



Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária

Seminário





Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão



Seminário

Involvement of free cholesterol and high-density lipoprotein in development and resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock

J. I. Moss, T. J. Garrett and P. J. Hansen

Joao Alvarado Rincón

Zootecnista, MSc.
Doutorando em Veterinária
Pelotas, 2015.



Journal of Animal Science

The Premier Journal and Leading Source of New Knowledge and Perspective in Animal Science

2012

Fator de impacto: **2,108**

Por quê o artigo?



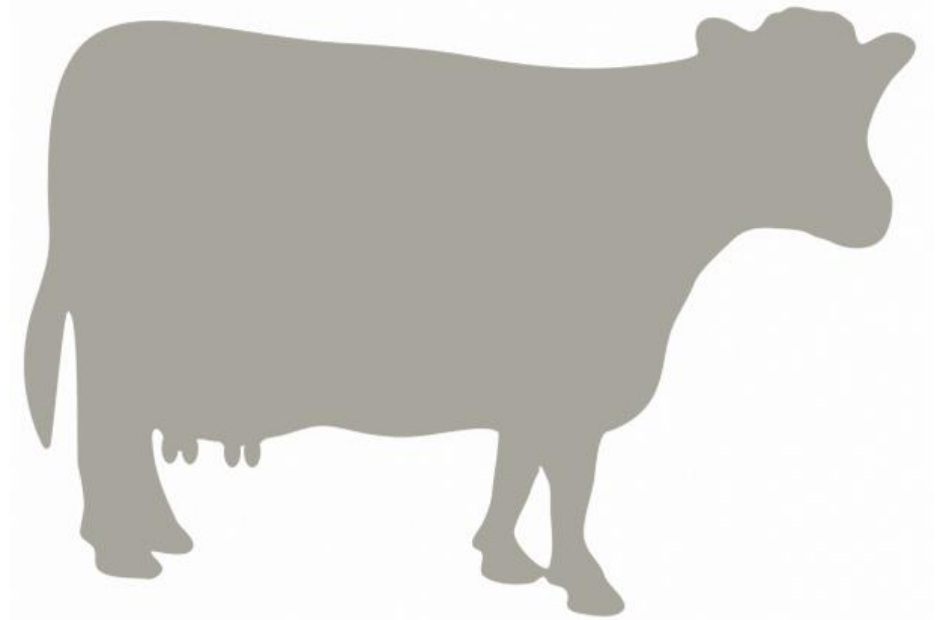
Estresse metabólico

↑ Incidência de
doenças

Desempenho

➤ Produtivo

➤ Reprodutivo



Por quê o artigo?

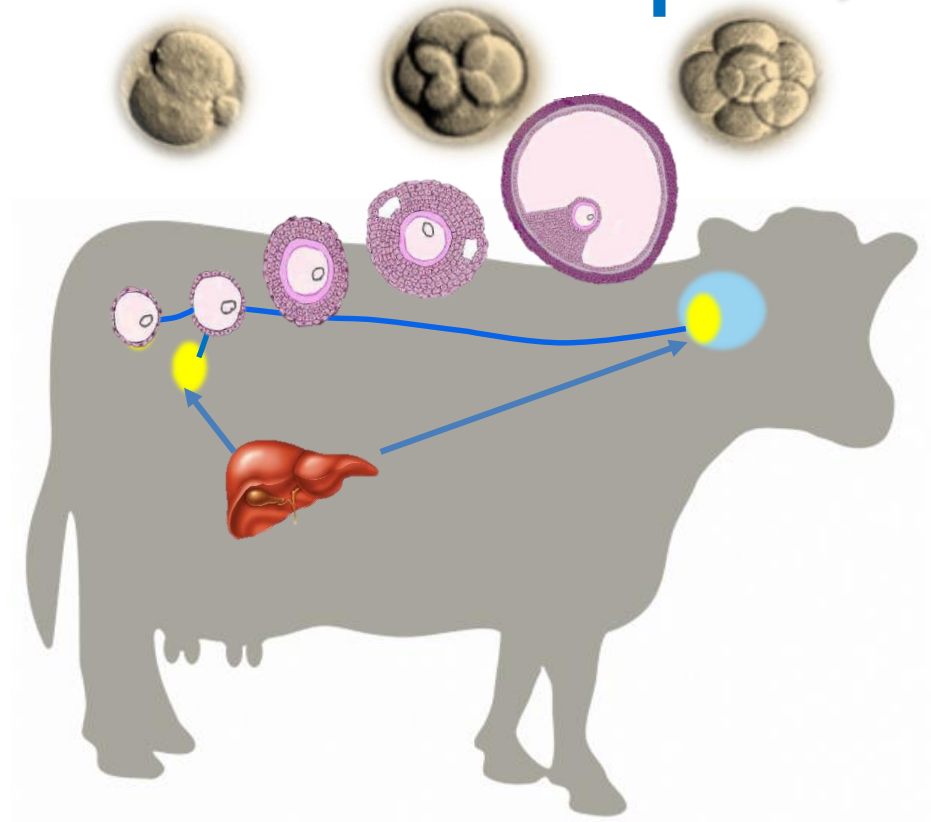
3 sem

Parto

3 sem

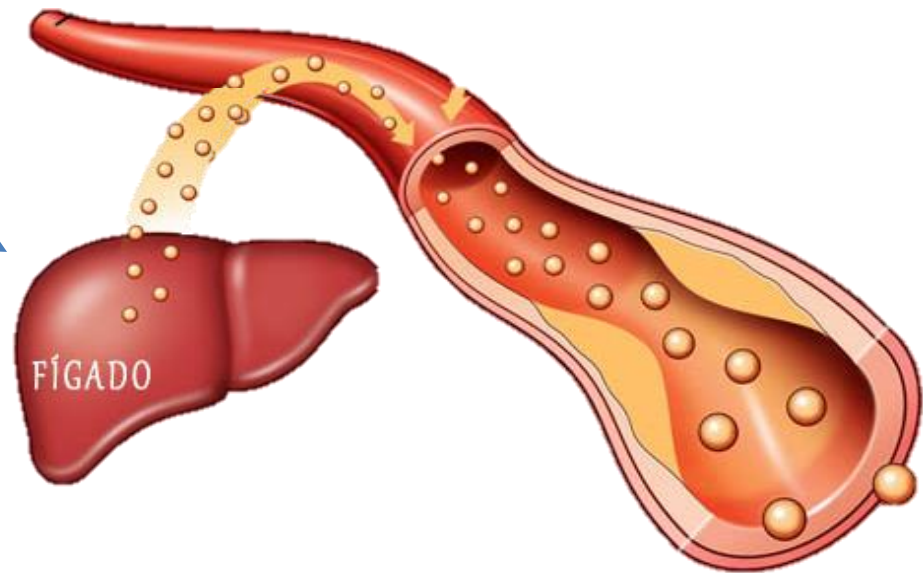
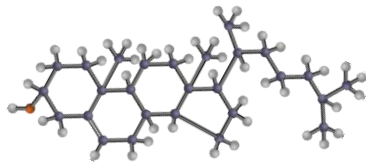
- Condições ambientais
- Nutrição
- Sanidade
- Manejo

Eficiência
reprodutiva



INTRODUÇÃO

Colesterol



Precursor

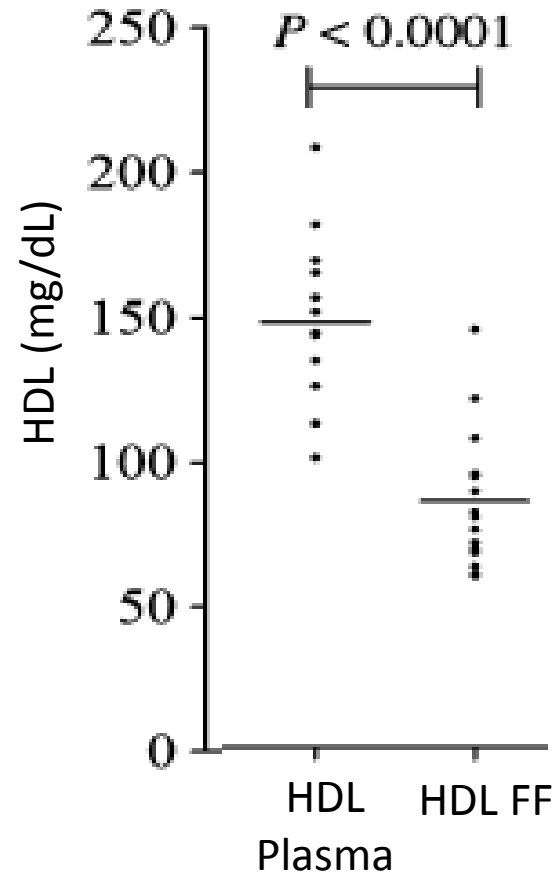
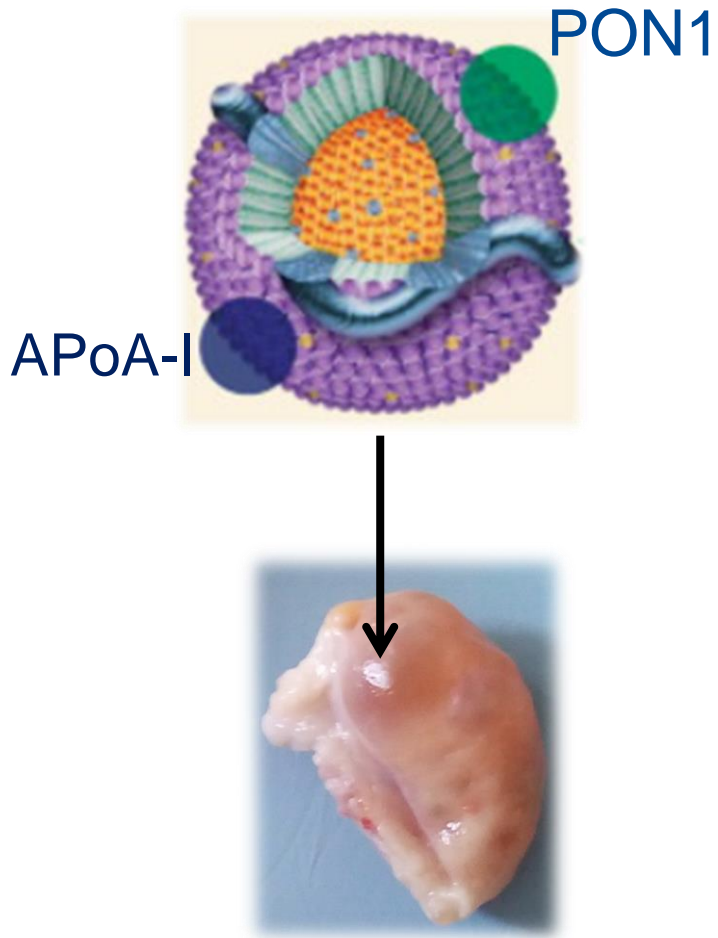
- hormônios esteroides

Transportado

- HDL, LDL, VLDL

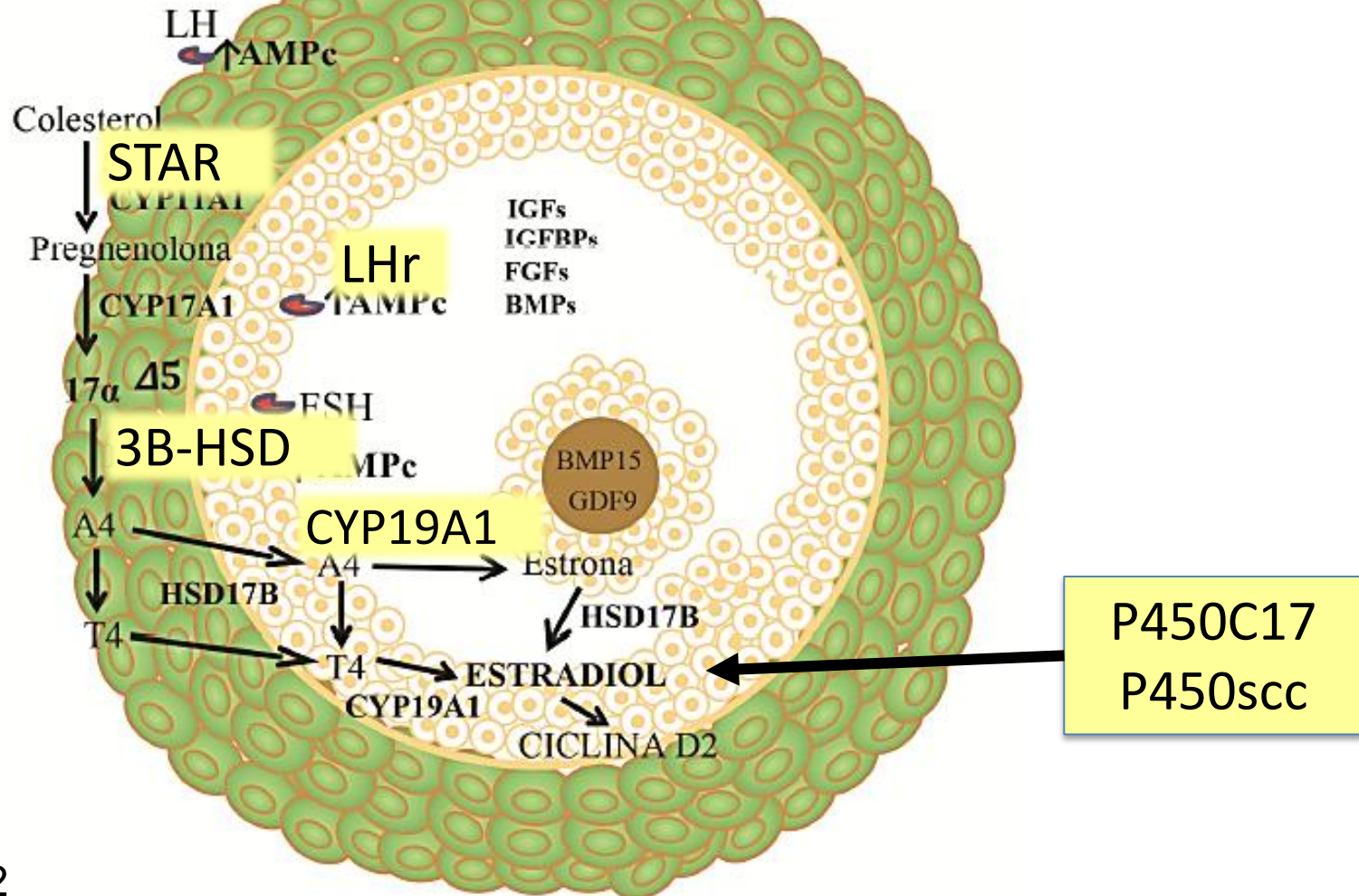
INTRODUÇÃO

HDL



INTRODUÇÃO

Esteroidogênese



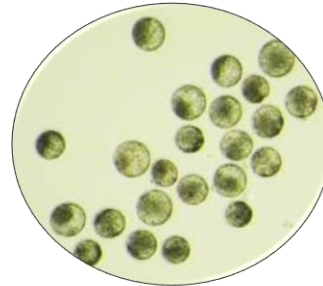
INTRODUÇÃO

Mudanças

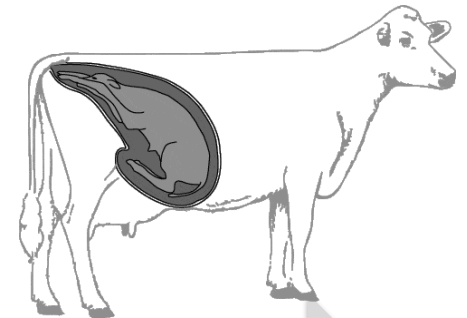
- Citoplasma
- Núcleo



Competência



Blastocisto



Gestação

In vitro

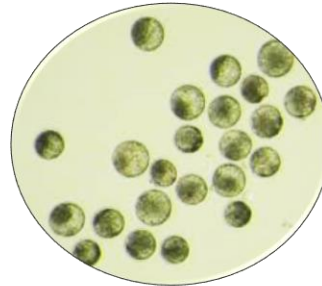
↑ EROs

- Alta tensão de oxigênio,
- Interferência de luz,
- Mudanças de temperatura,
- Ausência de antioxidantes presentes no fluido folicular.

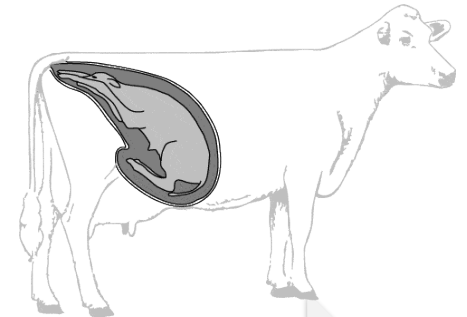
INTRODUÇÃO



Competência



Blastocisto



Gestação

Cultivo
embrionário

Maturação
oocitária

↓ Eficiência

PIVE

INTRODUÇÃO

Diversos
fatores



Susceptibilidade a
mudanças de °T

Mecanismos:

- Bioquímico
- Molecular

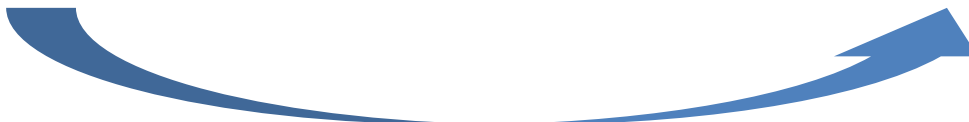
Diferenças:

- Raça
- Genética

Desenvolvimento



Resistência



INTRODUÇÃO

Choque
térmico



Desenvolvimento

↑ Síntese de colesterol → regula a fluidez da membrana

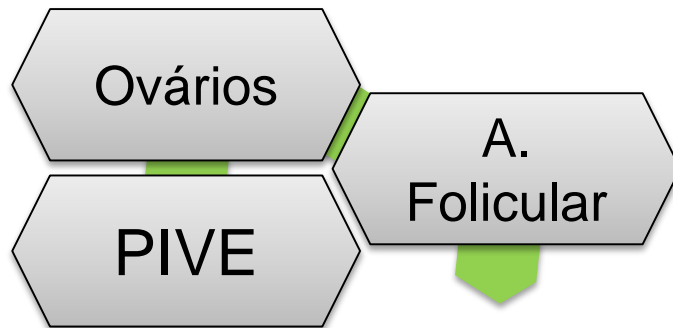
Relação positiva entre o colesterol em diferentes tipos de células de mamíferos e a resistência à morte devido a aquecimento

OBJETIVO

Determinar, se o aumento do teor de colesterol livre e da lipoproteína de alta densidade (HDL) podem melhorar a resistência embrionária ao choque térmico

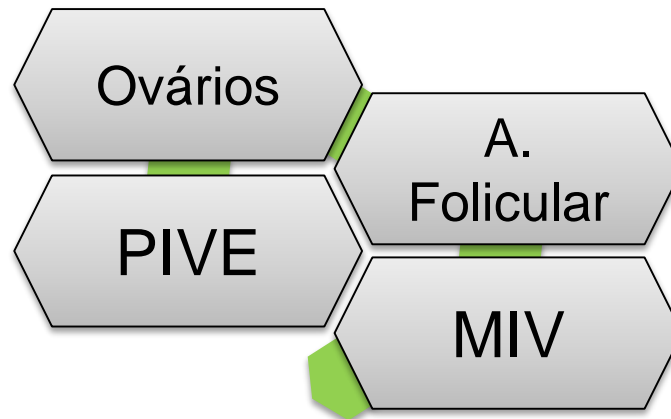


METODOLOGIA



- Abatedouro
- *Bos taurus*, *B. indicus* e seus cruzamentos

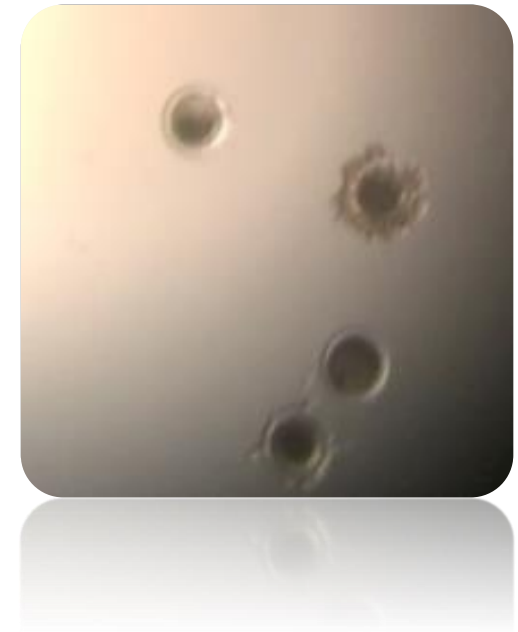
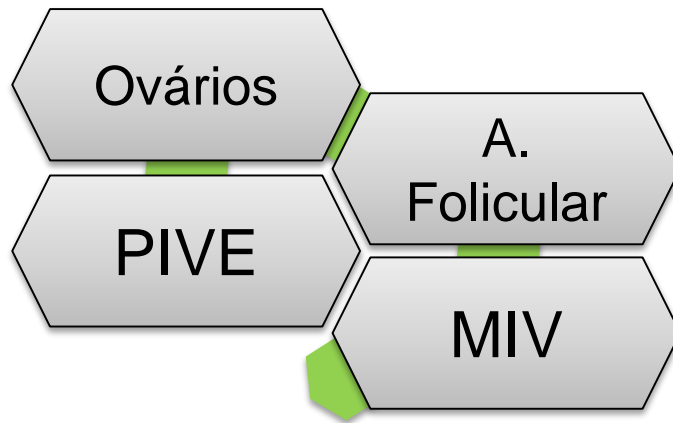
METODOLOGIA



- Seleção quanto à morfologia
(Loos et al., 1991)
 - Células do *cúmulos*
- Grupos de 10 COCs
- 20-22hs; 5% de CO₂ e 38,5 °C

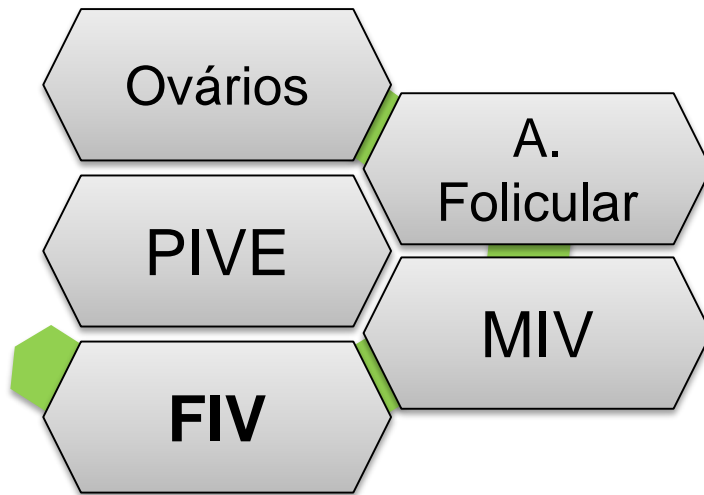
- Folículos (2-10mm)

METODOLOGIA

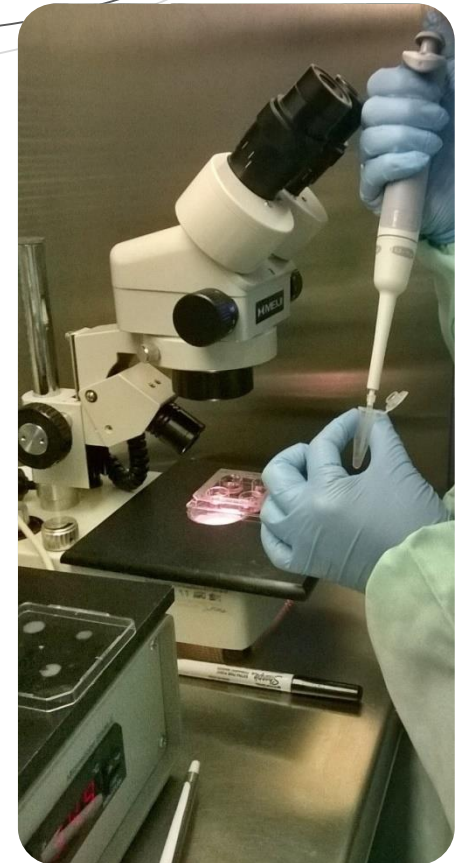


- Seleção quanto à morfologia
(Loos et al., 1991)
 - Células do *cúmulos*
- Grupos de 10 COCs
- 20-22hs; 5% de CO₂ e 38,5 °C

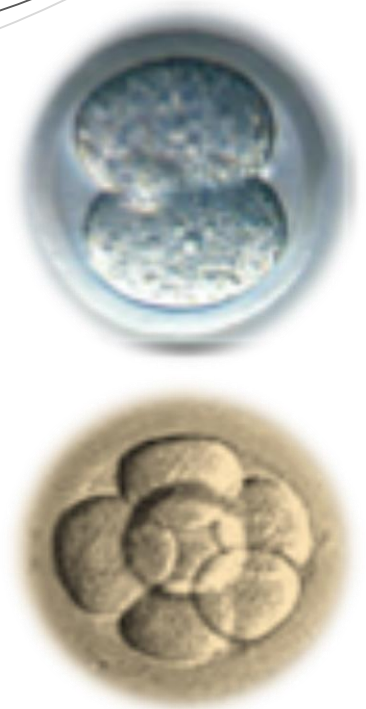
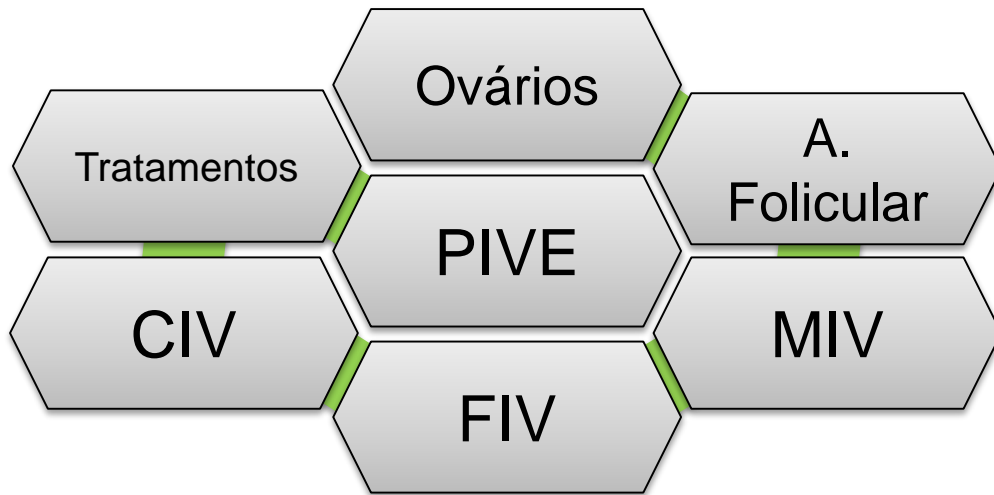
METODOLOGIA



- 3 Touros
- Seleção espermática
 - Percoll®
- 1×10^6 espermatozoides/mL
- 18hs, mesmas condições que a MIV



METODOLOGIA



- Descarte dos não fertilizados
- Desnudamento
 - 100 μ L de hialuronidase (vortex)
- Grupos de 30 zigotos (50uL : KSOM-BE2)
- Sob óleo mineral
- 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂

Soto et al.(2003)

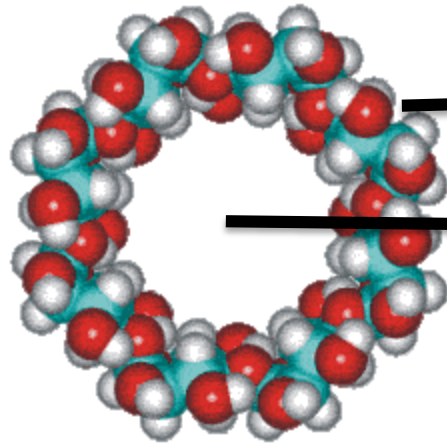
METODOLOGIA

Experimentos

- 1) - KSOM-BE2 (Potassium Simplex Optimized Medium–Bovine Embryo 2)
 - MBCD (Metil- β -ciclodextrina)

METODOLOGIA

Metil- β -ciclodextrina (MBCD)



Superfície hidrofílica (↑ Afinidade Colesterol)

Núcleo hidrofóbico

Oligossacarídeo cíclico

- Pode retirar o colesterol de células
- ↑ Transferência de colesterol (quando pré-carregado)

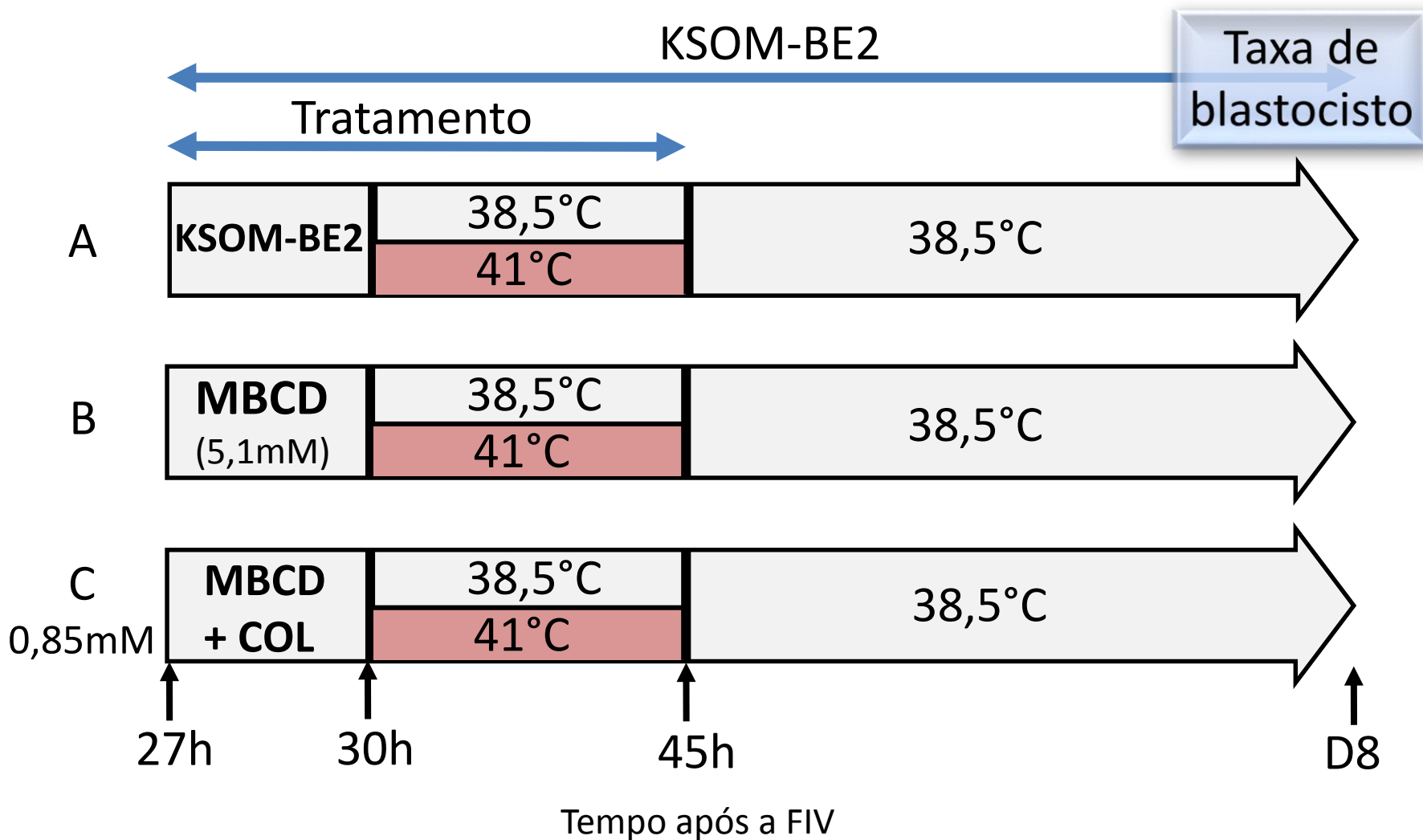
METODOLOGIA

Experimentos

- 1) - KSOM-BE2 (Potassium Simplex Optimized Medium–Bovine Embryo 2)
 - MBCD (Metil- β -ciclodextrina)
- 2) - KSOM-PVA (polyvinyl alcohol)
 - MBCD
- 3) - KSOM-BE2
 - HDL
- 4) – Análises de colesterol

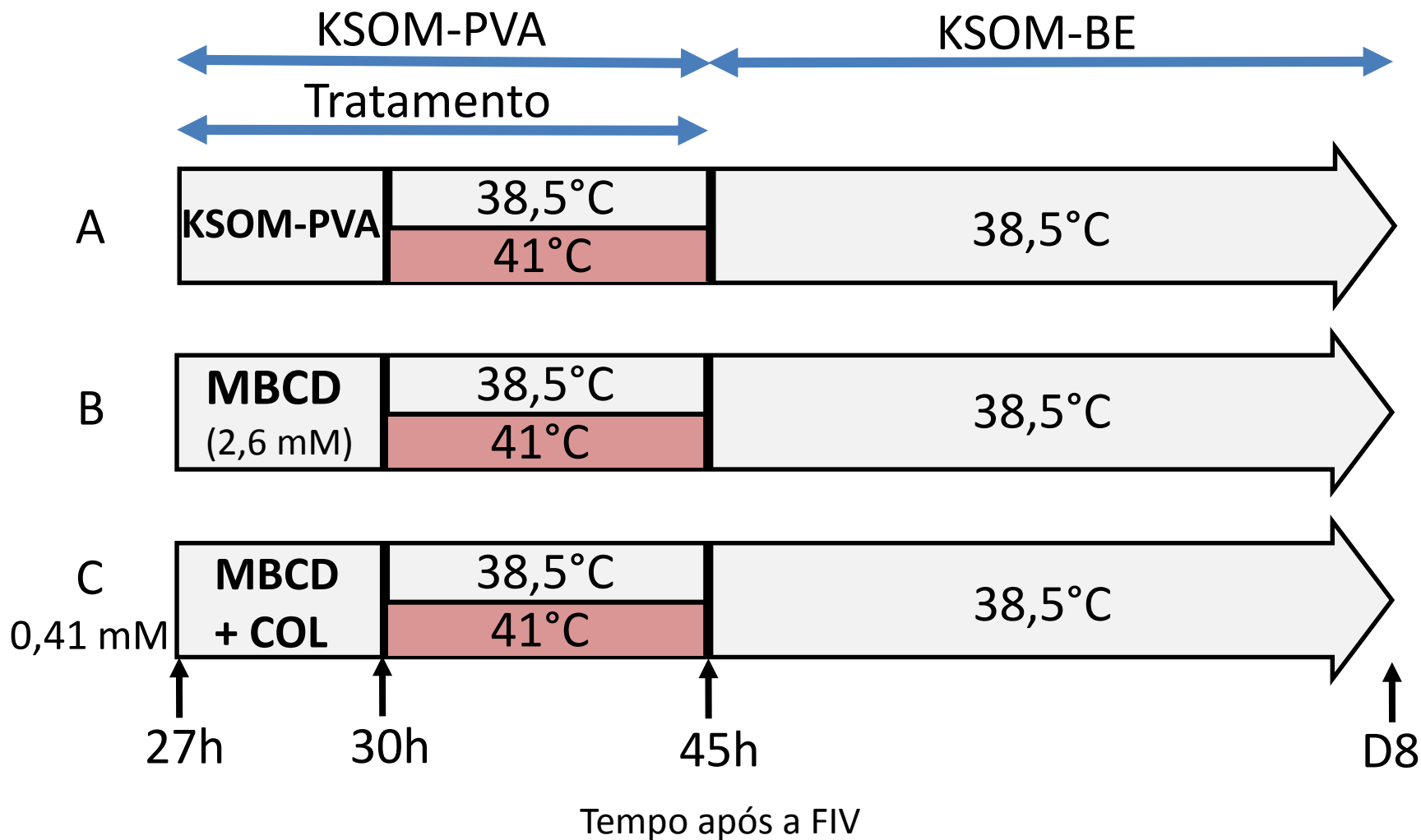
METODOLOGIA

Experimento 1



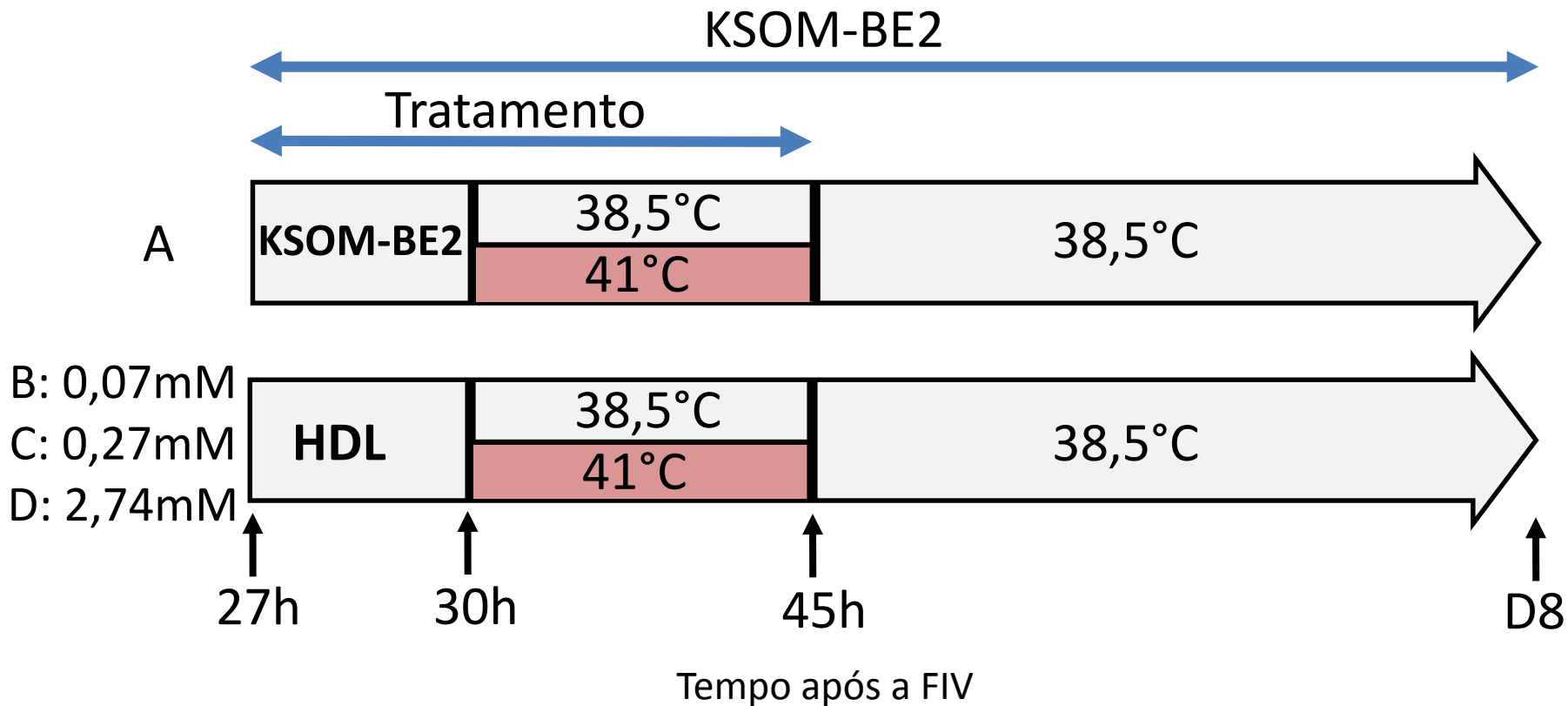
METODOLOGIA

Experimento 2



METODOLOGIA

Experimento 3



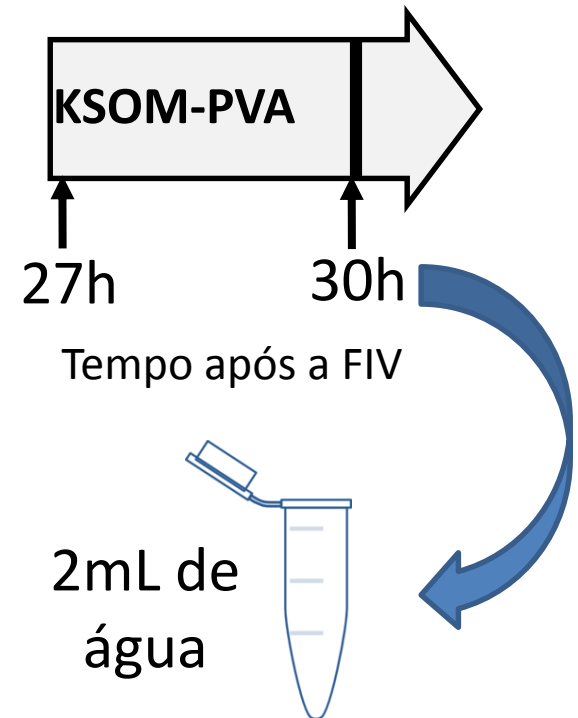
METODOLOGIA

Experimento 4

- ✓ KSOM-PVA
- ✓ KSOM-PVA + 2,6 mM de MBCD
- ✓ KSOM-PVA + 2,6 mM MBCD mM e 0,41 mM de colesterol
- ✓ KSOM-PVA + HDL e 2,74 mM de colesterol.

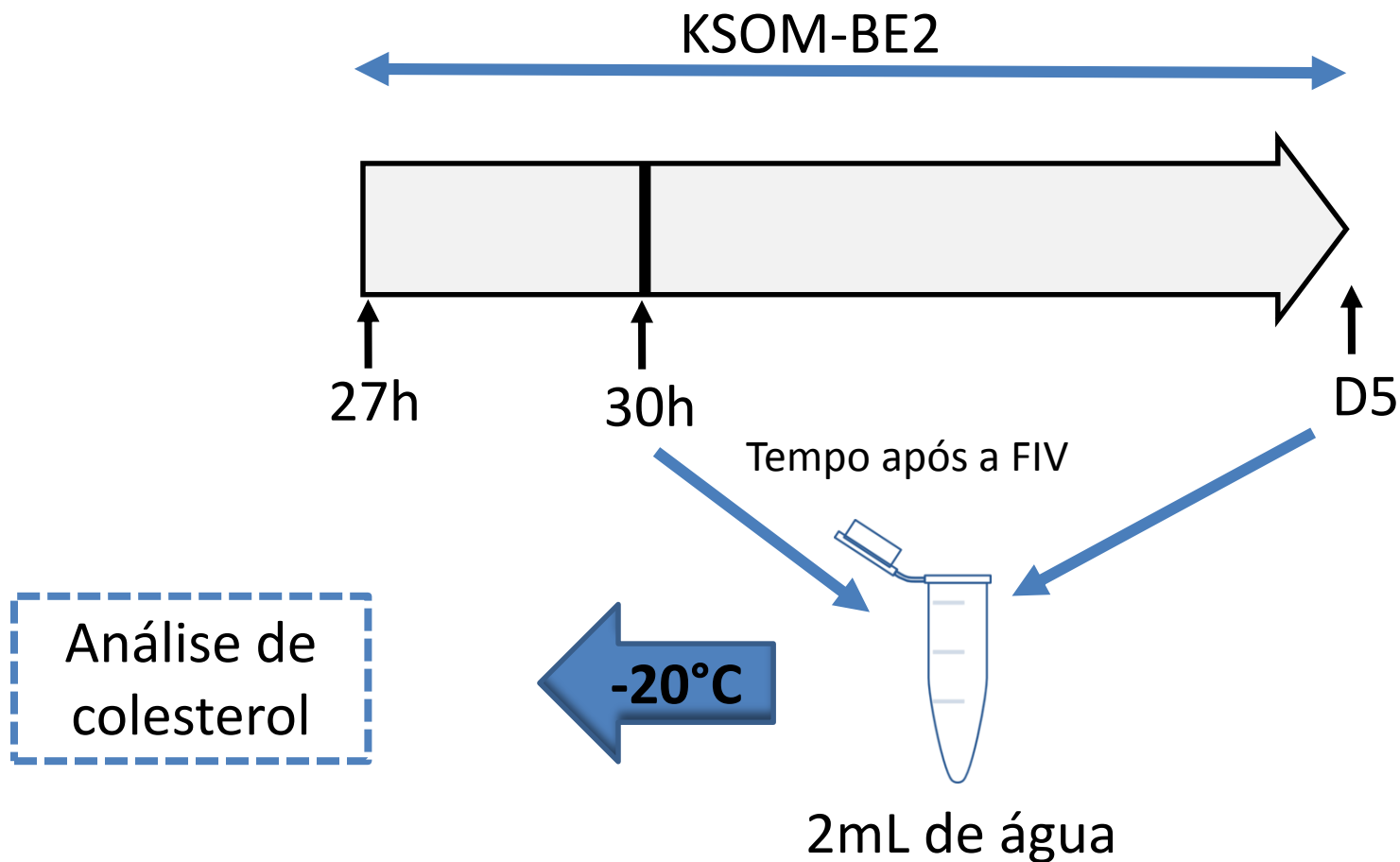
Análise de
colesterol

-20°C



METODOLOGIA

Experimento 4



METODOLOGIA

Avaliação de desenvolvimento embrionário

D 8



Análise de colesterol

Extração de colesterol

- **HPLC** (high performance liquid chromatography)
 - Metanol
 - Clorofórmio

Quantificação de colesterol

- Espectrometria de massa

METODOLOGIA

Análise estatística

ANOVA, GLM (SAS[®])

- Temperatura
- Colesterol
- Tratamento
- Rotina

- ✓ Efeitos
- ✓ Interações

Valores

- Quadrados mínimos médios

Valores percentuais

- Transformados arcsin

- ✓ $P < 0,05 \rightarrow$ diferença
- ✓ $0,05 < P < 0,10 \rightarrow$ tendência

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

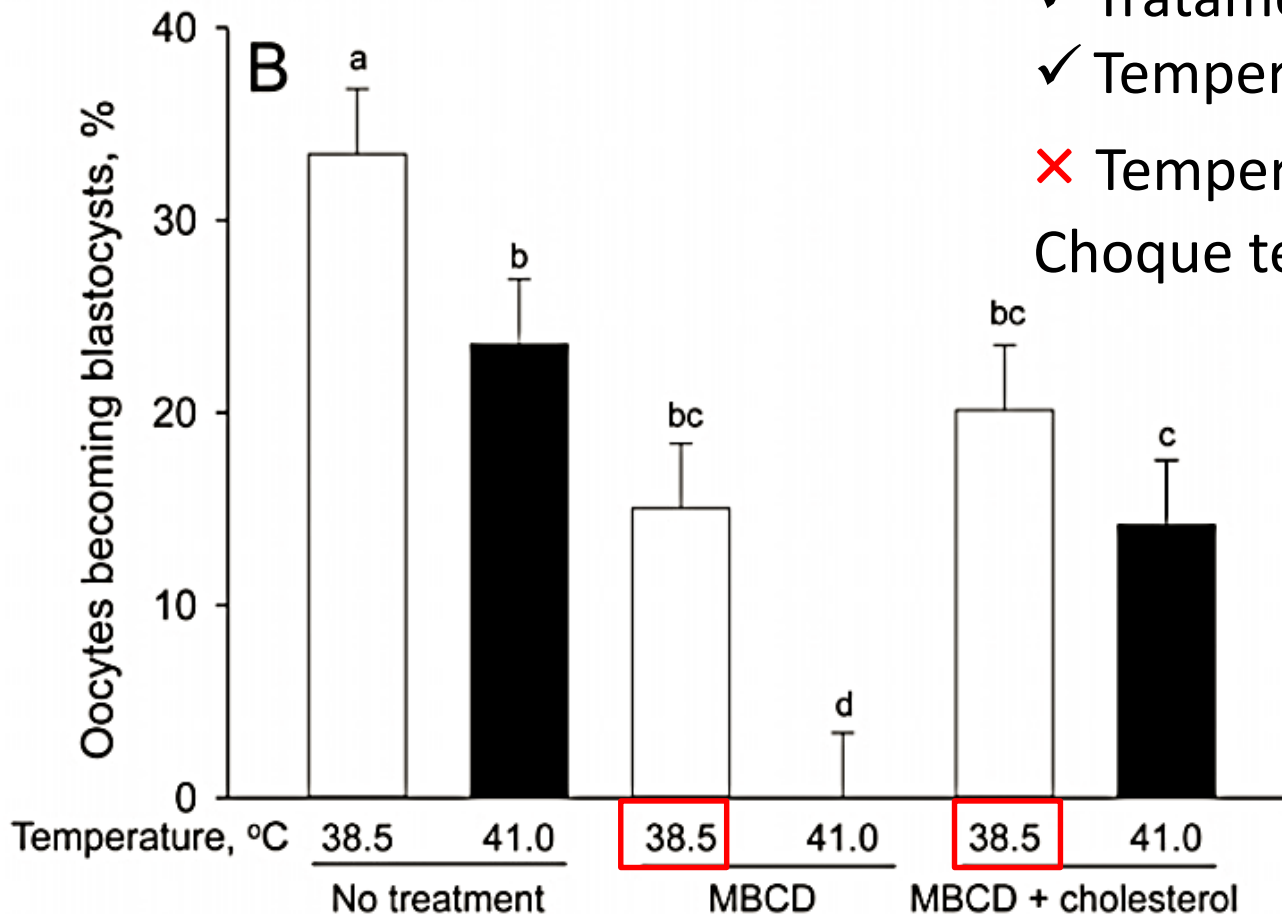
Efeito ($P < 0.001$):

✓ Tratamento

✓ Temperatura

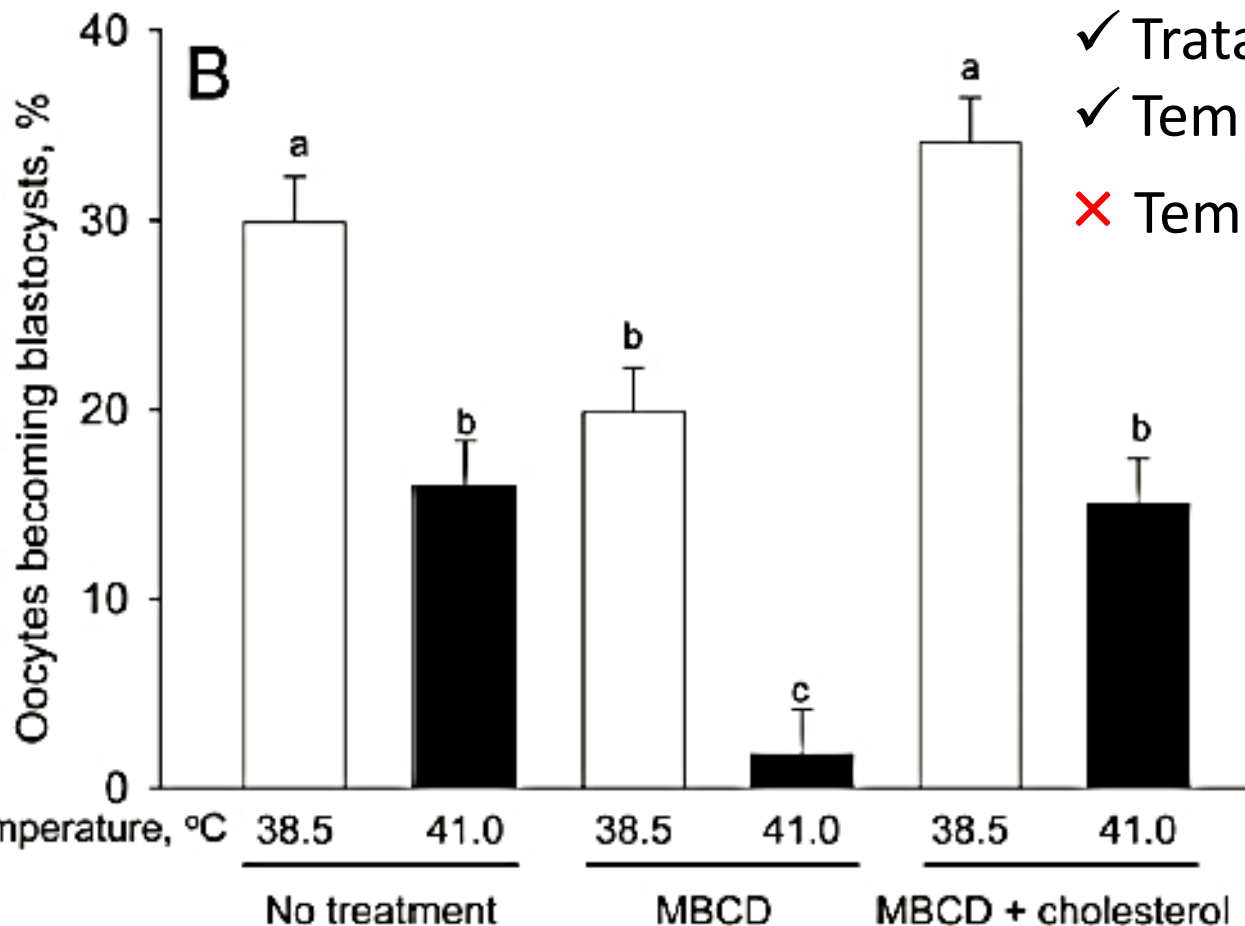
✗ Temperatura*tratamento

Choque térmico afetou a todos



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 2



Tendência:

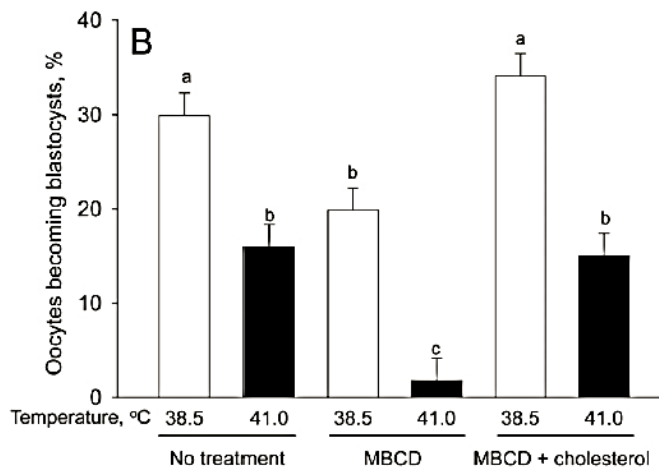
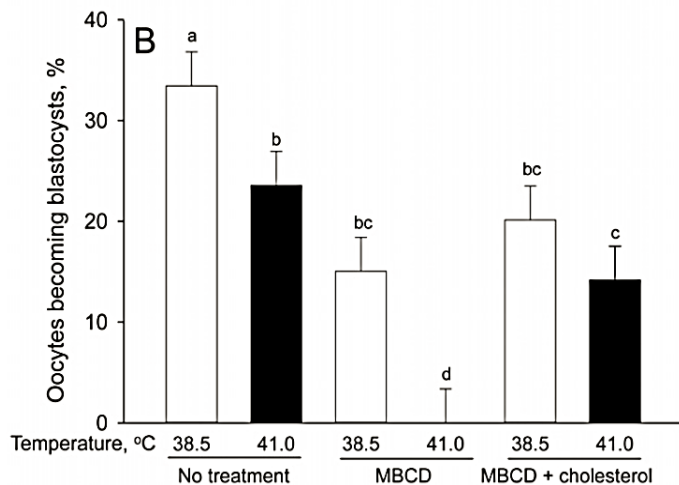
✓ Tratamento ($P = 0,10$)

✓ Temperatura ($P < 0,07$)

✗ Temperatura*tratamento

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 e 2



MBCD + Col. não aumenta resistência

➤ Manejo nutricional
↑ Col. Circulante
Não diminui perda embrionária

➤ Esgotamento de col. Com MBDC
↓ Desenvolvimento
Independente da T.

➤ ↑ KSOM-PVA
MBCD + Col.

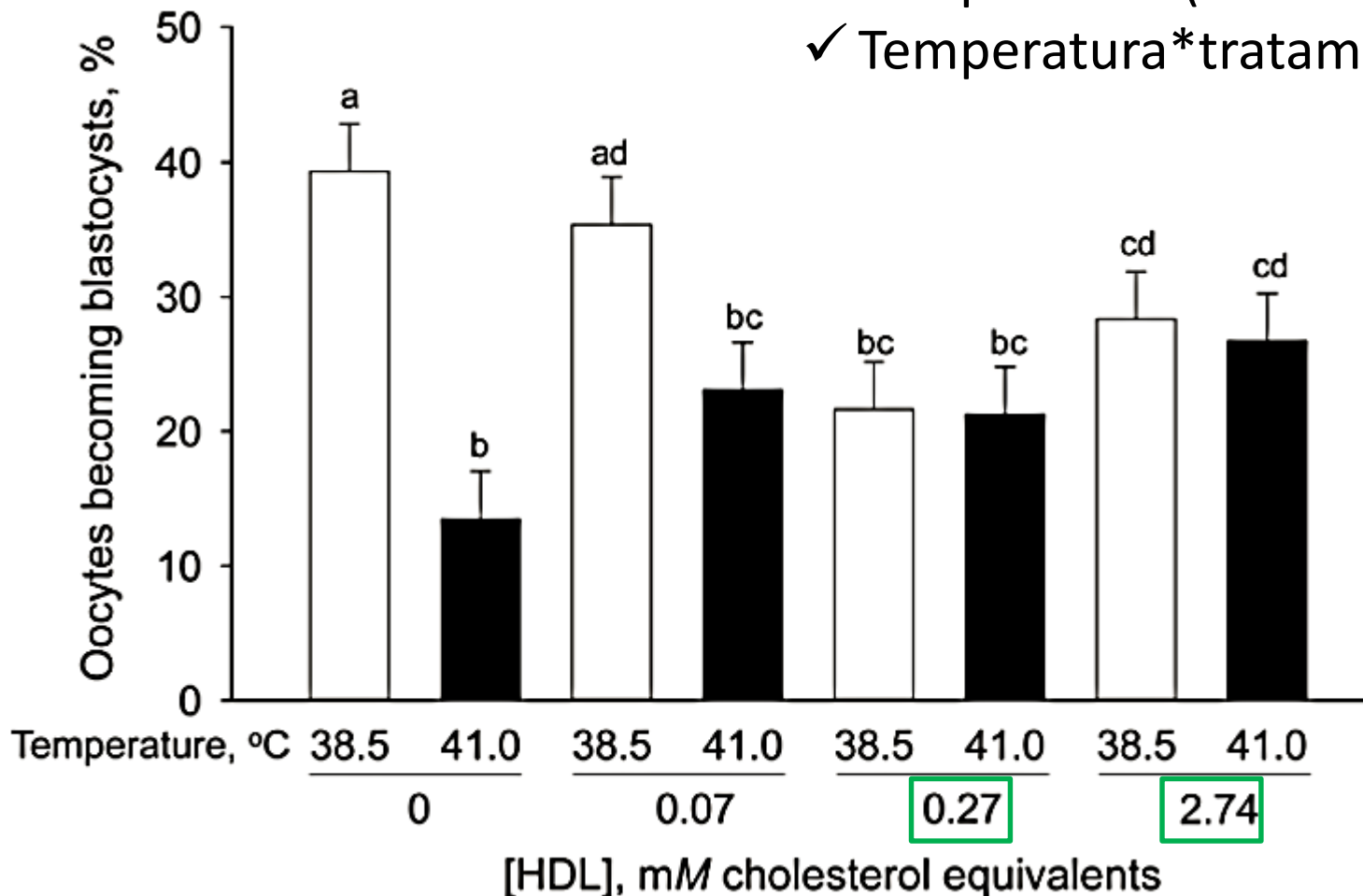
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 4

Efeito:

✓ Temperatura ($P < 0.05$)

✓ Temperatura*tratamento ($P < 0.01$).



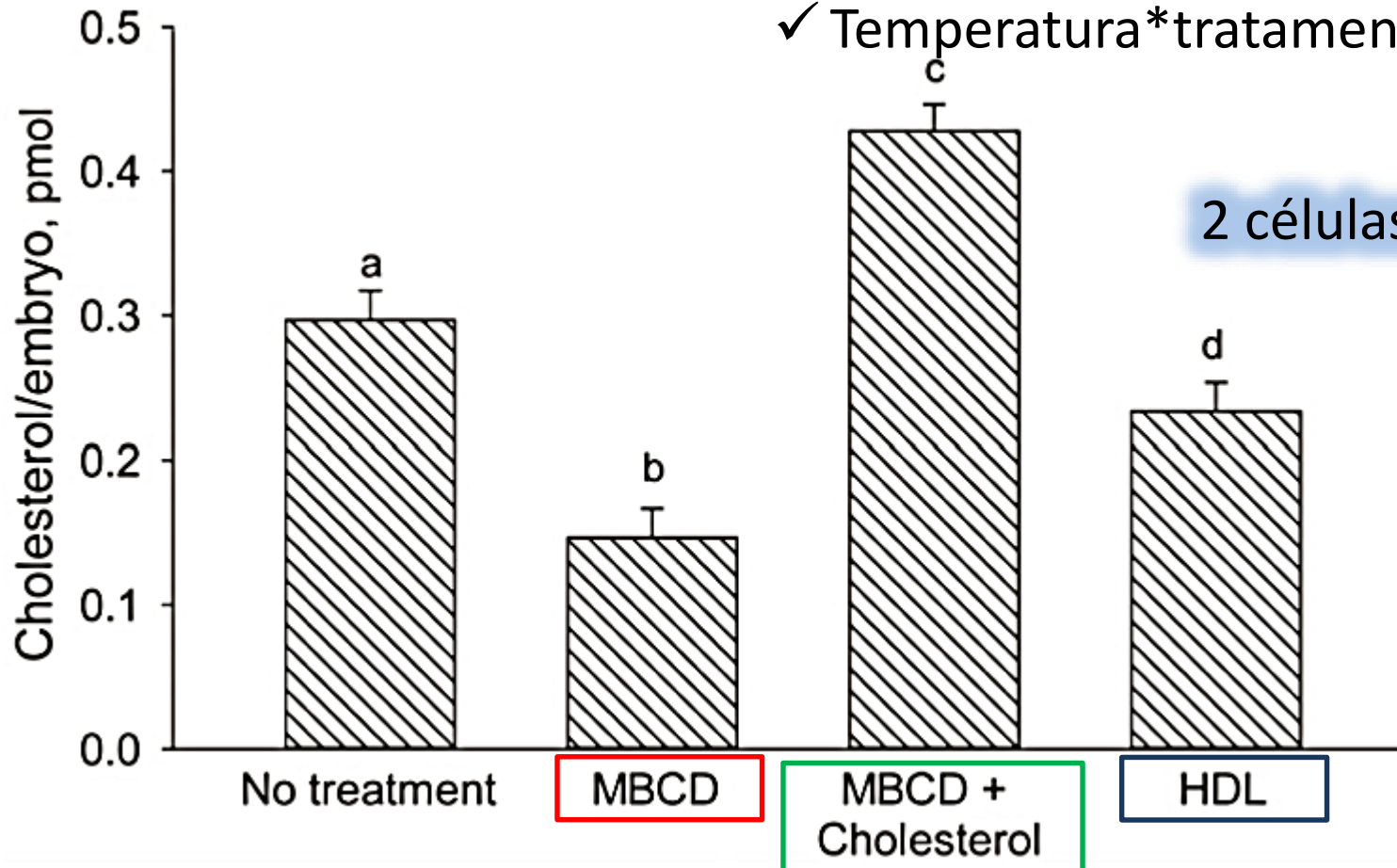
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 4

Efeito:

✓ Tratamento ($P < 0.05$)

✓ Temperatura*tratamento ($P < 0.01$).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

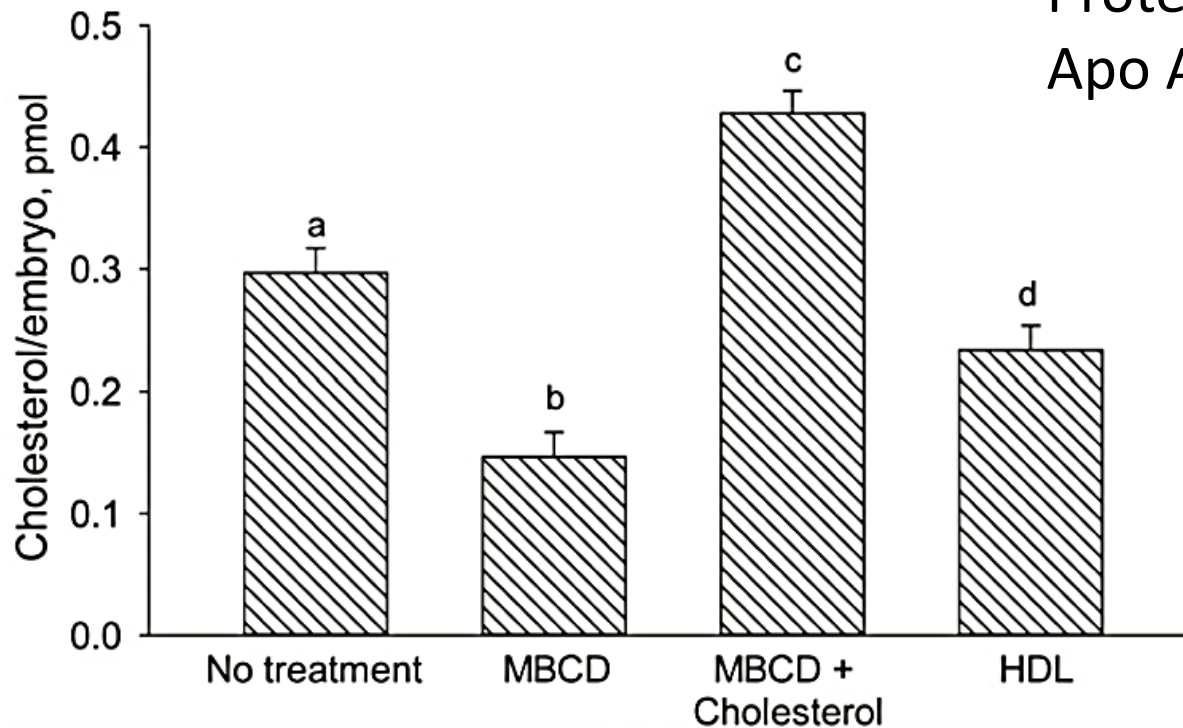
Experimento 4

HDL: ↓ Colesterol

↑ Resistência ao choque térmico

Proteção a radicais livres

Apo A-I, Apo A-3...



Outros trabalhos

Mulheres submetidas a FIV

APo-I

↑ **Atividade PON1**

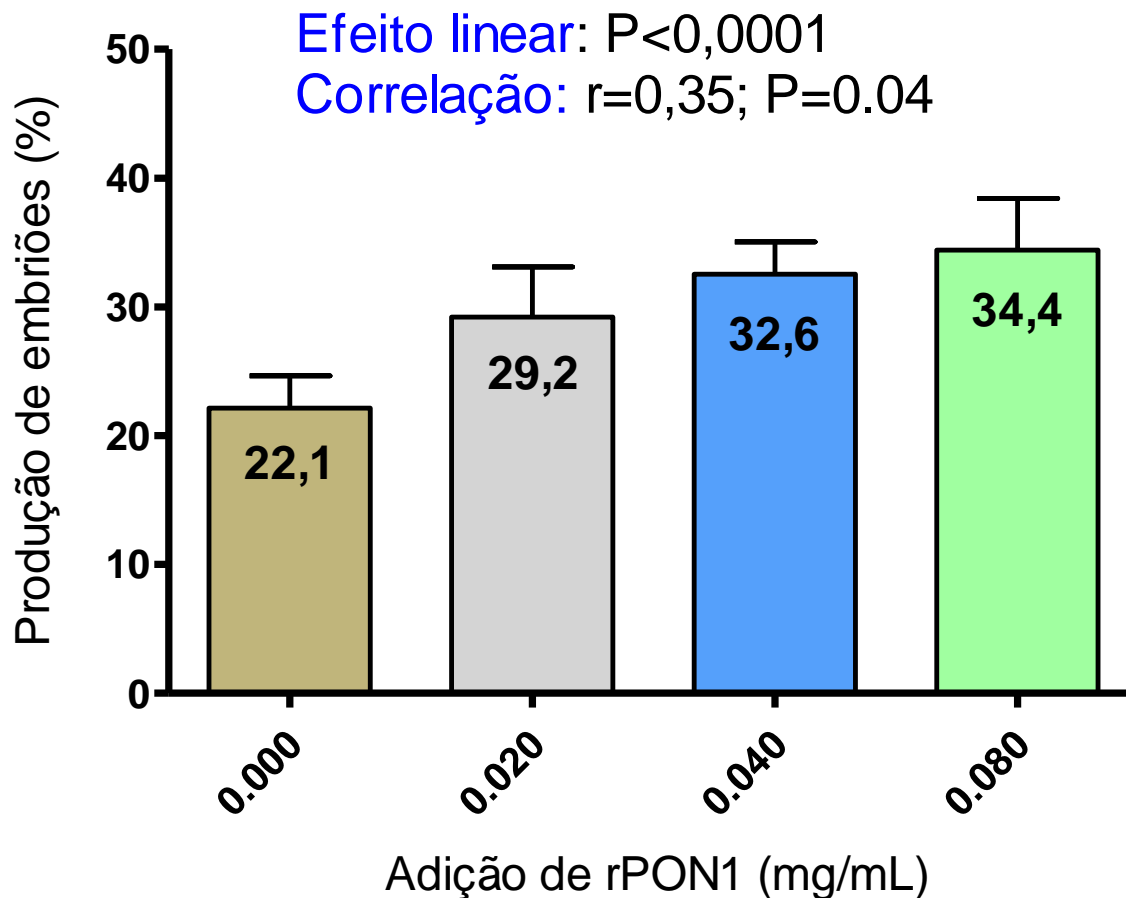
- Maior número de blastômeros
- Melhor qualidade do embrião

HDL

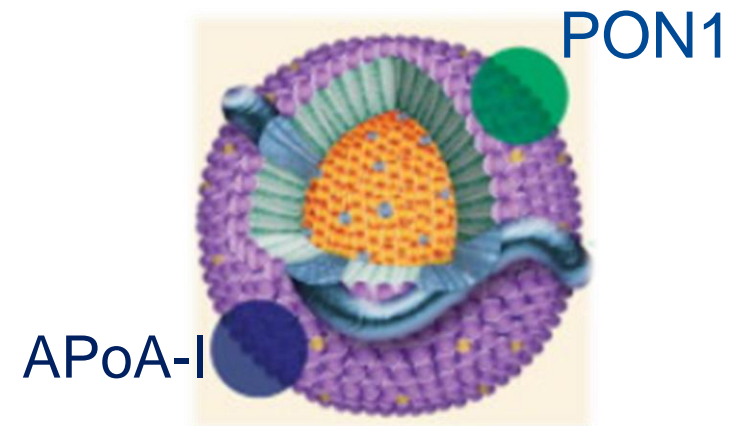
- Efeito protetor nas membranas
- Melhor competência do oócito

Outros trabalhos

Adição de PON1 na MIV



HDL



Outros trabalhos

Adição Butafosfan na MIV

Avaliando:

Ovócitos

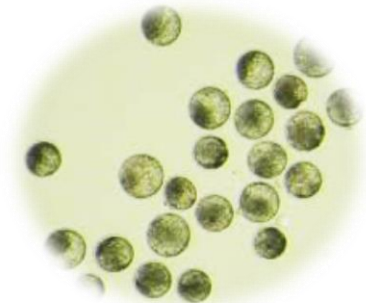
➤ Maturação → Hoescht

Células do cúmulo

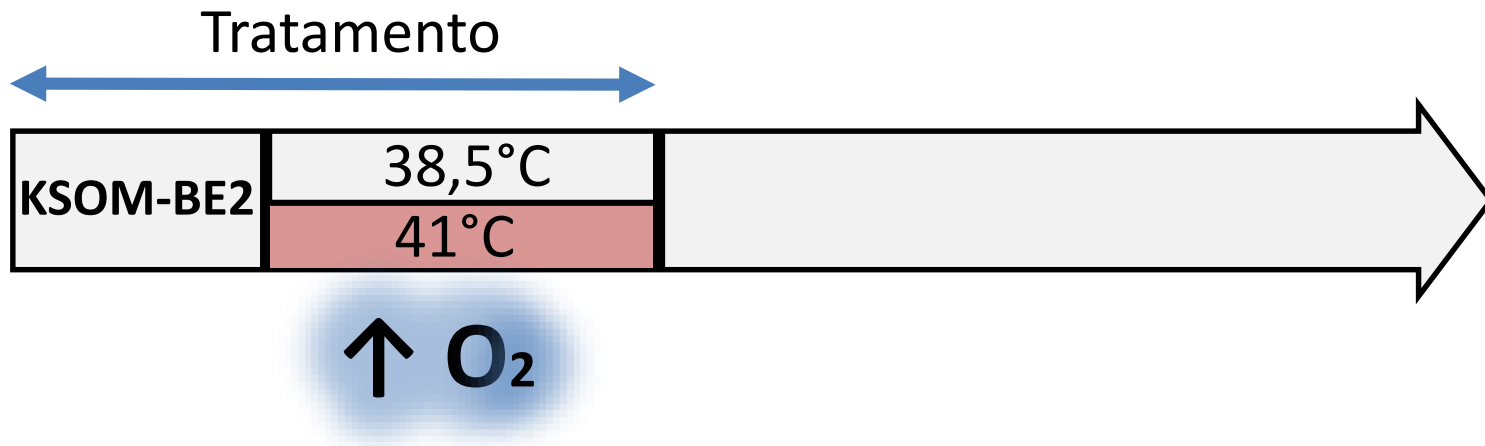
- ✓ Expressão Gênica
- ✓ Apoptose

Embriões

- ✓ Clivagem
- ✓ Desenvolvimento (D7)
- ✓ Expressão Gênica



Considerações finais



➤ Resultados ultimo experimento

CONCLUSÕES

- ✓ O aumento do teor de colesterol não melhora a sobrevivência embrionária em resposta ao choque térmico.
- ✓ A depleção de colesterol reduz o desenvolvimento embrionário inicial, independentemente da ocorrência de choque térmico.
- ✓ A capacidade termo protetora do HDL em embriões, provavelmente age através de um mecanismo independente do conteúdo de colesterol livre.



Obrigado!

Joao Alvarado Rincón

Doutorando em Veterinária -UFPel

E-mail: joaoal13@hotmail.com

