



Universidade Federal de Pelotas

Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária



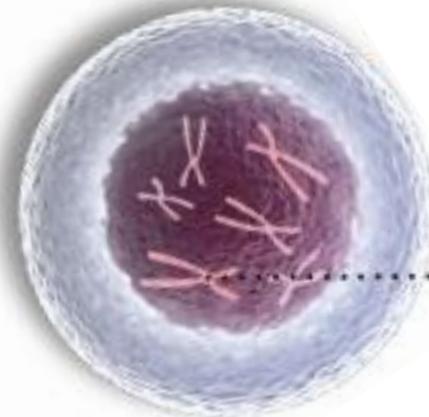
Efeito do ácido lisofosfatídico durante a maturação *in vitro* do complexo cumulus-oócito: expansão do cumulus, metabolismo da glicose e expressão de genes envolvidos na cascata ovulatória, competência do oócito e blastocisto

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

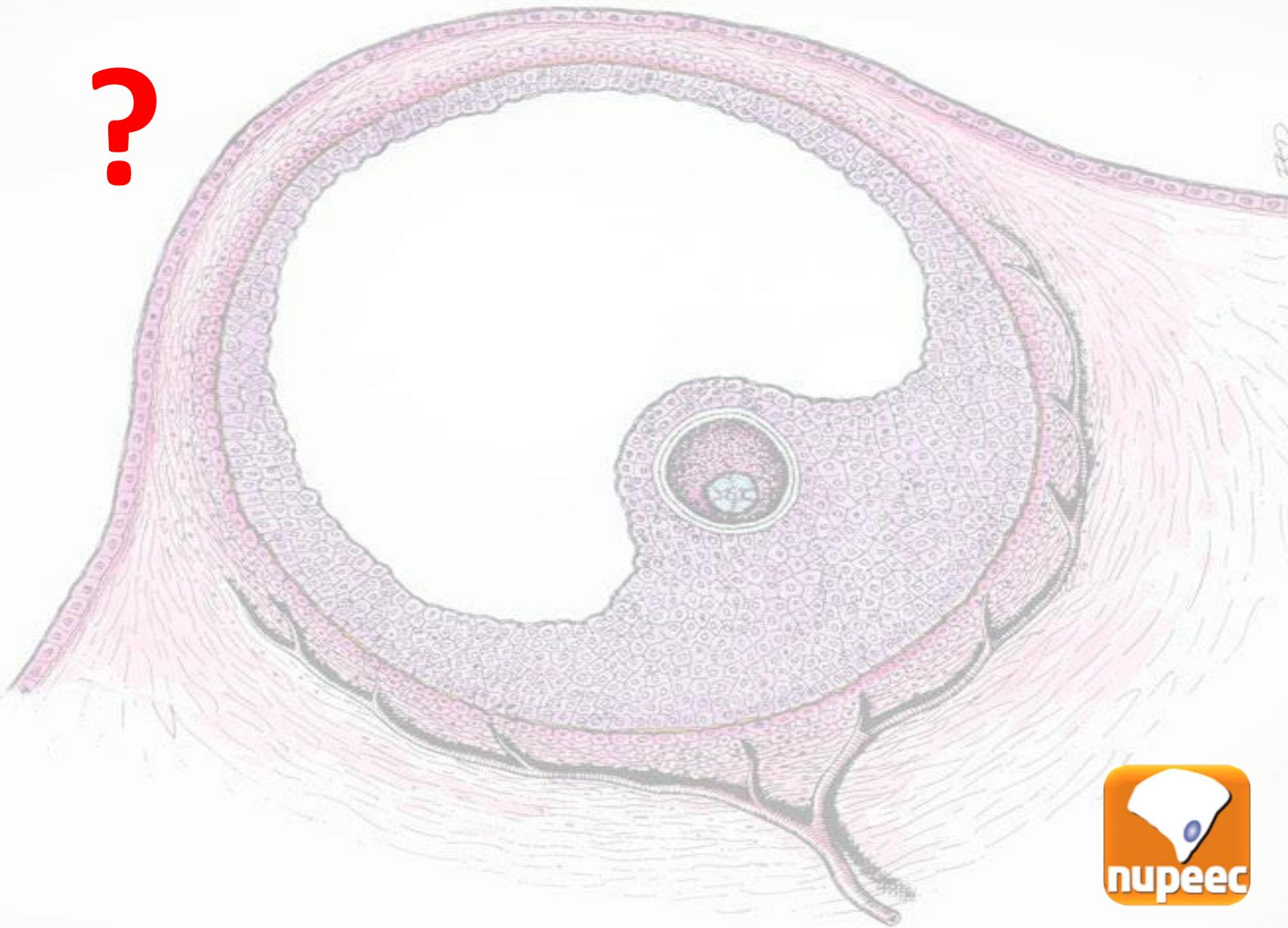
Open Access

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

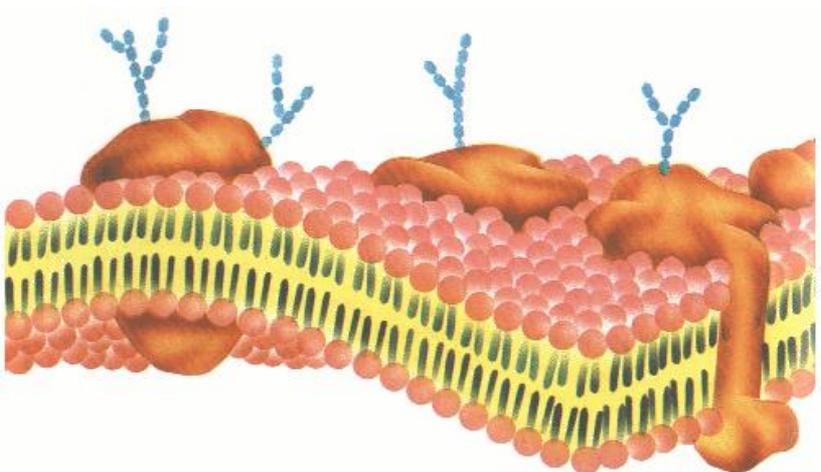
- Adição de cAMP ao meio de MIV
- Adição de PON ao meio de MIV - NUPEEC
- Adição de Butafosfan ao meio de MIV – NUPEEC
- ...
- Ácido lisofosfatídico



□ Introdução

Ácido Lisofosfatídico

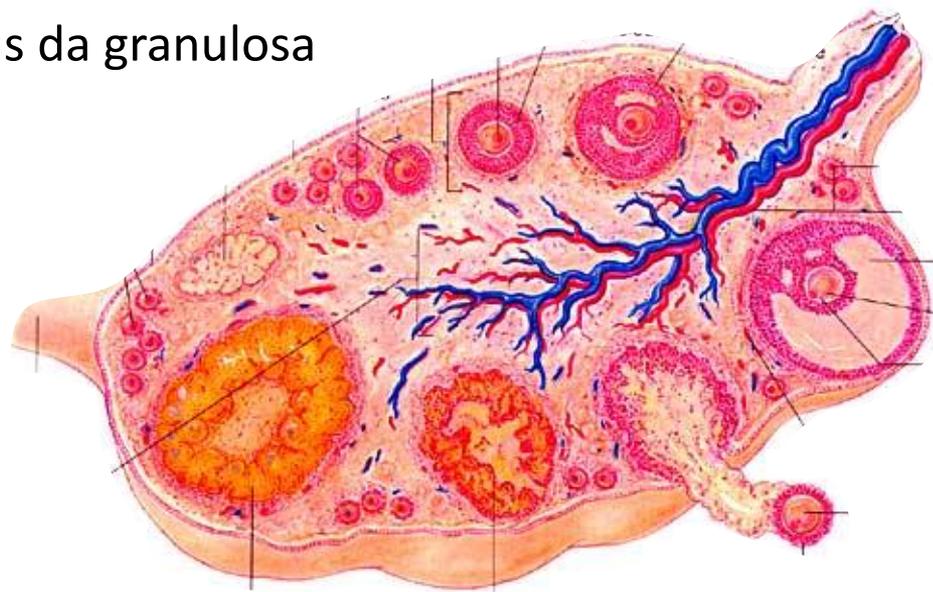
- Fosfolipídio transmembrana
- Importante sinalizador molecular
- Regulação da função reprodutiva em mulheres, roedores e ruminantes



☐ 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 CO₂, 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

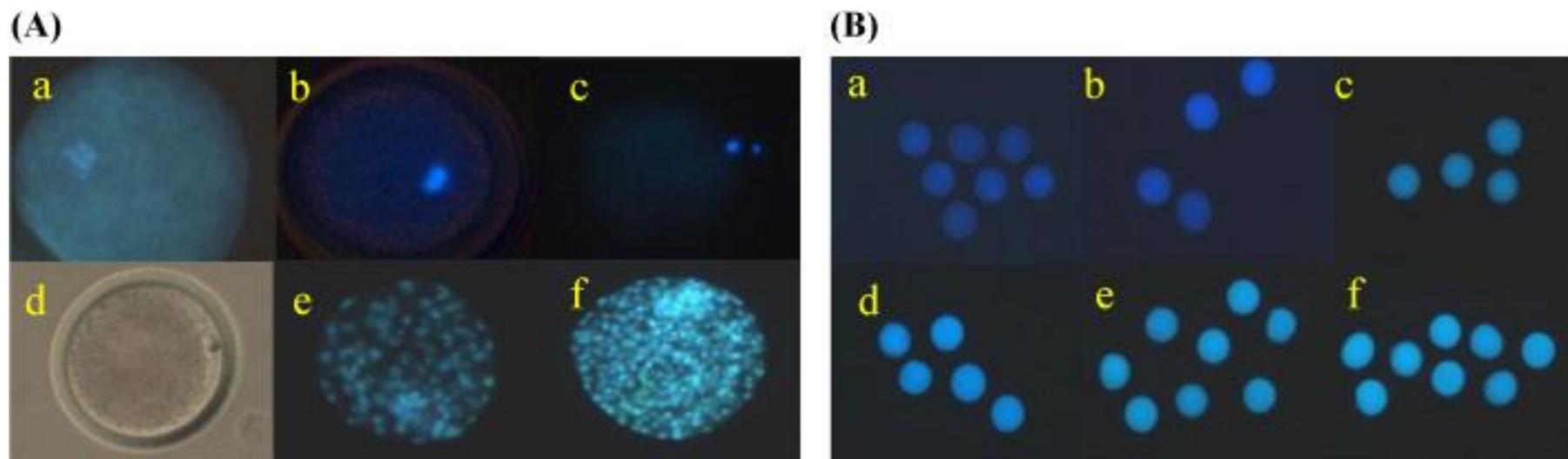


Figura 2. Coloração com Hoechst para avaliação da maturação e do número de células dos embriões (A). Oócito em vesícula germinativa (a), estágio intermediário (b), metáfase II (c), liberação do 1º corpúsculo polar (d), embrião com ± 110 células (e) e embrião com ± 360 células (f). Intensidade de fluorescência do nível GSH intracelular em oócitos avaliados com Cell Tracker Blue (B). Oócitos VG/H₂O₂ (a) VG (b) MIV/H₂O₂ (c) MIV (d) quercetina (e) e cisteamina (f).



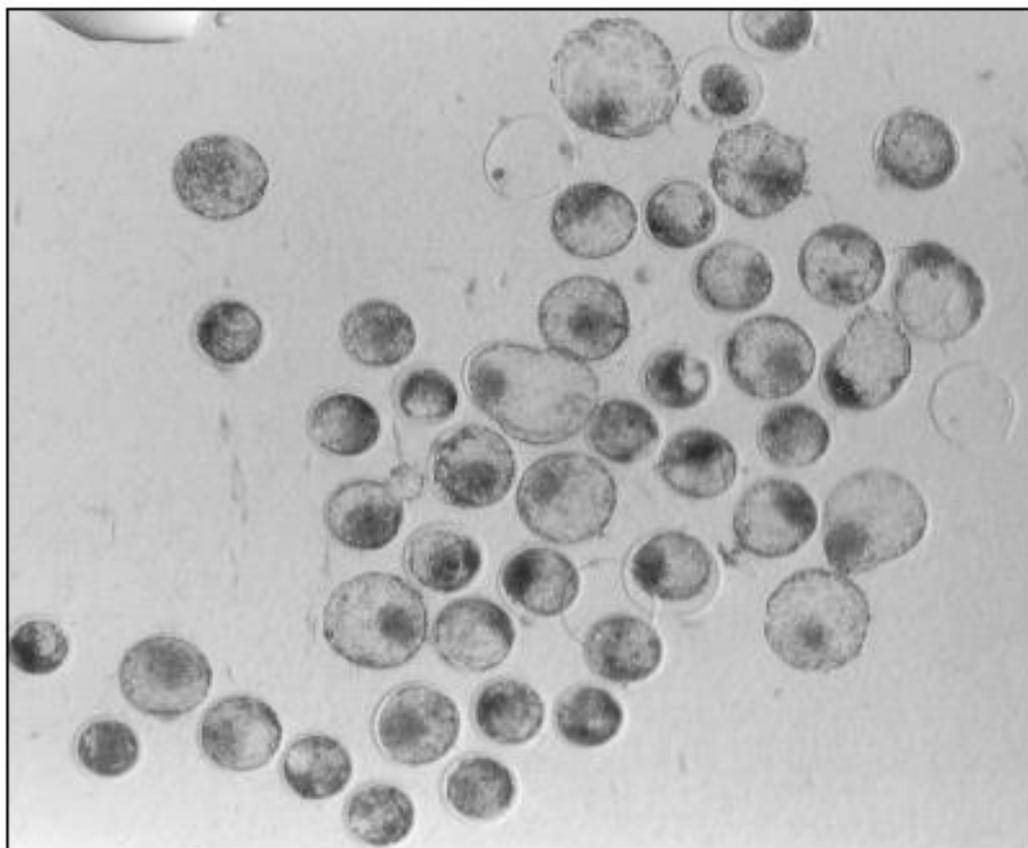
☐ Metodologia

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°C
- Transcriptase reversa – cDNA
- Diluído
- Estocado no -20°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

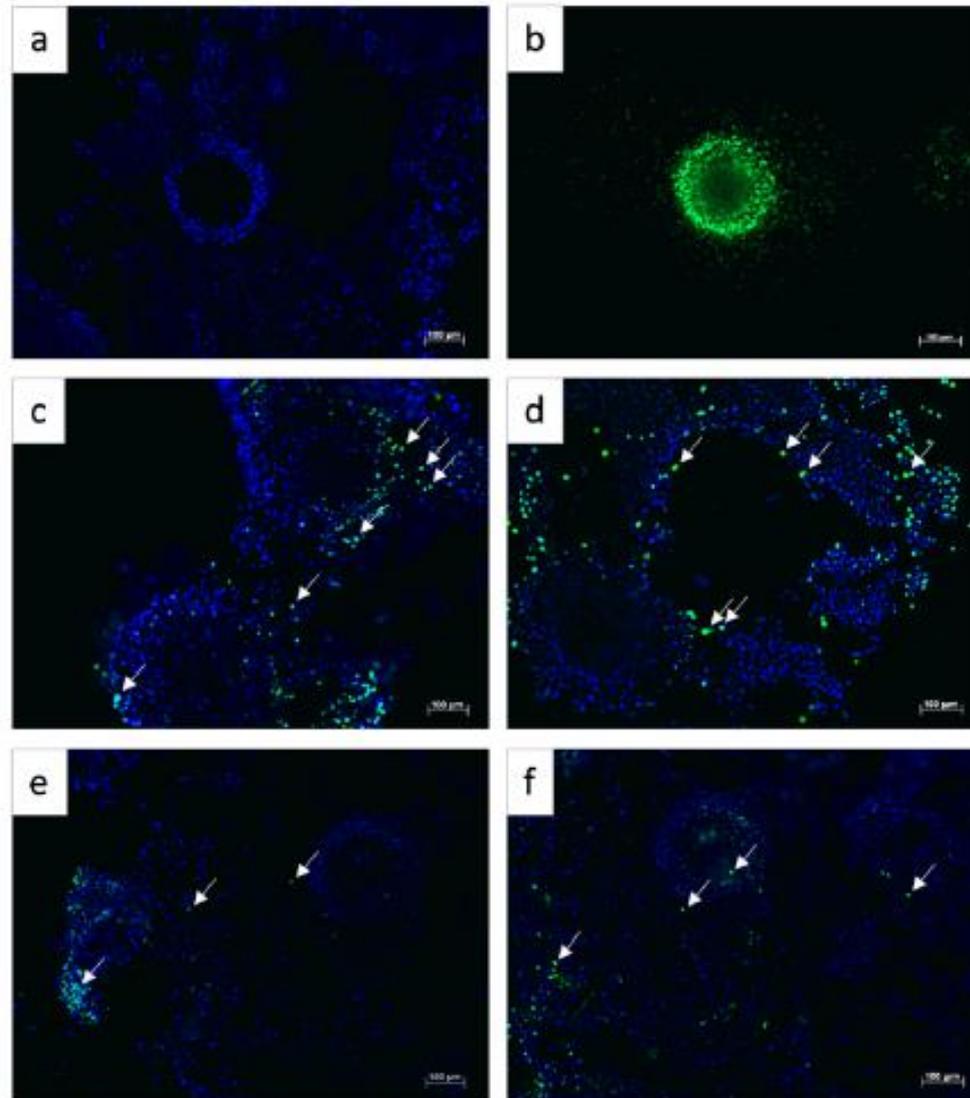
➤ Detecção de apoptose

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

☐ Metodologia

Análises moleculares

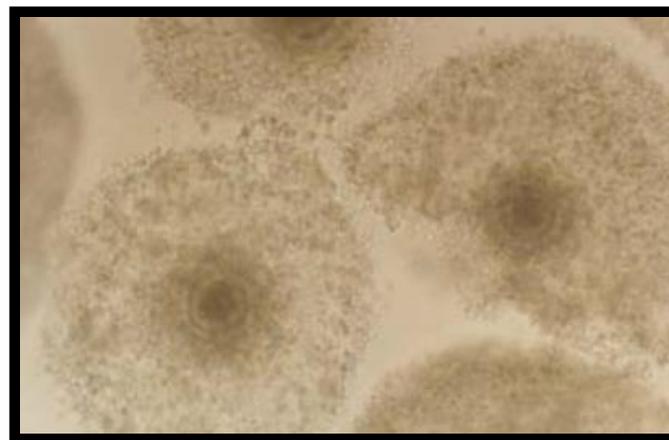
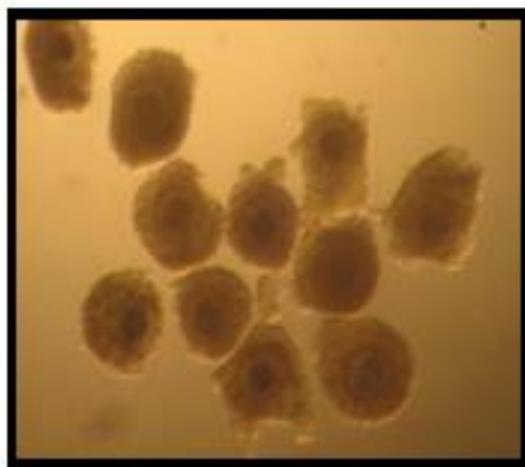
➤ Detecção de apoptose



☐ 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

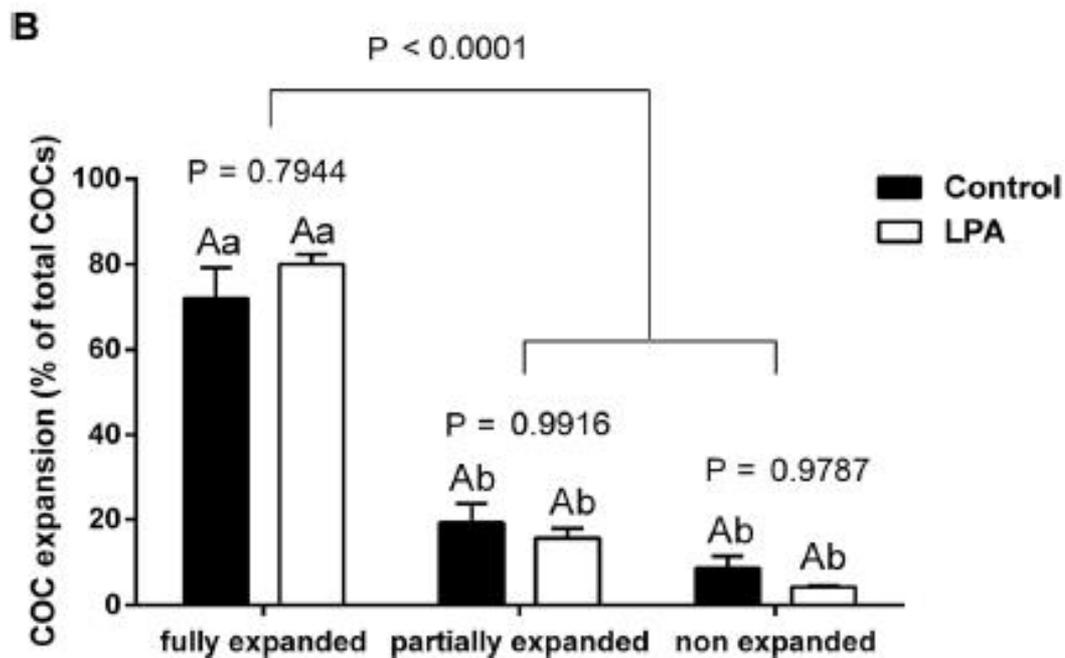
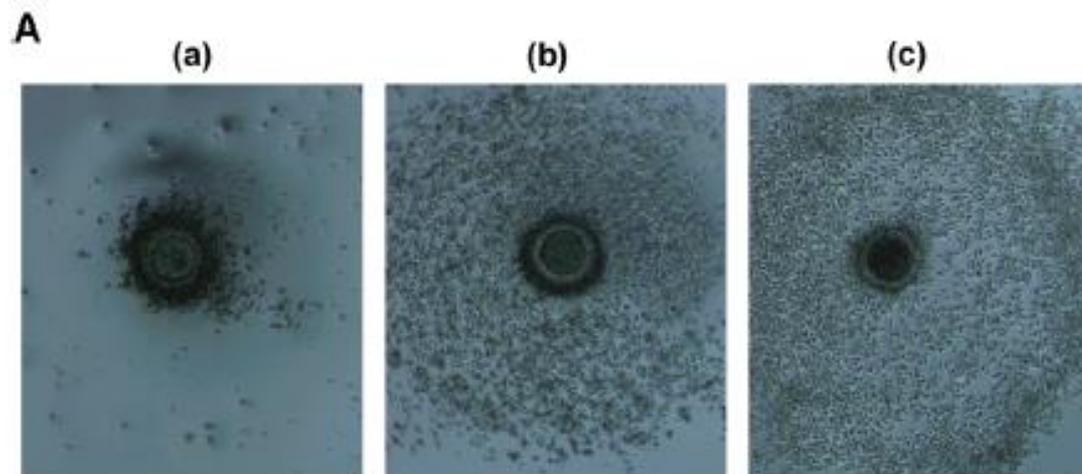
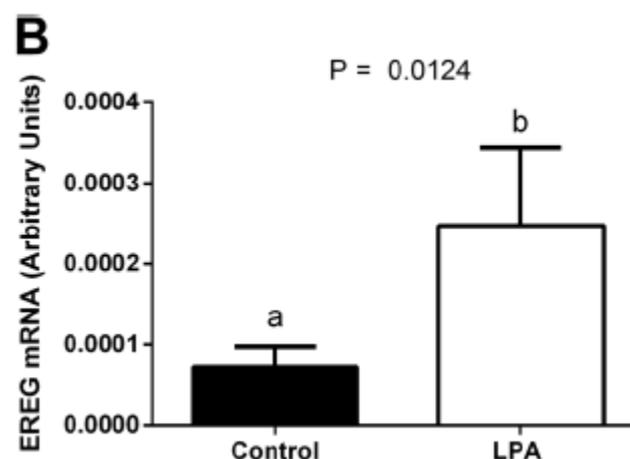
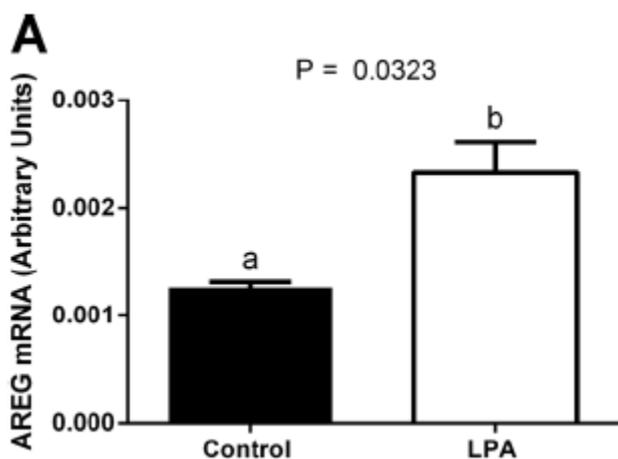


Fig. 5 The effect of LPA (10^{-5} M) supplementation of oocyte maturation medium on cumulus expansion. Panel **a** depicts representative images of bovine COCs exhibiting three degrees of cumulus expansion: **a** grade 1 (non-expanded), **b** grade 2 (partially expanded) and **c** grade 3 (fully expanded). 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

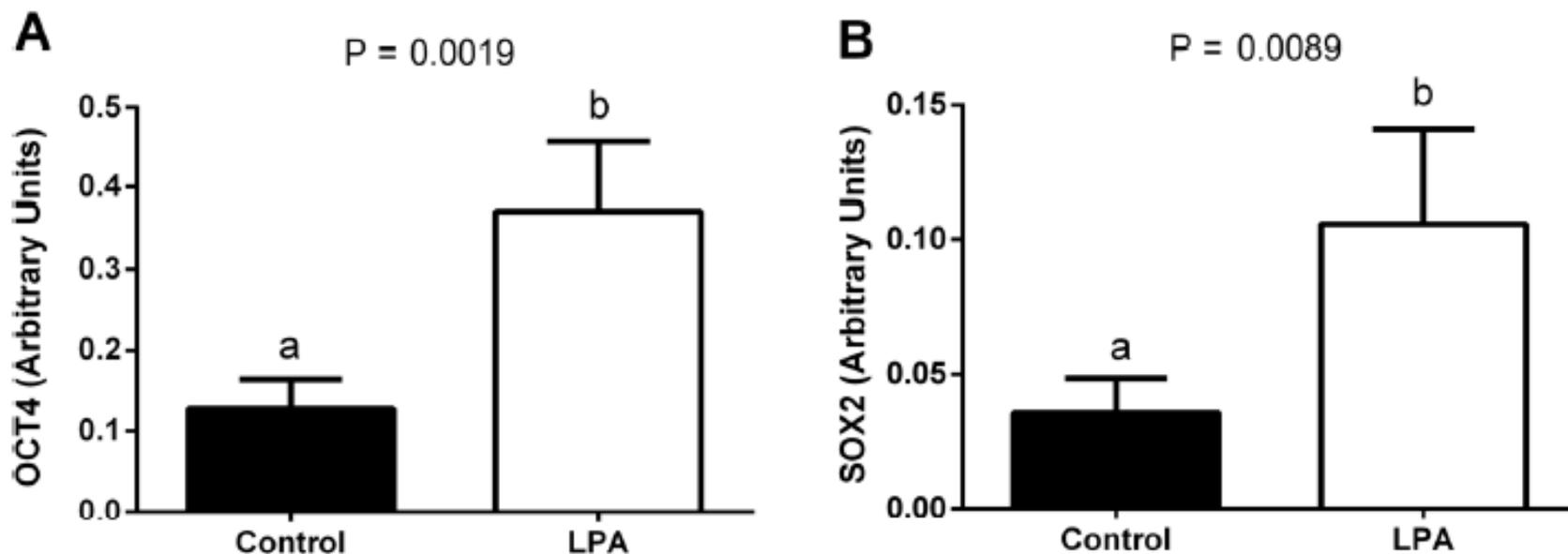
Supplement	Number of oocytes	Immature oocytes, n	Mature (MII) oocytes, n	Maturation rate, %	P value of maturation rate
Control (PBS)	114	40	74 ^a	64,9 ^a	0,0242
LPA (10 ⁻⁵ M)	106	22	84 ^b	79,2 ^b	

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



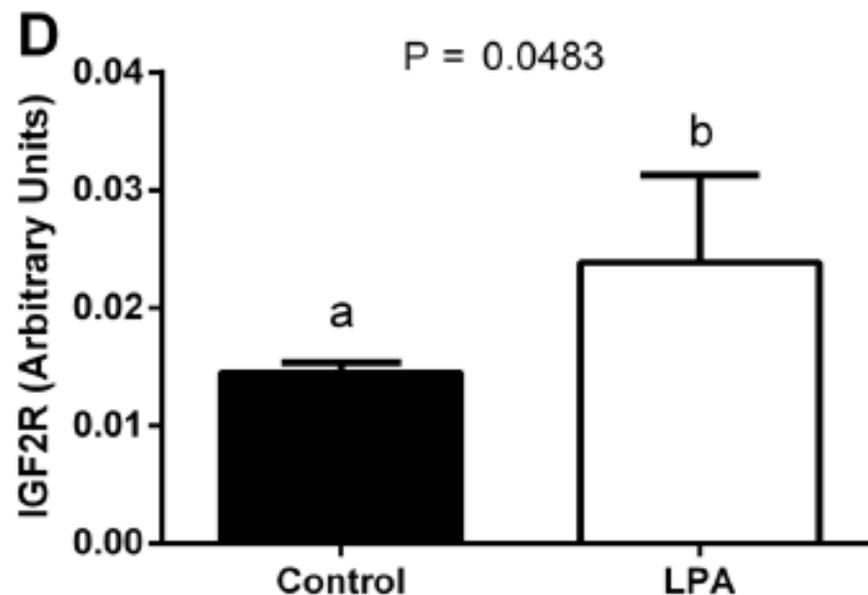
□ Resultados e Discussão

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

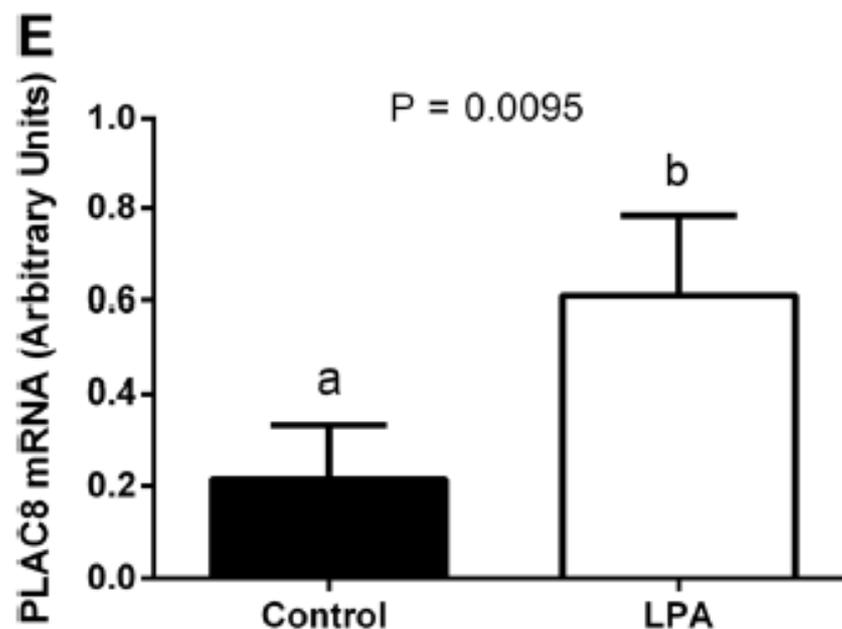
Expressão de genes relacionados à aquisição de competência



- 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 –

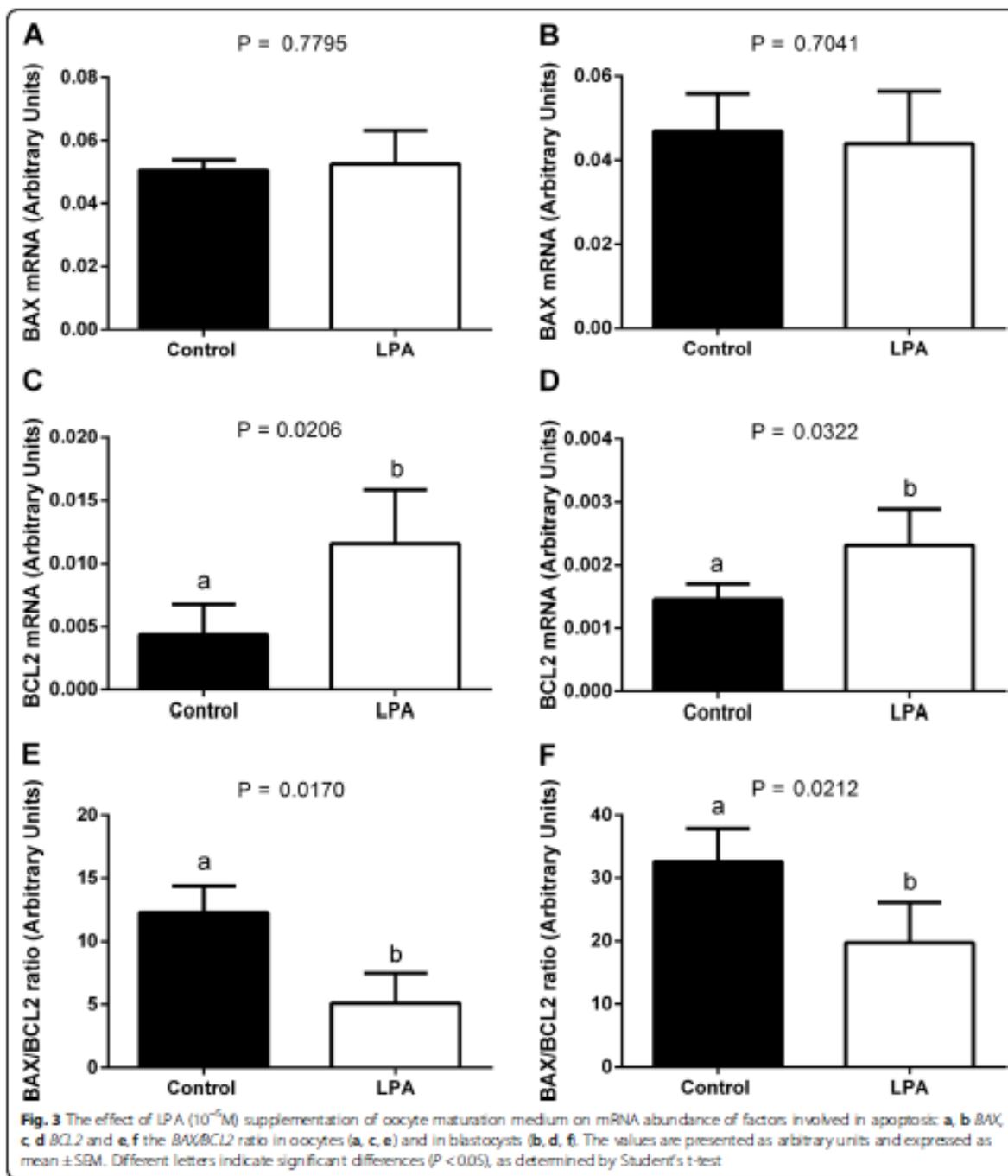
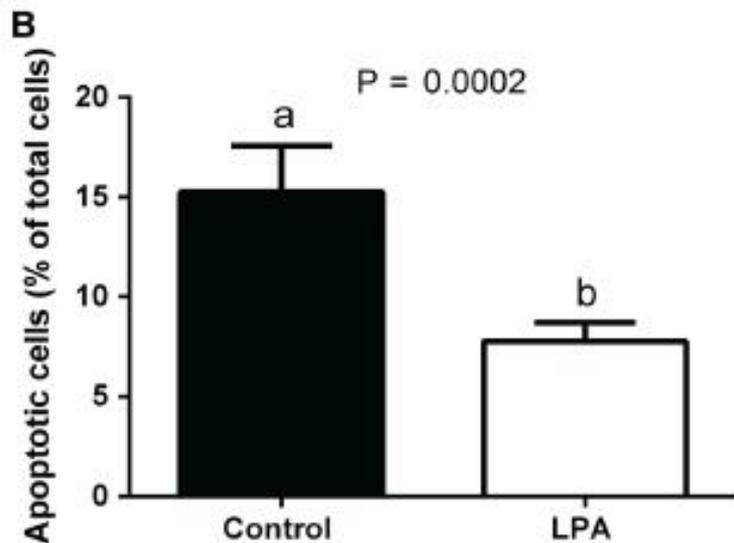
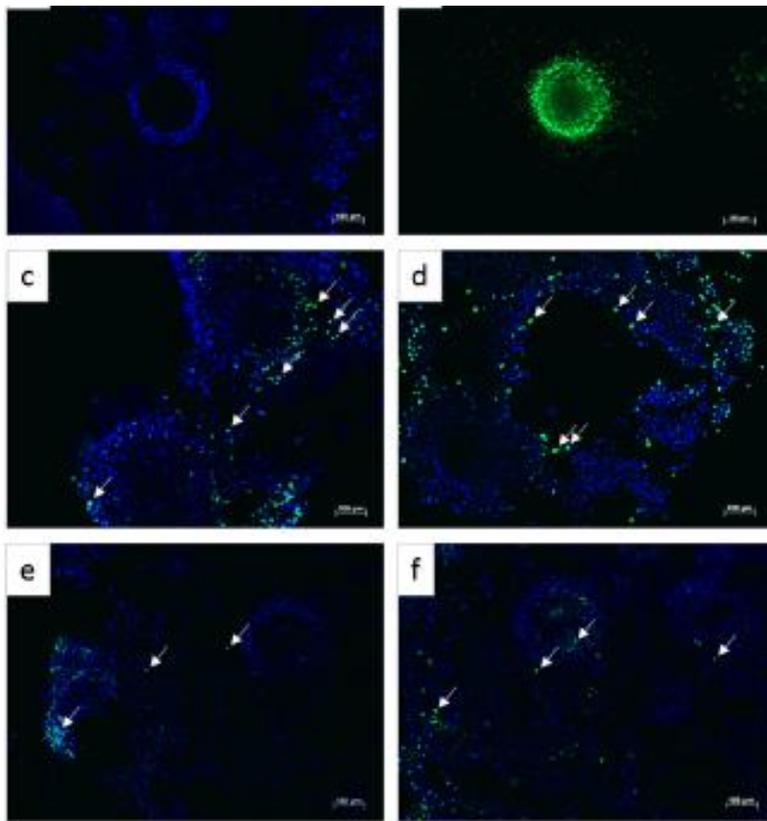


Fig. 3 The effect of LPA (10^{-6} M) supplementation of oocyte maturation medium on mRNA abundance of factors involved in apoptosis: **a, b** BAX, **c, d** BCL2 and **e, f** the BAX/BCL2 ratio in oocytes (**a, c, e**) and in blastocysts (**b, d, f**). The values are presented as mean \pm SEM. Different 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

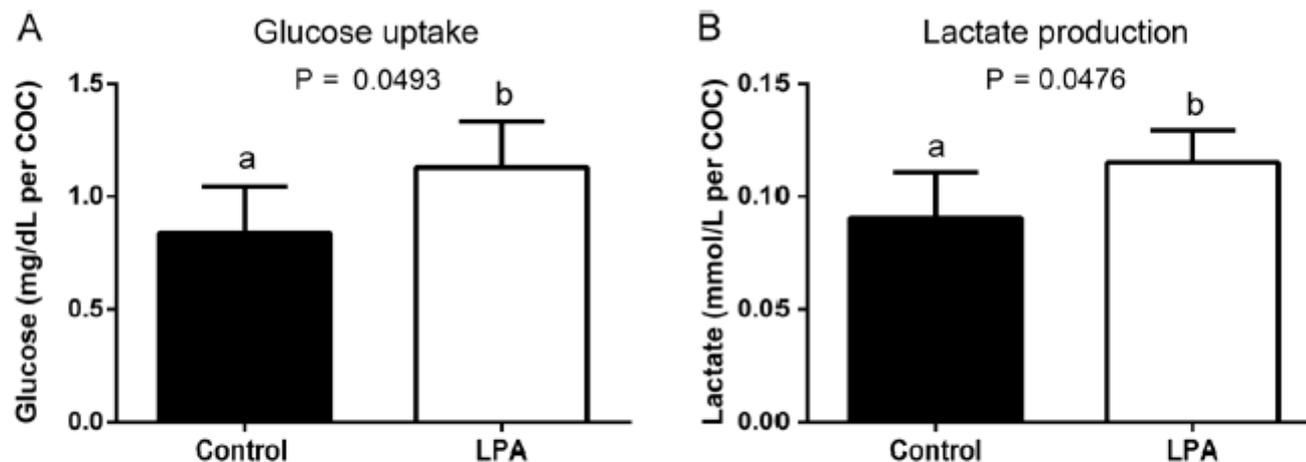
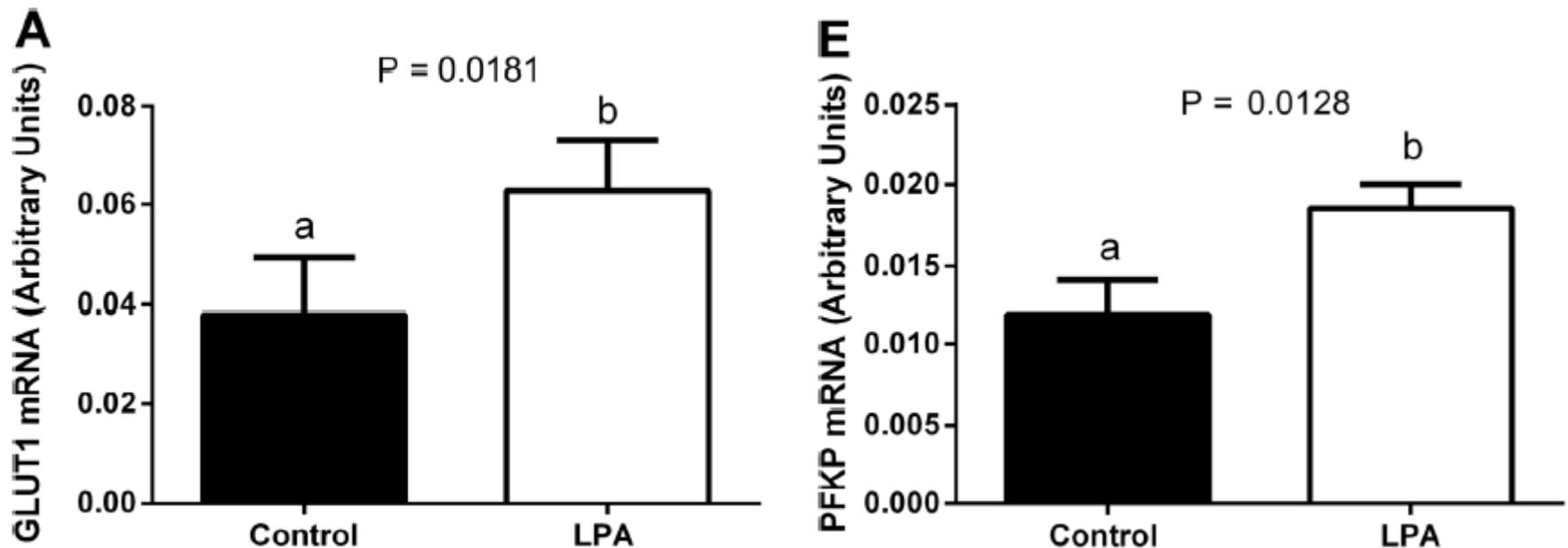


Fig. 7 The effect of LPA (10^{-5} M) supplementation of oocyte maturation medium on (a) glucose uptake and (b) lactate production by COCs. Glucose uptake and lactate production are expressed as mean \pm SEM and presented as mg/dL per COC and mmol/L per COC, respectively. Different letters indicate significant 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

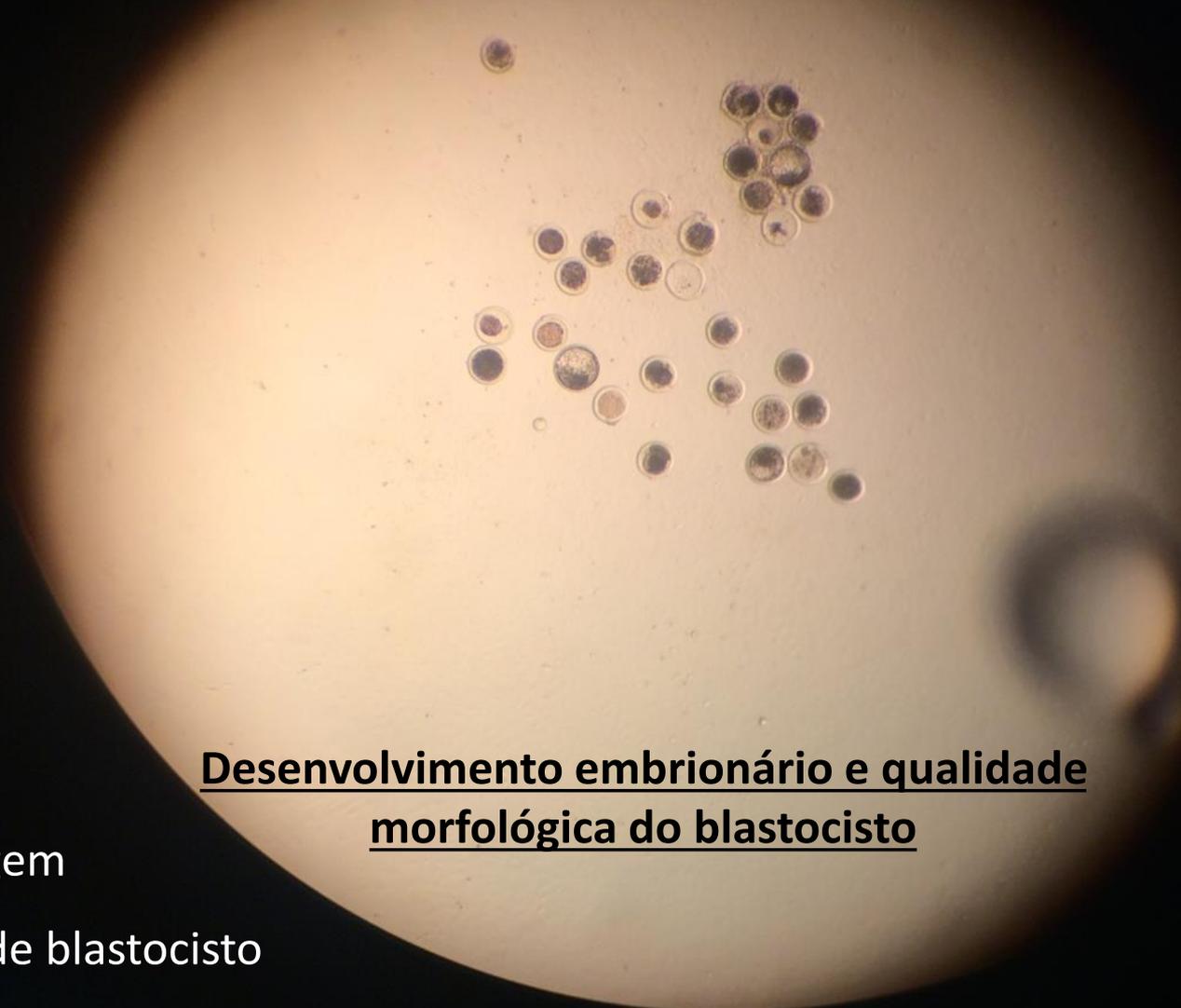


□ Resultados e Discussão

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!

