



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária



SEMINÁRIO

Alice Benites
Marjana Martins
Joao Rincón



RESEARCH

Controlled ovarian hyperstimulation induced changes in the expression of circulatory miRNA in bovine follicular fluid and blood plasma

Sina Seifi Noferesti^{1†}, Md. Mahmudul Hasan Sohel^{1,2†}, Michael Hoelker¹, Dessie Salilew-Wondim¹, Ernst Tholen¹, Christian Looft¹, Franca Rings¹, Christiane Neuhoff¹, Karl Schellander¹ and Dawit Tesfaye^{1*}

Abstract

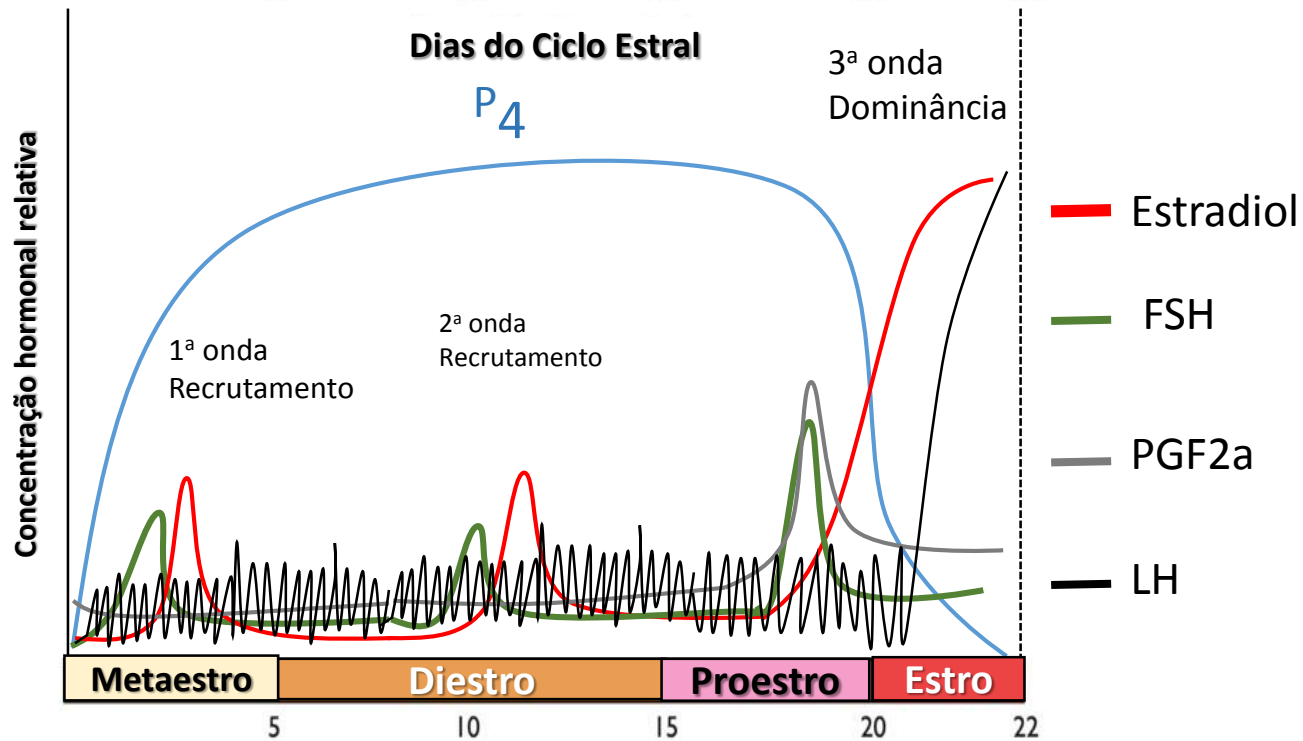
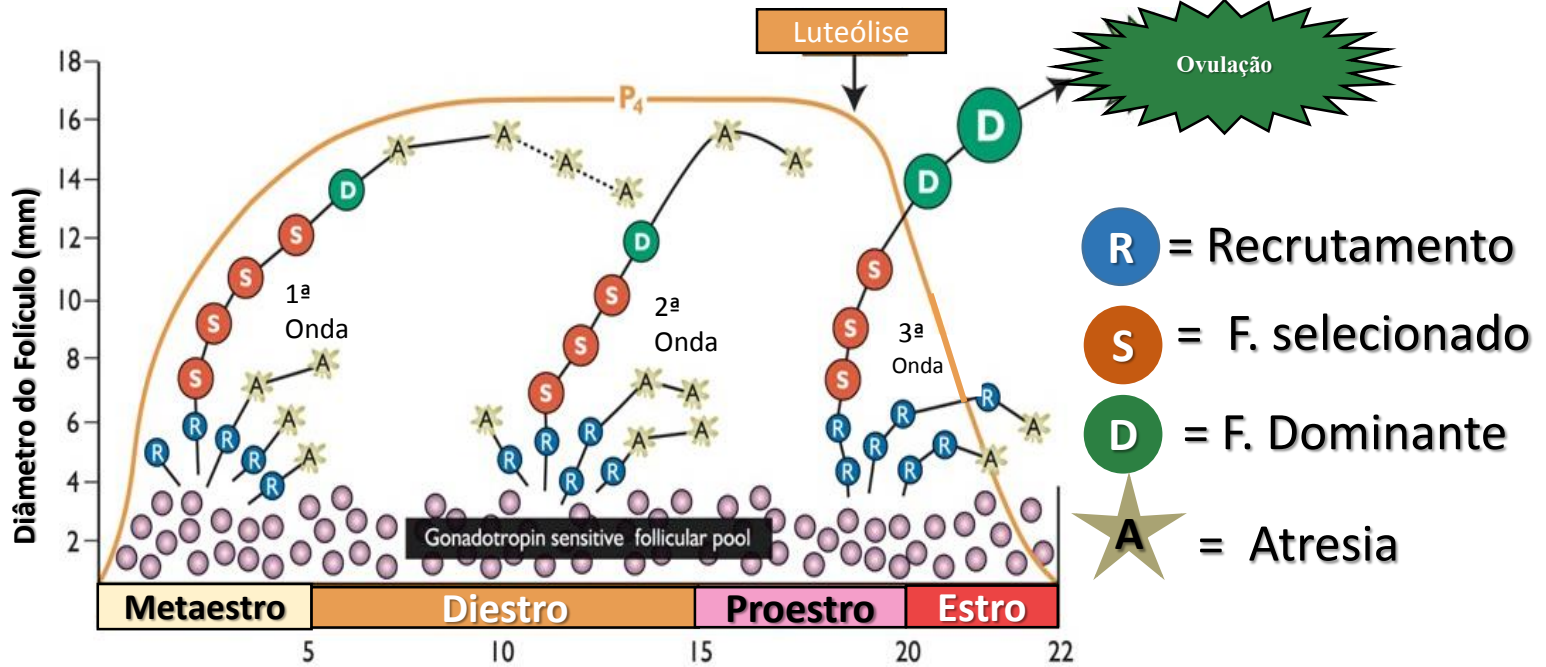
Background: Despite its role in increasing the number of offspring during the lifetime of an individual animal, controlled ovarian hyperstimulation (COH) may have detrimental effects on oocyte development, embryo quality and endometrial receptivity. Circulating miRNAs in bio-fluids have been shown to be associated with various pathological conditions including cancers. Here we aimed to investigate the effect of COH on the level of extracellular miRNAs in bovine follicular fluid and blood plasma and elucidate their mode of circulation and potential molecular mechanisms to be affected in the reproductive tract.

Conteúdo

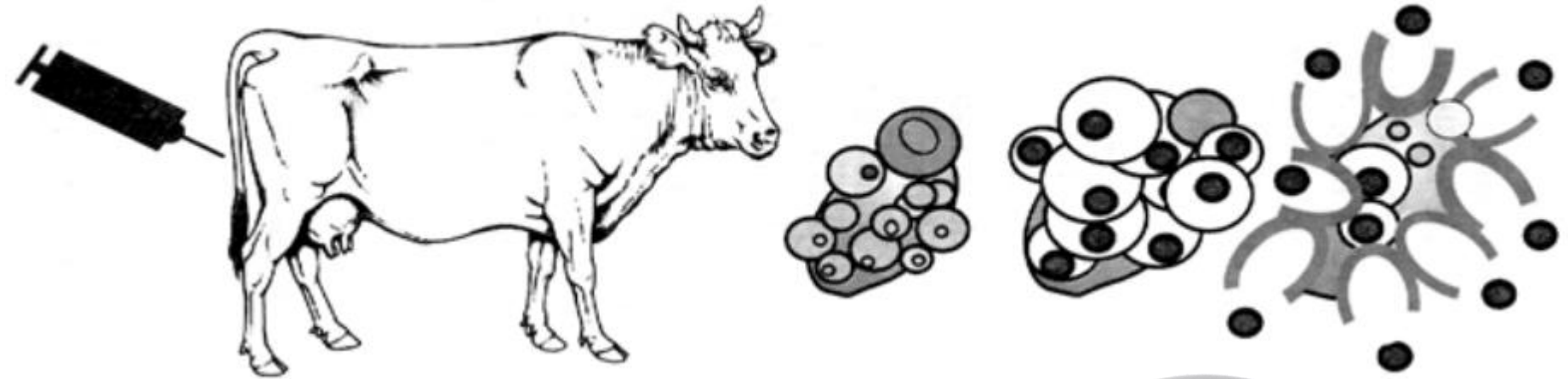


- ✓ Dinâmica folicular
- ✓ Hiperestimulação ovariana
- ✓ Micro RNAs
- ✓ Metodologia e Resultados
- ✓ Conclusão
- ✓ Considerações finais

Dinâmica folicular



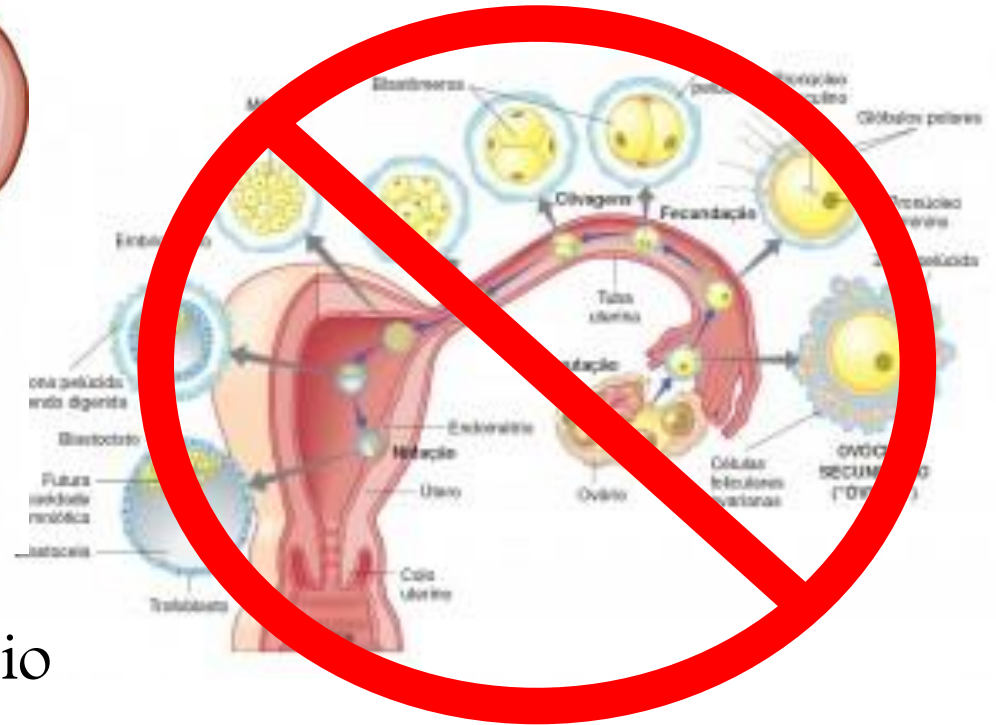
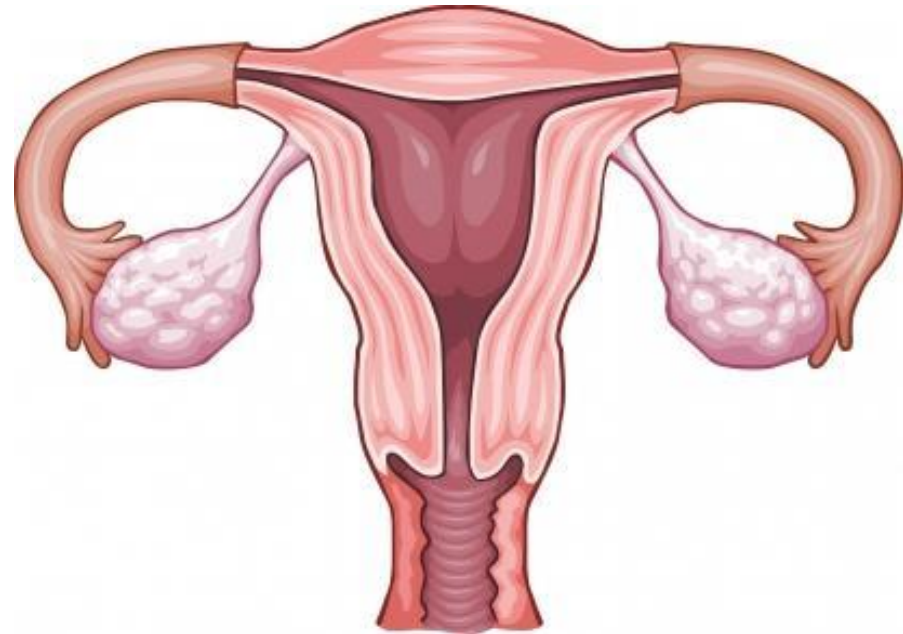
Hiperestimulação Ovariana



↑ Folículos primordiais
↑ Ovulação

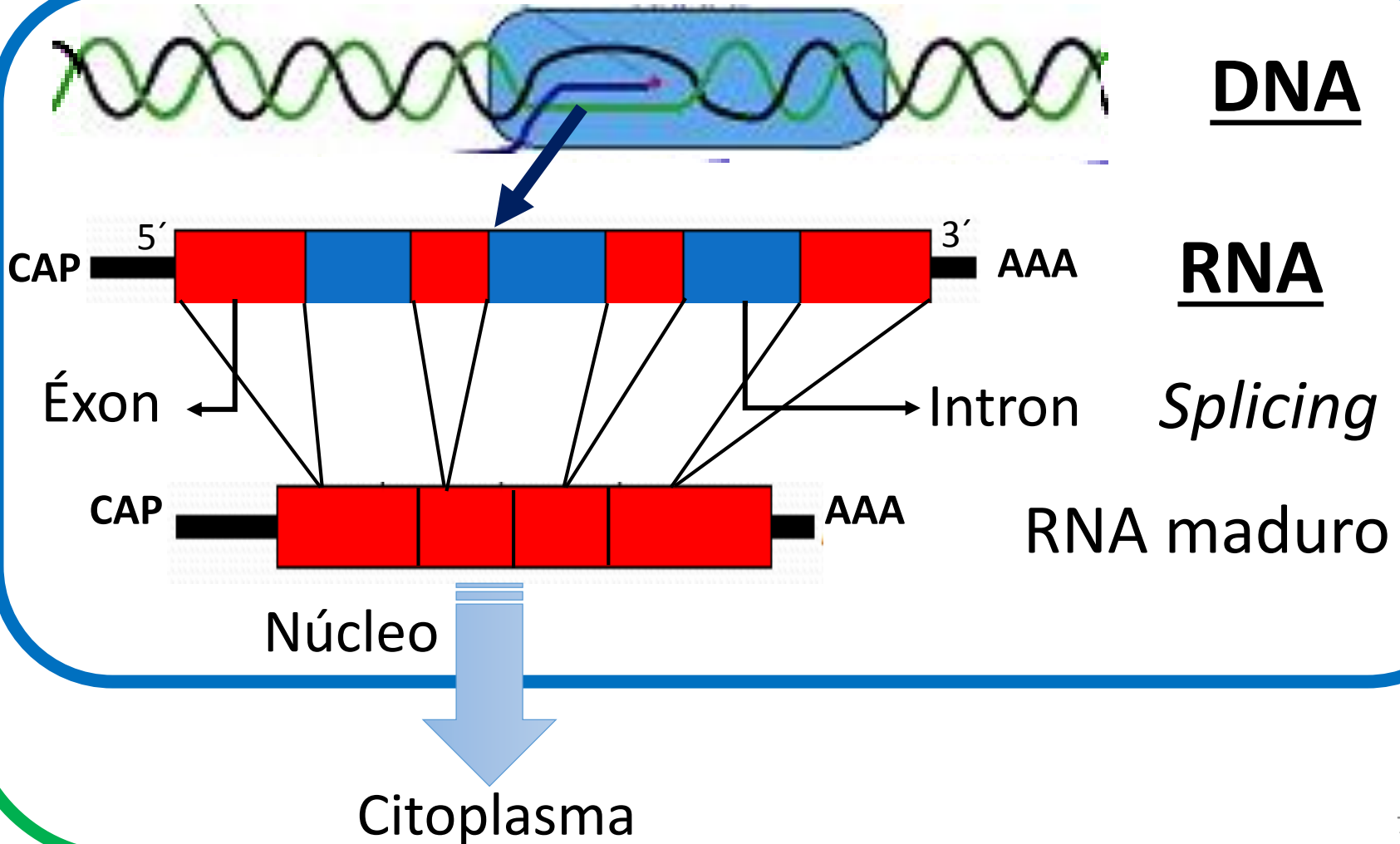


INTRODUÇÃO



- Desenvolvimento oocitário
- Qualidade embrionária
- Receptividade endometrial
- Taxa de concepção

Micro RNAs

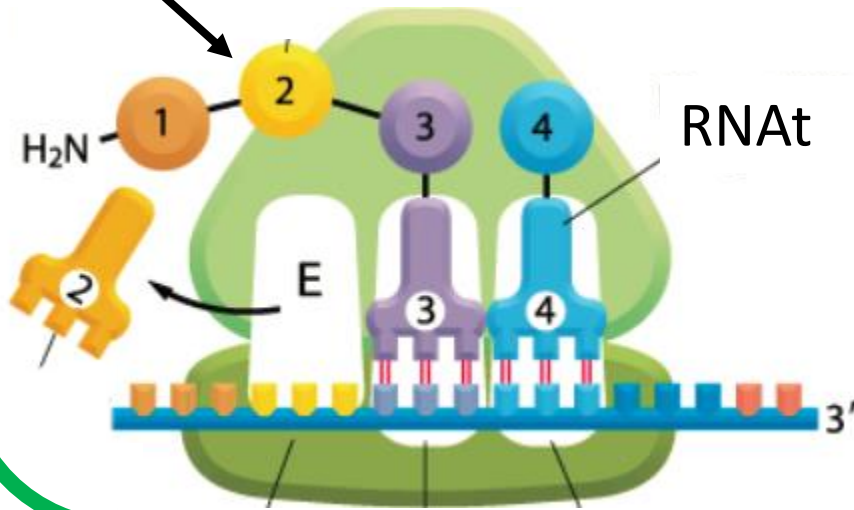


Micro RNAs



Proteína

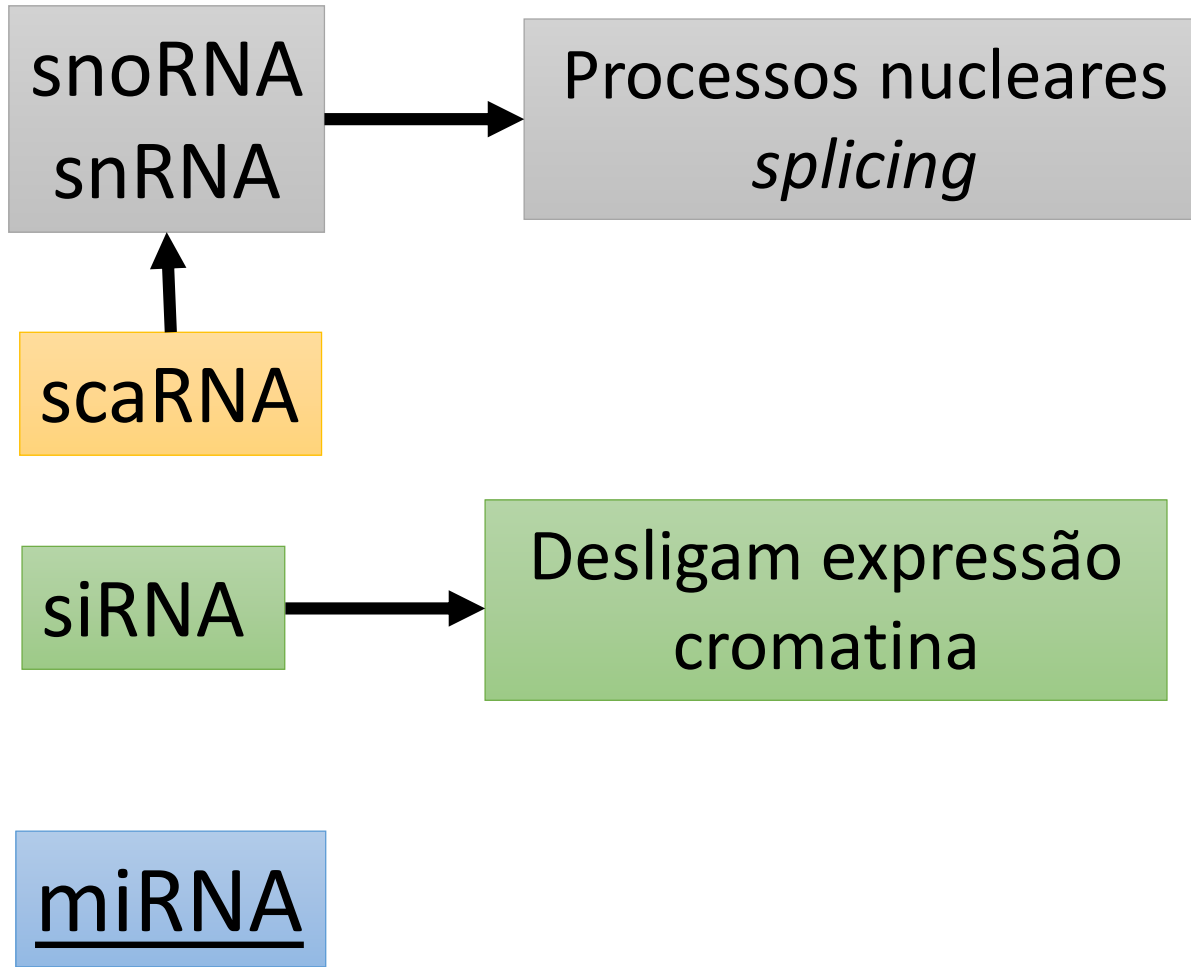
Citoplasma



- ✓ RNAr
- ✓ RNAt
- ✓ RNAm

Tradução

Micro RNAs



- ✓ RNAr
- ✓ RNAt
- ✓ RNAm

Micro RNAs



- ✚ RNAs não-codificantes (~22nt)
- ✚ Genes regulatórios mais abundantes h (30 %)
- ✚ Encontrados em todos os tecidos (mamíferos)
- ✚ Regular a expressão de genes a nível pós-transcricional
 - ✚ Degradação ou repressão da tradução de RNAm
- ✚ Implicados na maioria das principais funções celulares:
 - ✚ Proliferação;
 - ✚ Diferenciação;
 - ✚ Apoptose.
- ✚ Associados com várias doenças

Micro RNAs

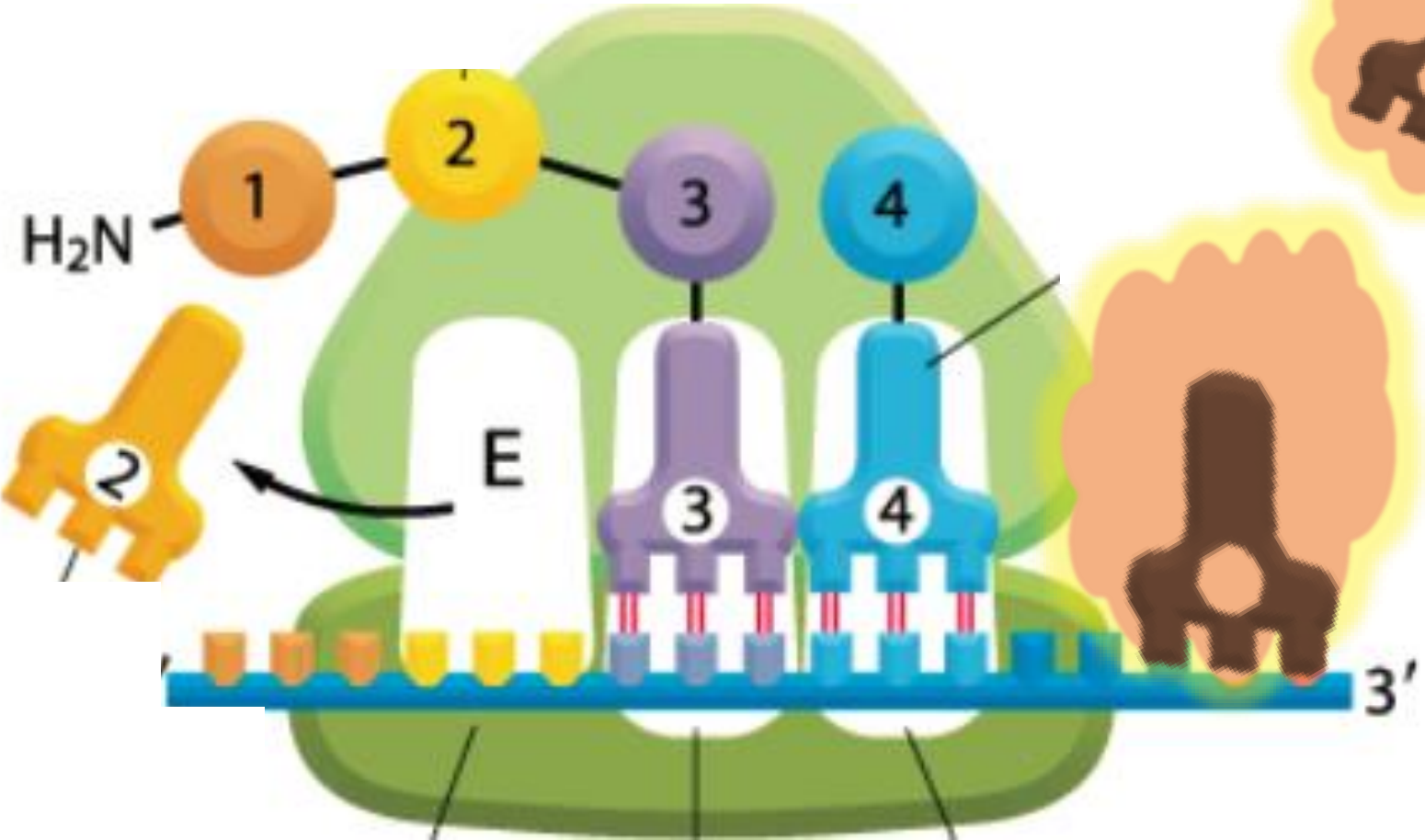


- ✚ RNAs não-codificantes (~22nt)
- ✚ Genes regulatórios mais abundantes h (30 %)
- ✚ Encontrados em todos os tecidos (mamíferos)

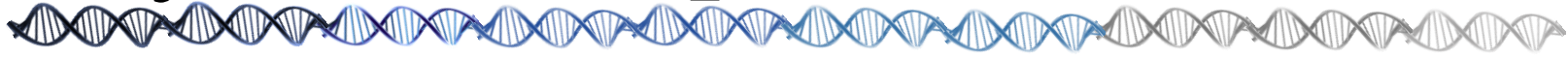
Mecanismo chave no processo de regulação gênica

- ✚ Implicados na maioria das principais funções celulares.
 - ✚ Proliferação;
 - ✚ Diferenciação;
 - ✚ Apoptose.
- ✚ Associados com várias doenças

miRNAs



Objetivo ~ Hipótese



Dinâmica folicular
Processo complexo
miRNAs



Hipótese



A hiperestimulação ovariana controlada muda a população de miRNAs extracelulares no fluido folicular e plasma sanguíneo de novilhas cíclicas, o que pode estar envolvido em vários processos fisiológicos.

Metodologia



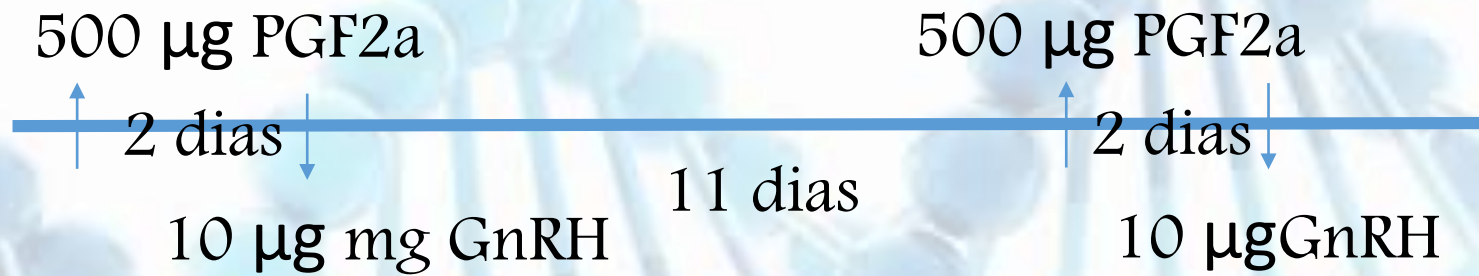
Comitê de ética, Alemanha
Novilhas: Simental (n=10)
Idade: 15 – 17 meses
Peso: 380 ~450 Kg
Mesmas condições



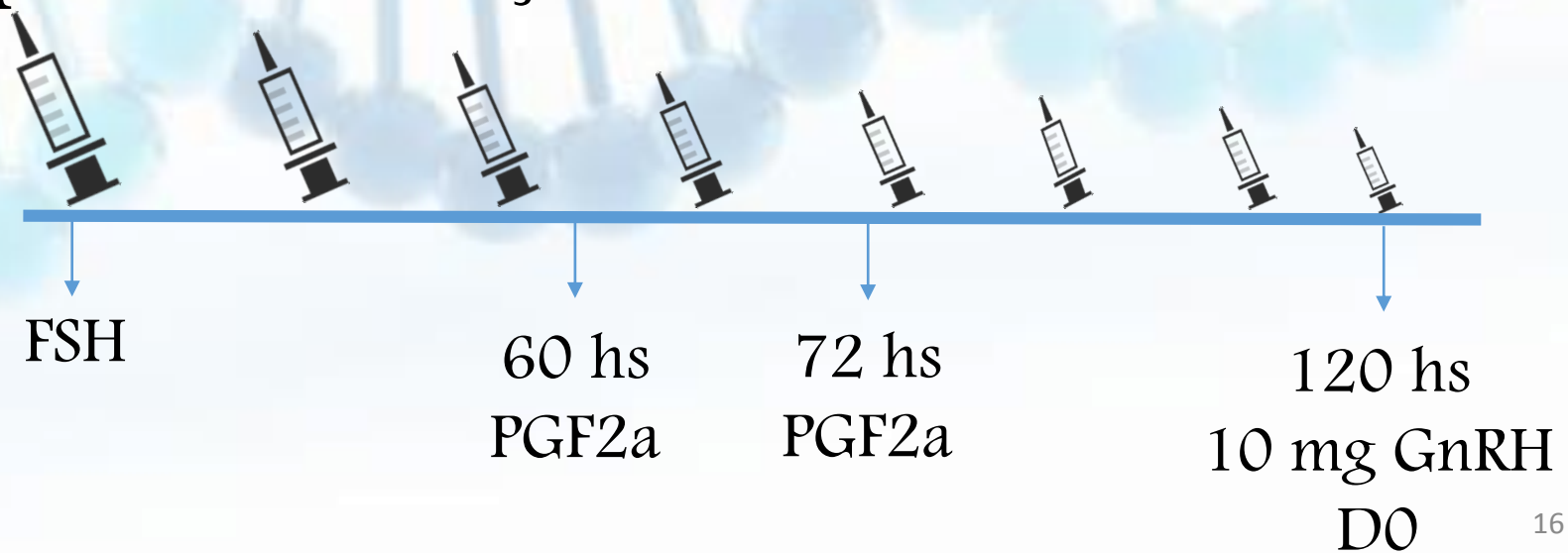
Hiperestimulação ovariana



Pré sincronização



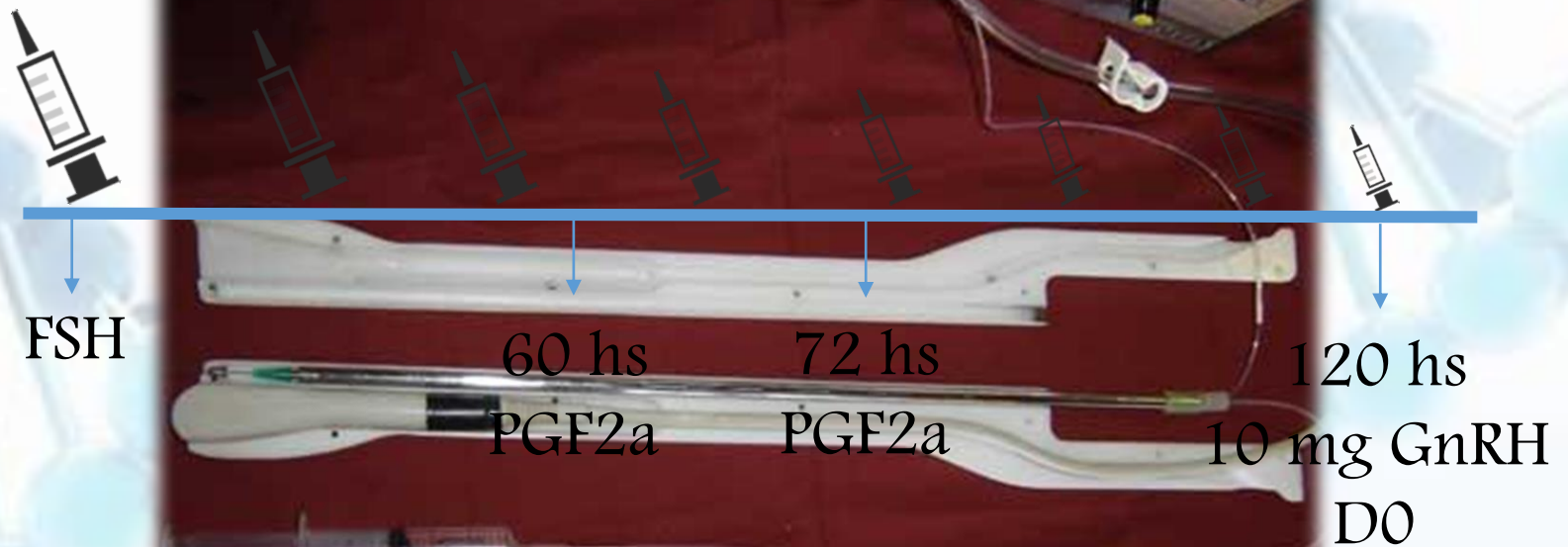
Hiperestimulação ~ n=6



Metodologia



Coletas de Sangue



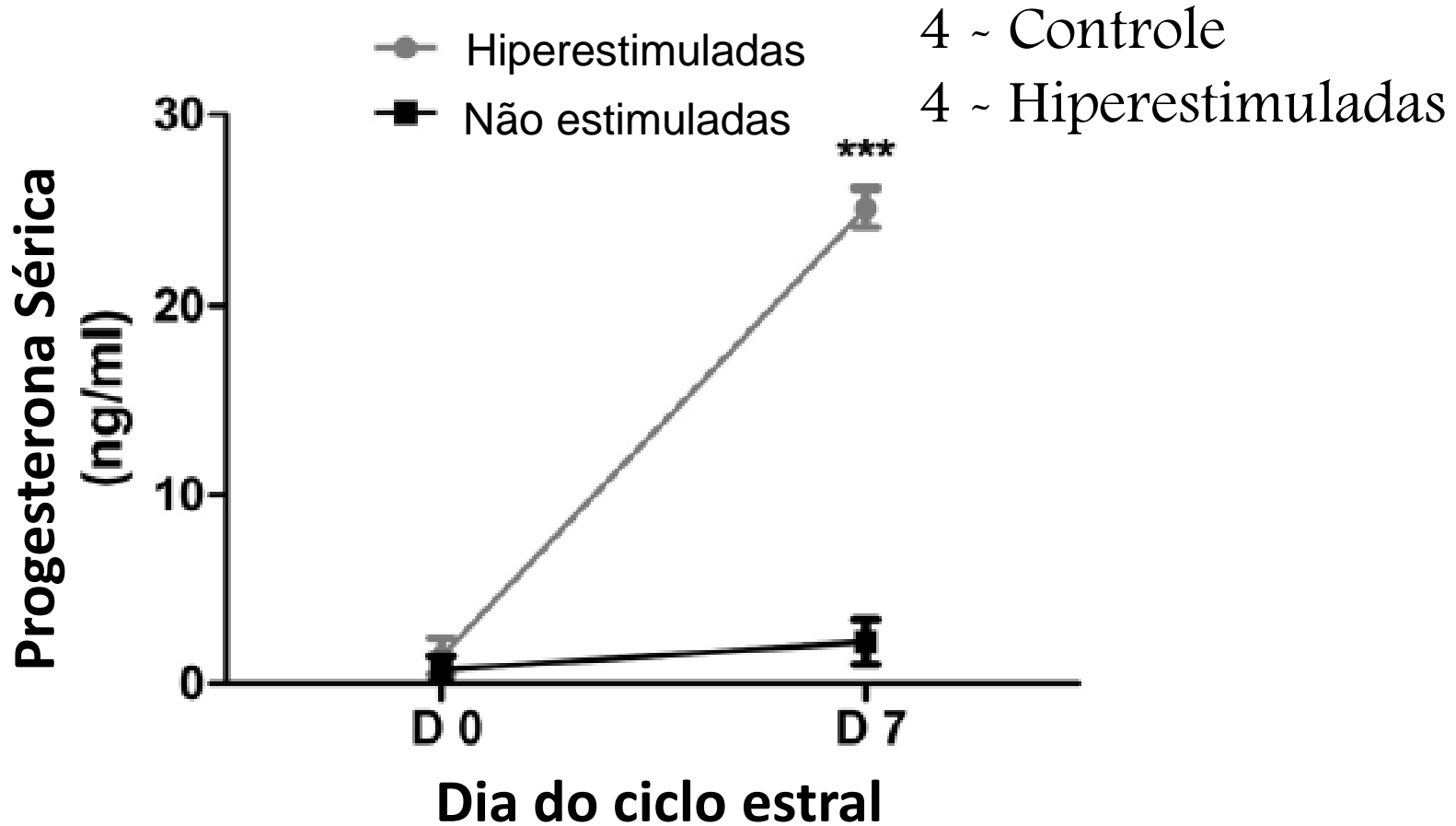
- Dias 0, 3 e 7
- Pós ovulação

Avaliação de P4



- Avaliação por Imunofluorescência
- n=10
- >24ng/mL
- <23ng/mL

Avaliação de P4



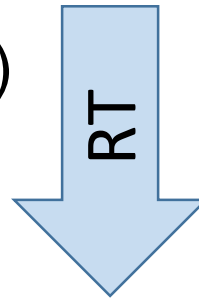
Detecção de miRNAs



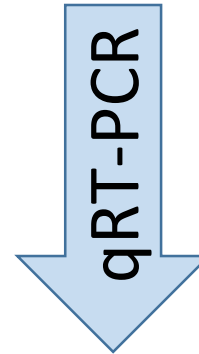
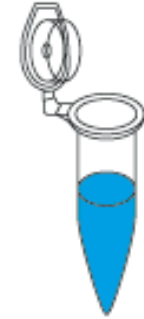
Extração de RNA (Qiagen®)

- ✓ Fluido folicular
- ✓ Plasma

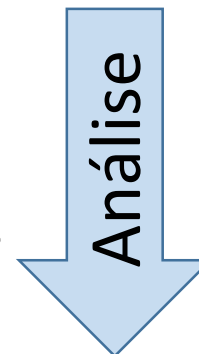
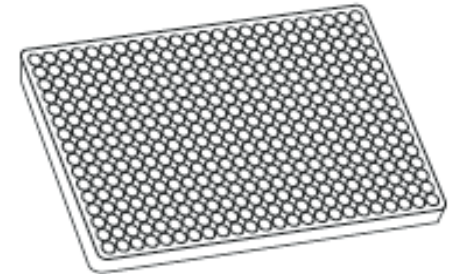
- Placas PCR 348 poços
- 748 iniciadores (h)
- 6 genes controle
- Pipetagem robótica
- 40 ciclos
- Ct <35 em 75% das amostras



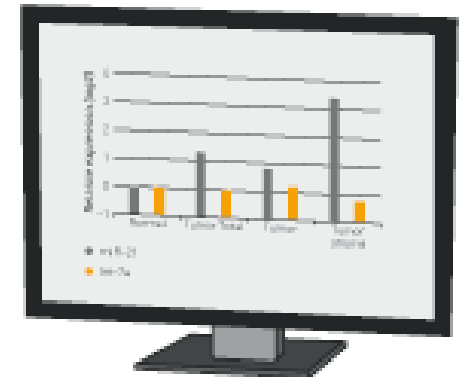
Kit
cDNA



- SYBER
- Painel



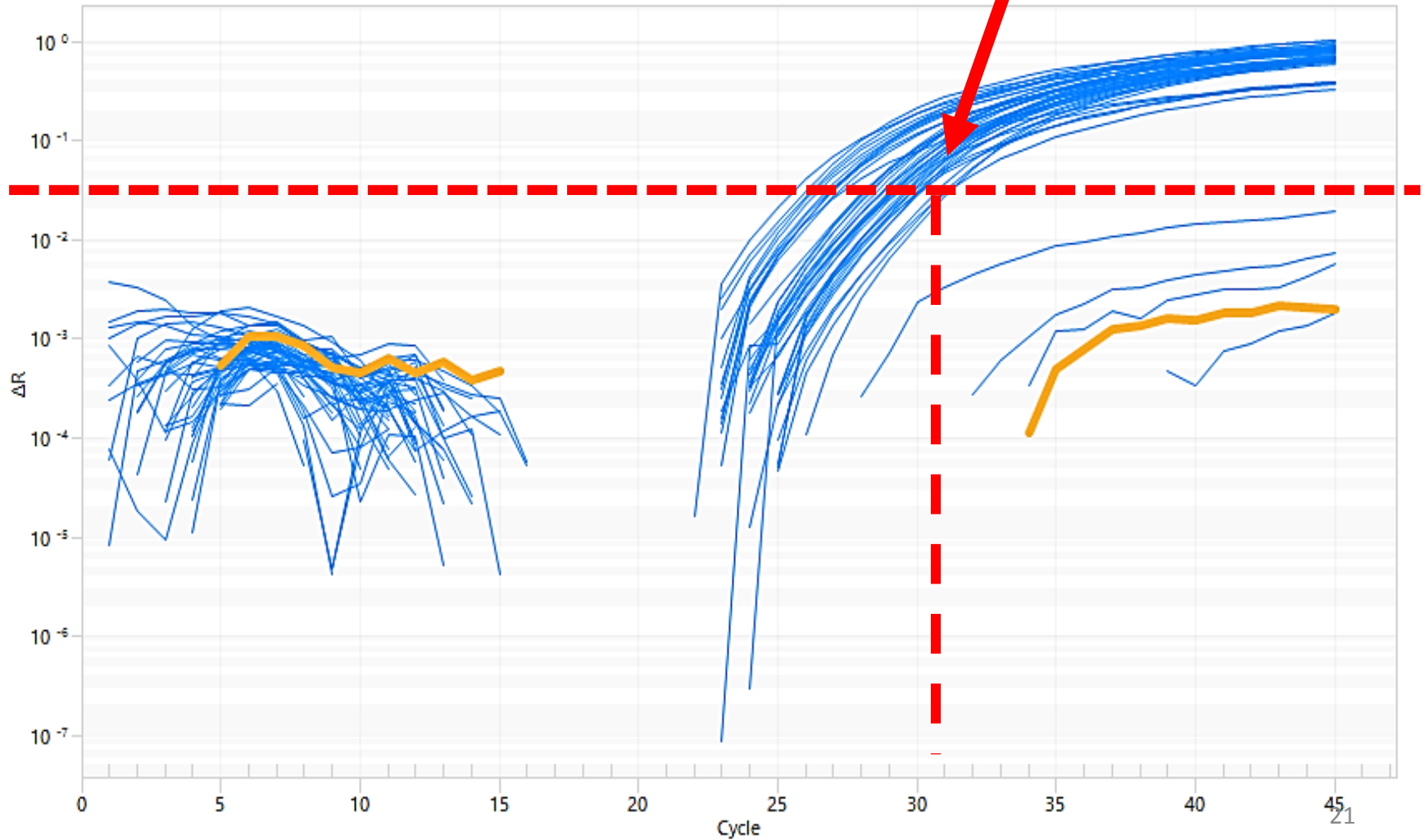
GenEx



Valor do Ct



Amplification Plot



Detecção de miRNAs

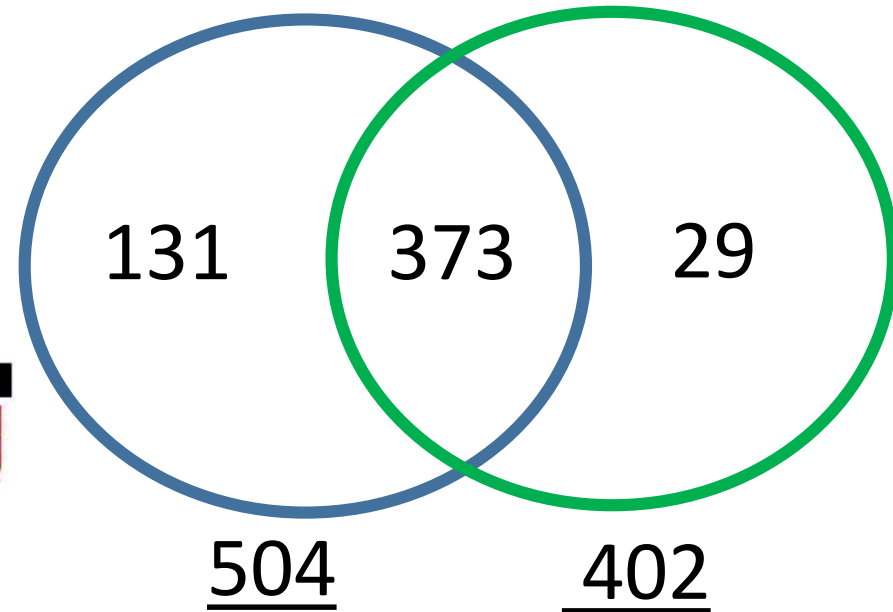
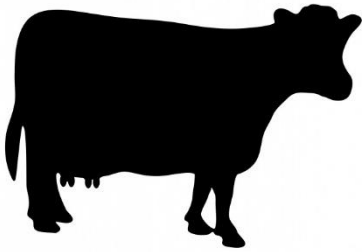


Avaliados: 748 miRNAs h

Análise comparativa “miRBase”

F. Folicular

Plasma



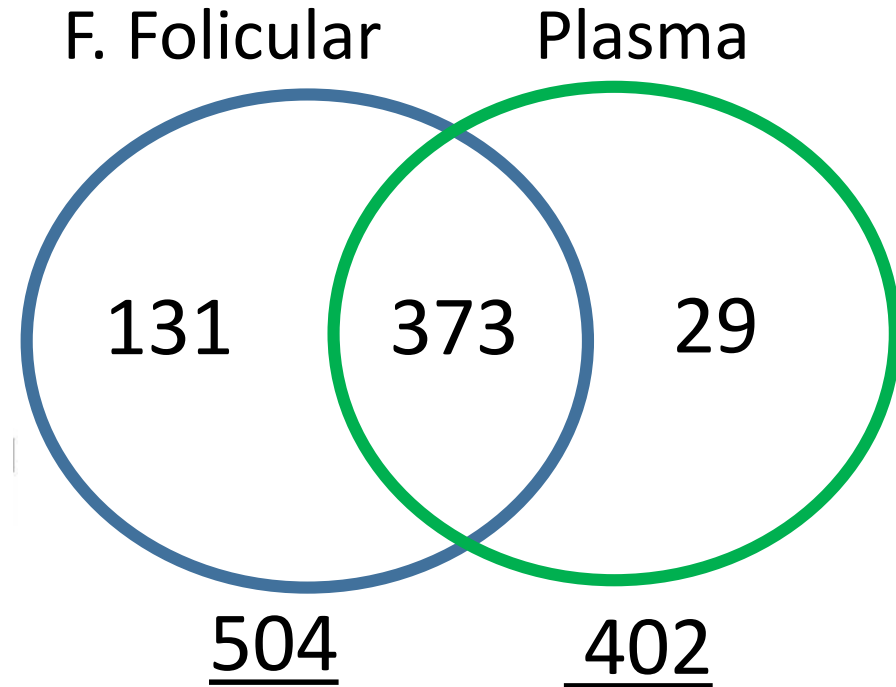
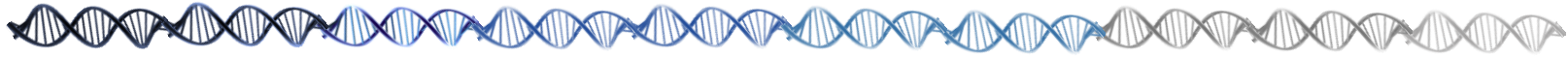
241 iguais

126 tamanho (1-5nt)

58 inadequações

323 Não pareados

Detecção de miRNAs



Expressão de miRNAs



Controle (n=4) vs Hiperestimuladas (n=4)
qRT-PCR

	F. follicular	Plasma
Total miRNAs id.	504	402
Excluídos	244*	---
+ Expressos	30	13
- Expressos	27	8

*Ct > 35

P < 0.05

Grupos de miRNAs



Hipótese: Hiperestimulação

- miRNAs individuais
- Grupos de miRNAs

Grupo: 10Kb no mesmo CH.
6 grupos

F. folicular:

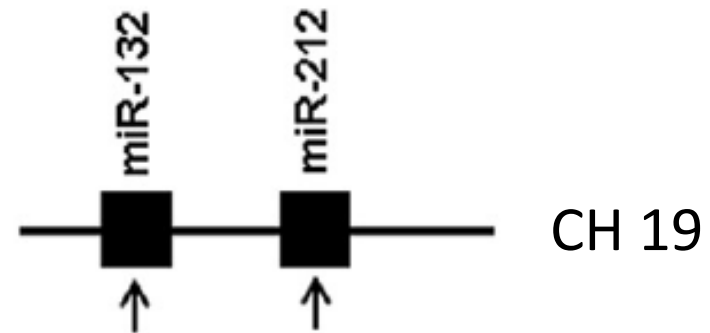
- ✓ 18% grupo
- ✓ 82% individuais

Plasma:

- 15% grupo
- 85% individuais

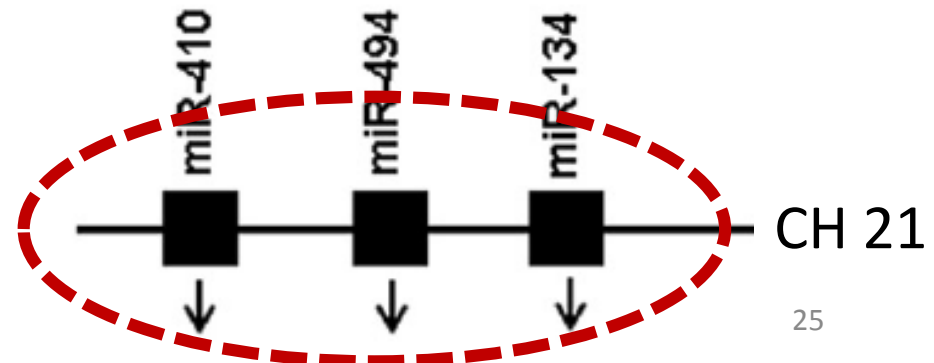
Plasma

Cluster # 4: miR-132 ~ 212 cluster.



F. folicular

Cluster # 1: miR-410 ~ 134 cluster.



Predição do alvo e rota



Limitação No. De miRNAs

- TargetScan
- miRDB
- NCBI DAVID Bioinformatic Resource (3000 genes)
- 22 rotas FF e 20 no plasma

F. folicular		Plasma	
+ Exp.	- Exp.	+ Exp.	- Exp.
8311	8050	6267	4982
3000	2700	1300	800

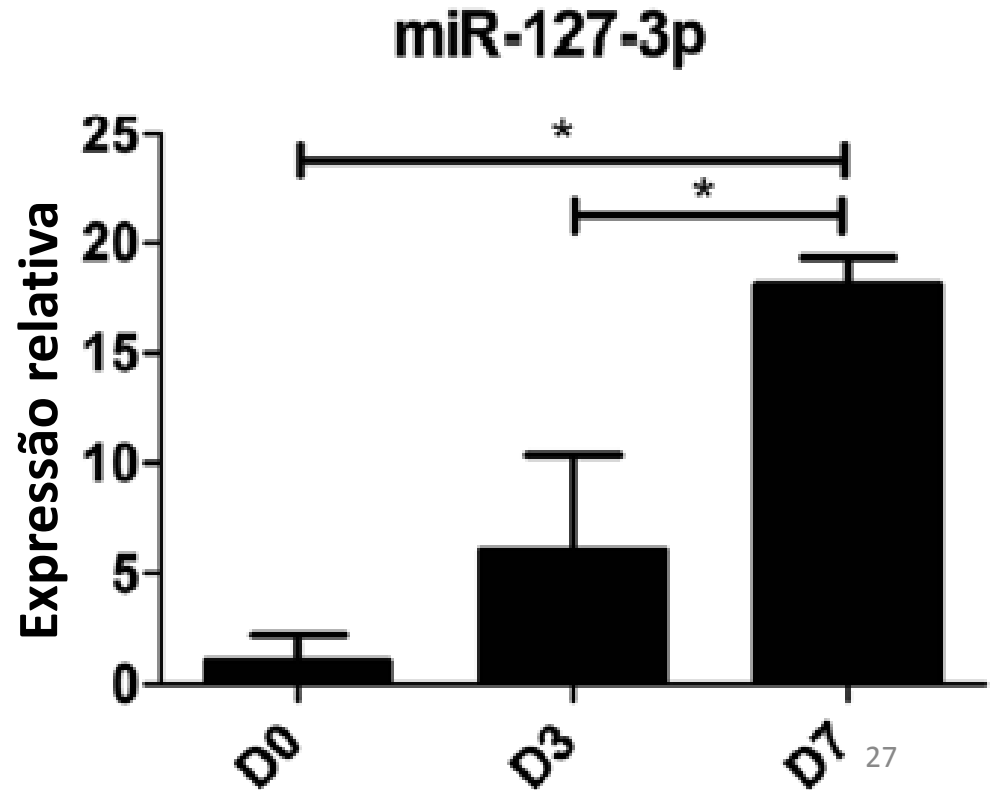
Expressão temporal no plasma



Hipótese:

Mudança na expressão de miRNAs circulatórios em novilhas hiperestimuladas

- 0, 3 e 7 dias (ovulação)
- miRNAs candidatos (6)
- ✓ 4 ↑ no D7
- ✓ 1 ↓ no D7
- ✓ 1 sem diferença



Detecção de miRNAs candidatos



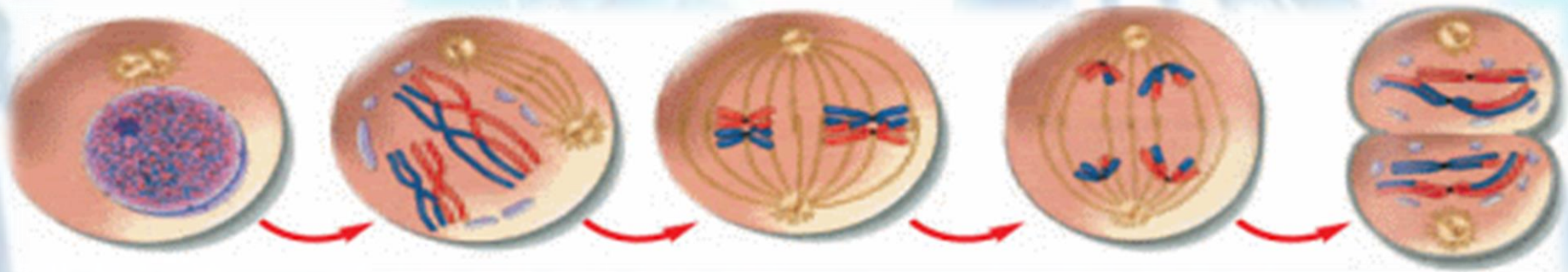
Rota	miRNAs	valor P
Mais expressos (hip x não est)		
Meiose Oocitária	miR-212, ~132, ~940, 495, ~595, ~107	0.003369
Rota de Sinalização do GnRH	miR-940, ~495	0.007085

miRNAs – envolvidos na regulação hormonal e vice-versa.

Detecção de miRNAs candidatos



Genes – Meiose Oocitária

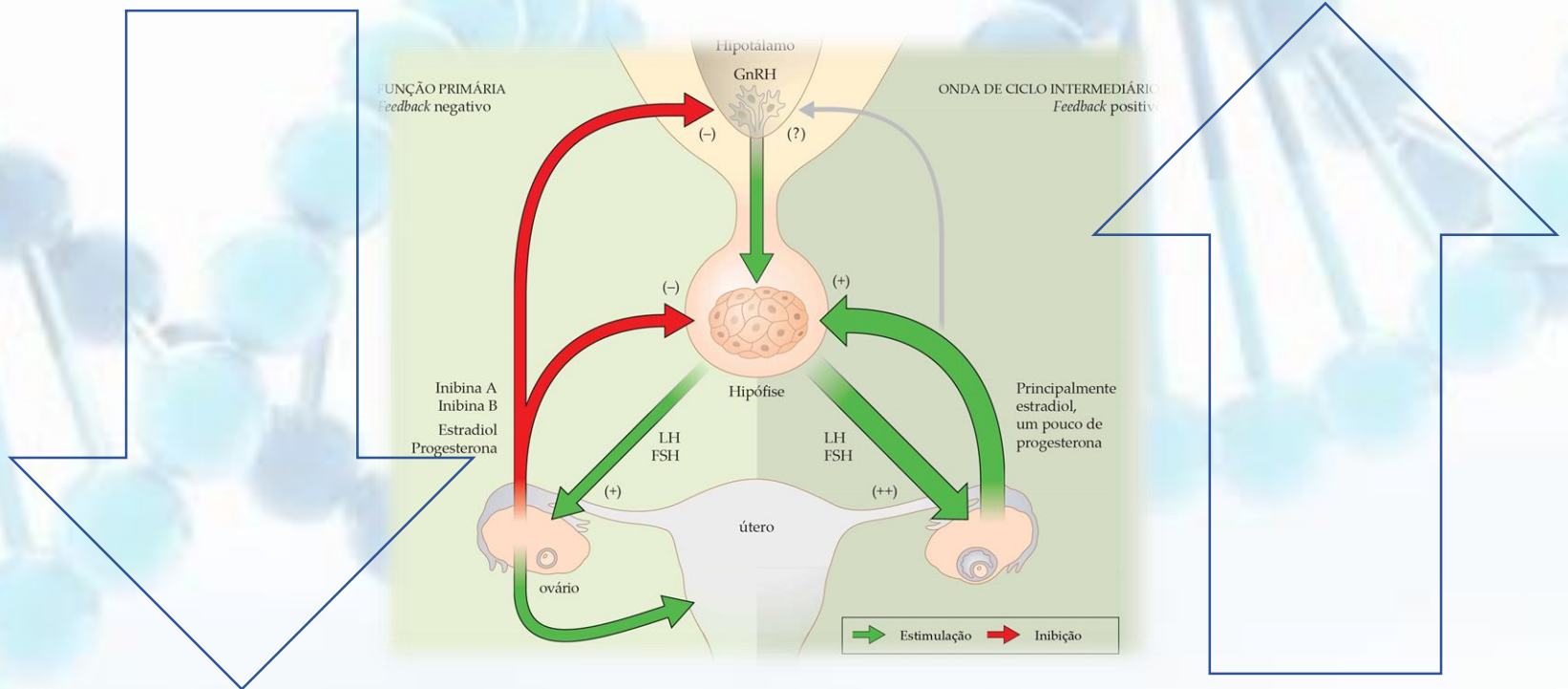


↑
Velocidade dos processos
Maturação
Desenvolvimento
↓

Detecção de miRNAs candidatos



Genes – Sinalização de GnRH



Desenvolvimento embrionário e crescimento celular

Detecção de miRNAs candidatos



miR-643, miR-548j, miR-224 and miR-33b

↑ FF das Hiperestimuladas – altamente associado com câncer.

miR-361-5p e miR-27b

↓ FF das Hiperestimuladas – relatado como supressor tumoral.

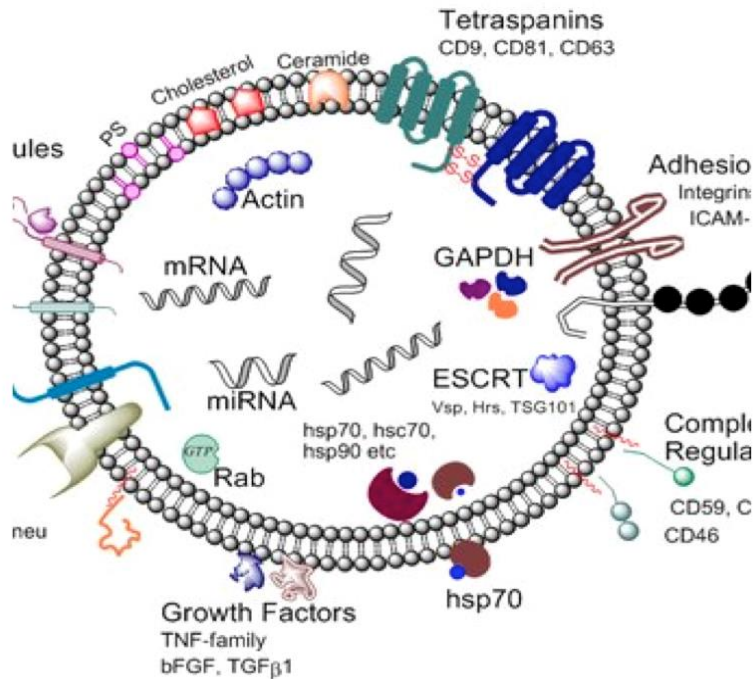
Validação exossomos e Ago2



FF e Plasma

Exossomos

Ago2



Validação exossomos e Ago2



FF e Plasma

Exossomos

Ago2

- Centrifugação
- Filtrado
- Centrifugação

- Imunoprecipitação

Especificidade: Western blot

Detecção de miRNAs



Avaliados (qRT-PCR):

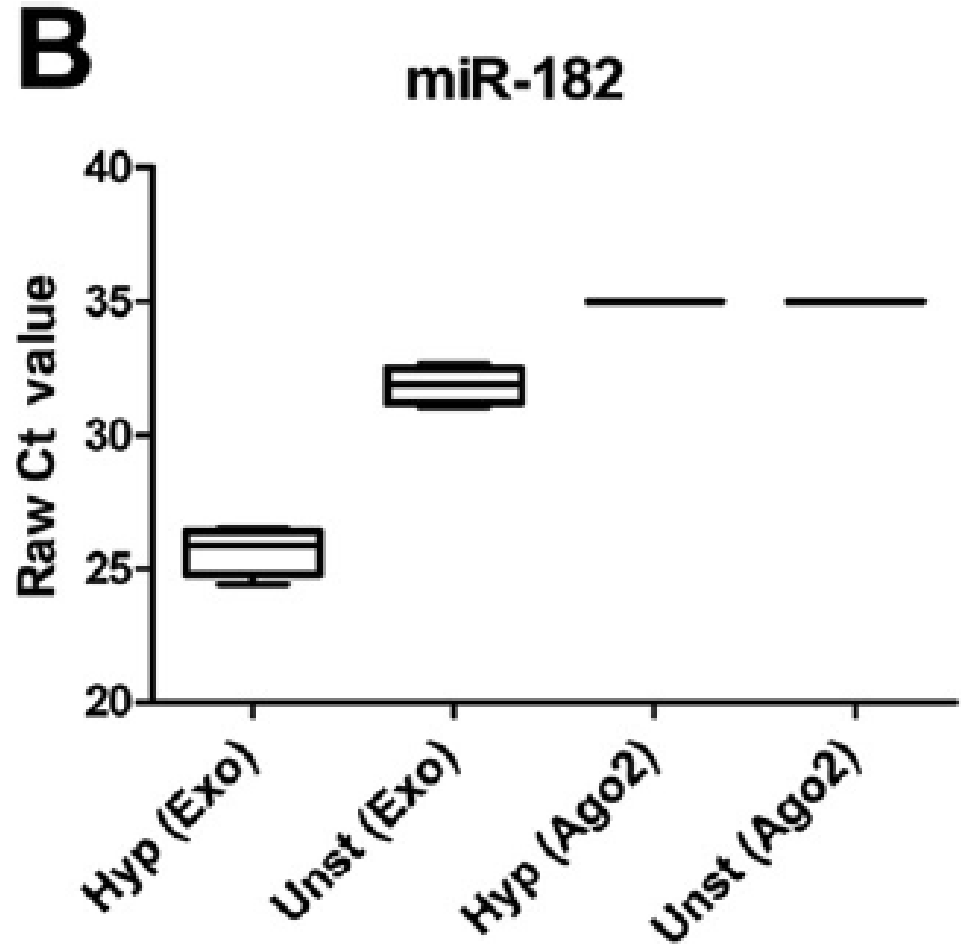
- 6 miRNAs candidatos
- Exossomos e Ago2

FF:

- ✓ 1 não detectado Ago2

Plasma:

- ✓ 4 detectados
- ✓ 2 não detectados Ago2



Conclusões



- A hiperestimulação ovariana pode induzir mudanças na relação de abundância de miRNAs extracelulares, que estão potencialmente envolvidos na regulação de genes em várias vias fisiológicas.
- A liberação de miRNAs para o espaço extracelular no FF e no plasma sanguíneo não é afetada pela hiperestimulação.

Considerações Finais



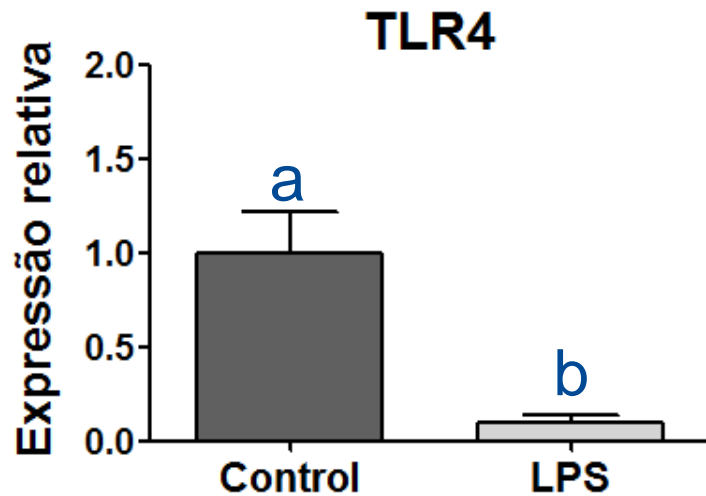
- *In silico*
- Estudo novo – mais investigações de miRNAs e rotas.



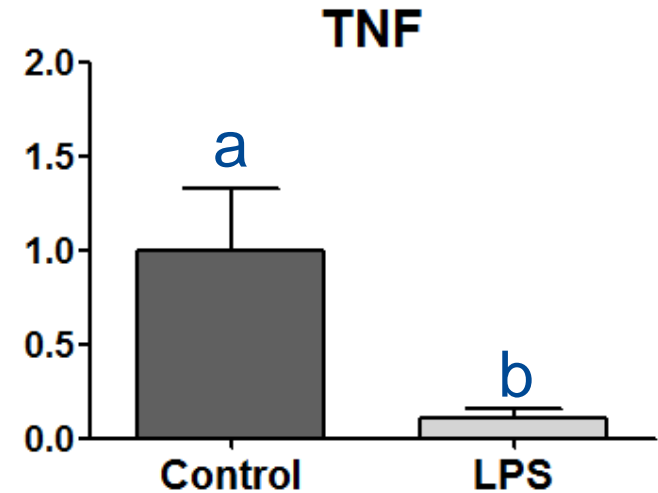
Trabalhos NUPEEC



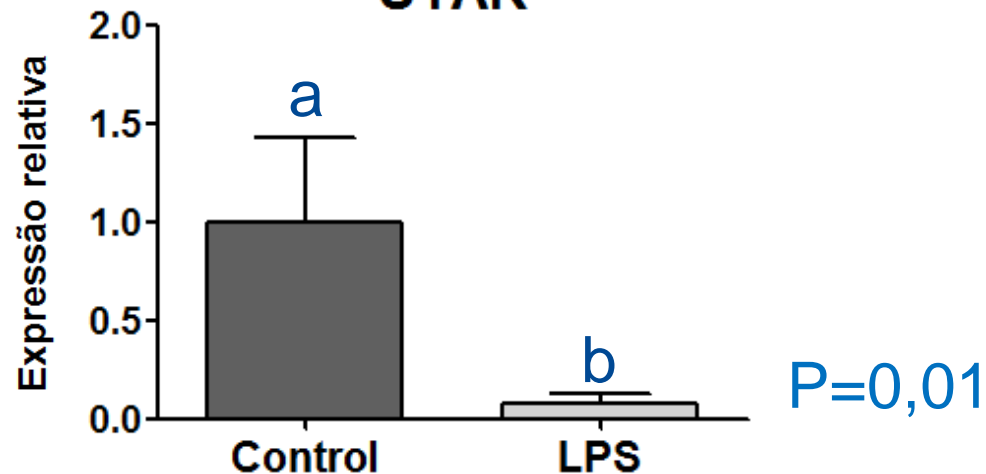
P=0,002



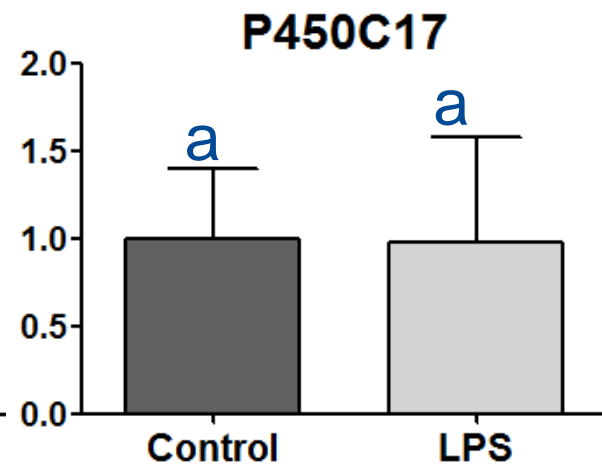
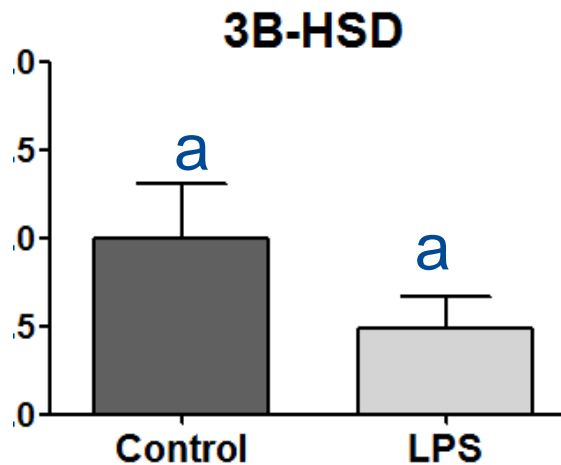
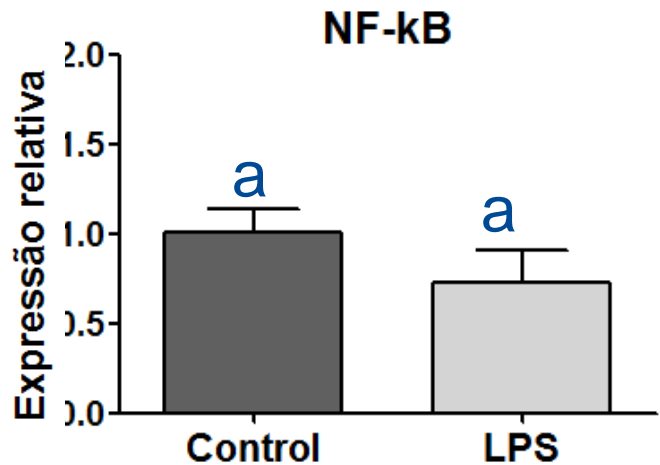
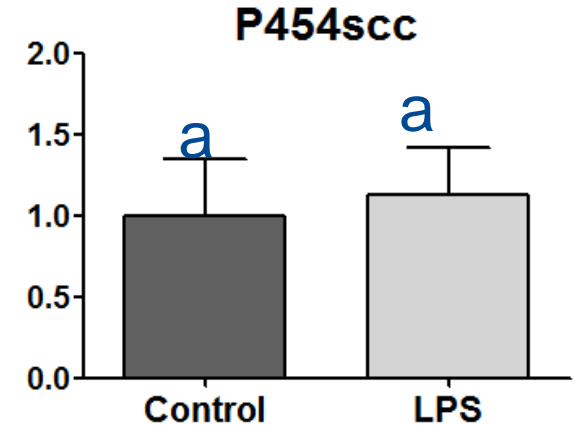
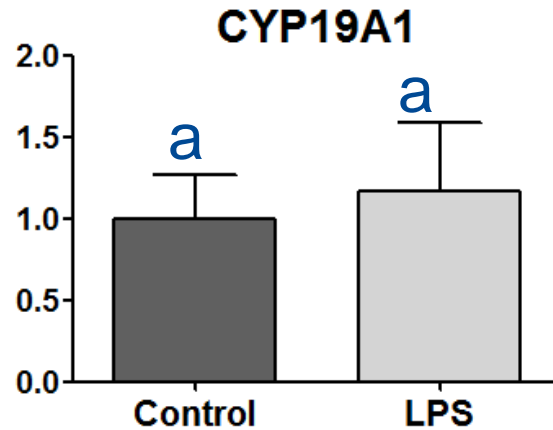
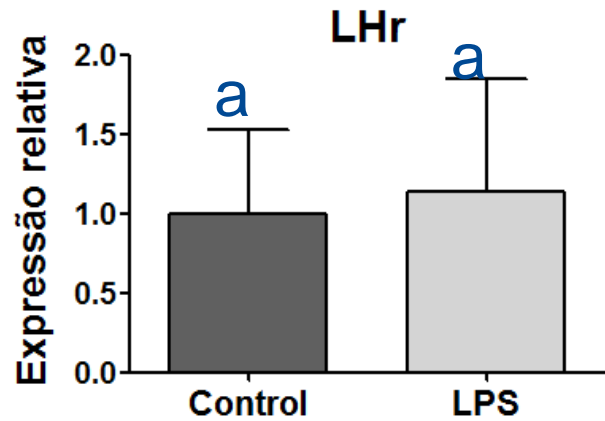
P=0,001



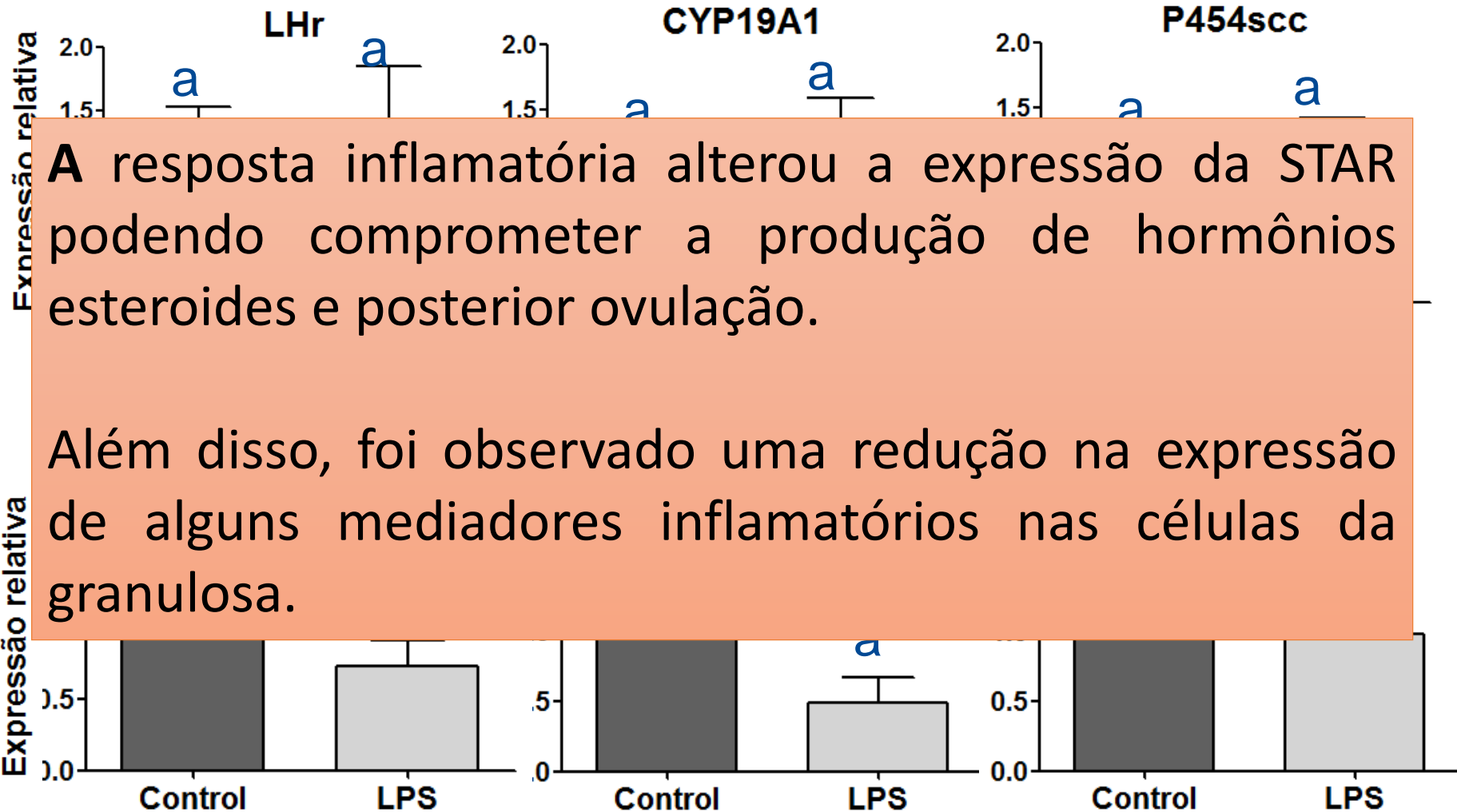
STAR



Trabalhos NUPEEC



Trabalhos NUPEEC



A resposta inflamatória alterou a expressão da STAR podendo comprometer a produção de hormônios esteroides e posterior ovulação.

Além disso, foi observado uma redução na expressão de alguns mediadores inflamatórios nas células da granulosa.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária



OBRIGADO!

Alice Benites – alicebenites@gmail.com

Marjana Martins – marjanam@hotmail.com

Joao Rincón – joaoal@hotmail.com