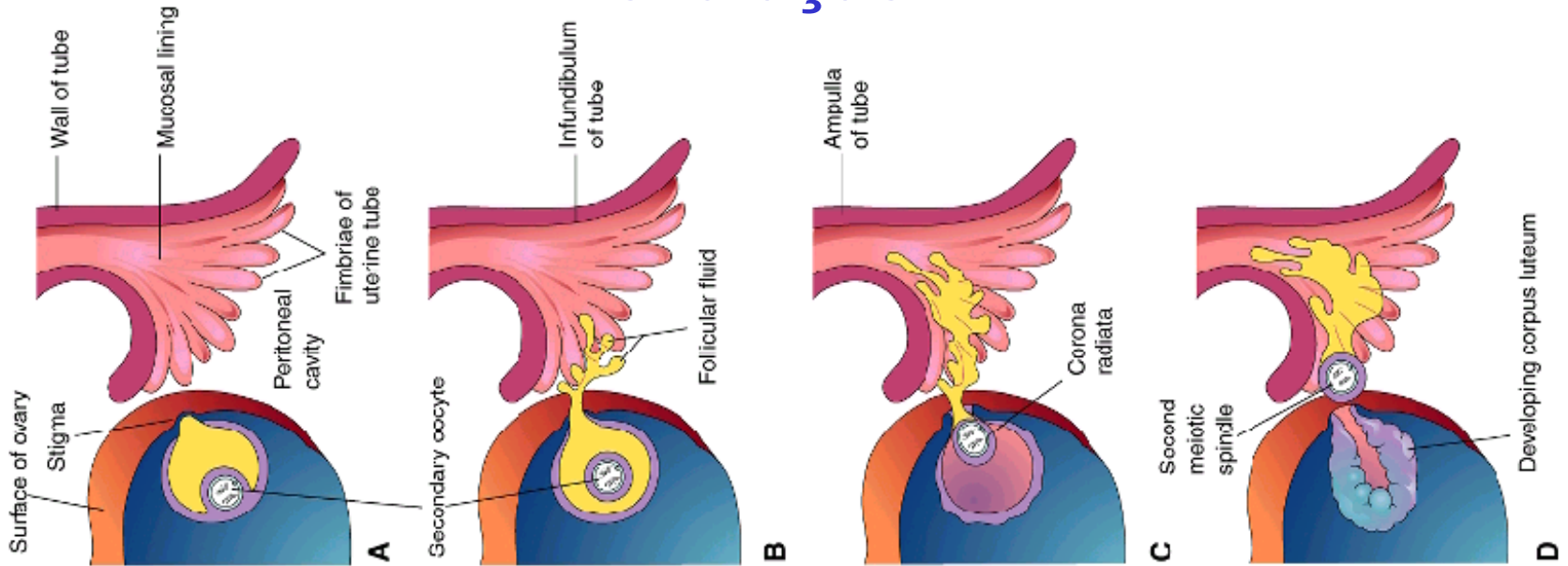
A



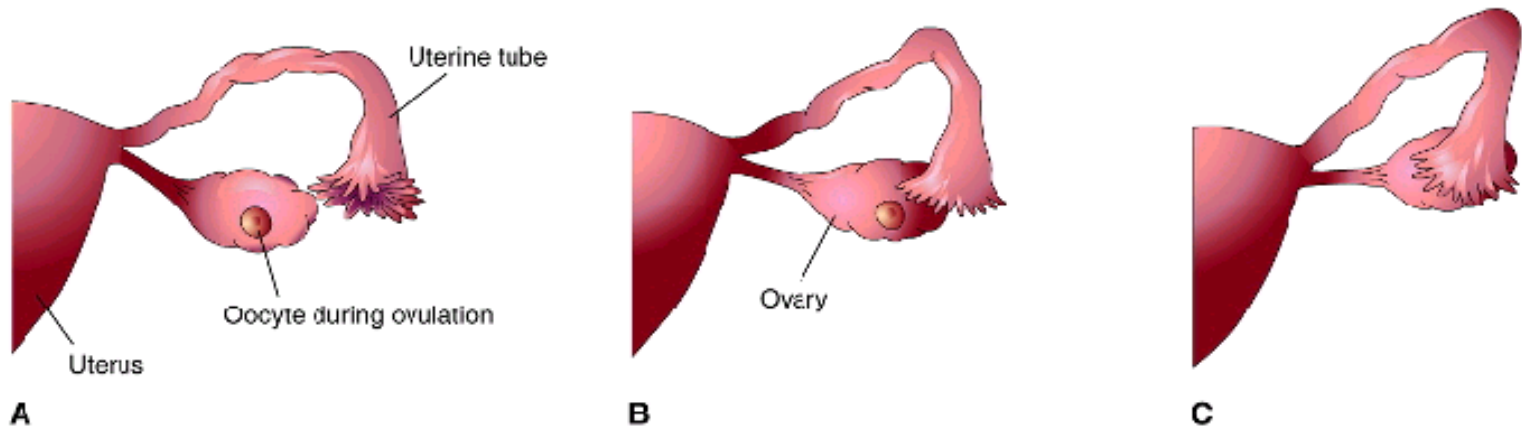
B



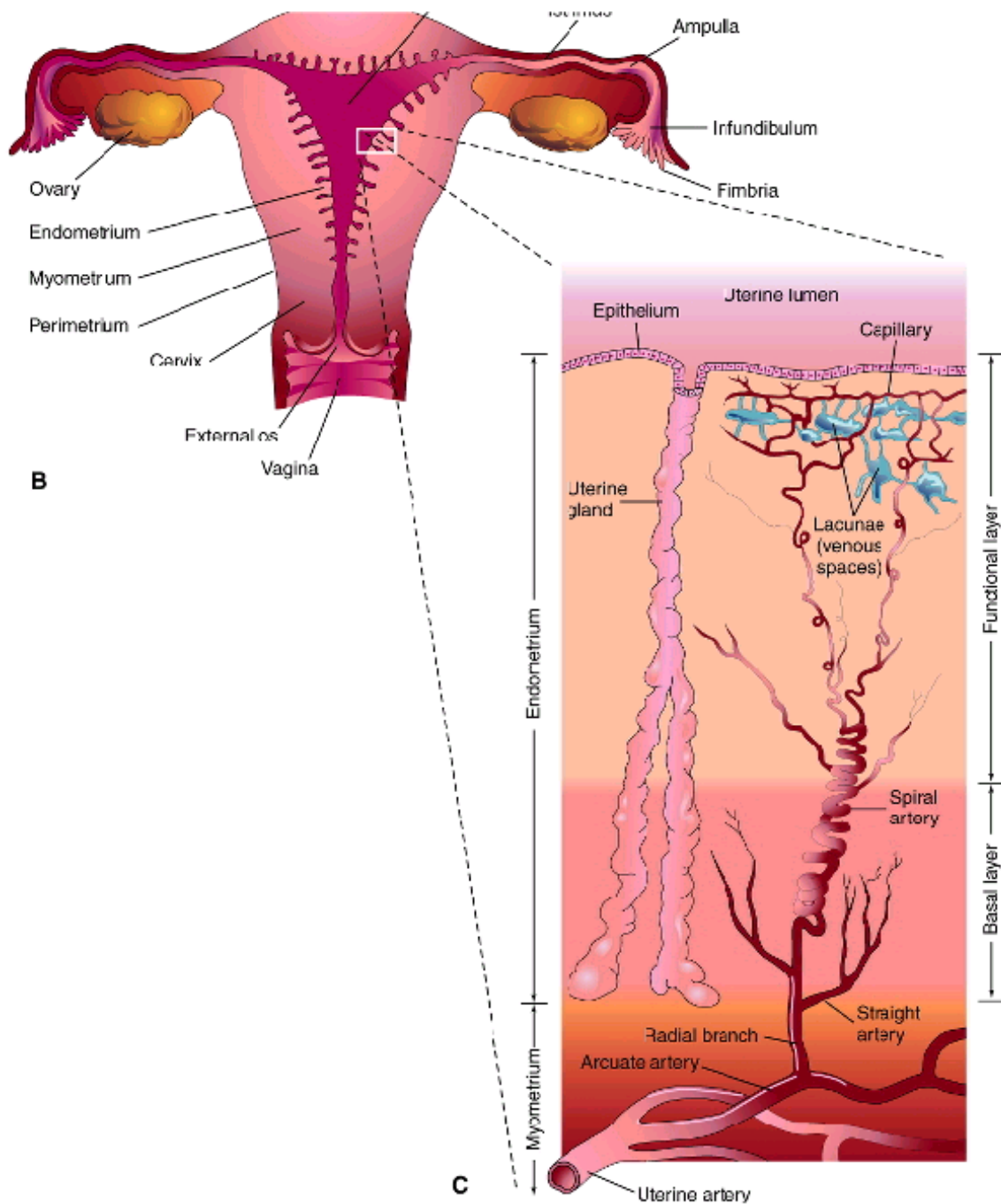
ovulação



óvulo (oócito secundário) é expulso junto com com a *corona radiata*



movimento do tubo uterino durante ovulação



proliferação das camadas do endométrio e das glândulas, vascularização intensa do endométrio por artérias espiraladas e redes capilares

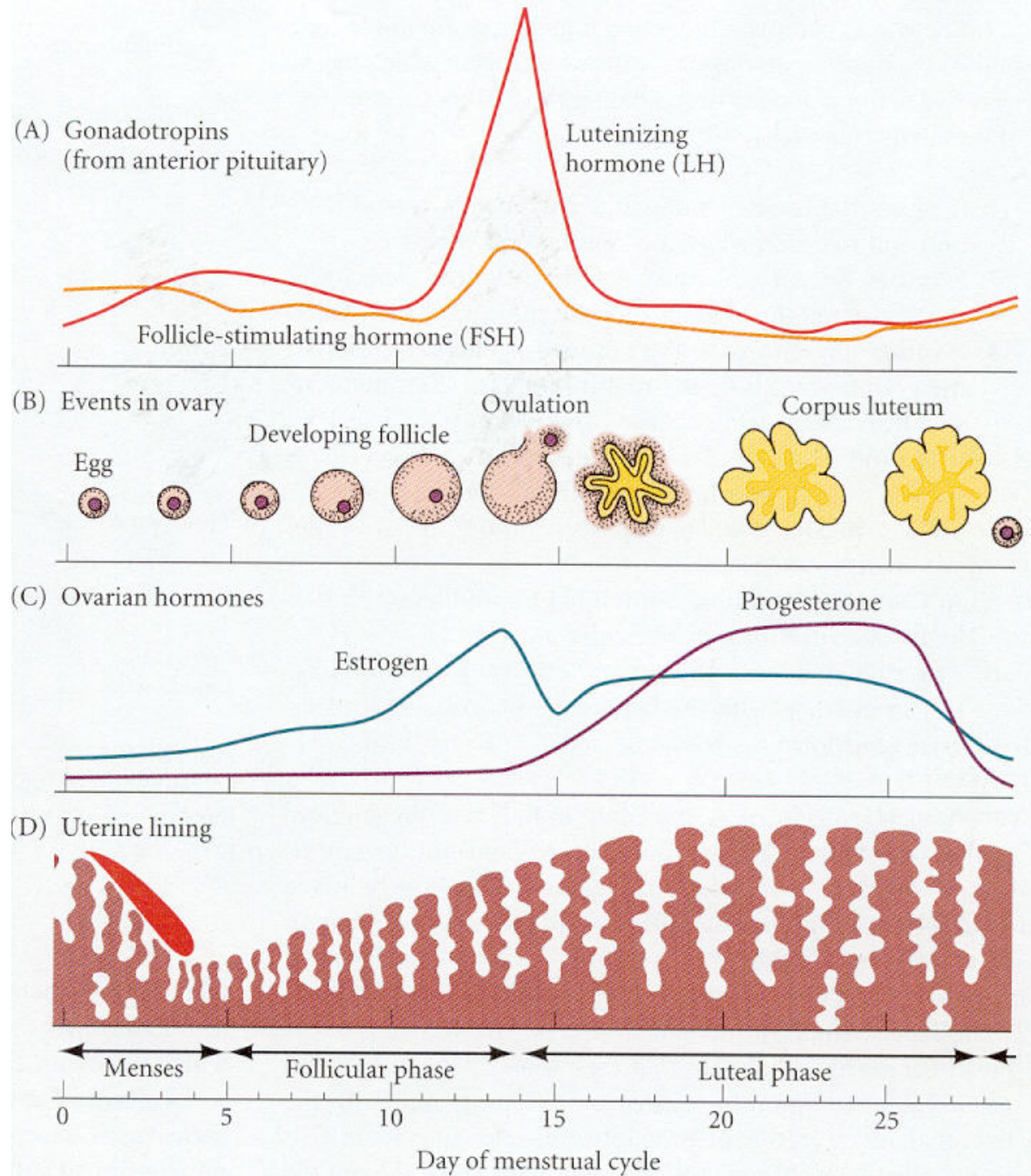
regulação hormonal da ovogênese e do desenvolvimento do endométrio

hipotálamo: GnRH

hipófise: FSH e LH

folículo: estrógeno e progesterona

pico de LH quebra bloqueio da meiose I, formação e liberação de oócito secundário na ovulação



regulação hormonal pós ovulatório

fase luteal - sem fertilização

corpo lúteo sintetiza principalmente progesterona e menos estrógeno

diminuição gradual da produção hormonal pelo corpo lúteo
baixas conc. de estrógeno e progesterona induzem liberação de GnRH

efeito: induz novo ciclo ovariano

fase luteal - com fertilização

corpo lúteo sintetiza principalmente progesterona e menos estrógeno

após implantação, **síntese de progesterona no corpo lúteo mantido por gonadotropina coriônica** produzido pelo sincíotrofoblasto

efeito: bloqueia novo ciclo estral

espermatogênese

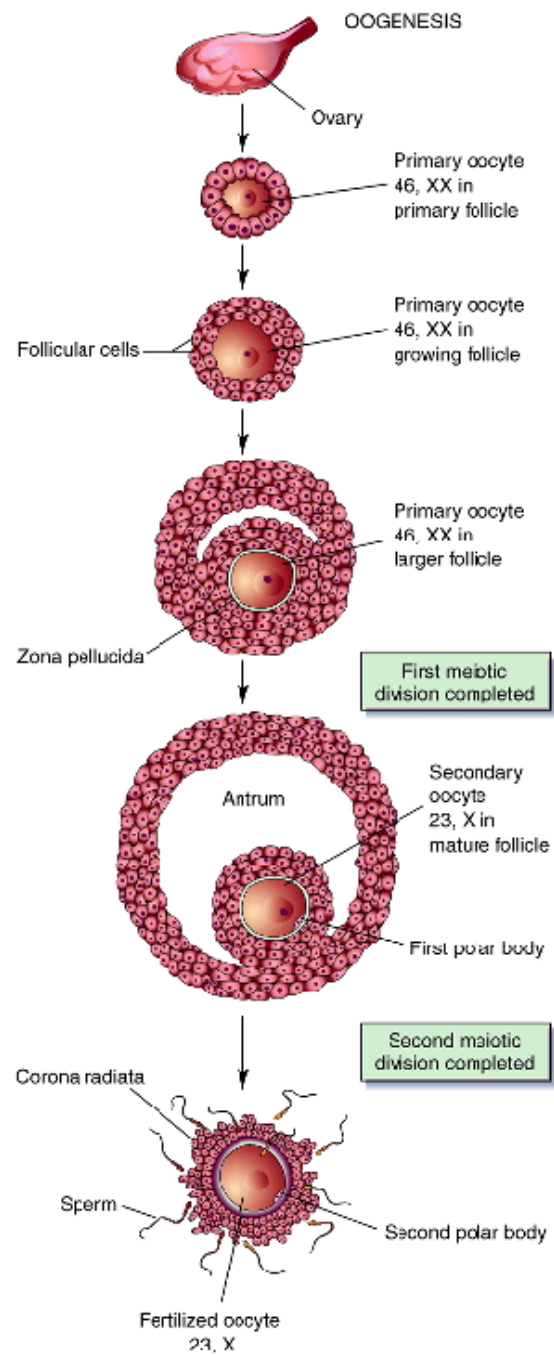
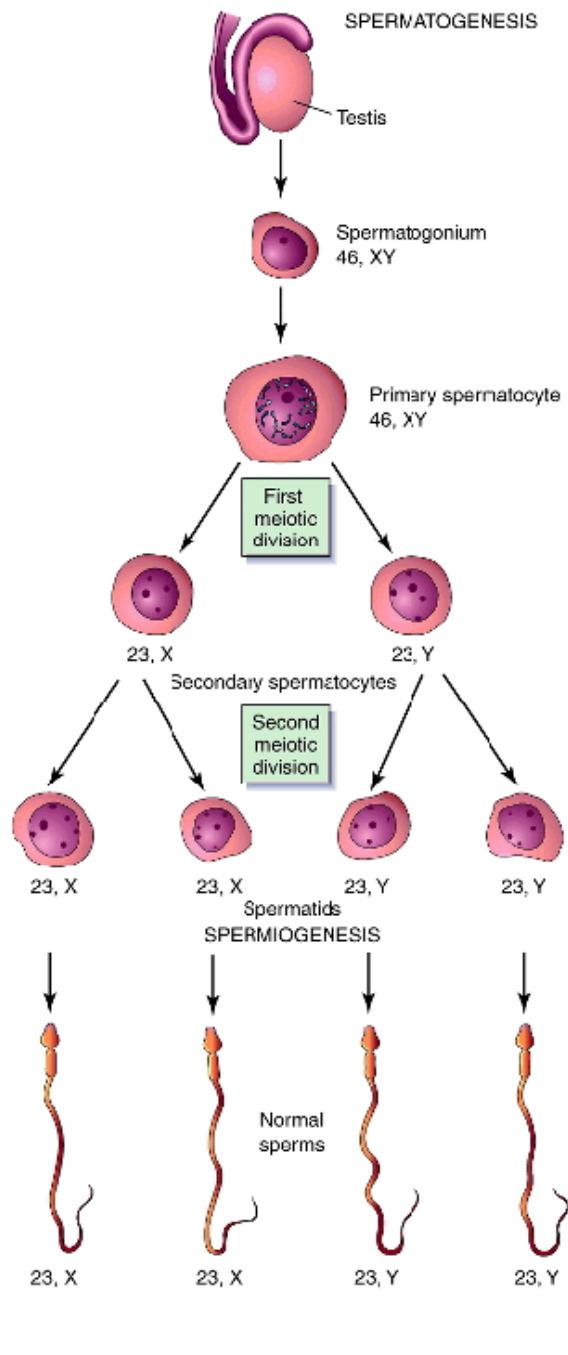
inicia na puberdade sob controle de testosterona

duas fases da espermatogênese:

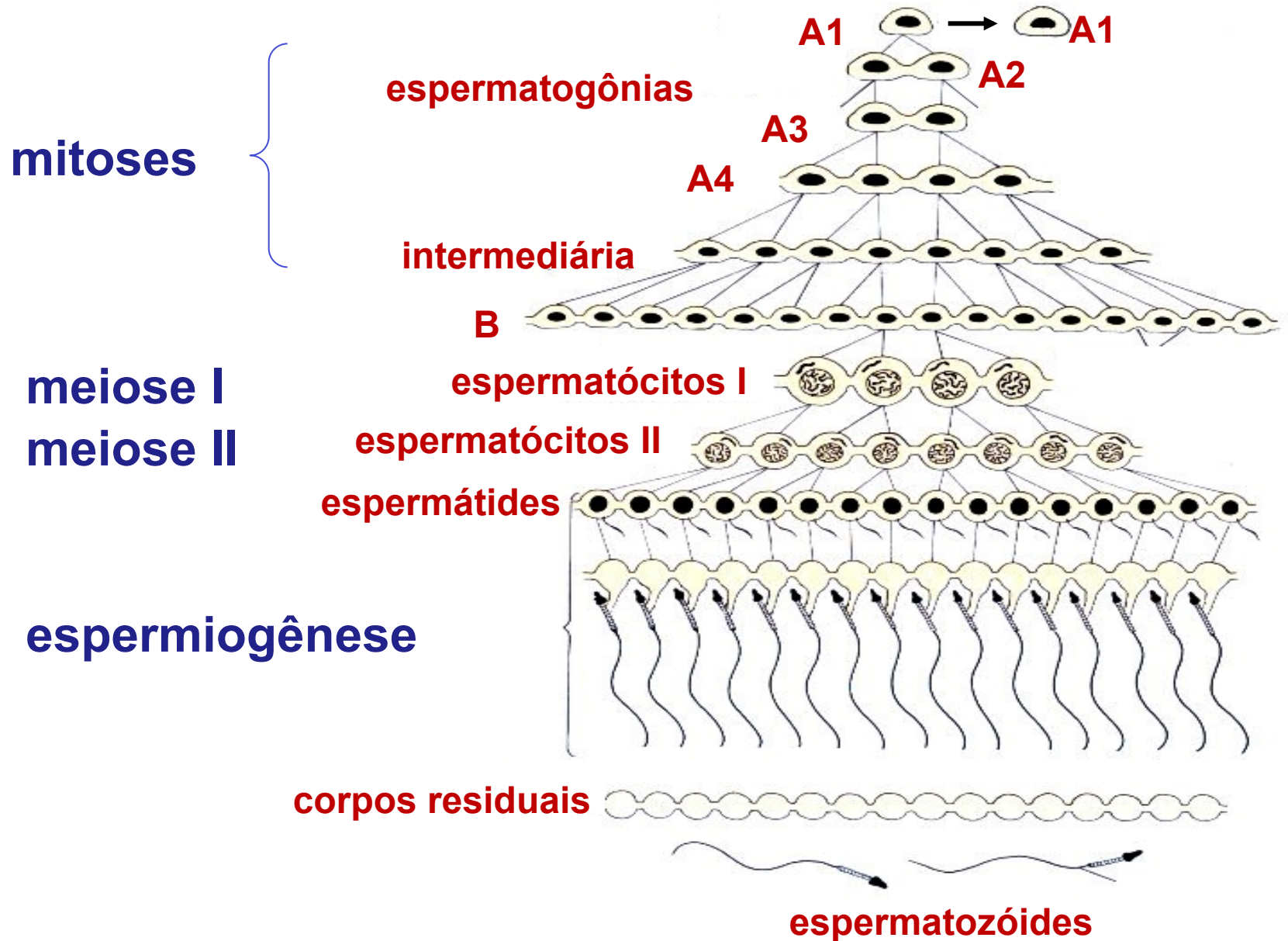
- meiose gera 4 espermátides
- na espermiogênese ocorre a diferenciação dos espermátides em espermatozóides



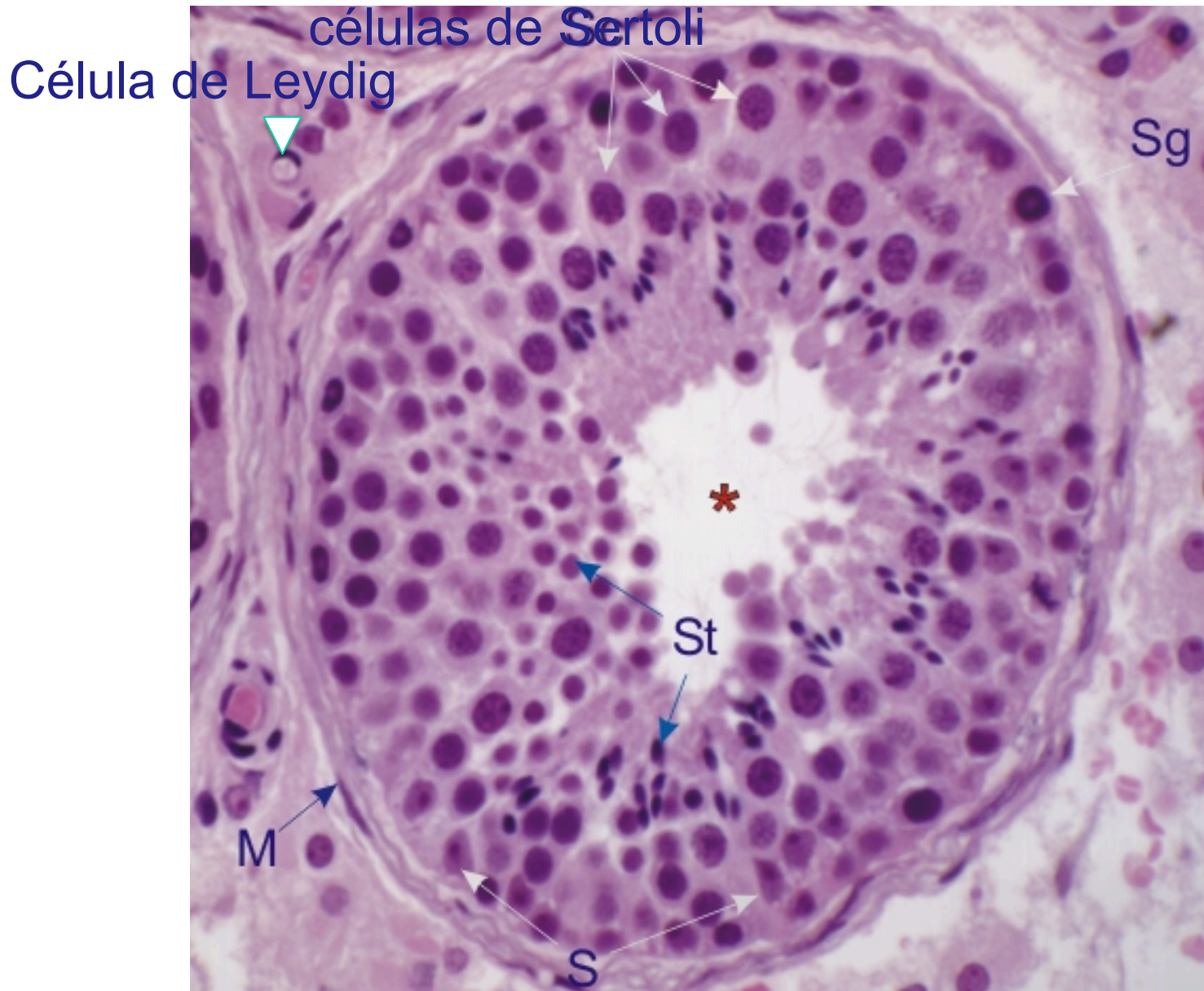
Hartsoeker
(1694)



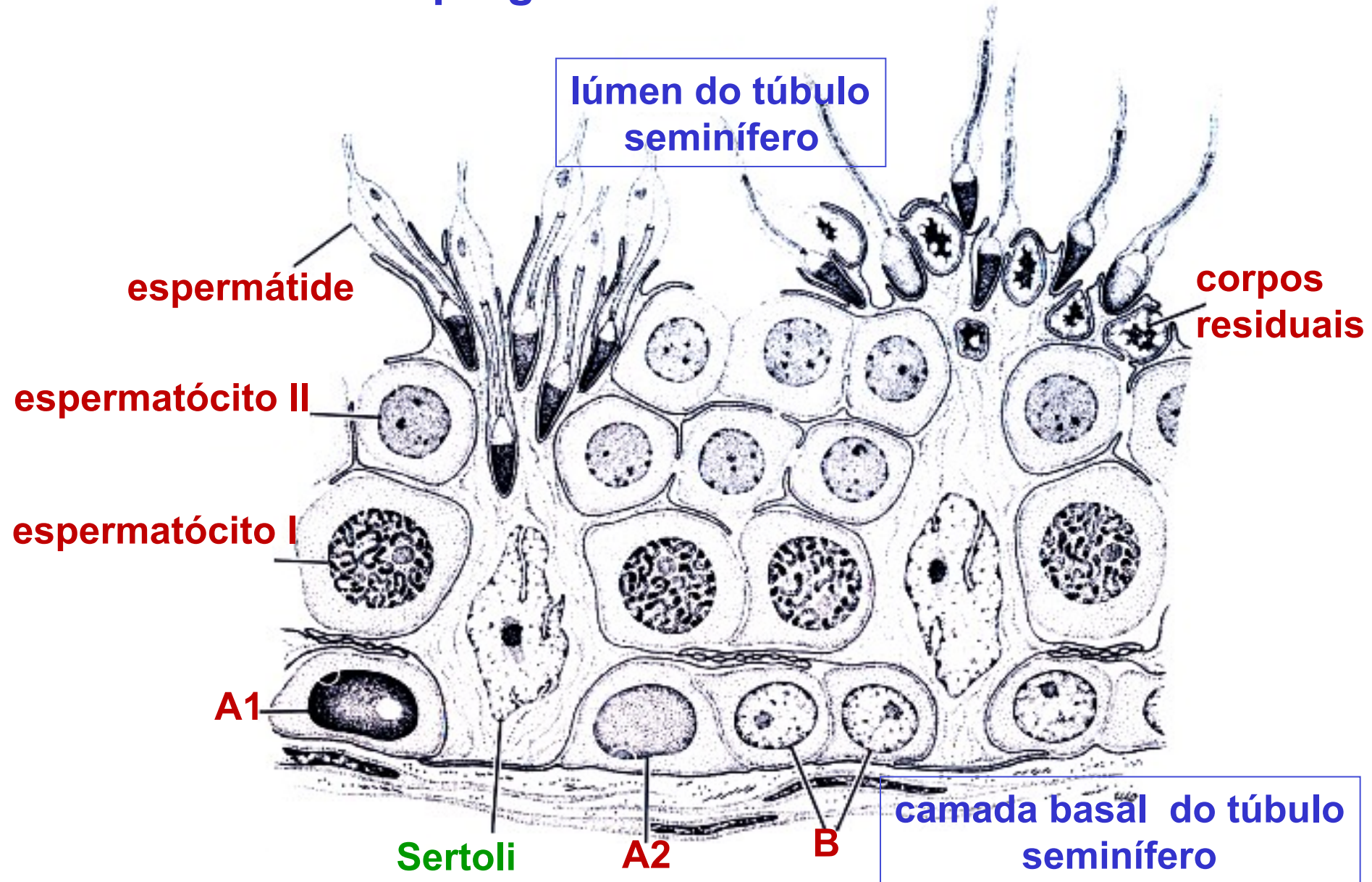
resumo esquemático da espermatogênese



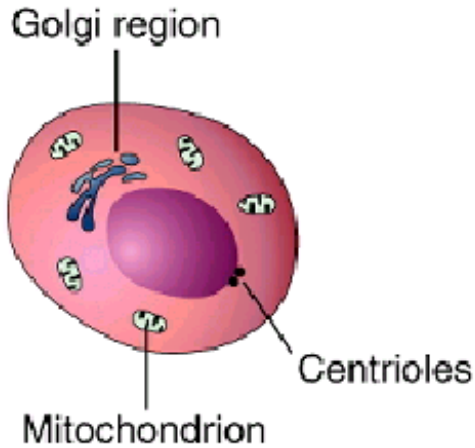
espermatogênese e espermiogênese no túbulo seminífero



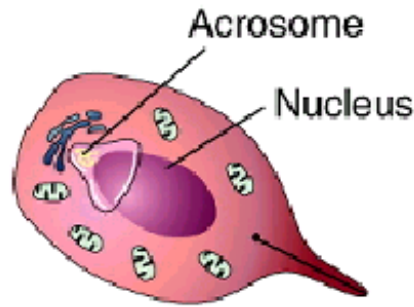
no túbulo seminífero a espermatogênese ocorre em progressão basal-luminal



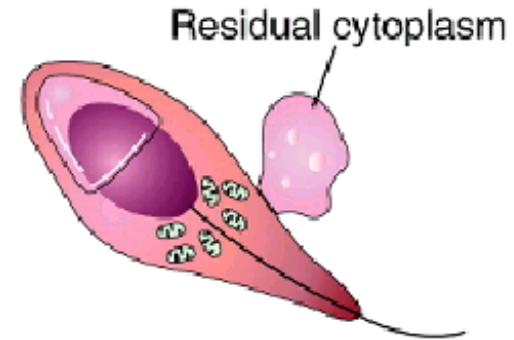
espermio gênese



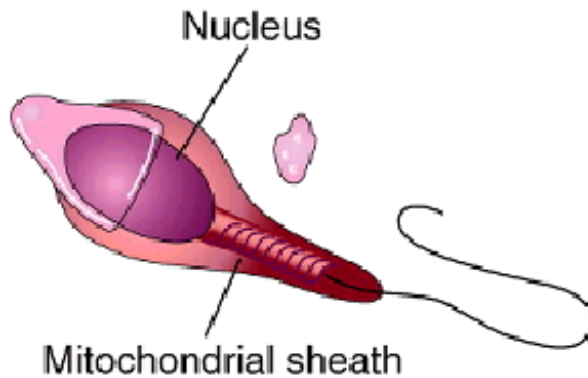
aparelho Golgi forma o vesículo do acrossomo (síntese de enzimas líticas)



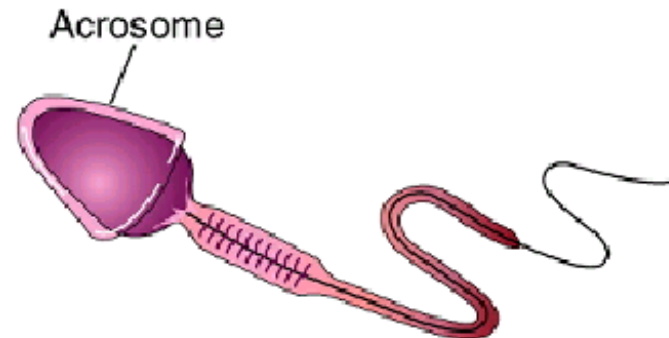
condensação da cromatina (inativação) - substituição de histones por protaminas



perda de parte do citoplasma



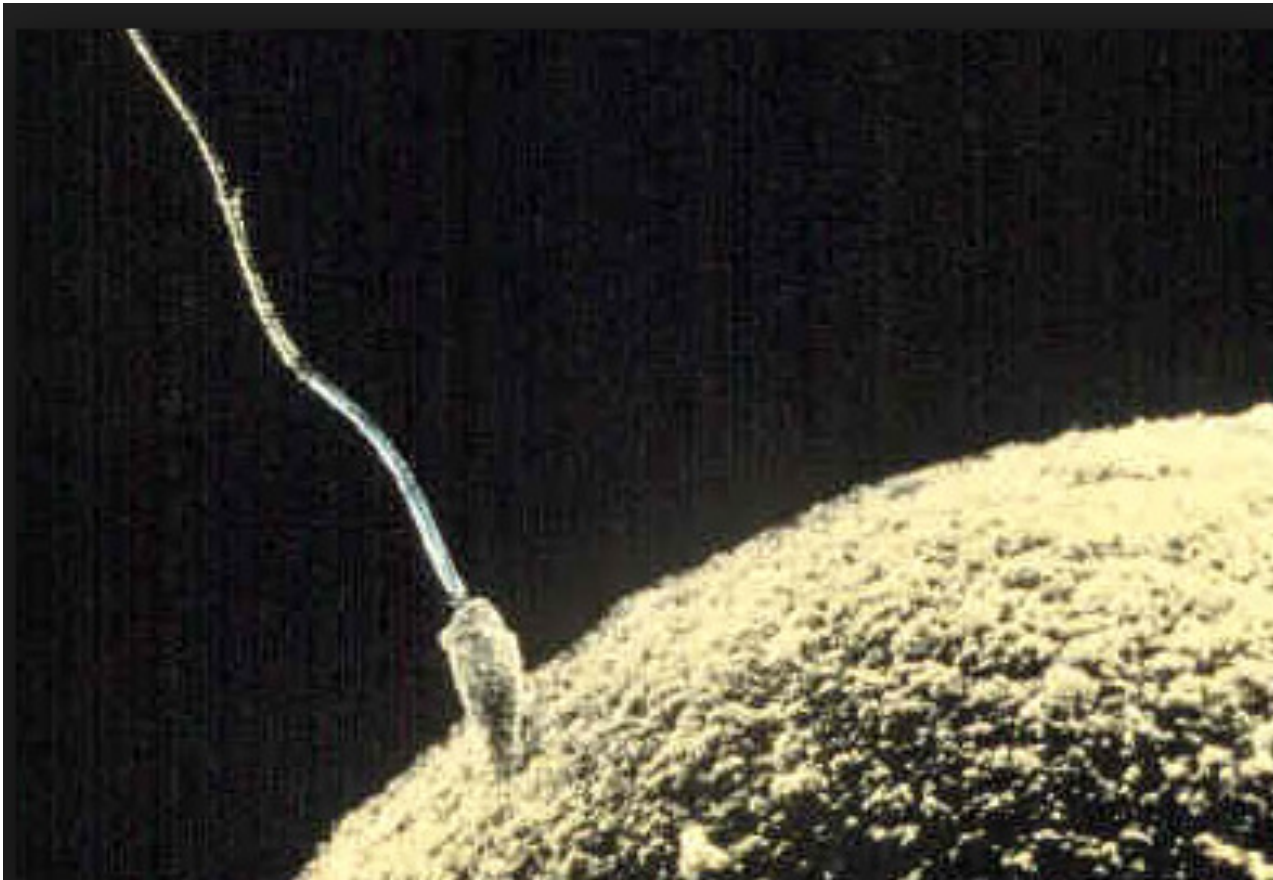
mitocôndrias migram para a base do flagelo e formam agregado (energia)



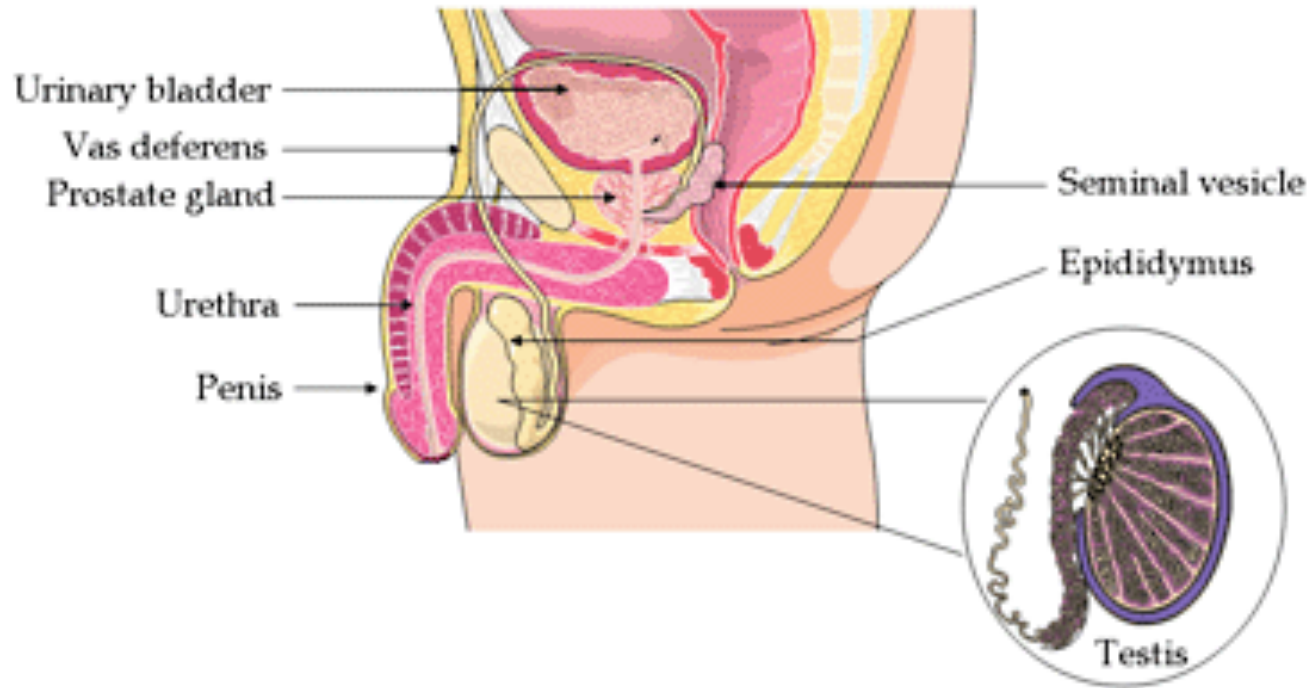
do centríolo inicia-se a formação do flagelo

Tópico 2

Fertilização e fatores que contribuem à infertilidade



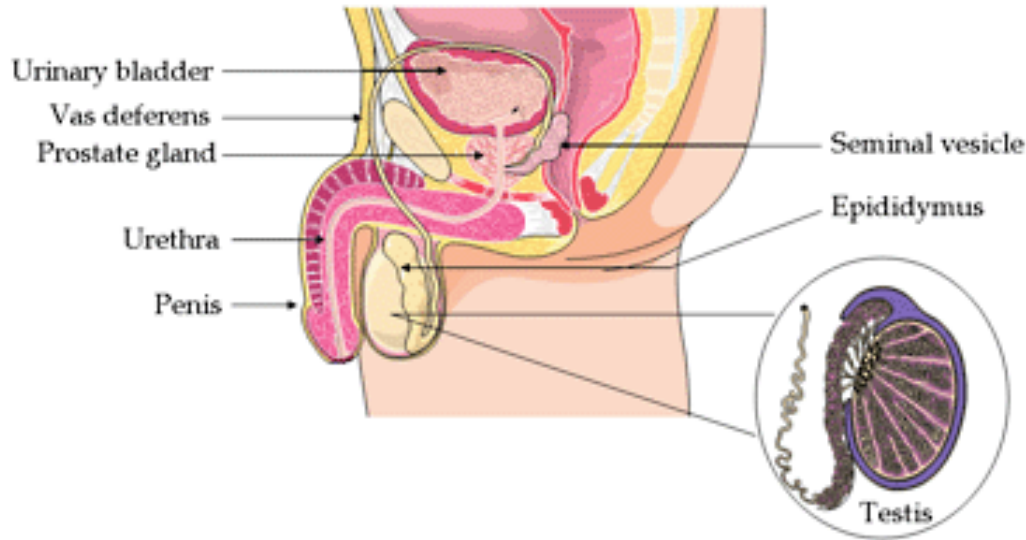
passagem dos espermatozóides pelo sistema reprodutivo masculino



migração dos espermatozóides dos túbulos seminíferos para o epidídimo

- retenção de água (mediado por esteróides andrógénicos)
- concentração de espermatozóides (maior # no ejaculado)
- redução do metabolismo (pouca reserva de ATP)

Human Male Reproductive System



emissão e ejaculação: contrações musculares (peristálticas) dos ductos deferentes garantem transporte rápido de espermatozóides maduros

mistura com secreções das glândulas acessórias: glândulas seminais (frutose), bulbo-uretrais e prostata (prostaglandinas, etc.) forma líquido seminal

ejaculado de 2-6 ml contém 100-600 milhões de espermatozóides (média de 300 milhões)

passagem dos espermatozoides pelo sistema reprodutivo feminino e capacitação

**viabilidade de espermatozoides no trato genital feminino:
max. 48 horas**

primeira barreira: retenção de espermatozoides com baixa motilidade no muco vaginal - ácido

segunda barreira: muco do colo do útero, altamente viscoso (menos na ovulação - controle hormonal)

**passagem pelo útero: mudança de pH para alcalino
aumenta motilidade**

passagem pelas trompas: retenção nas pregas, epitélio ciliado (contrafluxo laminar)

**dos ~300 milhões de espermatozoides ejaculados
apenas ~200 chegam na ampola do oviduto,
duração da passagem 5 - 45 min**

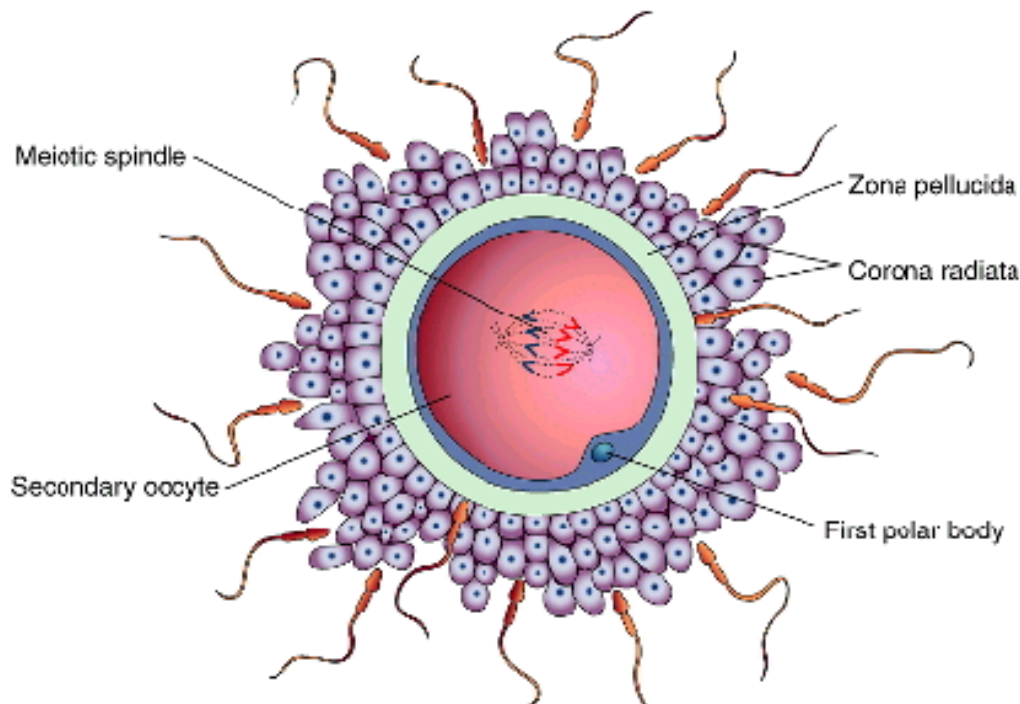
capacitação de espermatozóides

espermatozóides necessitam de capacitação para que possam fertilizar o óvulo

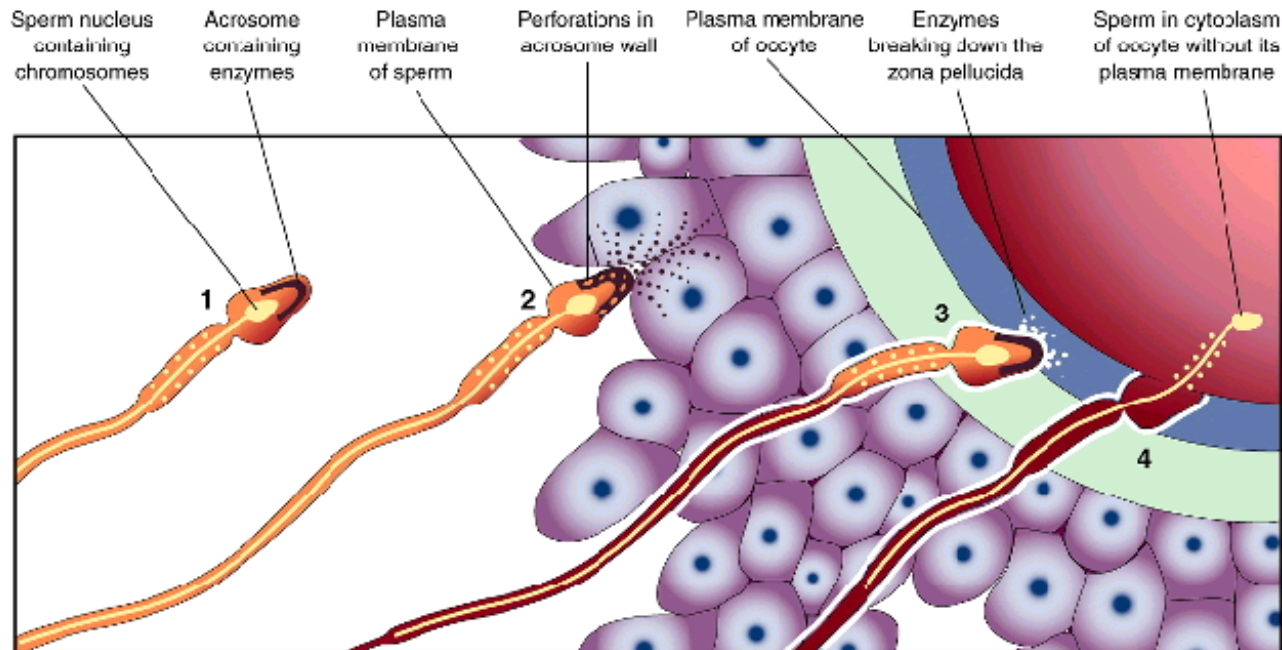
capacitação ocorre no trato reprodutivo feminino, por fatores secretados

capacitação envolve:

- **remoção de colesterol da membrana do espermatozóide** por ligação com proteínas albumínicas no útero (aumento de pH intracelular e abertura de canais de cálcio - ativação de cascata de transdução de sinal intracelular)
- **perda de carboidratos específicos da superfície do espermatozóide** (desbloqueio de sítios de ligação com proteínas da zona pelúcida)

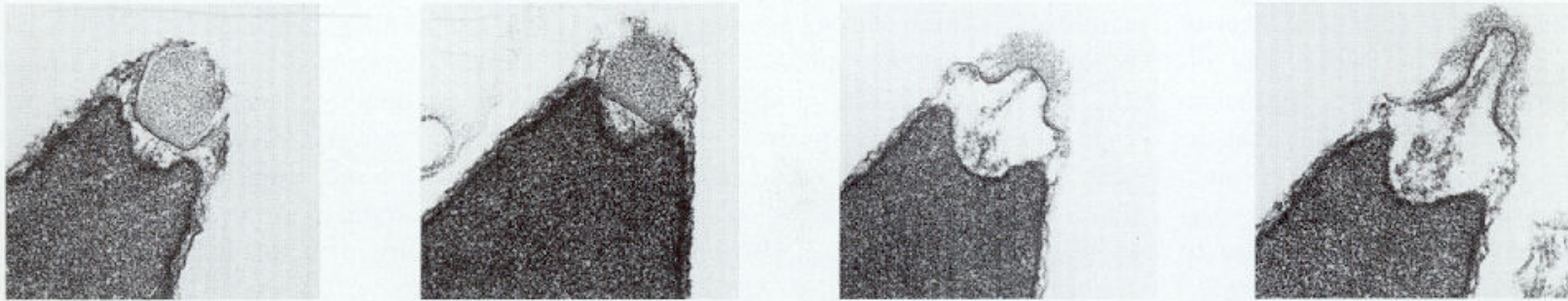
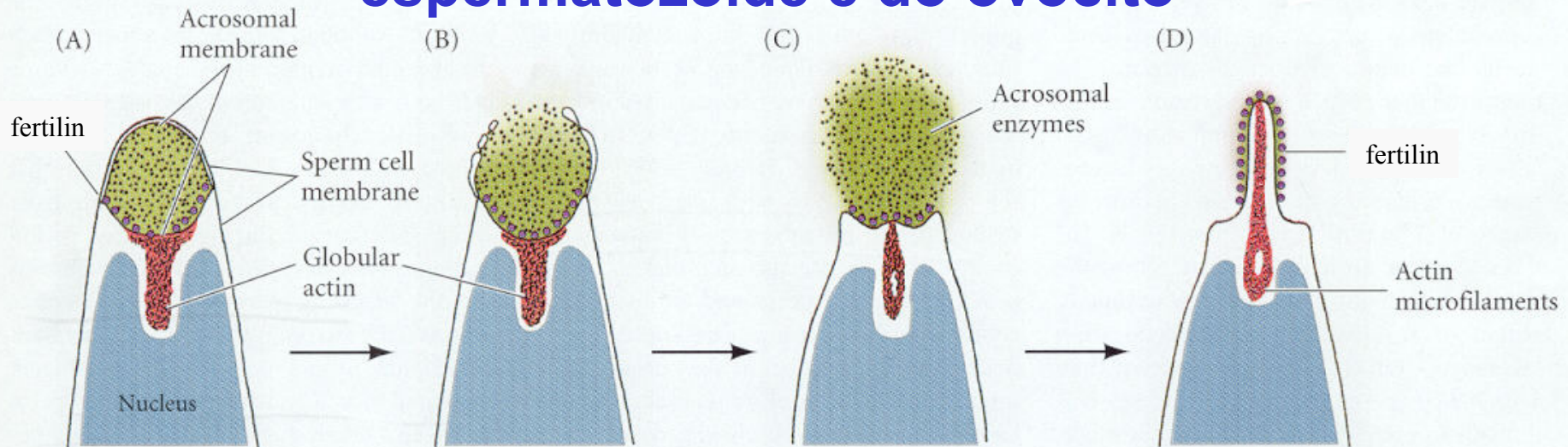


espermatozoides precisam passar pela barreira da corona radiata e zona pelúcida



contato com proteínas da zona pelúcida (ZP 1 e ZP3) causa interação com proteínas do espermatozóide, que elicitam reação acrossômica

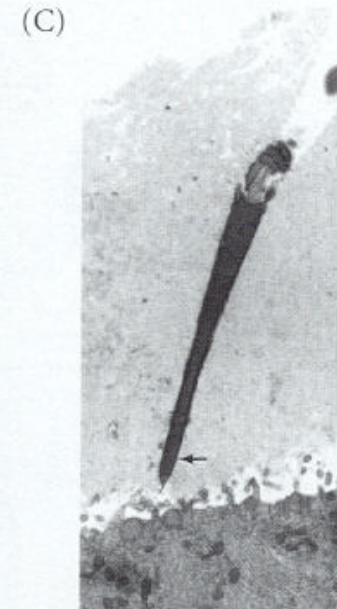
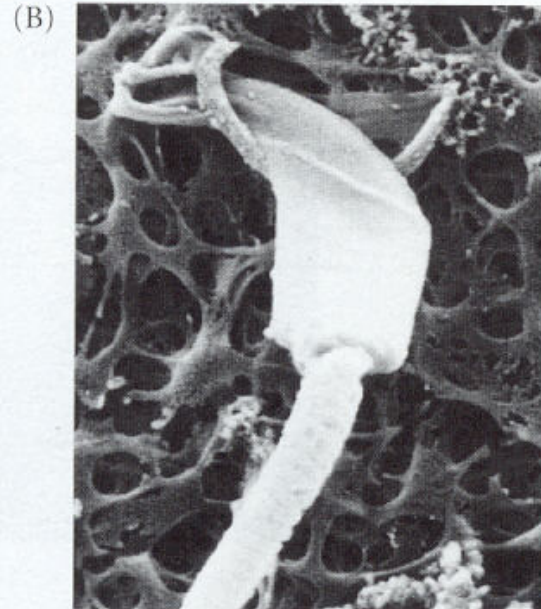
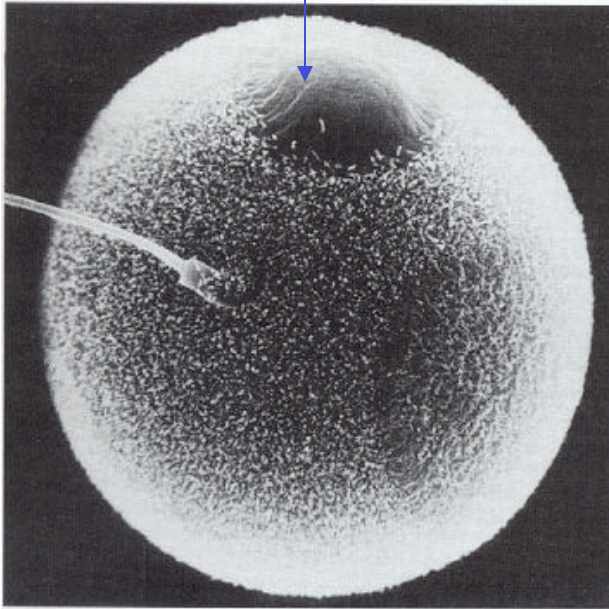
reação acrossômica e fusão das membranas do espermatozóide e do ovócito



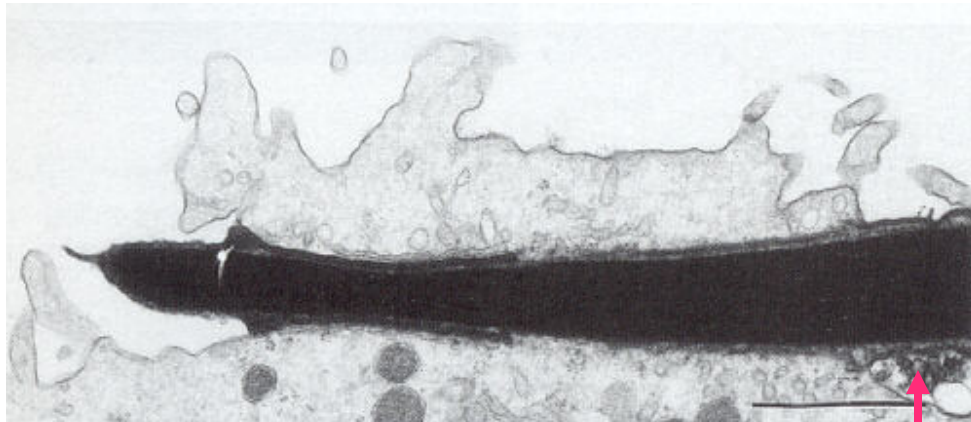
- liberação de **enzimas do acrossomo** para digestão da zona pelúcida
- exposição de **fertilinas** da membrana interna do acrossoma (reconhecimento espécies específica com óvulo)

penetração do espermatozóide no óvulo: hamster

corpúsculo polar



enzimas do acrossoma digerem zona pelúcida



ligação com membrana do ovócito secundário na região equatorial (**seta**) da membrana do espermatozóide

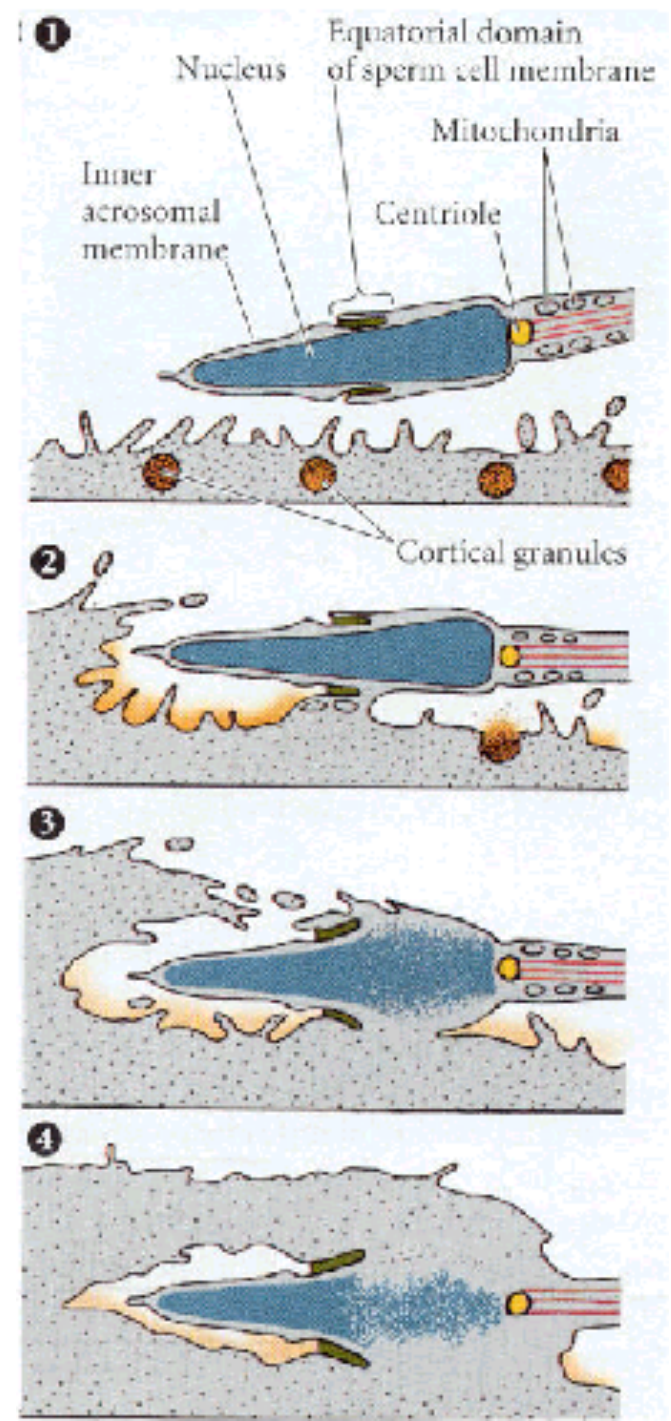
fusão das membranas

após penetração da zona pelúcida:
contacto da zona equatorial da cabeça
do espermatozóide com membrana do
ovócito secundário

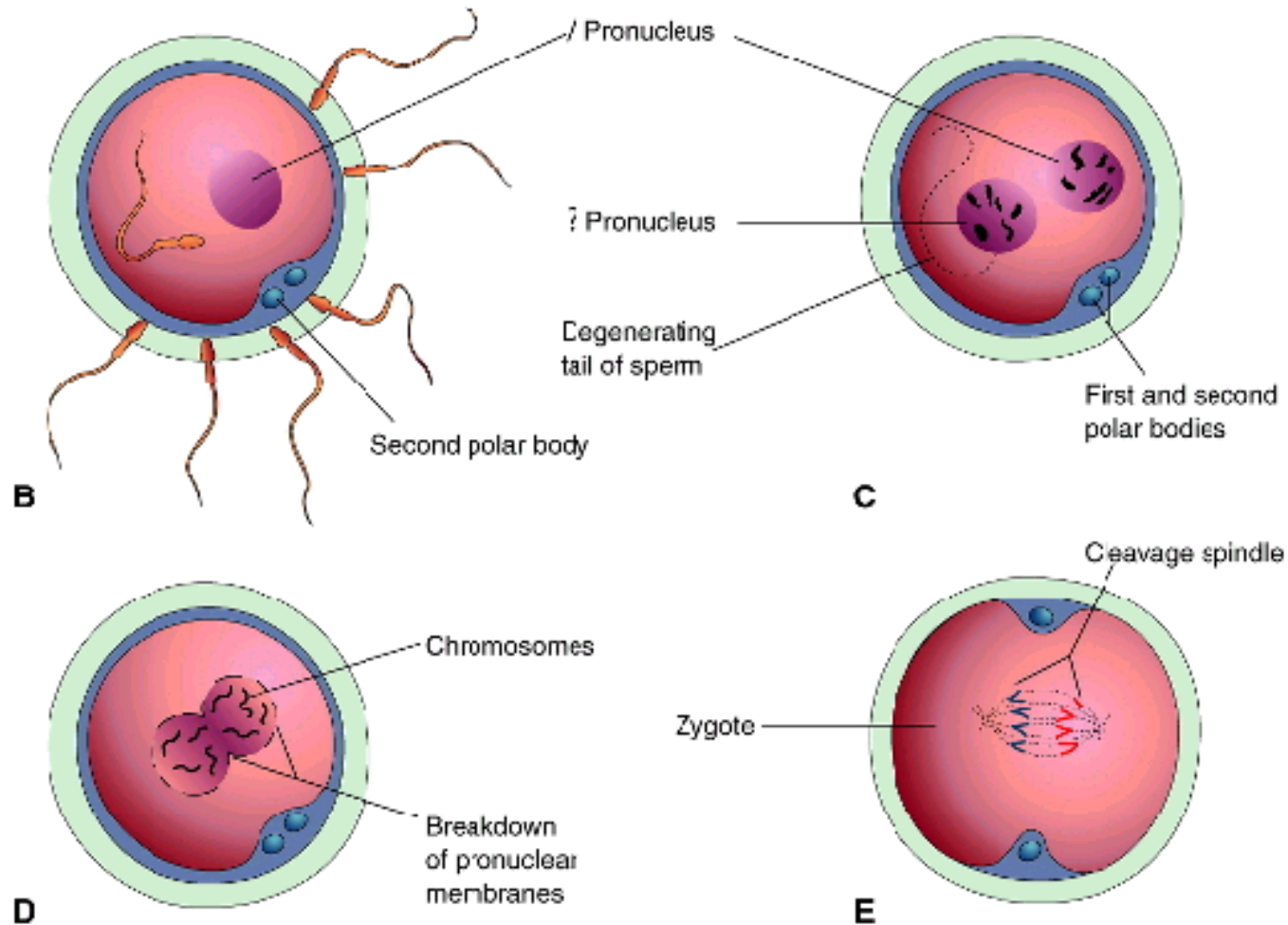
fertilinas da membrana interna
acrossómica e **Izumo** interagem com
proteínas com âncora **GPI** e **CD9**
(tetraspaninas) na membrana do
ovócito e

iniciam fusão de membranas das
gametas, seguida por reação cortical
do ovócito e desbloqueio da meiose II

apenas cabeça do espermatozoide e
centríolo e alguns mitocôndrios
entram no ovócito; inicia-se a
descompactação do cromatina paterno

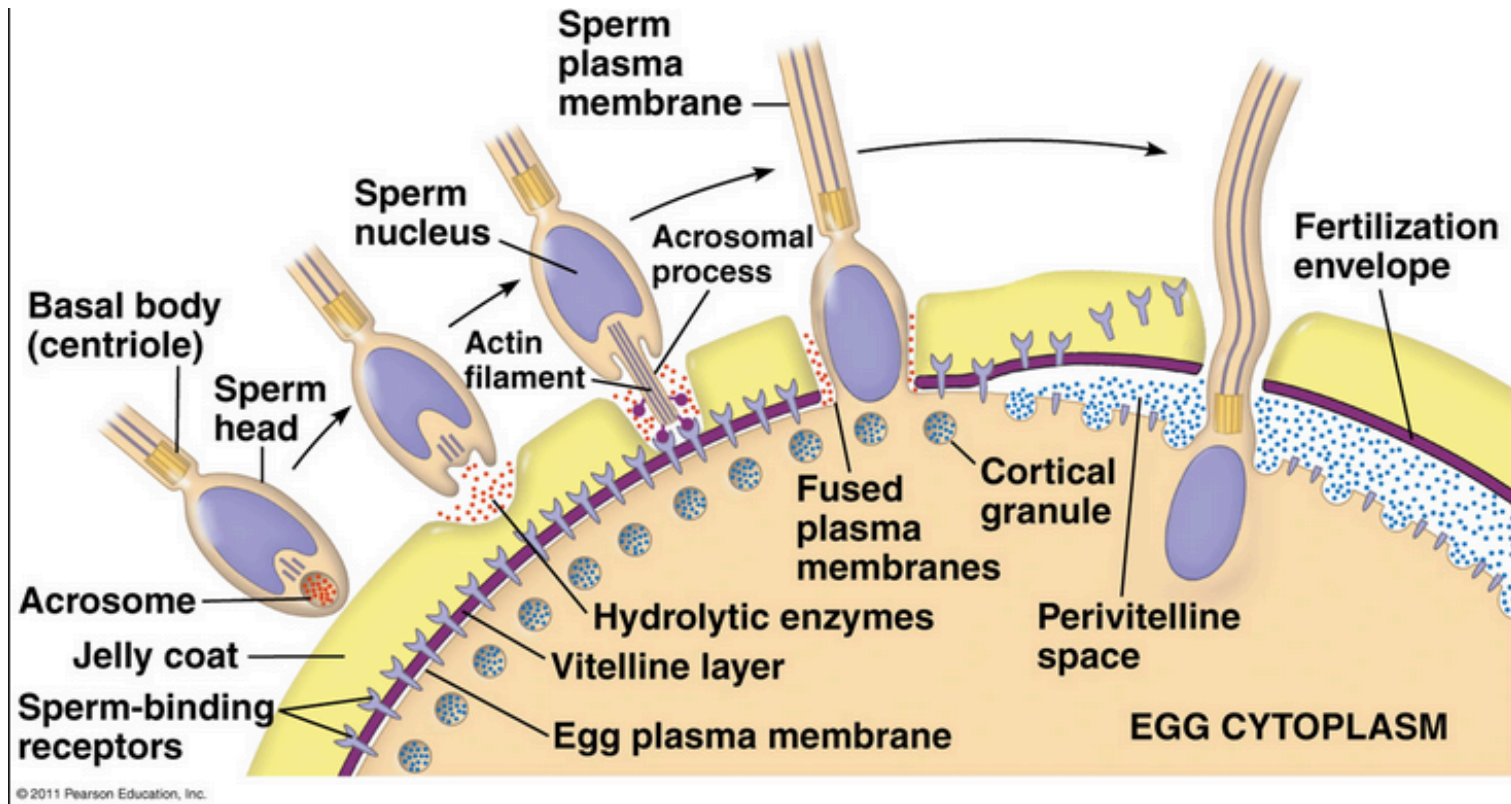


término da meiose II e bloqueio contra poliespermia



- penetração de um só espermatozóide (bloqueio contra poliespermia)
- ovócito completa meiose II
- kariogamia dos pronúcleos, duplicação de DNA, mitose (clivagem)

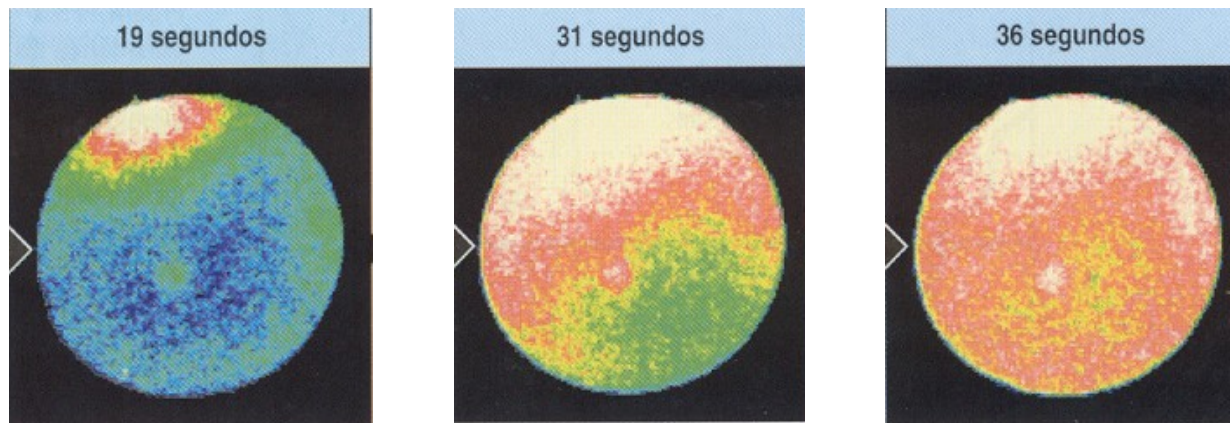
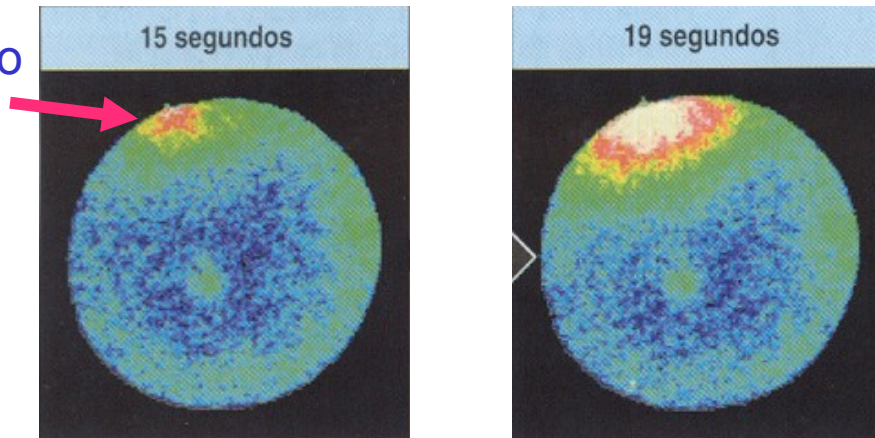
mecanismos de bloqueio contra poliespermia



- contato do primeiro espermatoócito com membrana do ovócito causa **depolarização da membrana (bloqueio rápido)** e influxo de cálcio
- onda de cálcio induz **exocitose dos grânulos corticais (bloqueio lento)**
- liberação de N-acetil glicosaminidase causa **clivagem de ZP3**, que impede ligação de outros espermatozoides

onda de cálcio na fecundação

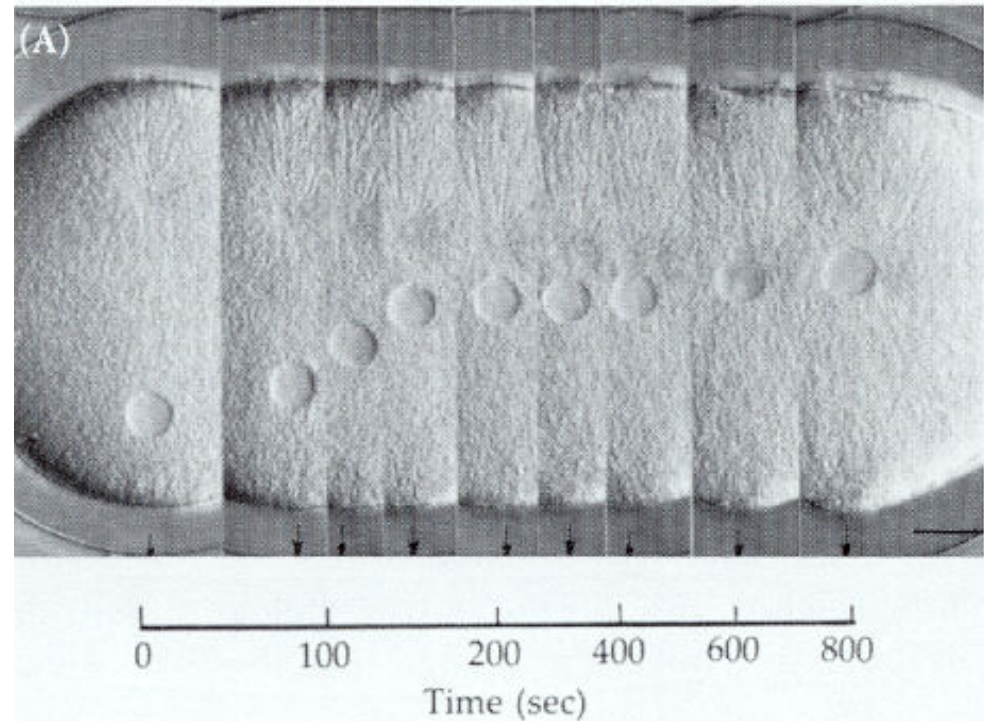
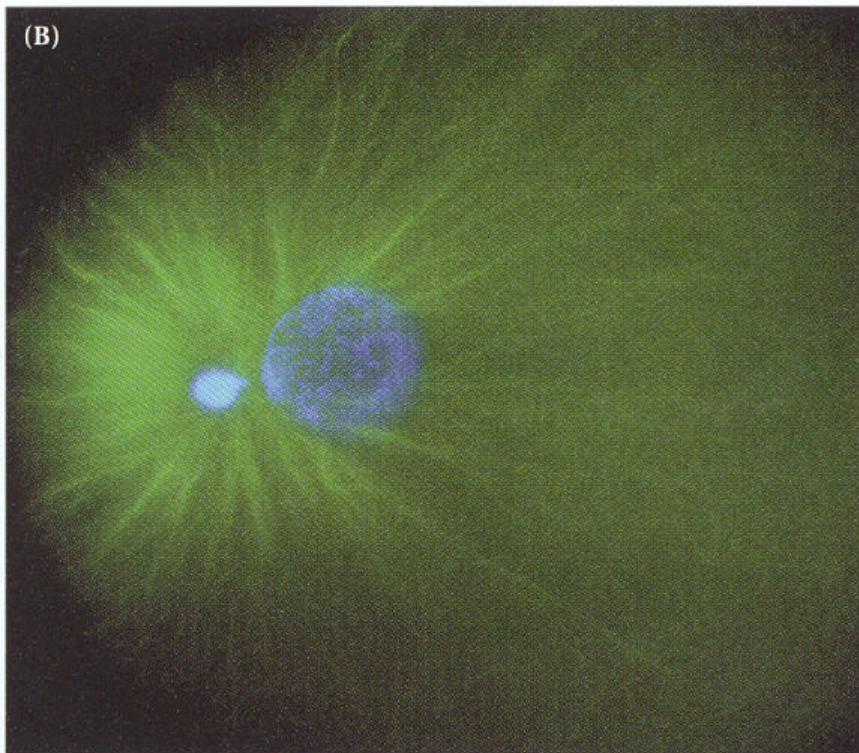
local de entrada do
espermatozóide



elicita reação cortical e desbloqueia metáfase da meiose II por degradação do complexo Fator Promotor da Maturação (MPF, um complexo ciclina/Cdk) por ativação da calpaina

o prónucleo paterno é descompactado e centrossoma paterno gera astro mitótico

a entrada do centrossoma paterno reativa o centrossoma materno; causa polimerização dos microtúbulos do ovócito



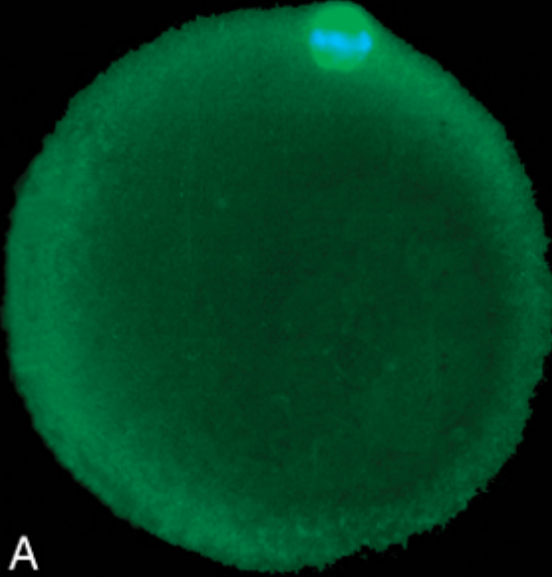
o centríolo/centrossoma é a segunda mais importante contribuição do espermatozóide



microtúbulos direcionam migração e encontro dos pronúcleos materno e paterno
pouco antes da da kariogamia os pronúcleos paternos e maternos replicam os seu DNA, para a subsequente mitose do zigoto

óvulo pós-ovulatório em metáfase meiose II

A

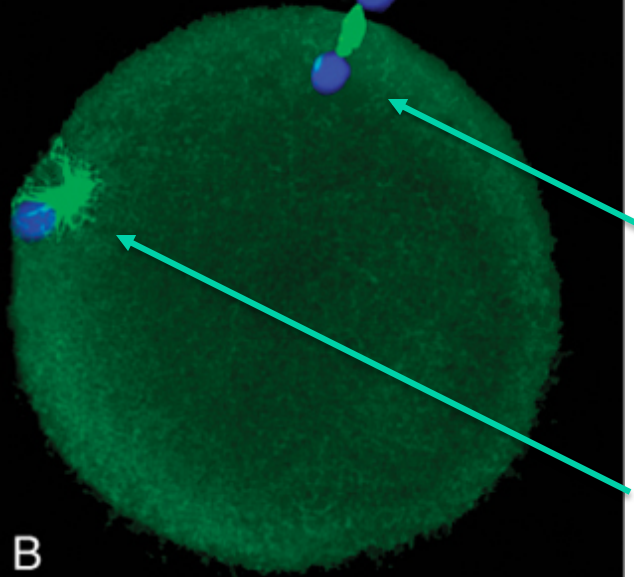


óvulo fecundado,

pronúcleo materno em anafase da meiose II

pronúcleo paterno com centrossoma

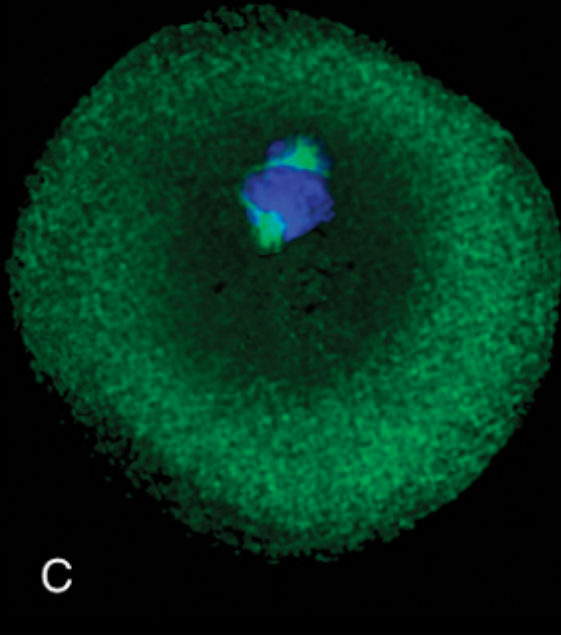
B



kariogamia

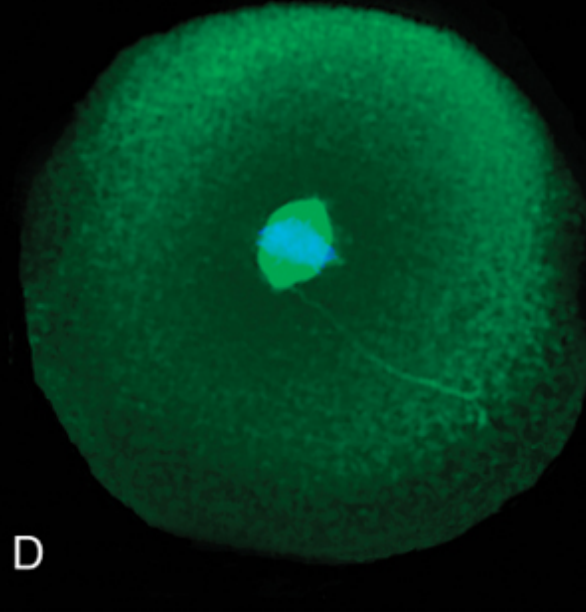
posicionamento oposto dos centríolos

C

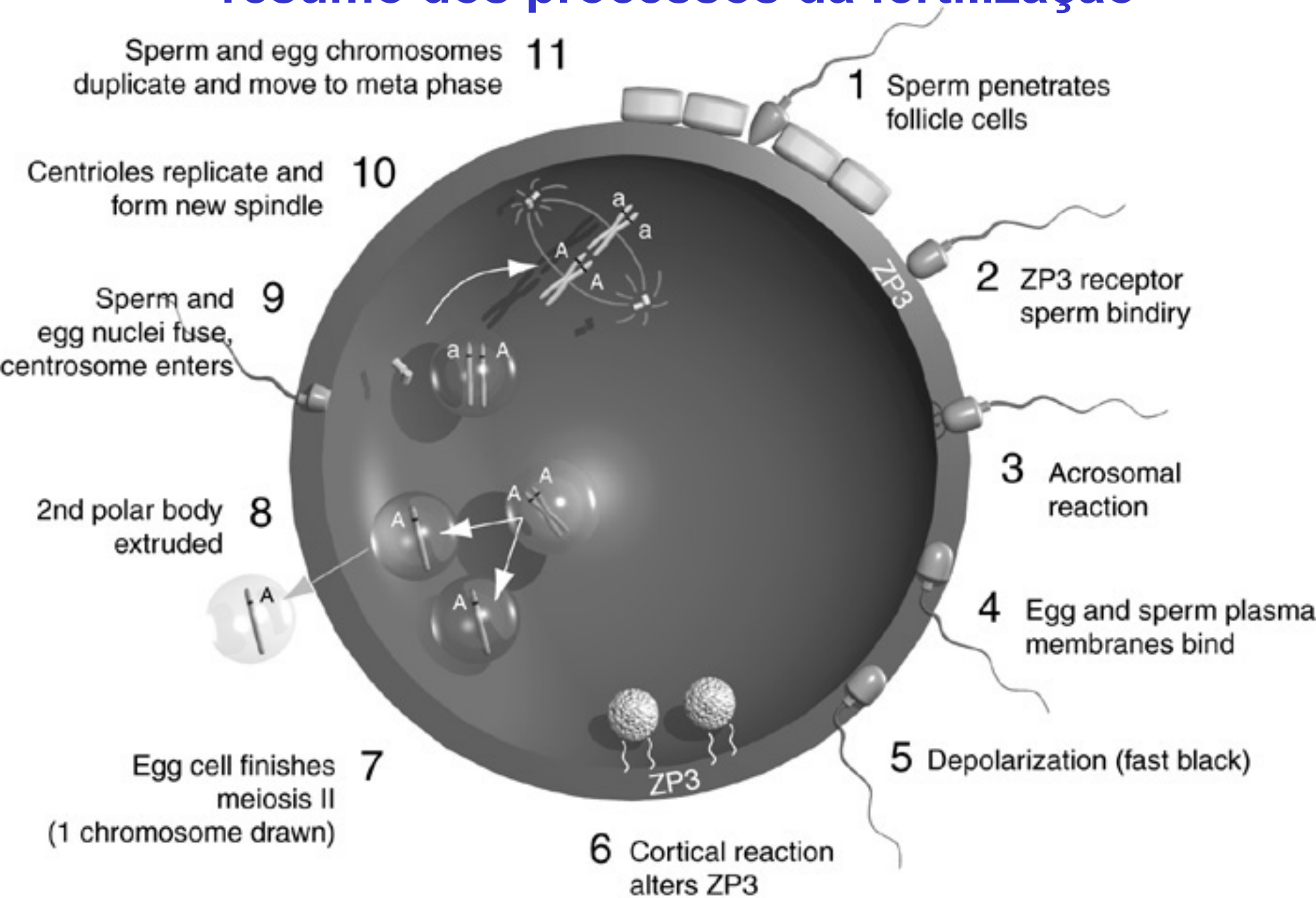


metáfase da 1ª divisão mitótica (clivagem)

D



resumo dos processos da fertilização



Infertilidade masculina

I. problemas na determinação primário e secundário do sexo:

deleção em SRY ou mutação em SOX9, duplicação de DAX1, mutações em receptores hormonais

II. produção insuficiente de espermatozóides ou número alto de espermatozóides malformados

III. não-ativação do centrossoma materno pelo paterno

principais causas de infertilidade masculina

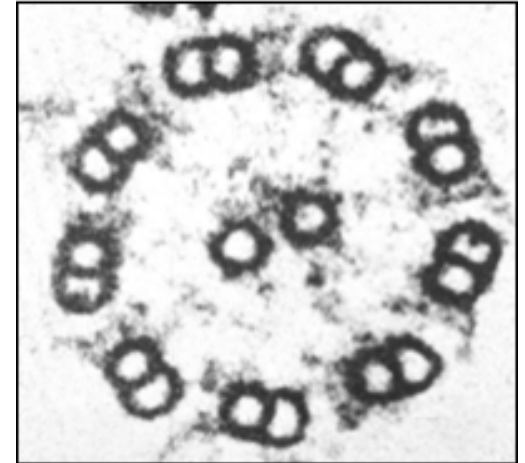
número insuficiente de espermatozóides ou espermatozóides com motilidade reduzida no ejaculado

espermatozóides funcionais < 10 milhões por ml no ejaculado = infertil (30% dos casos de infertilidade)

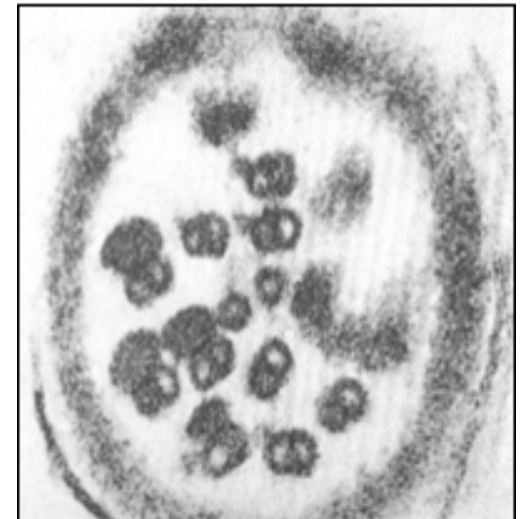
causas:

- mutações em genes relacionados a espermatogênese
- estresse oxidativo e radicais livres
- disfunção das glândulas do trato genital

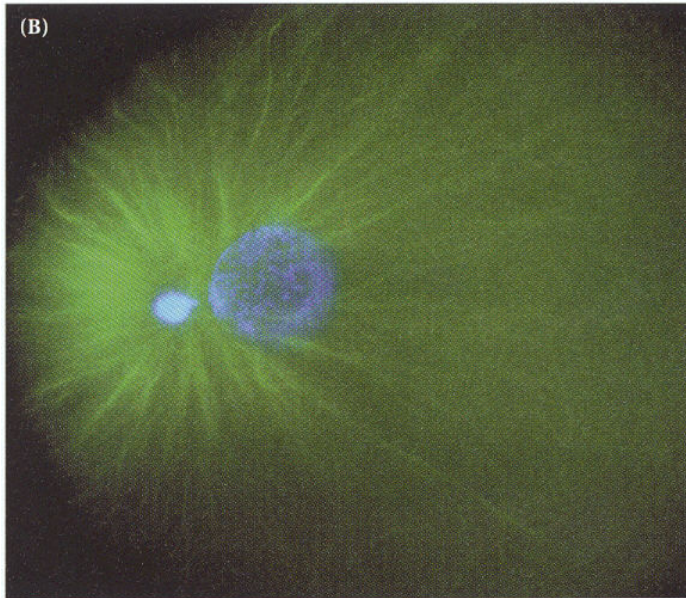
Electron Micrograph of the cross-section of a sperm tail



Cross-section of sperm tail with defective dynein



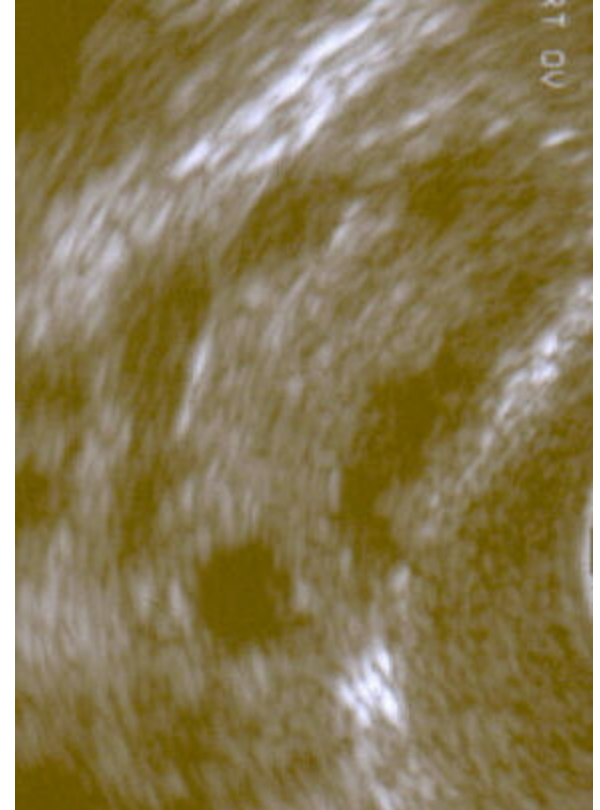
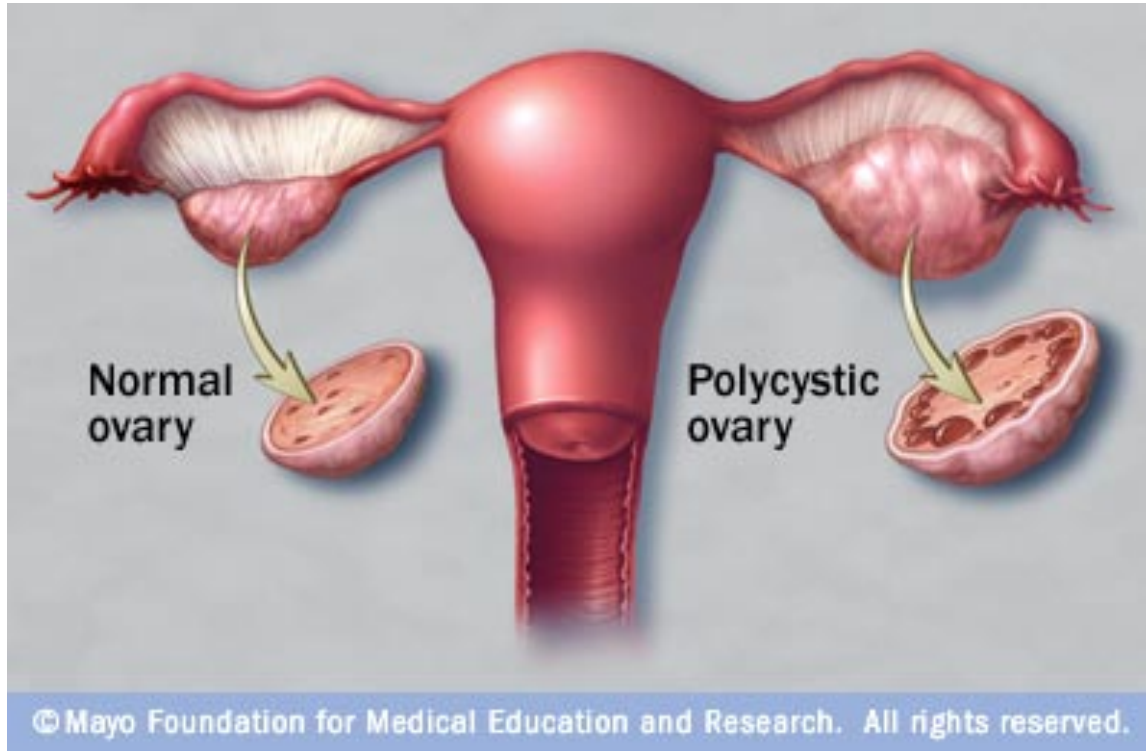
centrossoma paterno incapaz de ativar o centrossomo materno



poliespermia ou aneuploidia, impedem mitoses zigóticas

principais causas da infertilidade feminina

I. Síndrome do ovário policístico

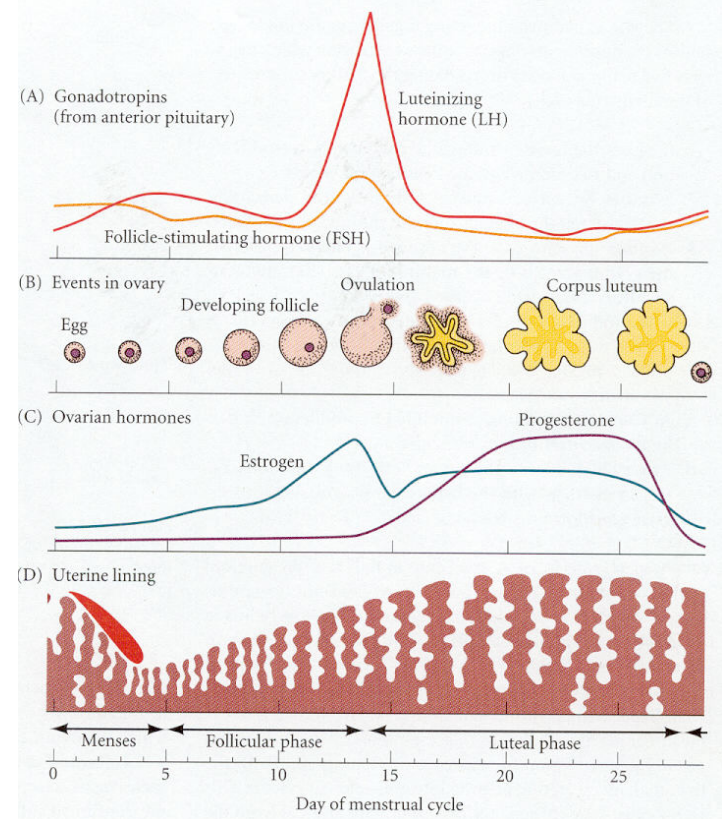


síndrome:

- a) ciclo ovariano irregular – ovulação infrequente;
- b) ovário com volume aumentado devido a cistos foliculares

causa principal:

disregulação do controle hormonal da ovulação, folículos crescem, mas não há ovulação



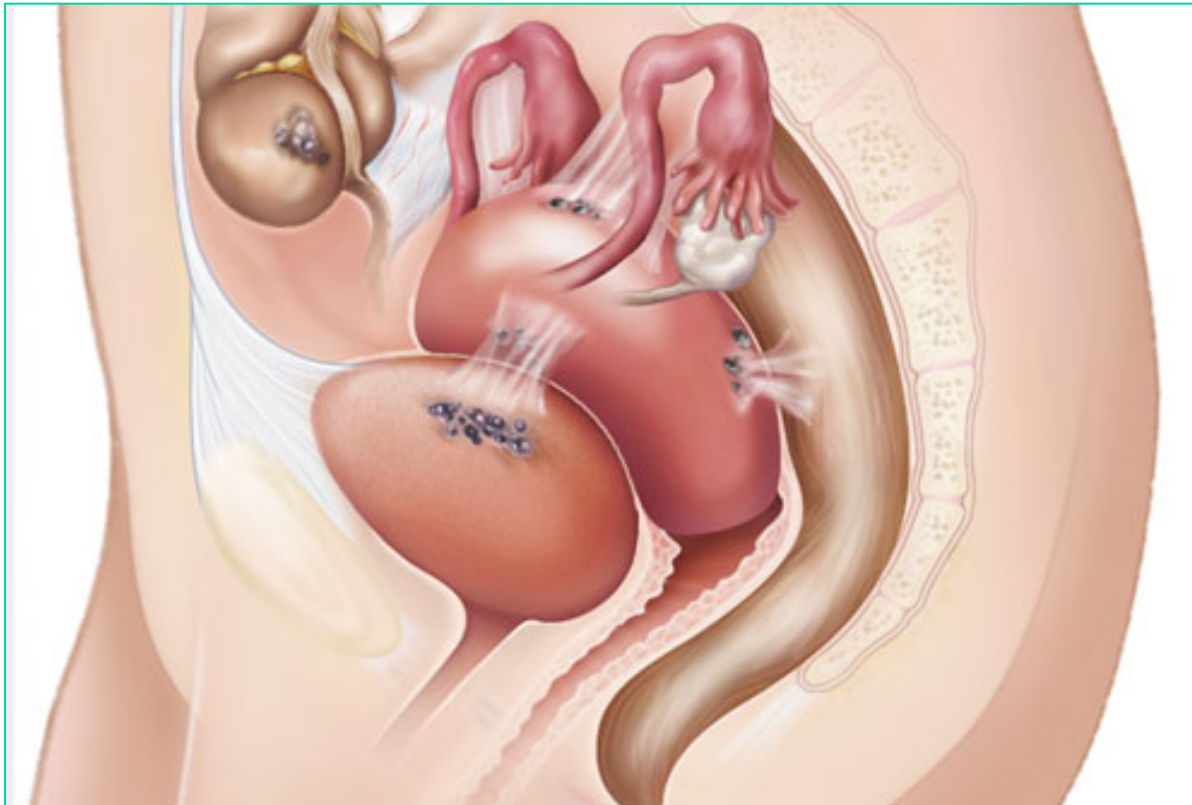
secreção de LH pode ser normal, mas o ovário frequentemente produz esteróides androgênicos em concentrações elevadas

fatores associados/causais:

- resistência à insulina (prediabetes, diabetes tipo II, obesidade)
- constituição genética
- exposição excessiva à andrógenos na fase fetal

principais causas da infertilidade feminina

II. Endometriose

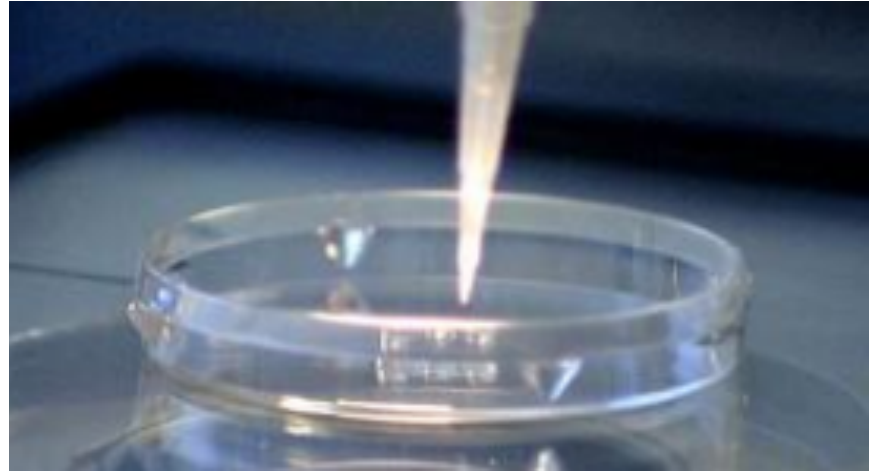


crescimento de tecido endometrial fora do útero, principalmente nos ovários, tubos falopianos, bexiga; causa dores e sangramentos.

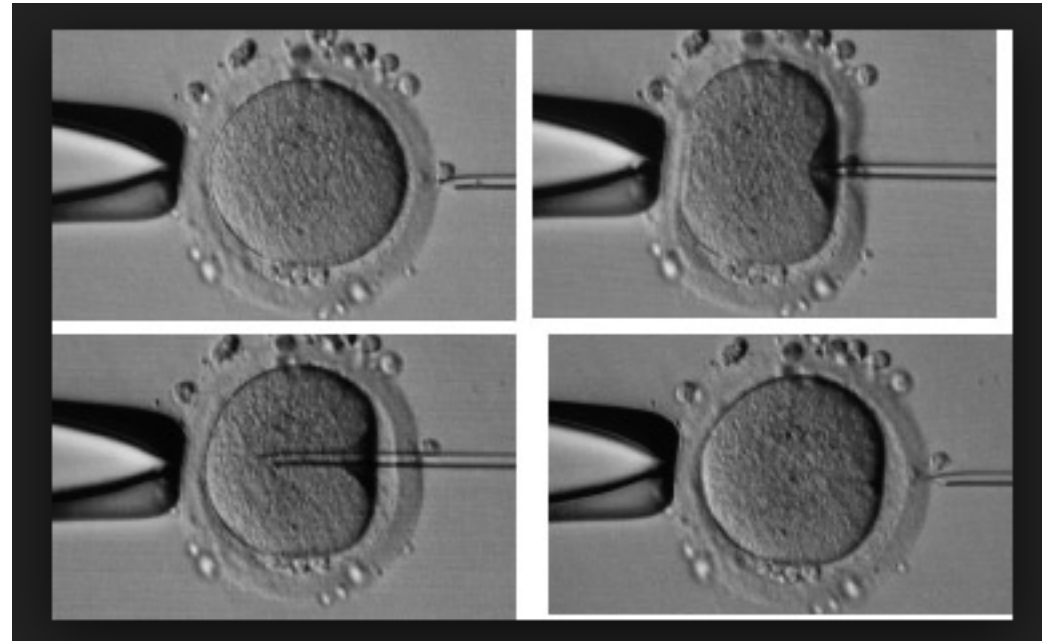
Endometriose ovariana e/ou nos tubos falopianos afeta a fertilidade.

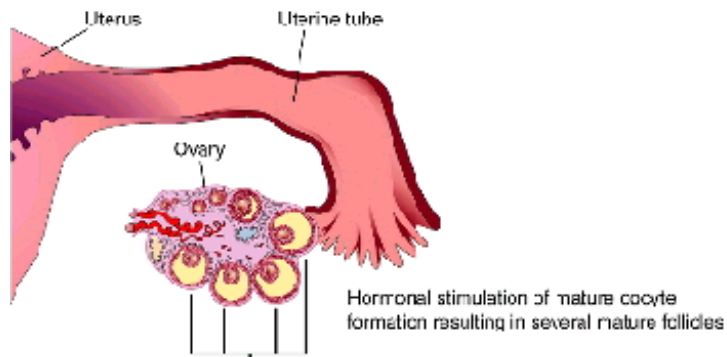
Reprodução assistida

fertilização *in vitro*
normal (poucos
espermatozóides
necessários) - requer
capacitação artificial



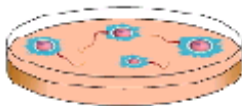
ou por ICSI (injeção
intracelular de
espermatozóide), na
ausência de
espermatozoides
capacitáveis



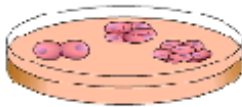


**colecção de ovócitos
(estimulação hormonal da ovogênese)**

Collection of oocytes from follicles with aspirator during laparoscopy



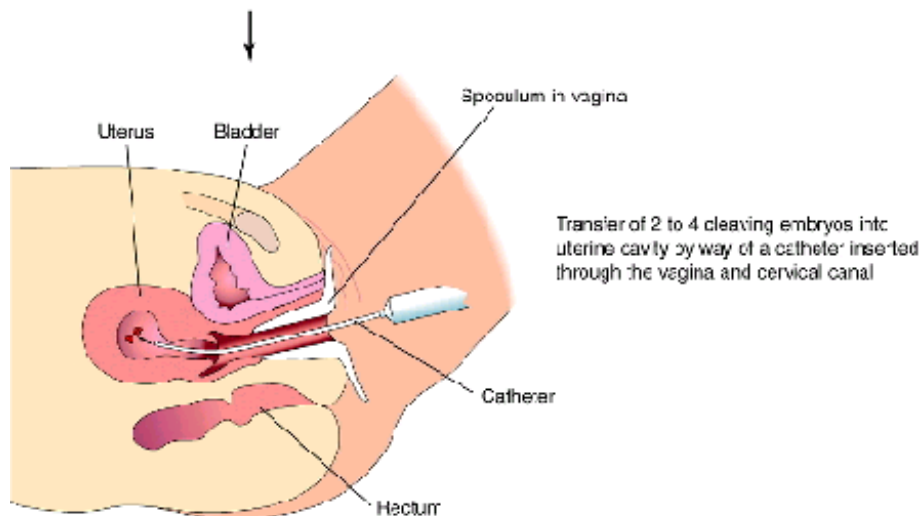
Placement of oocytes in Petri dish with capacitated sperms; in vitro fertilization of oocytes



Cleavage of zygotes in culture medium until 4- to 8-cell stages are reached

incubação com espermatozóides capacitados

incubação de embriões em clivagem para seleção



transferência para útero

Reprogenética

retirada de blastómeros para
kario- e genotipagem antes da
implantação



tais blastómeros também são
células embrionárias tronco

na discussão de implicações éticas:
não confundir reprodução assistida
com células embrionárias tronco e
clonagem!



Review Article

Reprogenetics: Preimplantational genetics diagnosis

Roberto Coco

Fecunditas Instituto de Medicina Reproductiva, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Abstract

Preimplantational Genetics Diagnosis (PGD) is requested by geneticists and reproductive specialists. Usually geneticists ask for PGD because one or both members of the couple have an increased genetic risk for having an affected offspring. On the other hand, reproductive specialists ask for embryo aneuploidy screening (PGS) to assure an euploid embryo transfer, with the purpose to achieve an ongoing pregnancy, although the couple have normal karyotypes. As embryonic aneuploidies are responsible for pre and post implantation abortions, it is logical to consider that the screening of the embryonic aneuploidies prior to embryo transfer could improve the efficiency of the *in vitro* fertilization procedures. Nevertheless, it is still premature to affirm this until well-designed clinical trials were done, especially in women of advanced age where the rate of embryos with aneuploidies is much greater. Although the indications of PGD are similar to conventional prenatal diagnosis (PND), PGD has less ethical objections than the PND. As with the PGD/PGS results only unaffected embryos are transferred, both methods can avoid the decision to interrupt the pregnancy due to a genetic problem; this makes an important difference when compared to conventional prenatal diagnosis.

Keywords: PGD, PGS, PGSS, embryo biopsy, trophoctoderm biopsy.

na discussão de implicações éticas: não confundir reprodução assistida com células embrionárias tronco e clonagem!

clonagem somática



enucleação de ovócito
ovulado e injeção de núcleo
de célula somática
(papel do citoplasma
ovocítica)

***núcleo de célula somática –
citoplasma de célula tronco
totipotente***

animais transgênicos



injeção de DNA linerizado
de construto gênico em
núcleo zigótico
(recombinação homologa
ou direcionada)