



**Universidade Federal de Pelotas**  
**Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária**



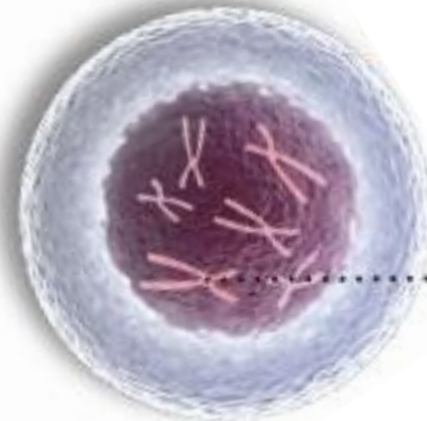
**Efeito do ácido lisofosfatídico durante a maturação *in vitro* do complexo cumulus-oócito: expansão do cumulus, metabolismo da glicose e expressão de genes envolvidos na cascata ovulatória, competência do oócito e blastocisto**

**Lucas Hax**

Médico Veterinário

Doutorando em Biotecnologia

**Pelotas, 06 de julho de 2016**





Boruszewska et al. *Reproductive Biology and Endocrinology* (2015) 13:44  
DOI 10.1186/s12958-015-0044-x



REPRODUCTIVE BIOLOGY  
AND ENDOCRINOLOGY

RESEARCH

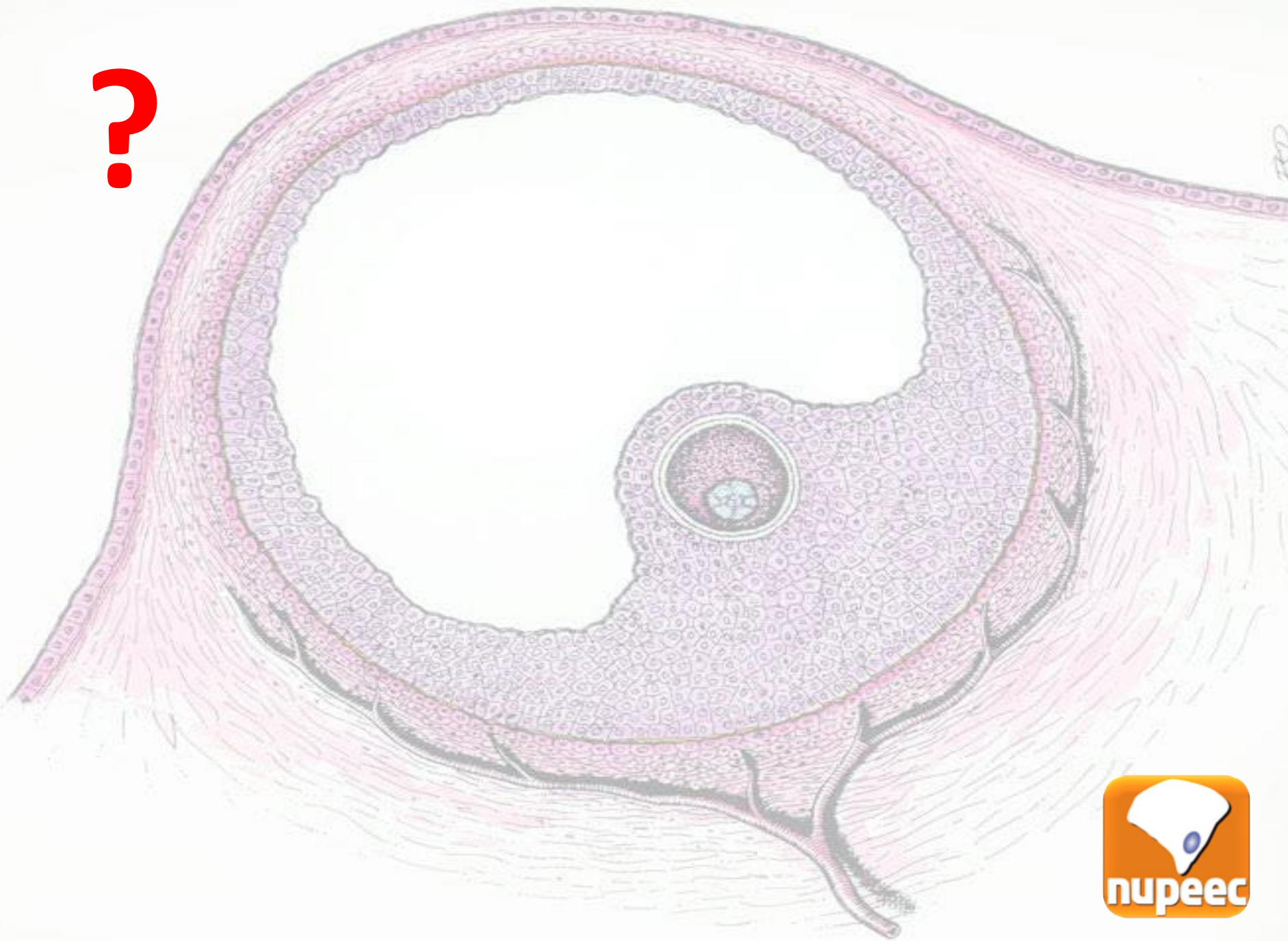
Open Access

# The effect of lysophosphatidic acid during *in vitro* maturation of bovine cumulus–oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence

Dorota Boruszewska, Emilia Sinderewicz, Ilona Kowalczyk-Zieba, Katarzyna Grycmacher and Izabela Woclawek-Potocka\*

FI: 2.147

?



## ☐ Introdução

### Brasil

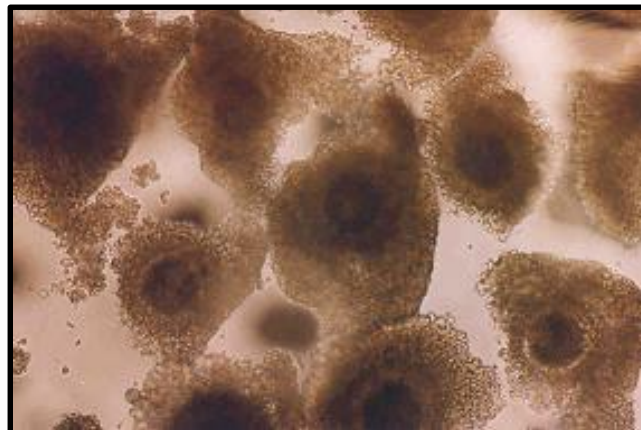
- ✓ Líder mundial em PIVE
- ✓ Animais de alto mérito genético
- ✓ Animais comerciais com SAM direcionada
- ✓ *In vivo* – 60-80% de competência oocitária
- ✓ *In vitro* – 20-40% de competência oocitária



## ☐ Introdução

### Competência Oocitária

Capacidade do oócito passar pela maturação, ser fecundado, se desenvolver até o estágio de blastocisto e ter a capacidade de induzir uma gestação





## □ Introdução

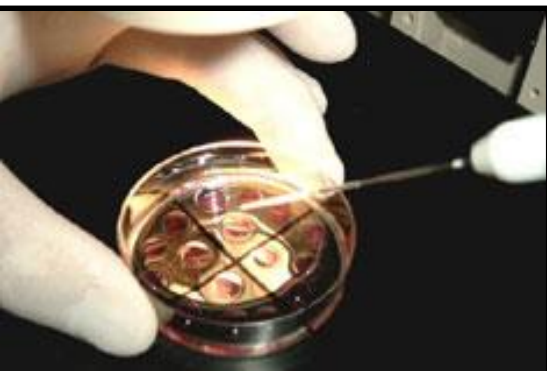
### Maturação Oocitária

- Aquisição de competência meiótica
  - Maturação meiótica ou nuclear
  - Maturação citoplasmática
  - Metáfase II
- 
- O desenvolvimento da competência oocitária *in vitro* é determinado pelas condições do meio de MIV

## □ Introdução

### Suplementos para melhora da MIV

- Adição de cAMP ao meio de MIV
- Adição de PON ao meio de MIV - NUPEEC
- Adição de Butafosfan ao meio de MIV – NUPEEC
- ...
- Ácido lisofosfatídico

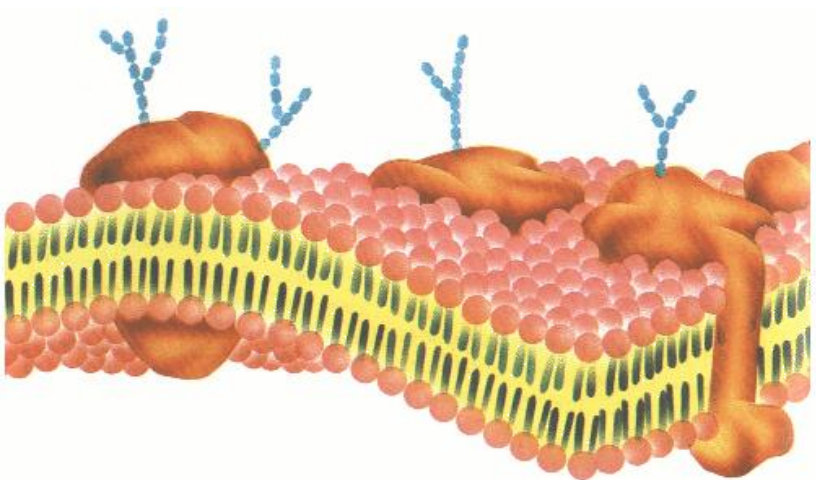




## □ Introdução

### Ácido Lisofosfatídico

- Fosfolipídio transmembrana
- Importante sinalizador molecular
- Regulação da função reprodutiva em mulheres, roedores e ruminantes

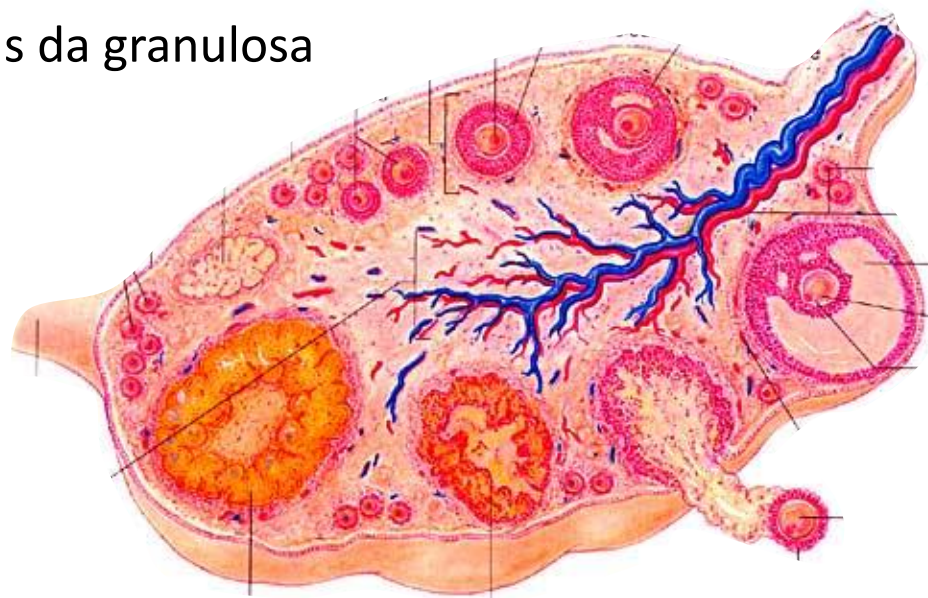




## □ Introdução

### Ácido Lisofosfatídico

- Produção local
- Ação autócrina e parácrina
- Ovário, útero, células da granulosa





## □ Objetivo

Avaliar o efeito da adição de ácido lisofosfatídico no meio de MIV na maturação oocitária, apoptose, expressão de genes envolvidos na apoptose e aquisição de competência, expansão do cumulus, metabolismo da glicose e expressão de genes relacionados com a sua utilização, taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário.



## ☐ Metodologia

### MIV

- Ovários coletados de abatedouro
- Grupos de 25 oócitos por poço
- 400uL de TCM por poço
- 400uL de óleo mineral para cobertura
- 39°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 24h

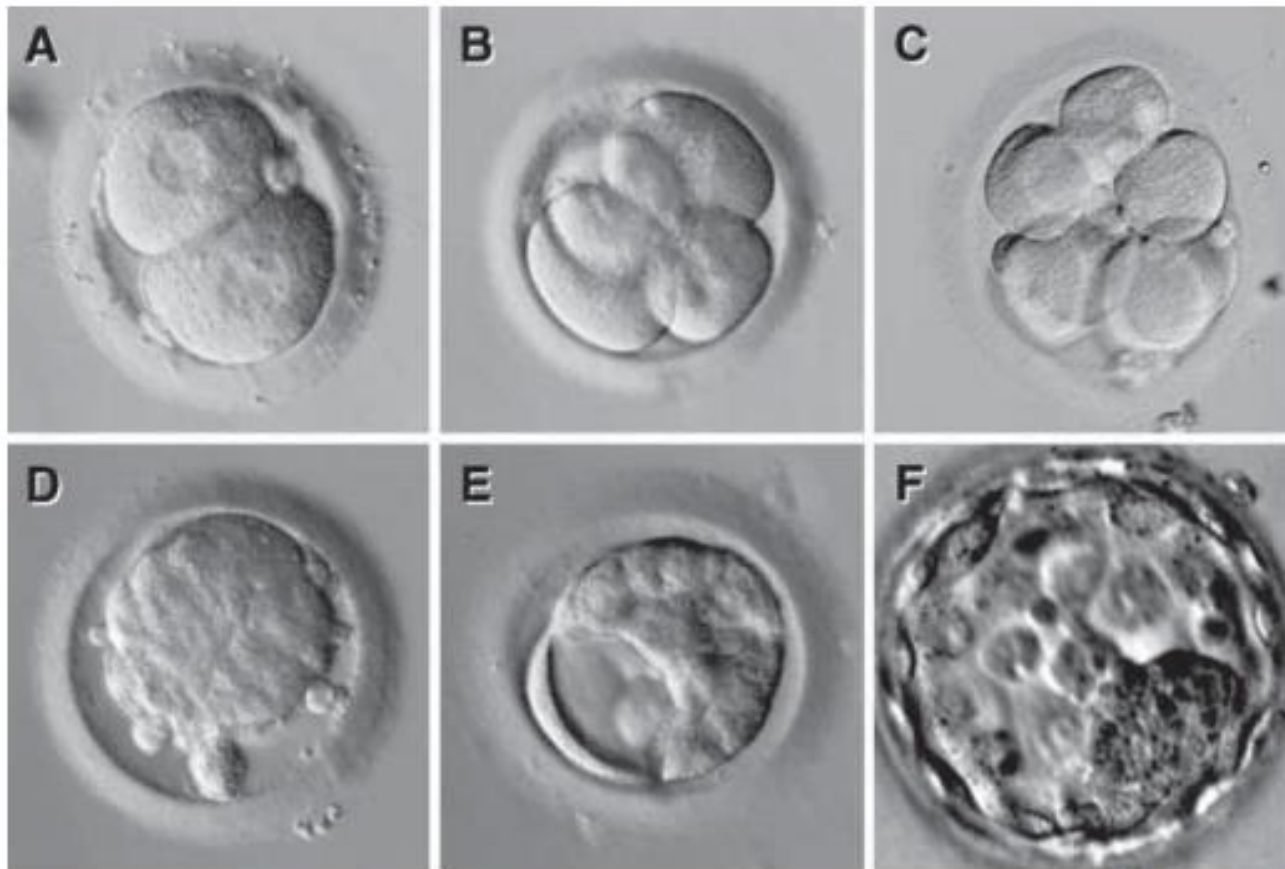
## ☐ Metodologia

### FIV

- Lavagem dos COCs em meio de FIV
- Descongelamento do sêmen
- Incubado em meio de capacitação por 1h
- Recuperação dos espermatozoides móveis através de swim-up
- Centrifugação do recuperado
- Diluição do pellet para a IA
- Incubados por 48h
- Avaliação da clivagem

## ☐ Metodologia

### FIV



**Figura 1.** Diferentes estádios do desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação: (A) Embrião de 2 células; (B) Embrião de 4 células; (C) Embrião de 8 células; (D) Mórula compacta; (E) Blastocisto inicial, com um pequeno fluido dentro da cavidade blastocística; (F) Blastocisto expandido (HARDY & SPANOS, 2002).

## ☐ Metodologia

### CIV

- Desnudamento dos zigotos em vórtex
- Lavagem em meio
- Poços com 400uL de meio de CIV
- 400uL de óleo mineral para cobertura
- Incubados por 7 dias

## ☐ Metodologia

### Tratamentos

- Controle – somente meio de MIV

- Tratamento (LPA) – meio de MIV

suplementado com  $10^{-5}$ M de LPA

- Após a MIV:

Análise da expansão das céls. do cumulus

5 oócitos de cada grupo para análise de

apoptose

3 COCs para isolamento de RNA

5 oócitos para avaliação da maturação





## ☐ Metodologia

### Definição da maturação

- Microscópio invertido de contraste

Extrusão do primeiro corpúsculo polar sem presença de vesícula germinativa – MII

Com vesícula germinativa ou sem vesícula germinativa e sem extrusão do primeiro corpúsculo polar - Imaturo

## ☐ Metodologia

### Definição da maturação

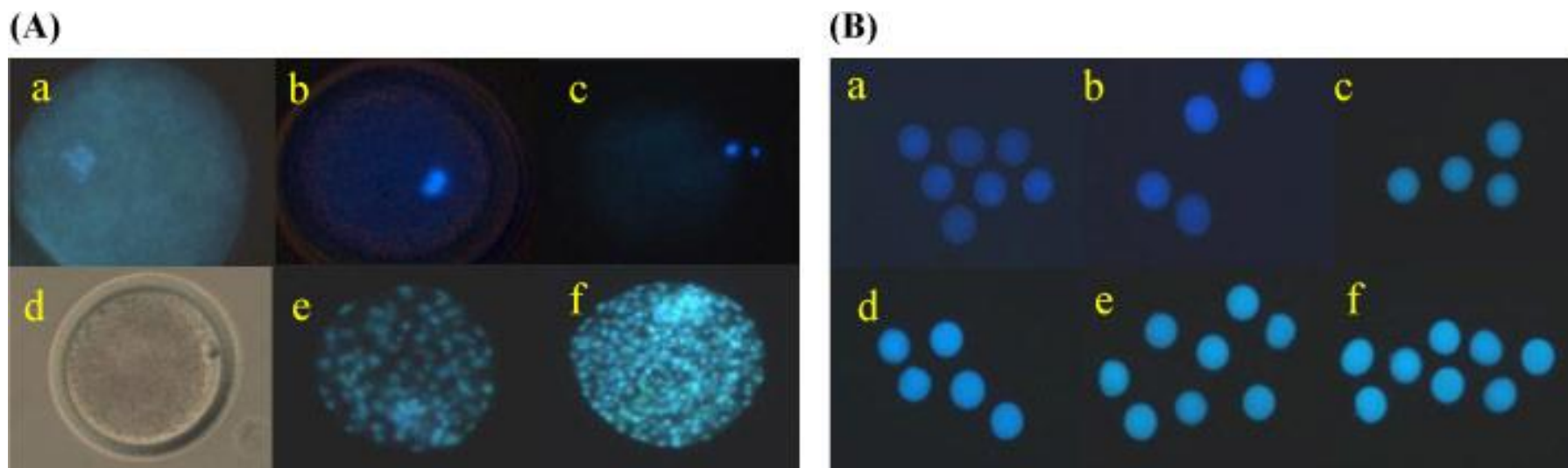


Figura 2. Coloração com Hoechst para avaliação da maturação e do número de células dos embriões (A). Oócito em vesícula germinativa (a), estágio intermediário (b), metáfase II (c), liberação do 1º corpúsculo polar (d), embrião com  $\pm 110$  células (e) e embrião com  $\pm 360$  células (f). Intensidade de fluorescência do nível GSH intracelular em oócitos avaliados com Cell Tracker Blue (B). Oócitos VG/ $H_2O_2$  (a) VG (b) MIV/ $H_2O_2$  (c) MIV (d) quercetina (e) e cisteamina (f).



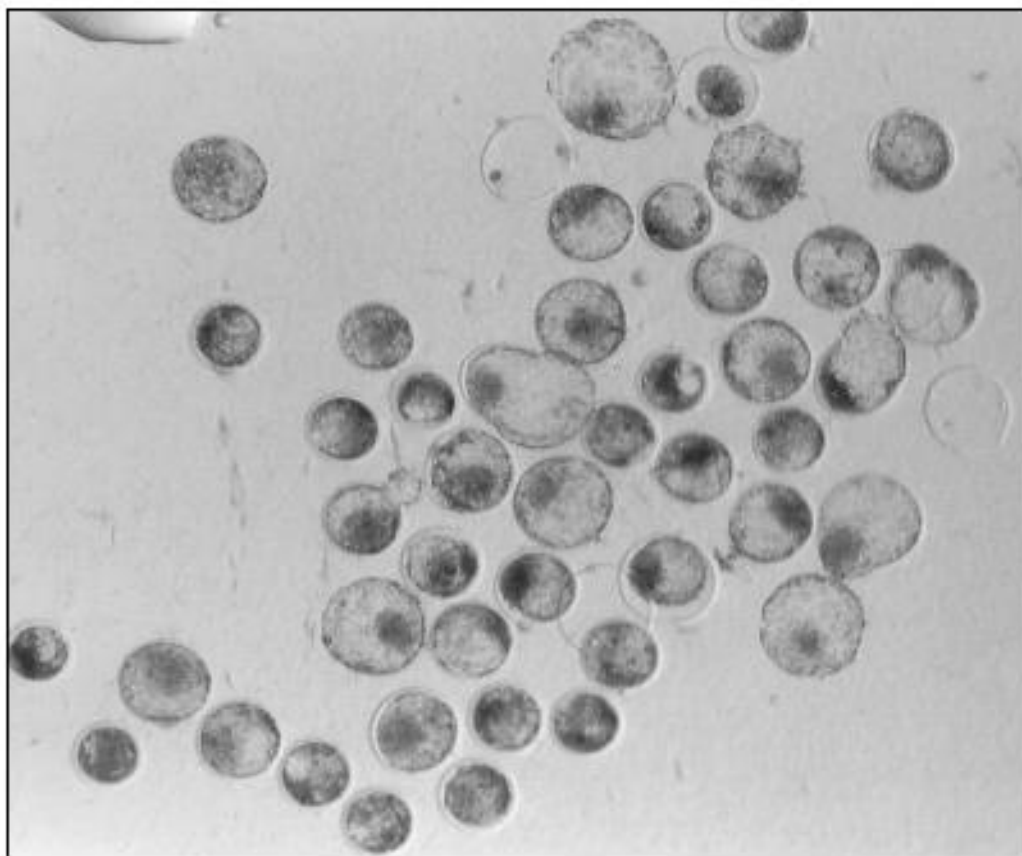
## ☐ Metodologia

### D7

- Avaliação do número e morfologia dos blastocistos
- Coleta de blastocistos para obtenção de RNA
- Taxa de desenvolvimento calculada com base no número de oócitos maturados

# ☐ Metodologia

D7





## ☐ Metodologia

### Análises moleculares

#### ➤ Extração de RNA

- Extração de RNA por KIT (Applied Biosystems)
- Estocagem no  $-80^{\circ}\text{C}$
- Transcriptase reversa – cDNA
- Diluído
- Estocado no  $-20^{\circ}\text{C}$  até o real time

## ☐ Metodologia

### Análises moleculares

#### ➤ Real-time PCR

- Applied Biosystems
- GAPDH – controle interno
- Genes:

OCT4	PLAC8	EREG	ADAM17	PTGS2	GLUT4
SOX2	BCL2	BTC	HAS2	GFPT1	LDHA
IGF1R	BAX	EGFR	PTX3	GFPT2	PFKP
IGF2R	AREG	ADAM10	TNFAIP6	GLUT1	



## ☐ Metodologia

### Análises moleculares

#### ➤ Detecção de apoptose

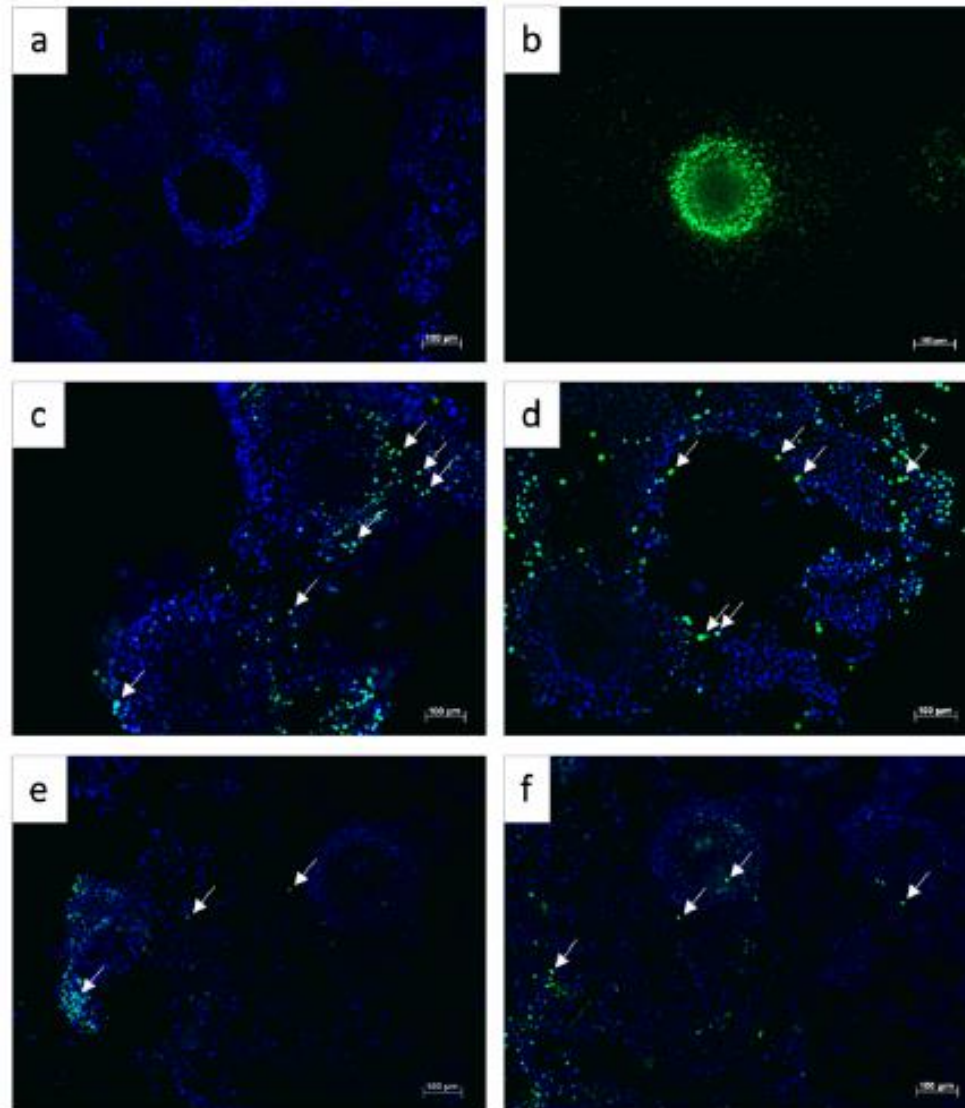
- Teste TUNEL
- Fluorescência diferente para DNA íntegro e não íntegro



# ☐ Metodologia

## Análises moleculares

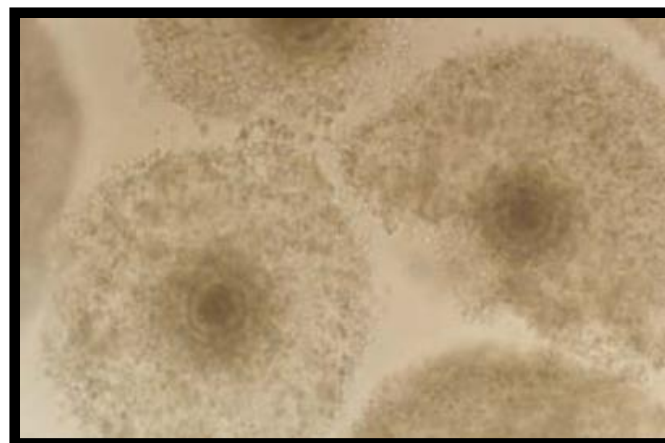
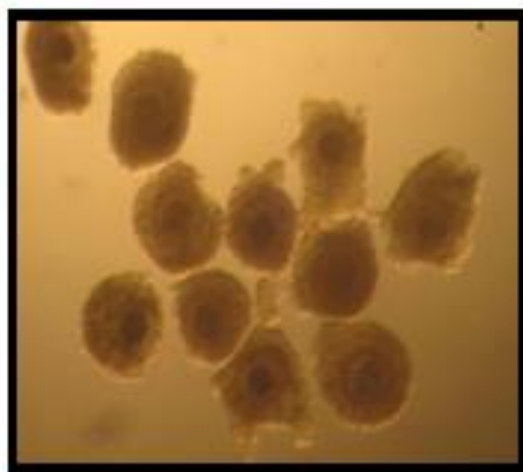
### ➤ Detecção de apoptose



## ☐ Metodologia

### Análise da expansão das células do cumulus

- 1 – não expandido
- 2 – parcialmente expandido
- 3 – totalmente ou quase totalmente expandido





## ☐ Metodologia

### Análise do metabolismo da glicose

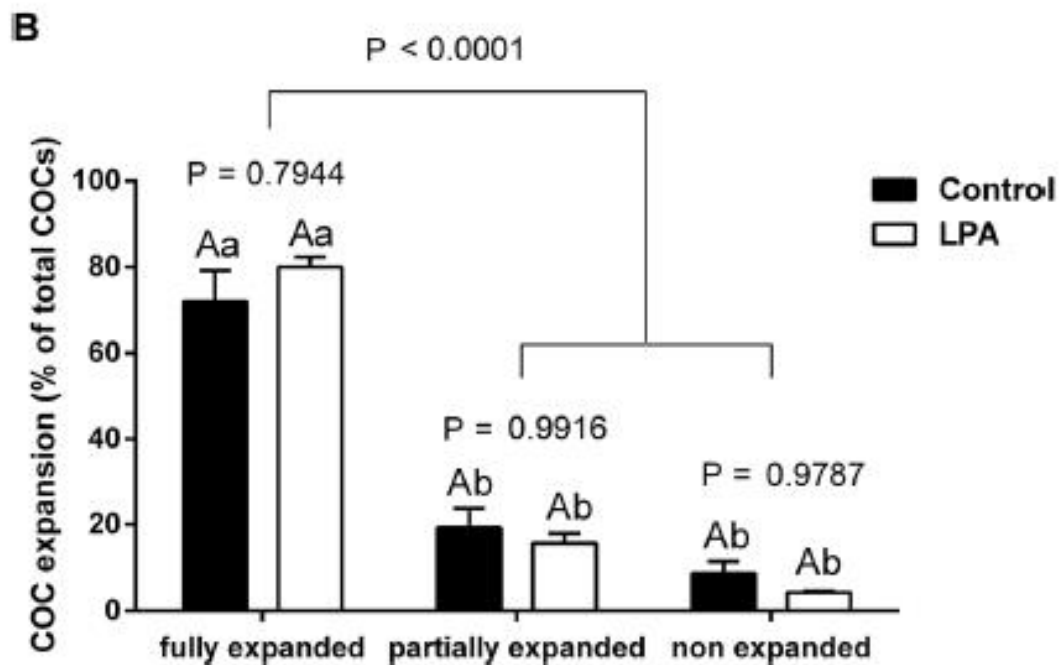
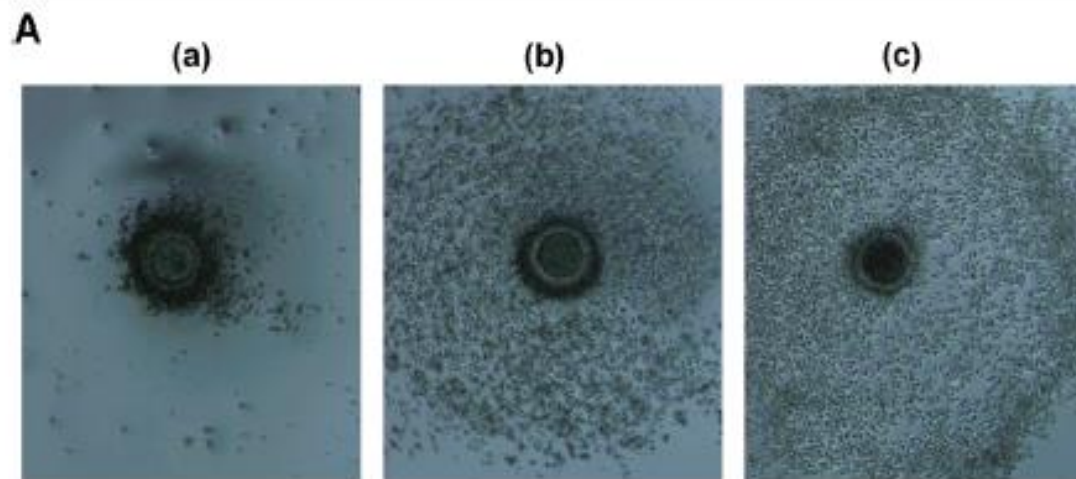
- Coleta do meio antes e após a MIV
- Mensuração da concentração de glicose e lactato
- Via glicolítica anaeróbica – lactato
- Substrato para o oócito



## ☐ Metodologia

### Análise estatística

- Apoptose, concentração de glicose e lactato – Teste T
- Expansão do cumulus - ANOVA - TUKEY
- Maturação oocitária e blastocisto – Fisher
- GraphPad PRISM 6.0

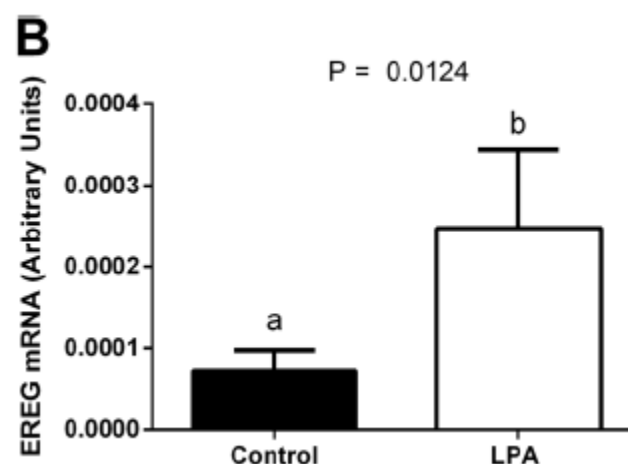
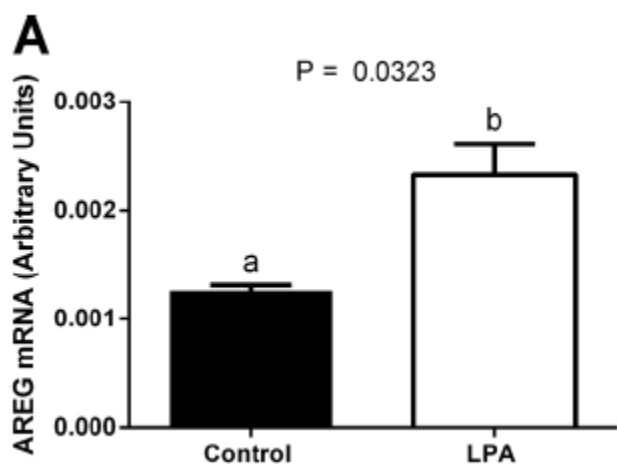


**Fig. 5** The effect of LPA ( $10^{-5}$ M) supplementation of oocyte maturation medium on cumulus expansion. Panel **a** depicts representative images of bovine COCs exhibiting three degrees of cumulus expansion: **a** grade 1 (non-expanded), **b** grade 2 (partially expanded) and **c** grade 3 (fully expanded). Original magnification  $\times 50$ . Panel **b** depicts quantitative analysis of LPA effect on cumulus expansion. The values are presented as percentage of COCs and expressed as mean  $\pm$  SEM. Capital letters indicate statistical significance ( $P > 0.05$ ) between two treatments whilst different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) within each treatment, as determined by two-way ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test

## ☐ Resultados e Discussão

### Expansão das células do cumulus

- Diferença na transcrição de genes envolvidos com a expansão das céls. do cumulus





## □ Resultados e Discussão

### Expansão das células do cumulus

- AREG – Amphiregulin
- EREG – Epiregulin
- Família do fator de crescimento epidermal
- Componentes da cascata de sinalização intracelular
- Ativados por LH



## □ Resultados e Discussão

### Expansão das células do cumulus

- Críticos para a expansão do cumulus
- Retomada da meiose, maturação do oócito e expansão do cúmulus
- Mediadores da ação do LH
- AREG estimula glicólise, consumo de glicose e produção de lactato
- LPA estimula AREG e EREG mas não altera a expansão **VISUALMENTE**, mas melhora o metabolismo do oócito

## □ Resultados e Discussão

### Efeito na maturação oocitária

**Table 2** The effect of LPA supplementation of *in vitro* oocyte maturation medium on maturation of bovine oocytes

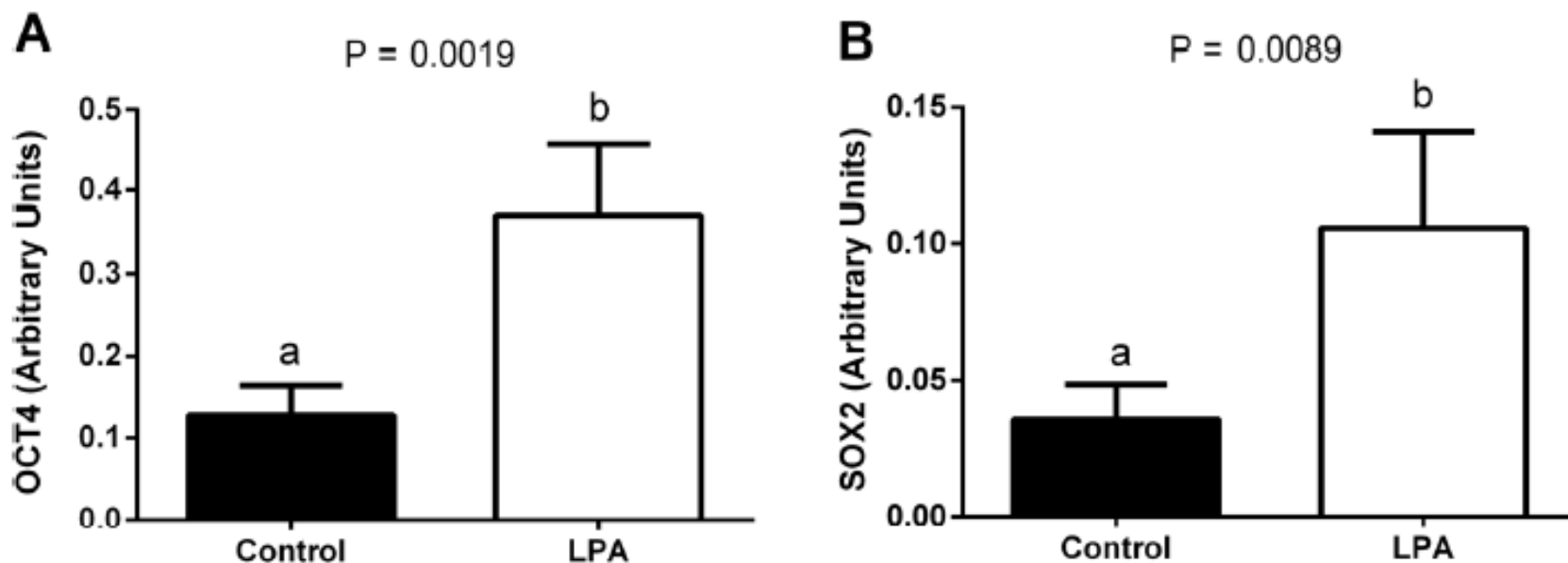
Supplement	Number of oocytes	Immature oocytes, n	Mature (MII) oocytes, n	Maturation rate, %	P value of maturation rate
Control (PBS)	114	40	74 <sup>a</sup>	64,9 <sup>a</sup>	0,0242
LPA (10 <sup>-5</sup> M)	106	22	84 <sup>b</sup>	79,2 <sup>b</sup>	

Proportion of mature oocytes relative to the total number of oocytes

Different letters indicate significant differences ( $P= 0,0242$ ), as determined by Fisher's exact test

## ☐ Resultados e Discussão

### Expressão de genes relacionados à aquisição de competência



- OCT4 – fator de transcrição ligante de octâmero
- SOX2 – região determinante de sexo Y-box 2



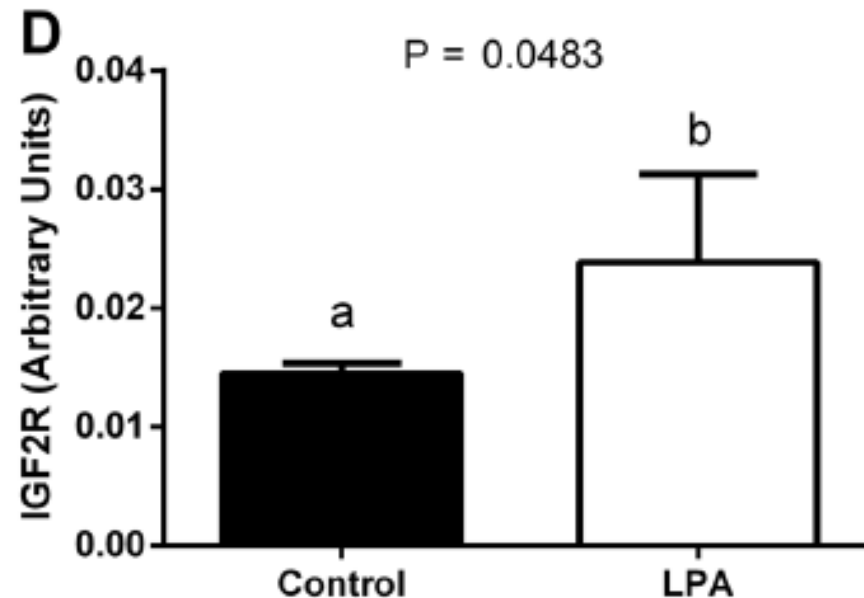
## □ Resultados e Discussão

### Expressão de genes relacionados à aquisição de competência

- OCT4 – fator de transcrição ligante de octâmero
- SOX2 – região determinante de sexo Y-box 2
- Pluripotência
- Diferenciação celular
- Regulação do desenvolvimento embrionário inicial

## □ Resultados e Discussão

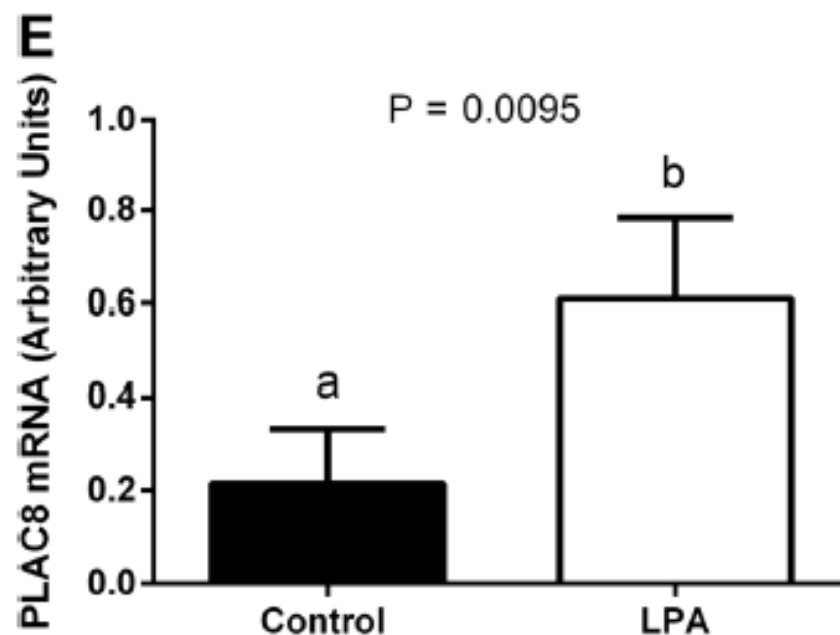
### Expressão de genes relacionados à aquisição de competência



- IGF2R – Receptor 2 do fator de crescimento semelhante à insulina
- Arranjo morfológico e crescimento (oócito e embrião)

## ☐ Resultados e Discussão

### Expressão de genes relacionados à aquisição de competência



- PLAC8 – placenta específico 8
- Aumenta conforme o crescimento do embrião



## □ Resultados e Discussão

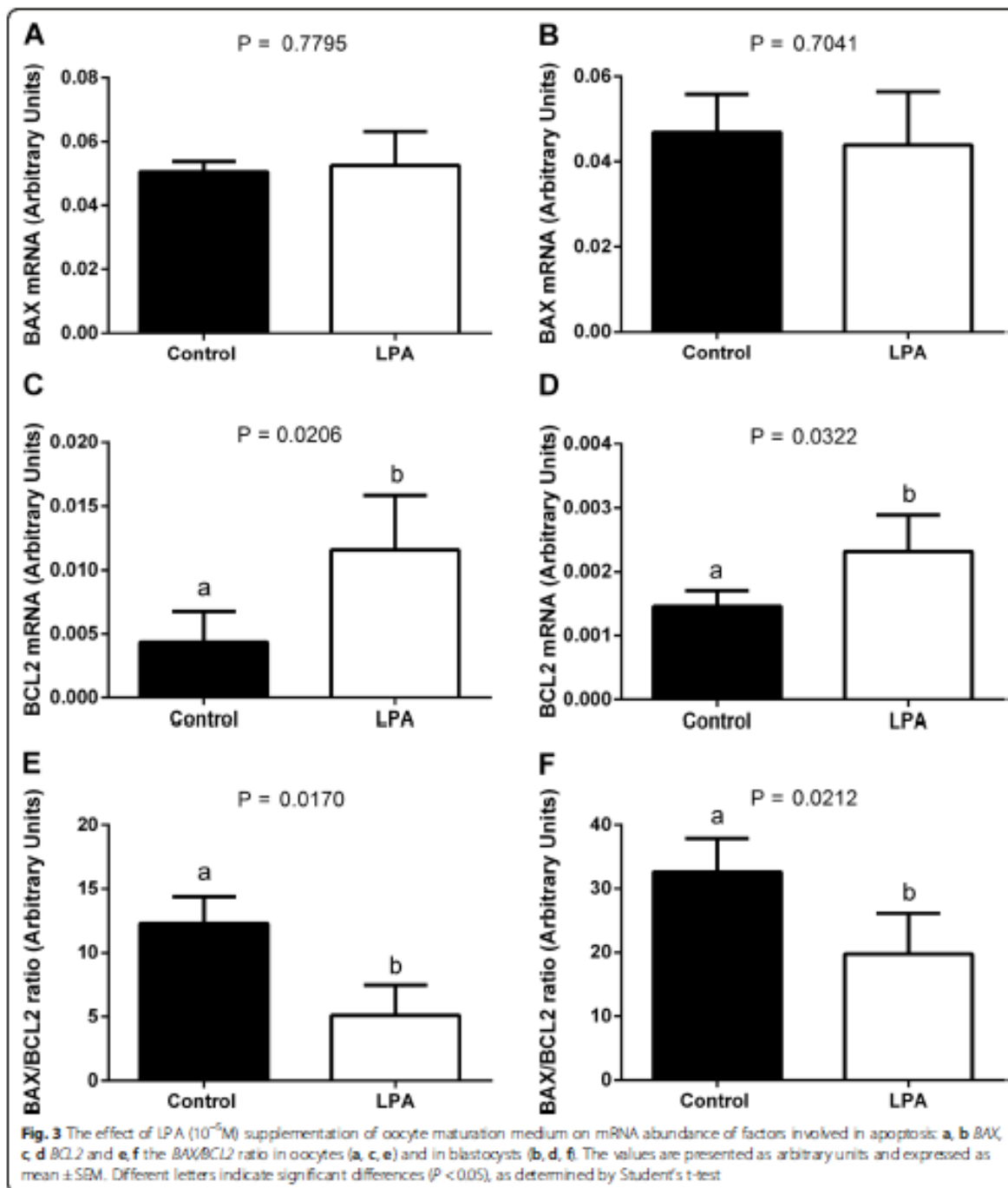
### Expressão de genes relacionados à aquisição de competência

- PLAC8 – placenta específico 8
- Importante no estágio de pré-implantação embrionária
- Comunicação embrio-materna
- Expressão relacionada a gestação de sucesso (embriões *in vivo* e *in vitro*)





- LPA ap
- Maior
- BAX –
- BCL2 –

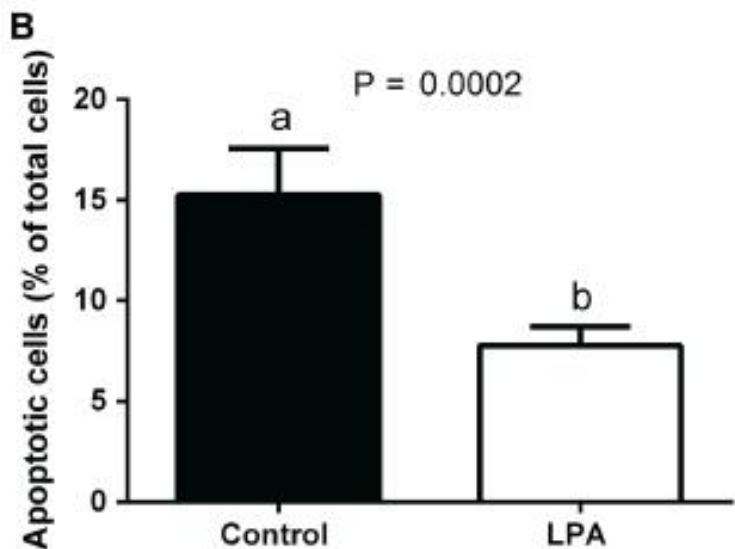
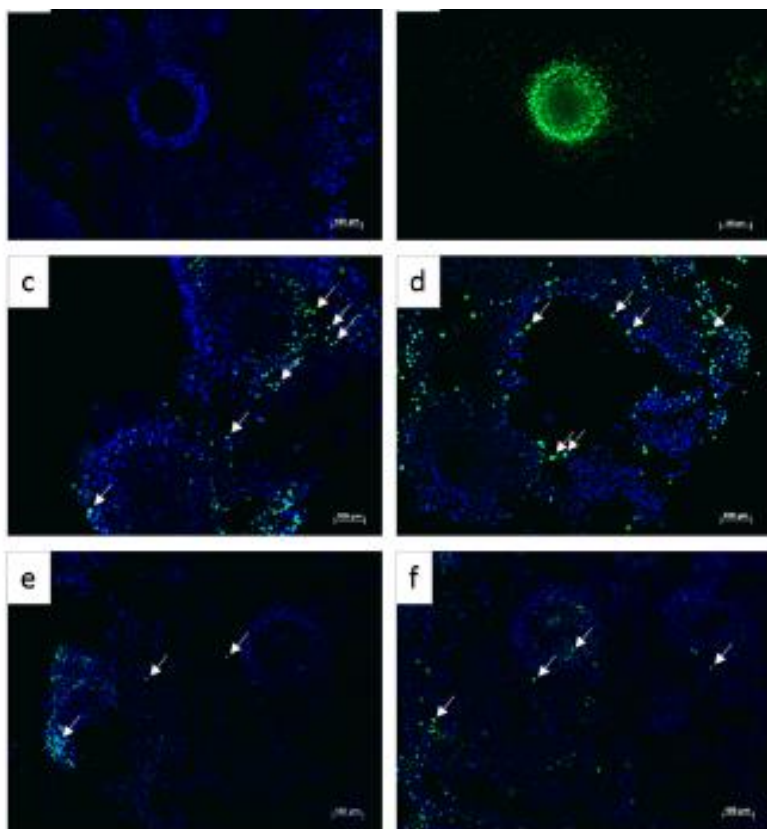


**Fig. 3** The effect of LPA ( $10^{-10}$ M) supplementation of oocyte maturation medium on mRNA abundance of factors involved in apoptosis: **a, b** BAX, **c, d** BCL2 and **e, f** the BAX/BCL2 ratio in oocytes (**a, c, e**) and in blastocysts (**b, d, f**). The values are presented as mean  $\pm$  SEM. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), as determined by Student's t-test

## □ Resultados e Discussão

### Apoptose do COCs

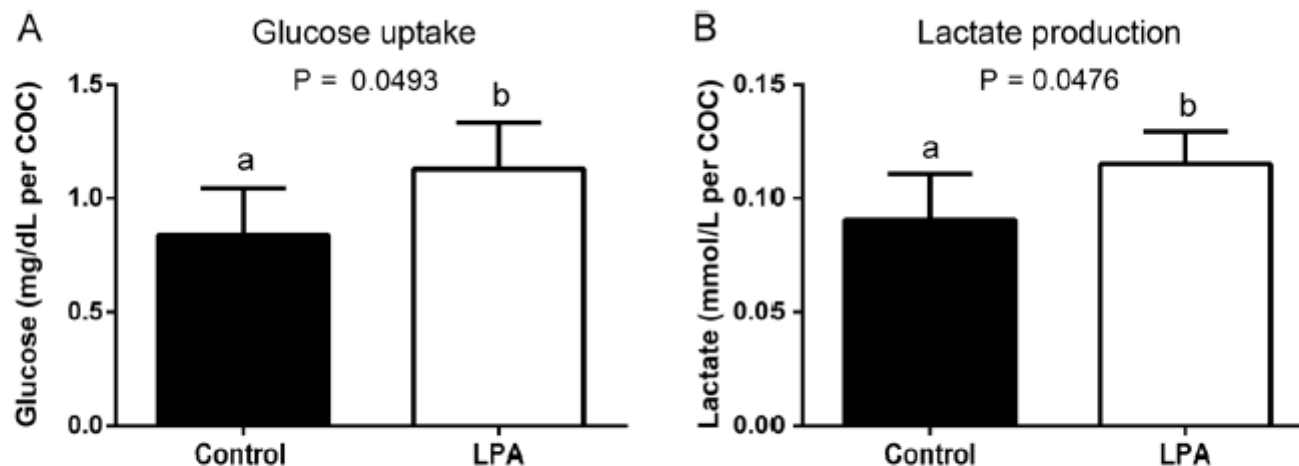
- Células TUNEL positivas – apoptóticas – verde
- Células TUNEL negativas – vivas – azul



## □ Resultados e Discussão

### Glicose e Lactato

- LPA estimulou a captação de glicose e a produção de lactato

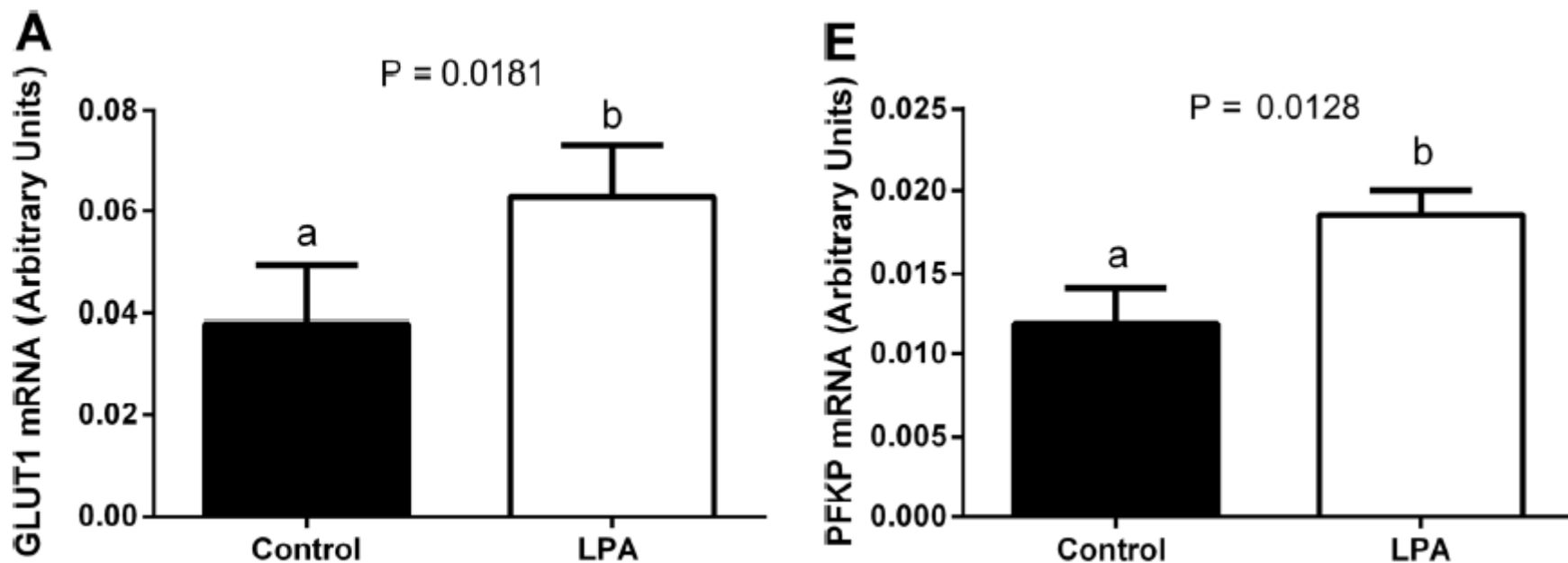


**Fig. 7** The effect of LPA ( $10^{-5}$ M) supplementation of oocyte maturation medium on (a) glucose uptake and (b) lactate production by COCs. Glucose uptake and lactate production are expressed as mean  $\pm$  SEM and presented as mg/dL per COC and mmol/L per COC, respectively. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), as determined by Student's t-test

## □ Resultados e Discussão

### Glicose e Lactato

- LPA estimulou GLUT1 (transporte passivo de glicose)
- LPA estimulou PFKP (enzima de regulação da glicólise) – mais ativa no cumulus do que no oócito

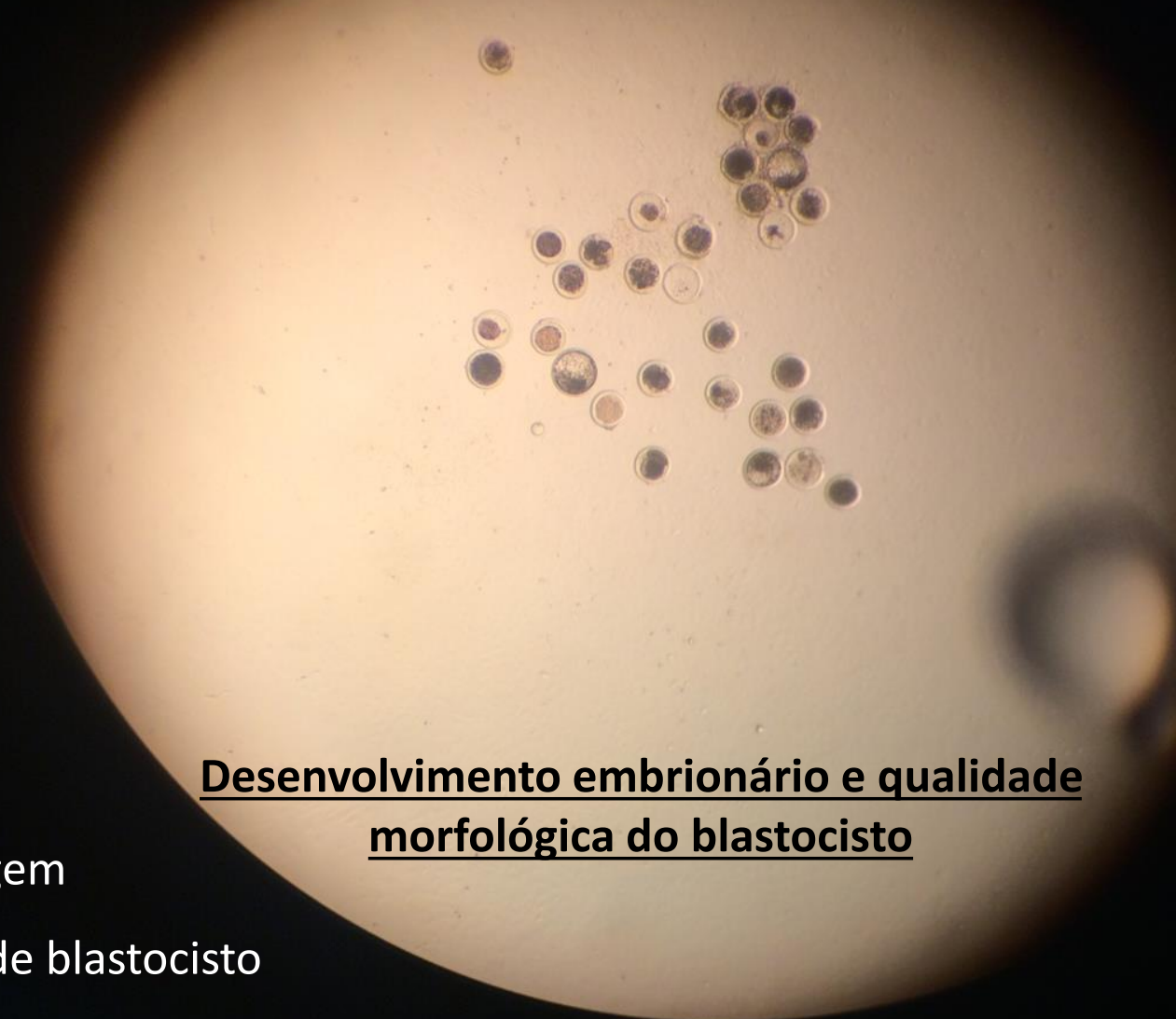


## □ Resultados e Discussão

### Glicose e Lactato

- Glicose X maturação, expansão, competência, blastocisto
- Cumulus – junções GAP – oócito
- Cumulus – lactato – junções GAP – oócito
- Lactato – Substrato de eleição do oócito

## □ Resultados e Discussão

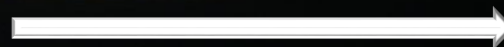


### Desenvolvimento embrionário e qualidade morfológica do blastocisto

▪ Clivagem

▪ Taxa de blastocisto

▪ Qualidade dos blastocistos em D7



Não foi diferente



## ❑ Conclusão

### Em resumo...

- O ácido lisofosfatídico:
  - ✓ Melhorou a qualidade da expansão do cumulus;
  - ✓ Melhorou a utilização de glicose via GLUT1 pelo cumulus e suprimento de lactato via PFKP para o oócito
  - ✓ Com isso, reduziu a apoptose
  - ✓ Estimulou rotas de pluripotência e aquisição de competência
  - ✓ Estimulou a produção de fatores de crescimento
  - ✓ Aumentou a maturação
  - ✓ Aumentou a capacidade de sinalização embrio-materna
  - ✓ Modulador metabólico e de vias de expressão gênica na PIVE

**Muito Obrigado!**

