



Painel temático

Pelotas, 28 de setembro de 2017





Universidade Federal de Pelotas
Faculdade De Veterinária
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária
www.ufpel.edu.br/nupeec



Painel temático

Efeitos dos Lipopolissacarídeos (LPS) durante a
maturação oocitária e desenvolvimento
embrionário inicial em bovinos

Pelotas, 28 de setembro de 2017



Moderador

Joao Alvarado Rincón

Doutorando PPGV



Painelista 1

Márcio Brachak

Graduando em Medicina Veterinária



Painelista 2

Giuliana de Avila Ferronato

Graduanda em Biotecnologia

Objetivo

Abordar os possíveis mecanismos pelos quais os Lipopolissacarídeos (LPS) podem afetar negativamente a fertilidade, a nível de maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial em bovinos.



Conteúdo

1) Introdução

- ✓ LPS
- ✓ Maturação oocitária

2) Artigo 1

- ✓ LPS *in vivo* e maturação *in vitro*

3) Projeto de doutorado

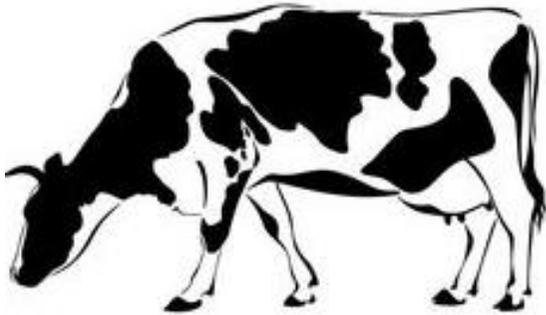
- ✓ Objetivo
- ✓ Resultados parciais

4) Artigo 2

- ✓ LPS na MIV e possíveis mecanismos

5) Conclusões

Período crítico



↑ Incidência de doenças

- Mastite (20-50%)
- Metrite (40%)
 - *E. coli* (Gram -)

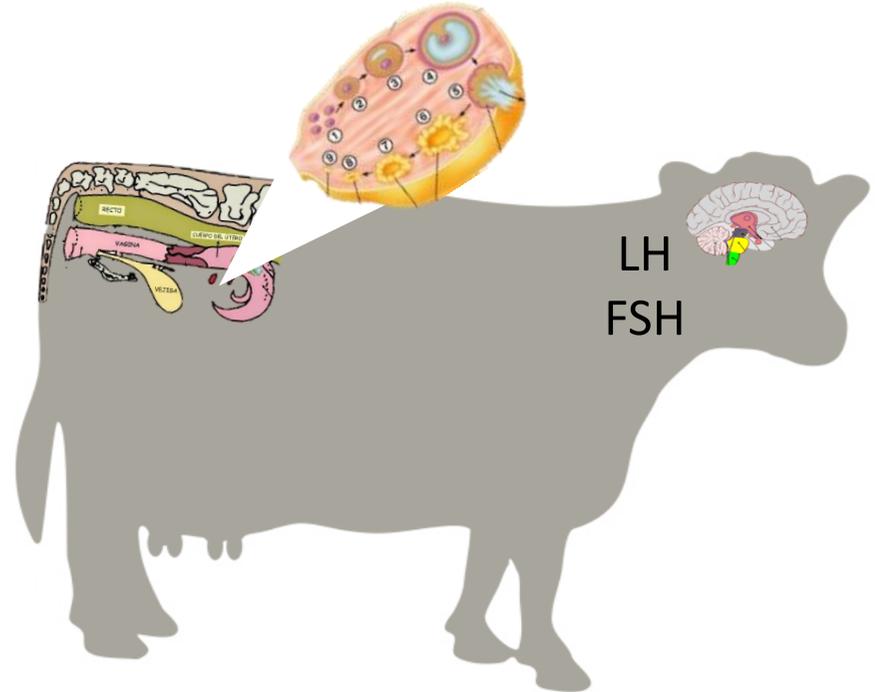


- [] De E2, LH e FSH alteradas;
- ↓ Crescimento folicular;
- Atraso na ovulação;
- Redução da fertilidade.

Lipopolissacarídeos (LPS)

- ✓ Plasma
- ✓ F. uterino
- ✓ F. folicular

- Mastite (*E. coli*)
- Metrite
- Endometrite:

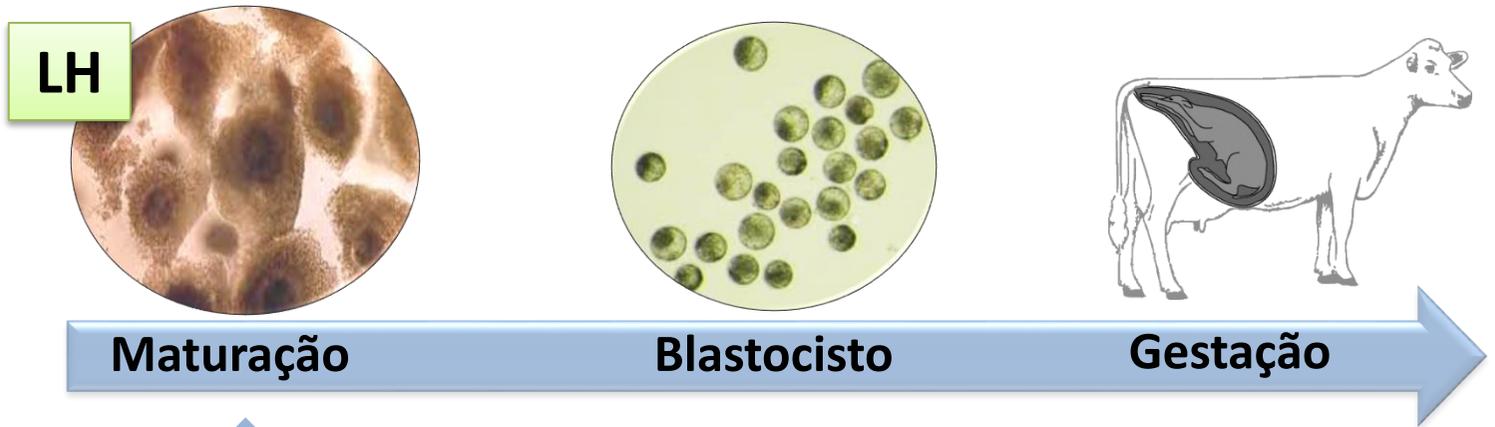


Clínica 4,3 - 875,2 ng/mL
Subclínica 0 - 40 ng/mL

vs

Saudável: 0 - 0,8 ng/mL

Maturação oocitária



Fatores:

- Endógenos
- Exógenos

in vivo: 60-80%
in vitro: 25-40 %

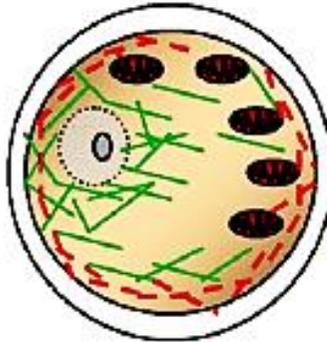
Maturação oocitária

Nuclear
Citoplasmática
Molecular

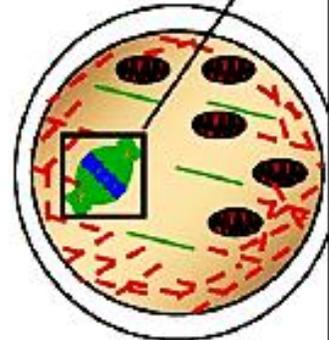
Vesícula
germinativa



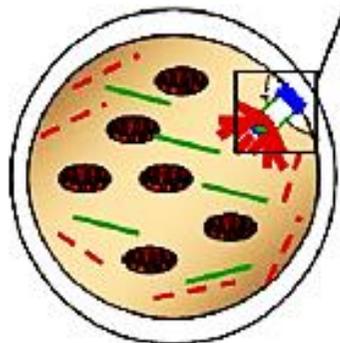
GVBD



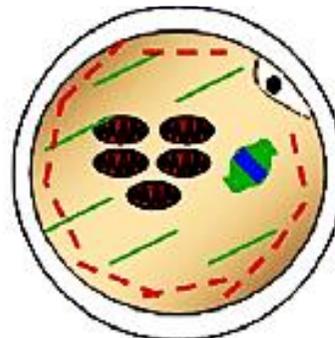
Metáfase I



Telófase I



Metáfase II



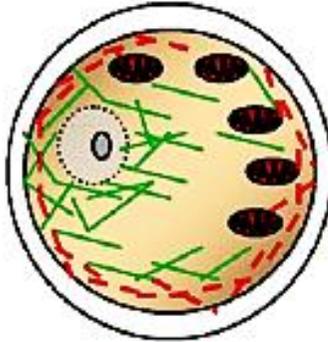
Maturação oocitária

Nuclear

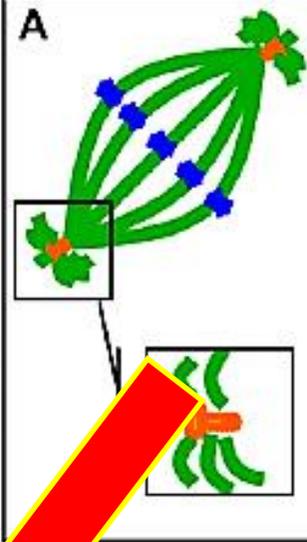
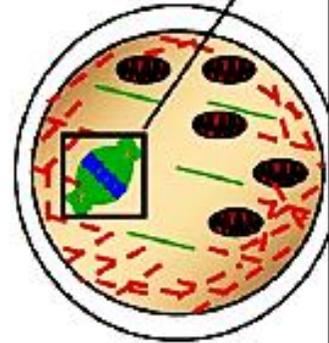
Vesícula germinativa



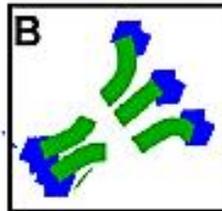
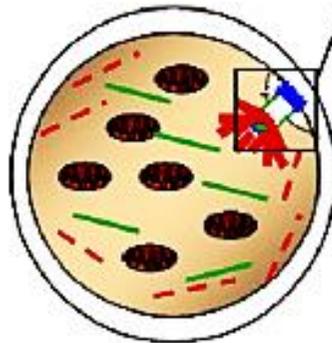
GVBD



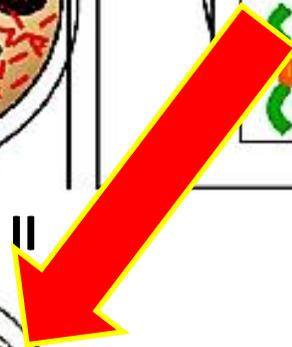
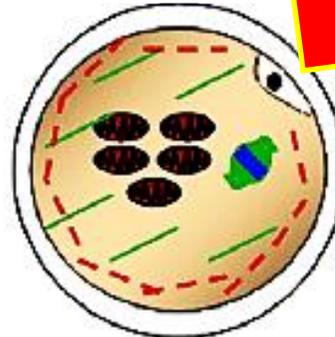
Metáfase I



Telófase I



Metáfase II



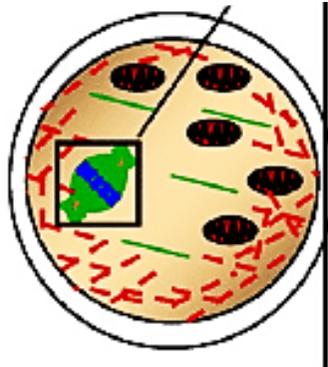
Maturação oocitária

Citoplasmática

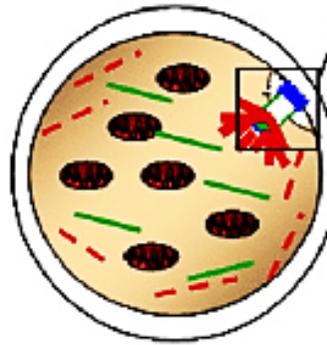
Vesícula germinativa



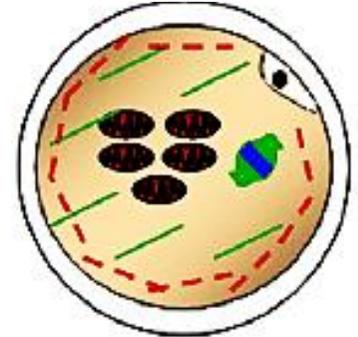
Metáfase I



Telófase I



Metáfase II



- Mitocôndrias
- Microtúbulos (tubulina α e β)
- Filamentos de actina
- Grânulos corticais

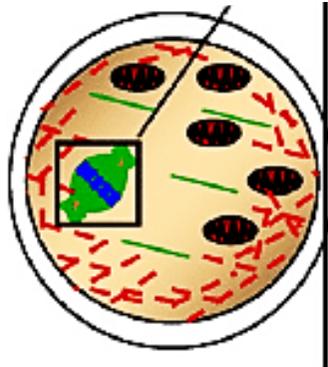
Maturação oocitária

Molecular

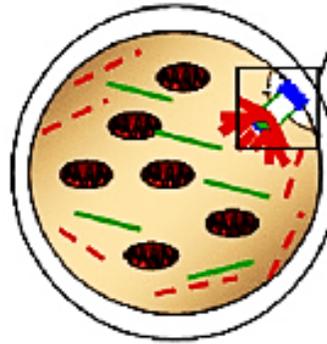
Vesícula germinativa



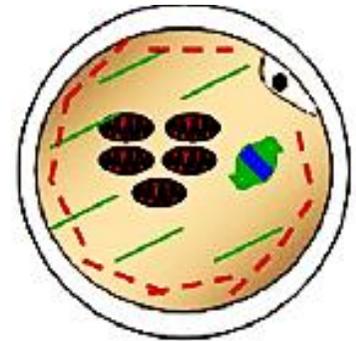
Metáfase I



Telófase I



Metáfase II

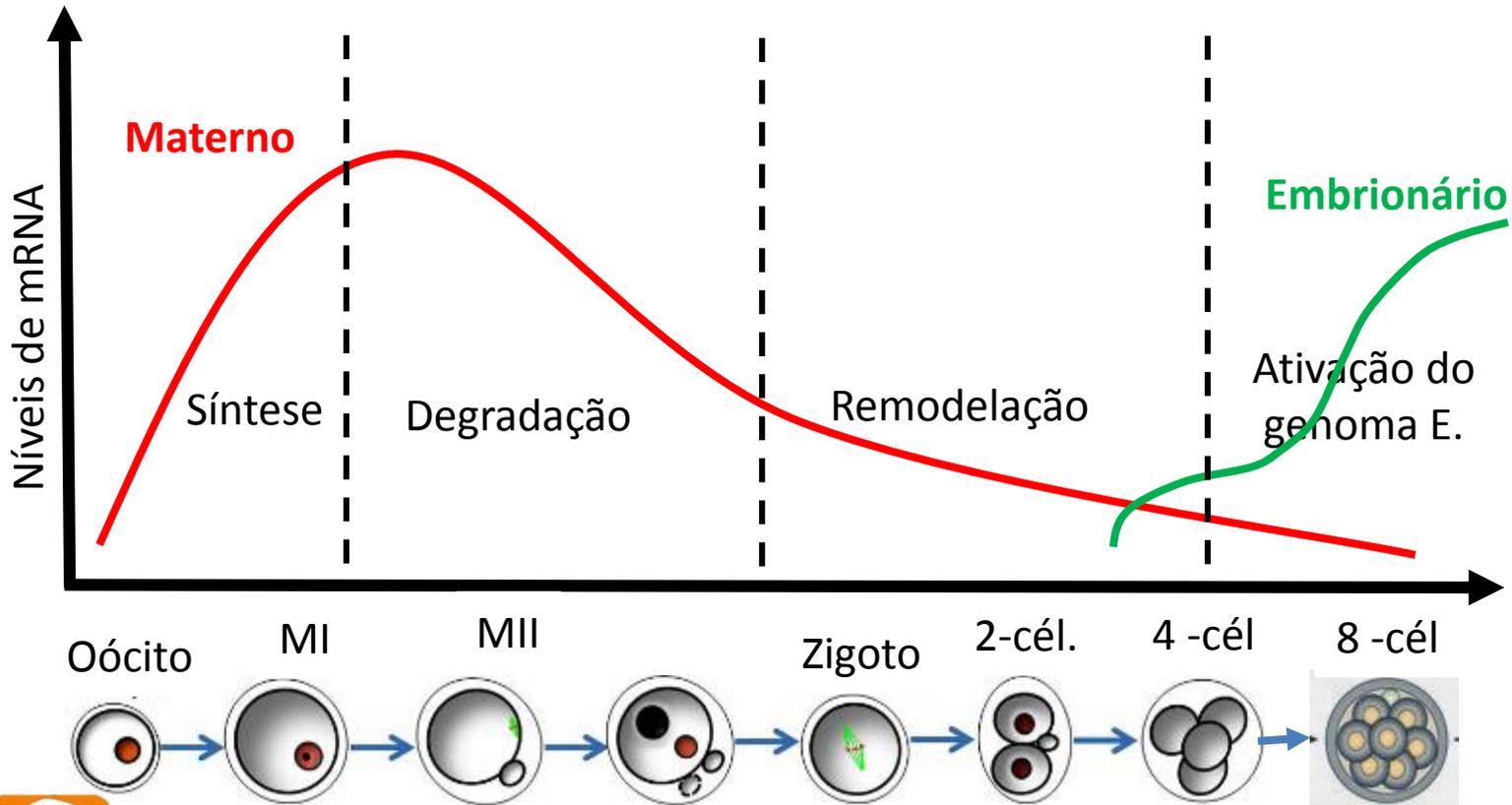


MAPK (Proteína cinase ativada por mitogenos)

- Ativada por sinais extracelulares
- Regula:
 - ✓ Expressão gênica
 - ✓ Mitose
 - ✓ Apoptose

Maturação oocitária

Molecular



Lipopolissacarídeos (LPS)

- C. Granulosa CIV (24h) + LPS (10 μ g/mL)

Expressão TLR4

↑ Acumulo de IL-6

↑ Acumulo IL-8

- C. Granulosa CIV (24h) + LPS (1 μ g/mL)

↓ Estradiol

Expressão TLR4

↑ Citocinas e quimiocinas inflamatórias

- COCs – MIV (24h) + LPS (10 μ g/mL)

↓ Taxa maturação meiótica



Lipopolissacarídeos (LPS)

LPS IV (2,5 µg/Kg de peso vivo) (n=10)

- ↑ Temperatura **40,4 ± 0,1°C** vs 38,8 ± 0,1°C ($P < 0,001$)
- Diâmetro folicular ($P = 0,27$)
- E2 e P4 ($P > 0,05$)
- ↓ PON1 FF e sanguínea
- Alteração na expressão gênica nas C. da granulosa
 - ✓ STAR
 - ✓ TNF
 - ✓ TLR4

Artigo 1

Reproduction, Fertility and Development

Subclinical mastitis disrupts oocyte cytoplasmic maturation in association with reduced developmental competence and impaired gene expression in preimplantation bovine embryos

Z. Roth^{A,C}, S. Asaf^A, O. Furman^A, Y. Lavon^A, D. Kalo^A, D. Wolfenson^A and G. Leitner^B

A mastite subclínica interrompe a maturação citoplasmática do oócito em associação com uma menor competência de desenvolvimento e diminuição na expressão gênica de embriões bovinos durante a pré-implantação.

Publicado: 2015

Fator de impacto: 2,65



Objetivo

Avaliar os efeitos da resposta inflamatória (LPS-Mastite subclínica) a longo prazo e o ambiente folicular na maturação de oócitos bovinos.



Metodologia

- *In vivo*



- *In vitro*



Toxinas:

Staphylococcus aureus (+)

Escherichia coli (-)

In vivo

12 Vacas Holandês

LPS $n=(6)$

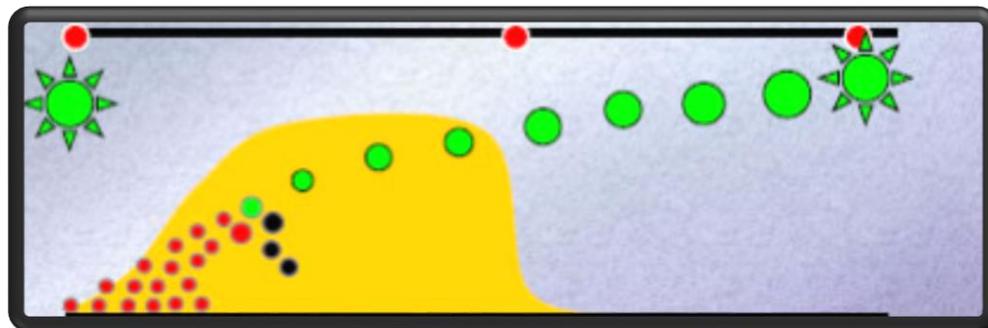
Controle $n=(6)$

Ovsynch

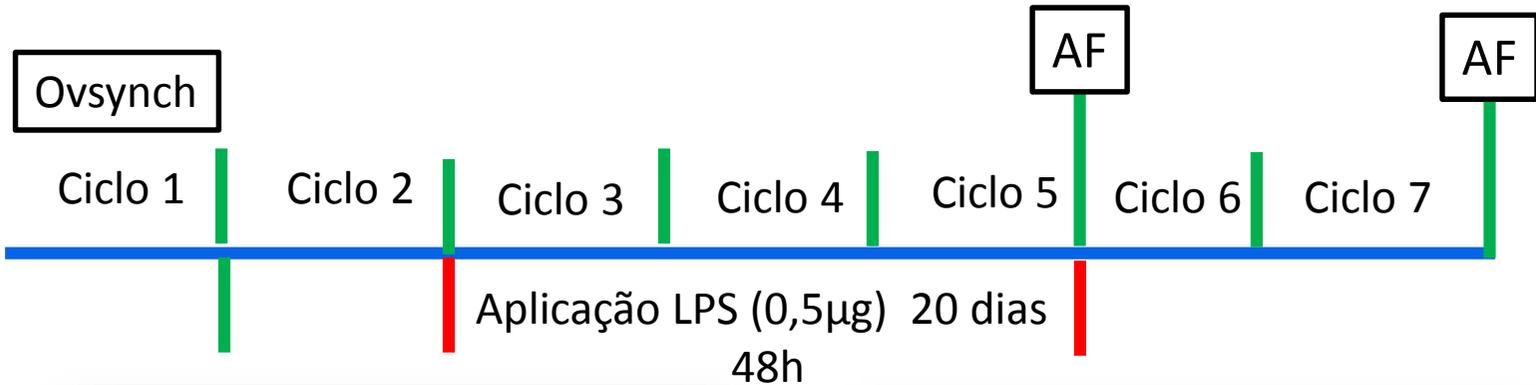


Dia 0 do ciclo

✓ D6 (PG) D8 (GnRH)



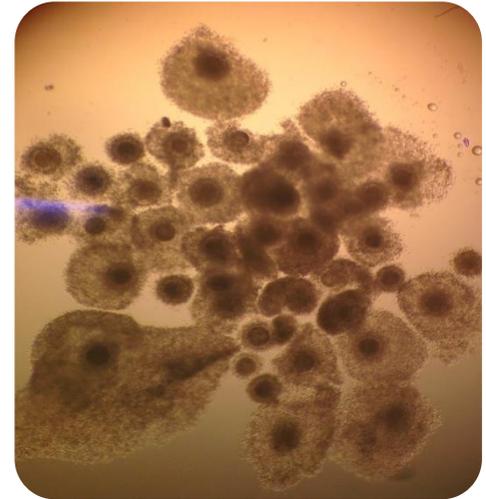
In vivo



In vitro

PIVE

Aspiração
folicular



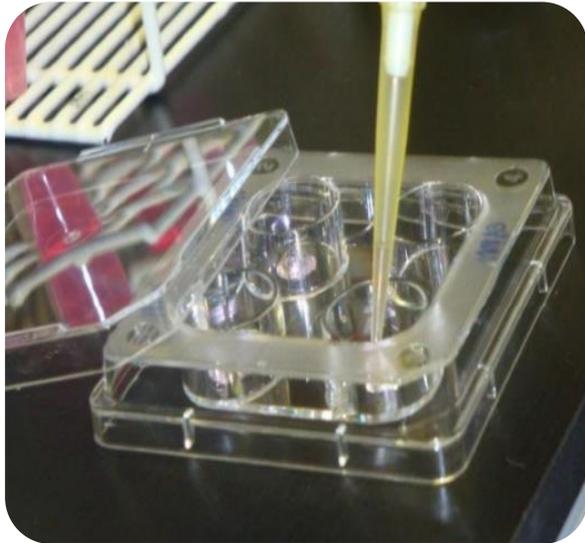
- Abatedouro
- Aspiração de folículos: 3 – 8 mm de diâmetro
- Busca e seleção de oócitos

In vitro

PIVE

Aspiração
folicular

MIV
22h



- ✓ FF de vacas desafiadas com LPS
- ✓ FF controle

In vitro

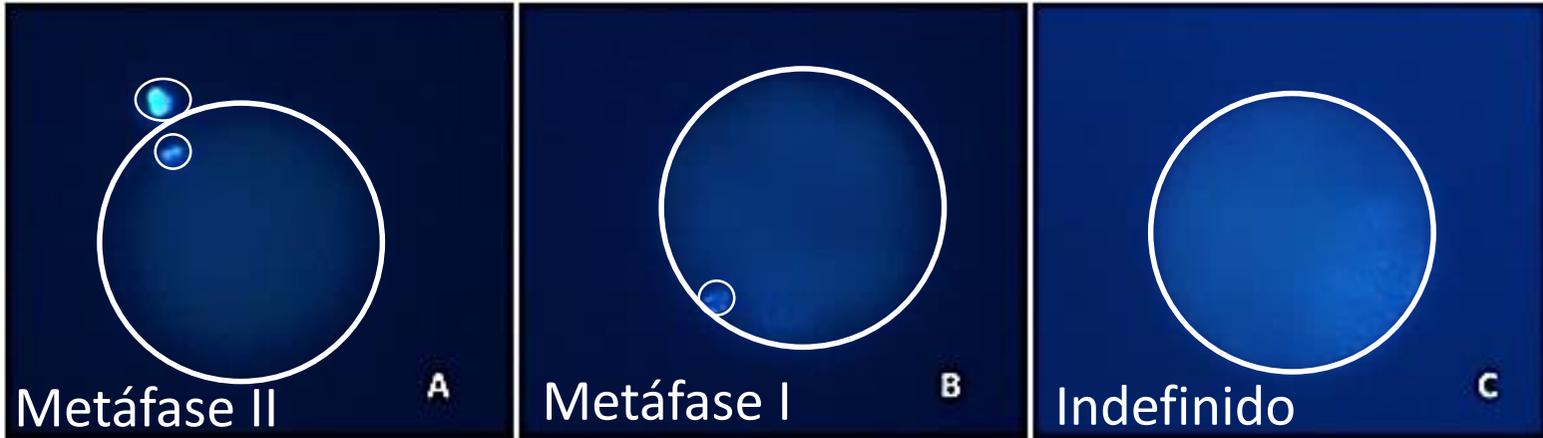
PIVE

Aspiração
folicular

MIV

Análises

Maturação nuclear (DAPI)



- Desnudados
- 5 repetições (n= 50 COCs/grupo)
- Microscópio de fluorescência invertido

In vitro

PIVE

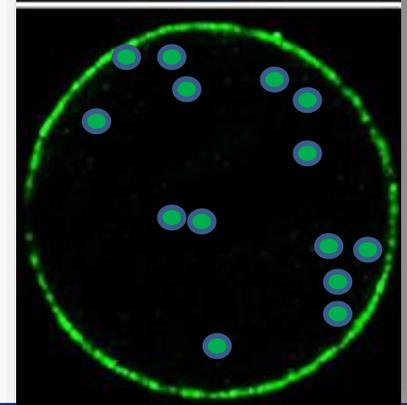
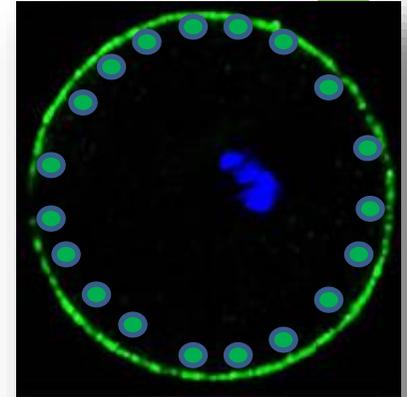
Aspiração
folicular

MIV

Análises

Grânulos corticais (FITC-PNA)

- Desnudados
- 5 repetições (n= 50 COCs/grupo)
- Microscópio de fluorescência invertido



In vitro

PIVE

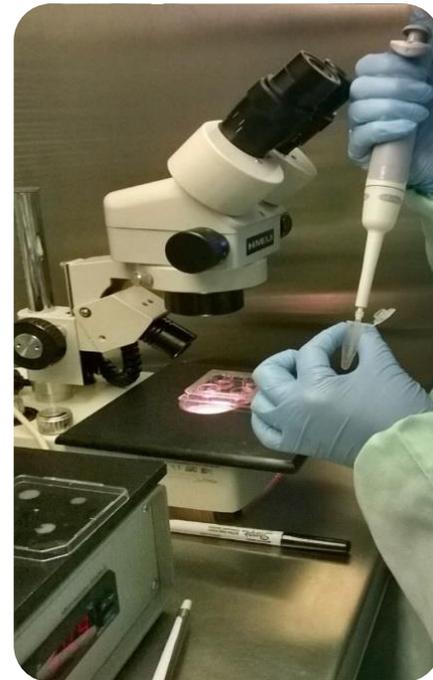
**Aspiração
folicular**

MIV

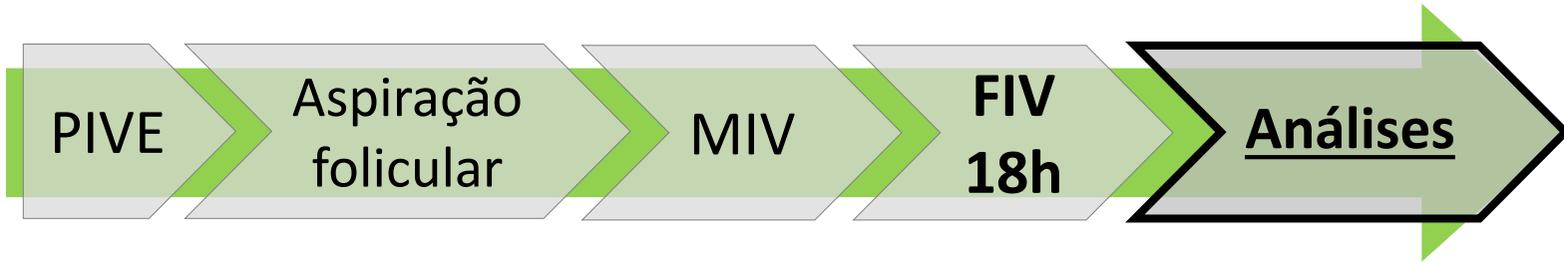
**FIV
18h**

**CIV
D8**

Inseminação:
Dia 0 (D0)



In vitro



Expressão gênica

- Oócitos: 22h de MIV
- Zigotos: 44h de FIV
 - ✓ PTGS2: Inflamação
 - ✓ HSF1: Estresse proteotóxico
 - ✓ POU5F1: Ativador de transcrição
 - ✓ GDF9: Competência oocitária
 - ✓ SLC2A1: Metabolismo

In vitro

PIVE

Aspiração
folicular

MIV

FIV
18h

CIV
D8

Clivagem (44h)



In vitro

PIVE

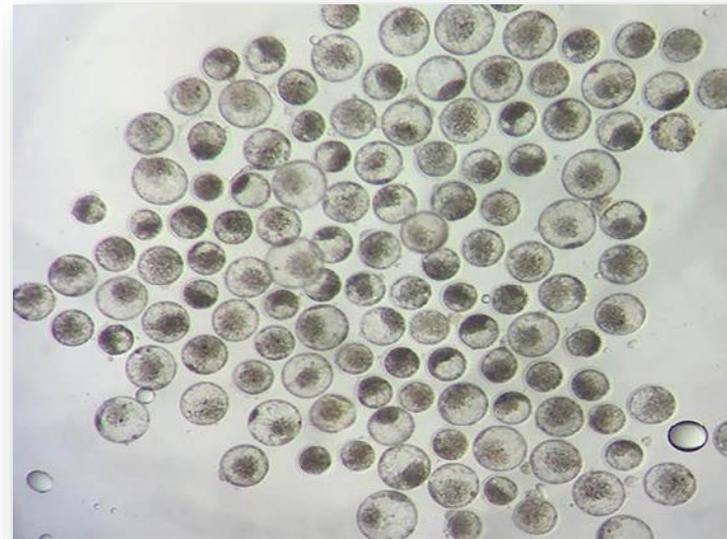
Aspiração
folicular

MIV

FIV
18h

CIV
D8

- Blastocisto (D8)
- Contagem celular (Hoechst)
- Apoptose (TUNEL)
- ✓ Microscópio de fluorescência invertido
- ✓ n= 20 embriões/grupo



In vitro

PIVE

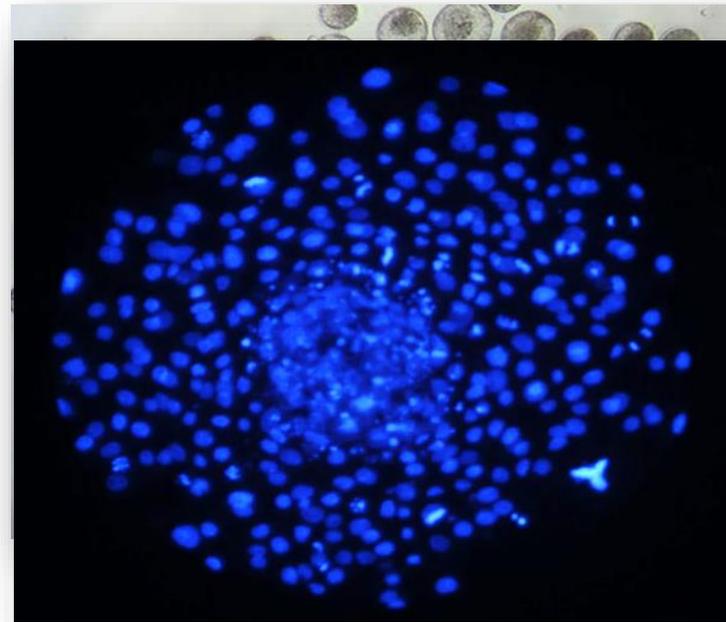
Aspiração
folicular

MIV

FIV
18h

CIV
D8

- Blastocisto (D8)
- Contagem celular (Hoechst)
- Apoptose (TUNEL)
- ✓ Microscópio de fluorescência invertido
- ✓ n= 20 embriões/grupo



In vitro

PIVE

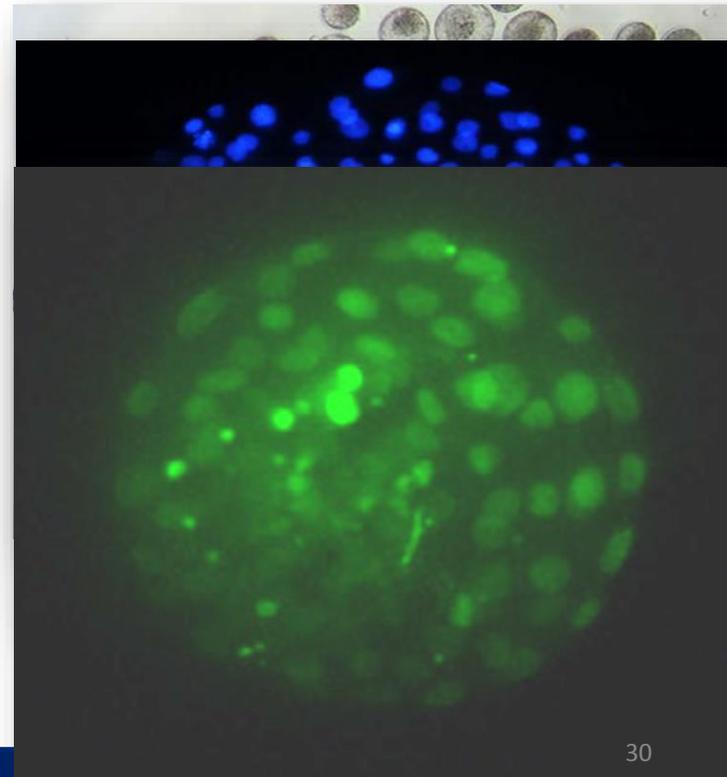
Aspiração
folicular

MIV

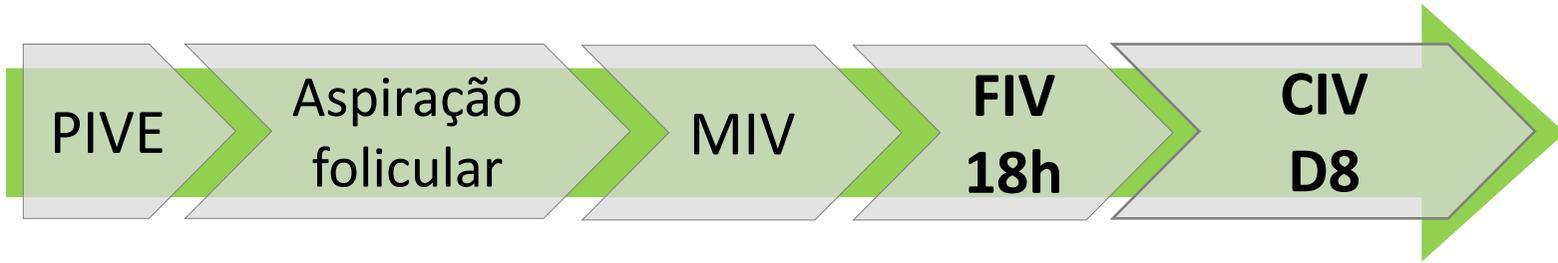
FIV
18h

CIV
D8

- Blastocisto (D8)
- Contagem celular (Hoechst)
- Apoptose (TUNEL)
- ✓ Microscópio de fluorescência invertido
- ✓ n= 20 embriões/grupo



In vitro



Análise Estatística

- One way ANOVA (SAS)
- Tukey
- $P < 0,05$ diferença significativa

RESULTADOS

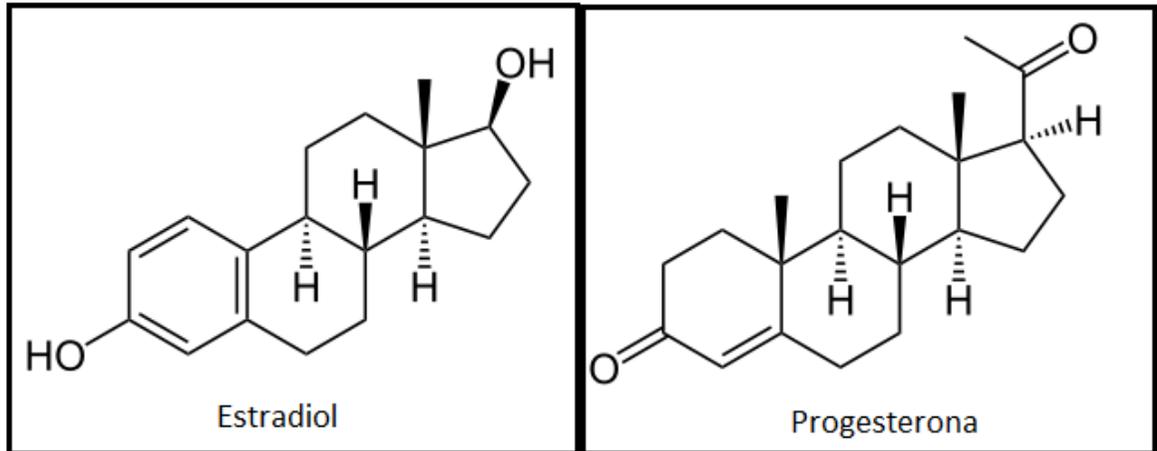
Caracterização da Mastite

- Cortisol, haptoglobina e produção não diferiram.

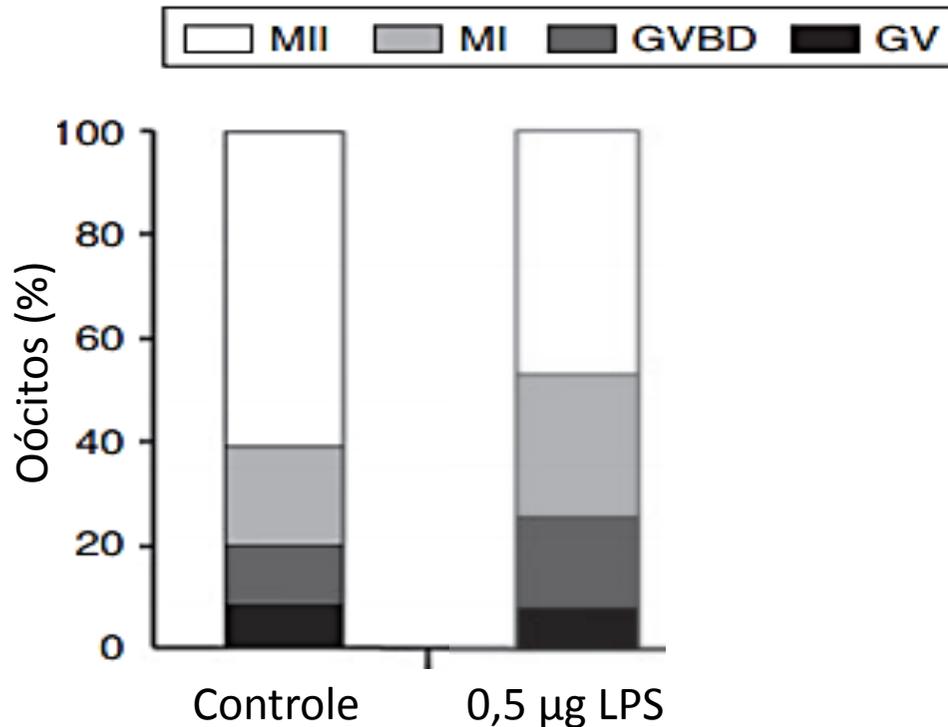


Hormônios FF

- P4: ↓ 66,5 ng/mL (LPS) e 236,2 ng/mL (Controle)
- E2: ↓ 927,8 ng/mL (LPS) e 1060,0 ng/mL (Controle)
- P4:E2 sem diferença entre tratamentos

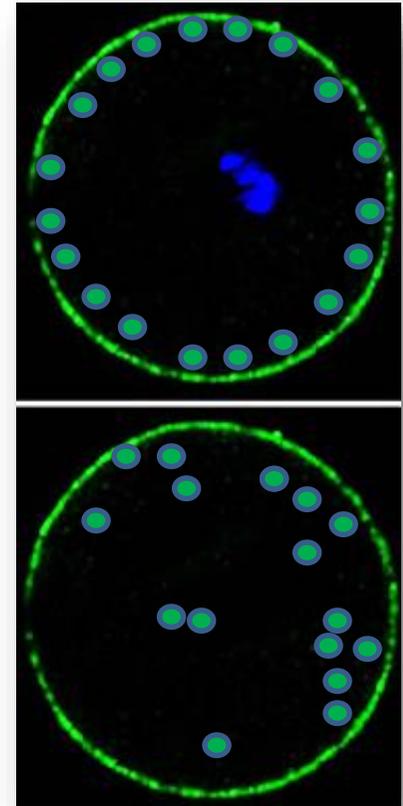
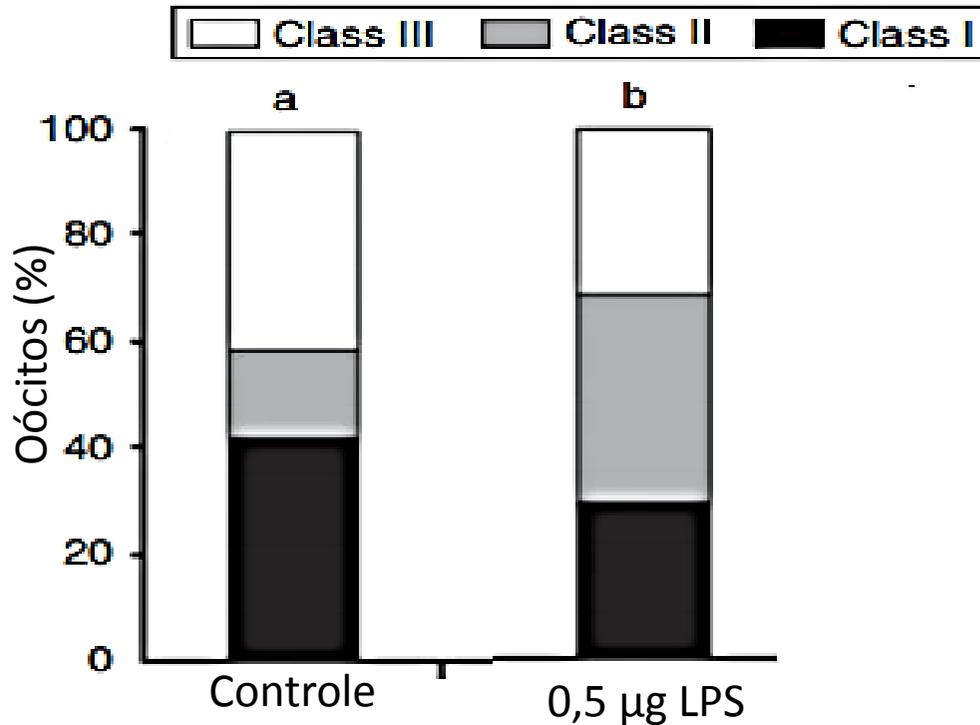


Ciclo celular



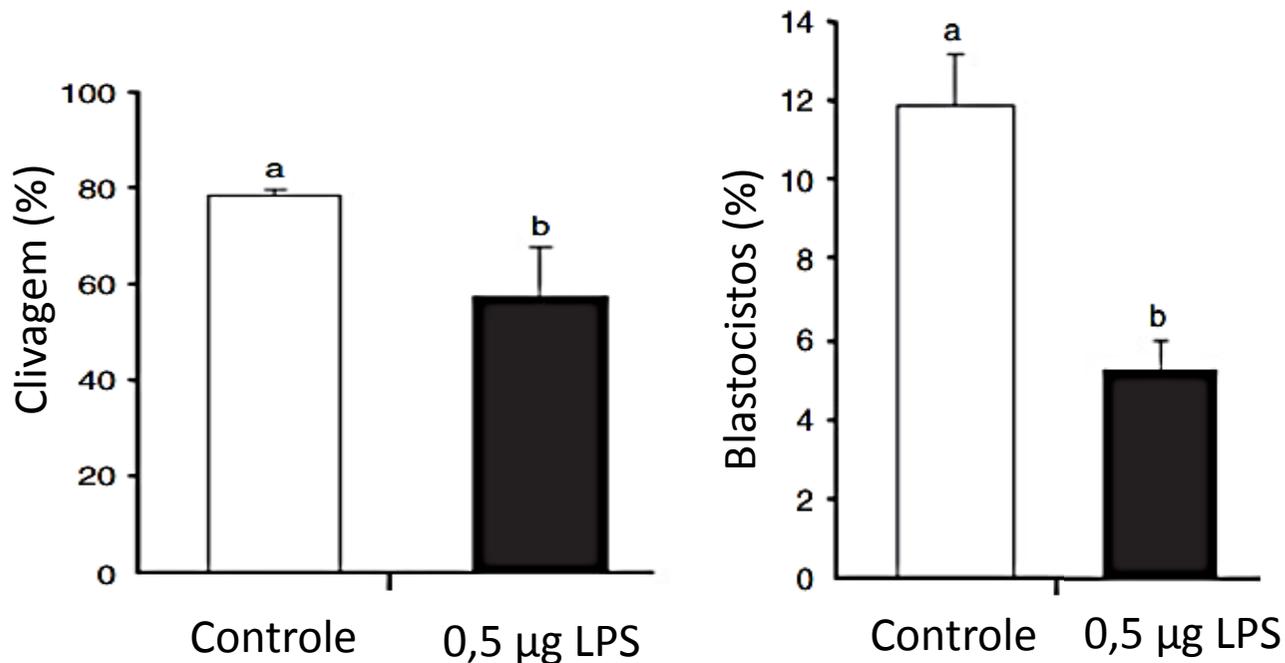
Ciclo celular de oócitos maturados *in vitro* em FF de vacas desafiadas ou não com LPS.

Grânulos corticais



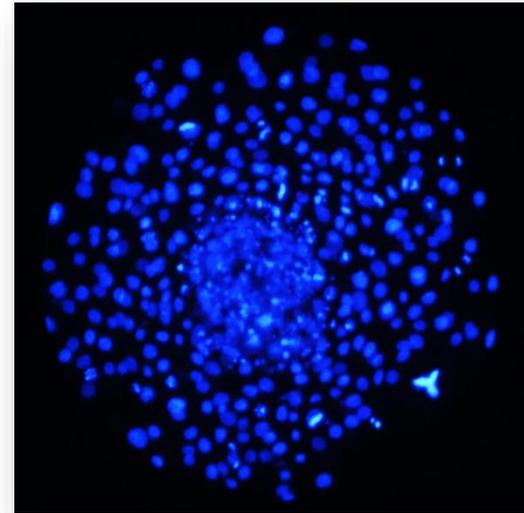
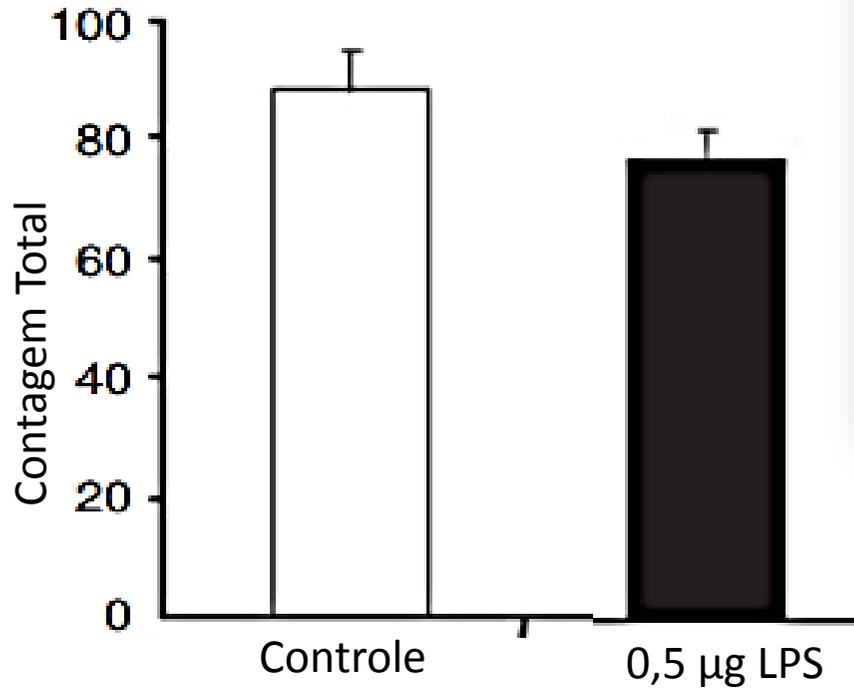
Classificação de oócitos maturados *in vitro* com FF de vacas desafiadas ou não com LPS.

Desenvolvimento embrionário



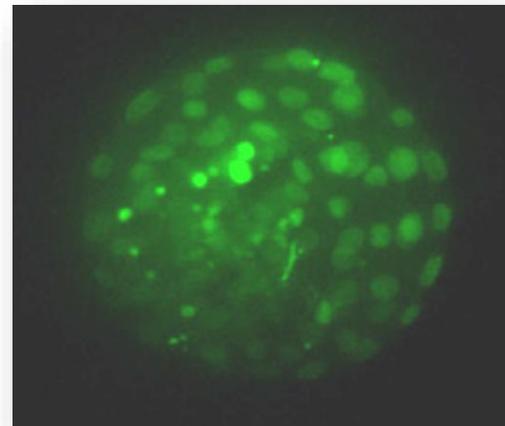
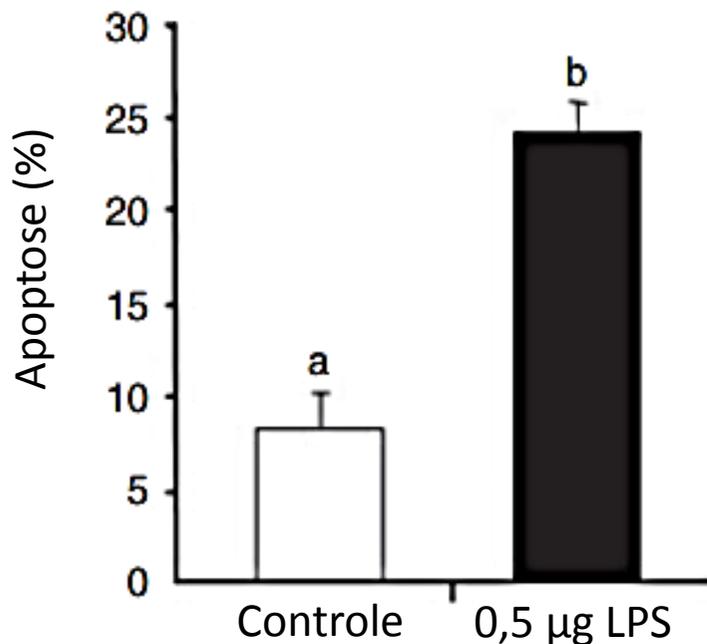
Taxa de clivagem (44h) e taxa de blastocisto (D8) proveniente de oócitos maturados *in vitro* em FF de vacas desafiadas ou não com LPS.

Contagem de Células



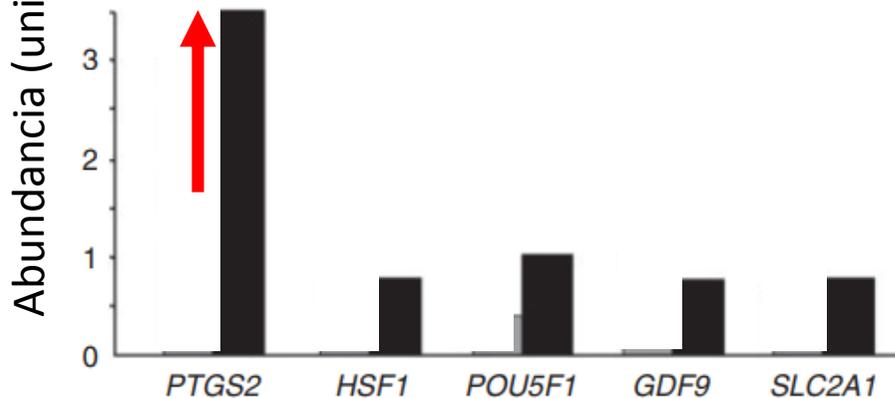
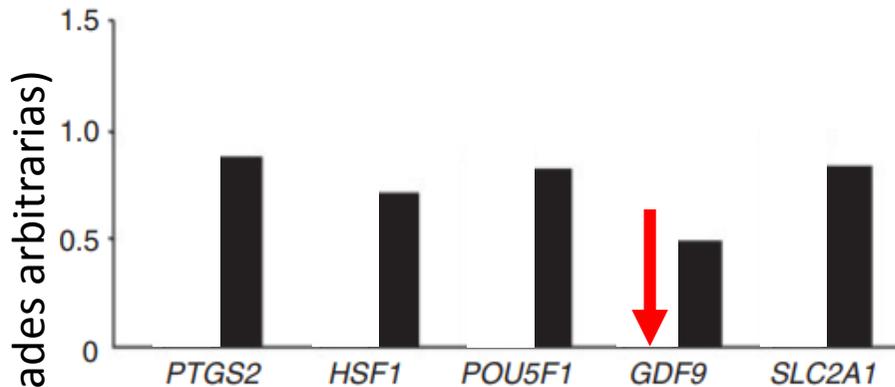
Contagem total de células de embriões (D8) provenientes de oócitos maturados *in vitro* em FF de vacas desafiadas ou não com LPS.

Apoptose



Taxa de apoptose de embriões (D8) provenientes de oócitos maturados *in vitro* em FF de vacas desafiadas ou não com LPS.

Expressão gênica



Expressão gênica em oócitos (22h MIV) e embriões (44h FIV)

provenientes de oócitos maturados em FF de vacas desafiadas com LPS

Conclusão: Artigo 1

LPS (0,5 μ g)

Mastite subclínica
(crônica)

- X** Distribuição de grânulos corticais
- ↓** Maturação
- ↓** Clivagem
- ↓** Desenvolvimento embrionário
- ↓** GDF9 (Oócitos)
- ↑** PTGS2 (Zigotos)

**↓ Desempenho reprodutivo
do rebanho leiteiro**

Experimento doutorado

PIVE

Objetivo

Avaliar os efeitos do LPS (Clínica vs subclínica) durante a maturação *in vitro* de oócitos sobre o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos.



Experimento doutorado

PIVE

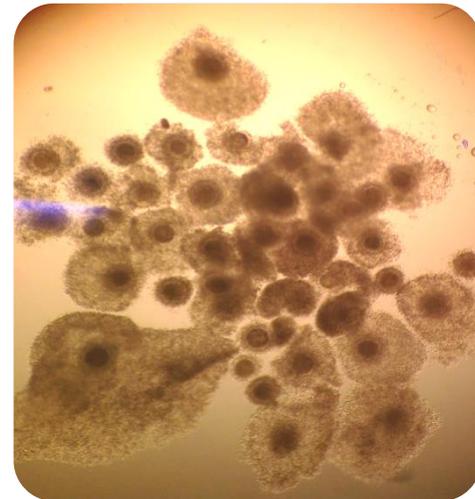
Aspiração
folicular



Aspiração



Busca



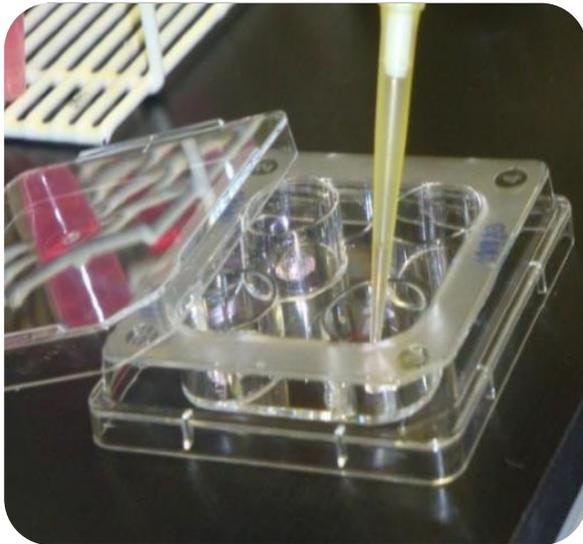
Seleção

Experimento doutorado

PIVE

Aspiração
folicular

MIV



Clínica: 0,005- 0,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Subclínica 0 – 0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$

| LPS ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Oócitos |
|---------------------------------|---------|
| 0,0 | 50 |
| 0,1 | 50 |
| 1 | 50 |
| 5 | 50 |

LPS (SIGMA)

9 repetições (Total: 1800 COCs)

Experimento doutorado

PIVE

Aspiração
folicular

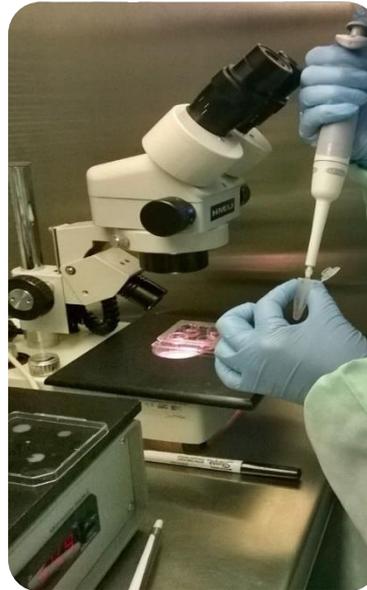
MIV

FIV

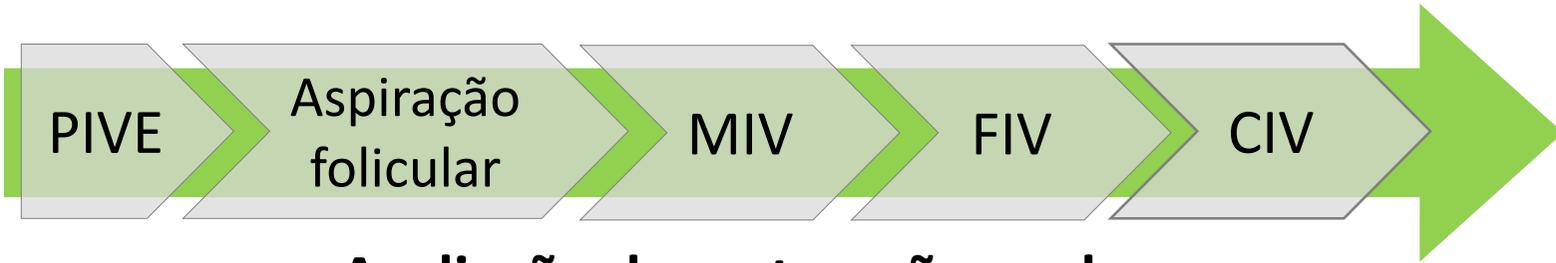
CIV

Inseminação:

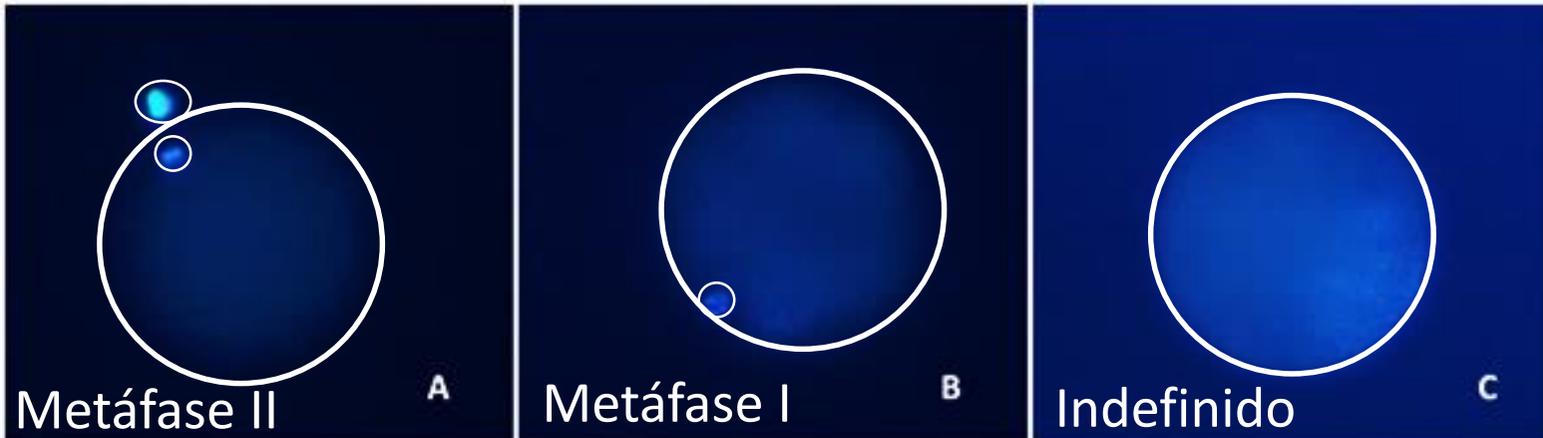
- 18-20 hs (dia 0)
- Desnudamento
- 7 dias: 5% de CO₂ e 39 °C
- D3: taxa de clivagem
- D7: Taxa de Blastocisto



Experimento doutorado



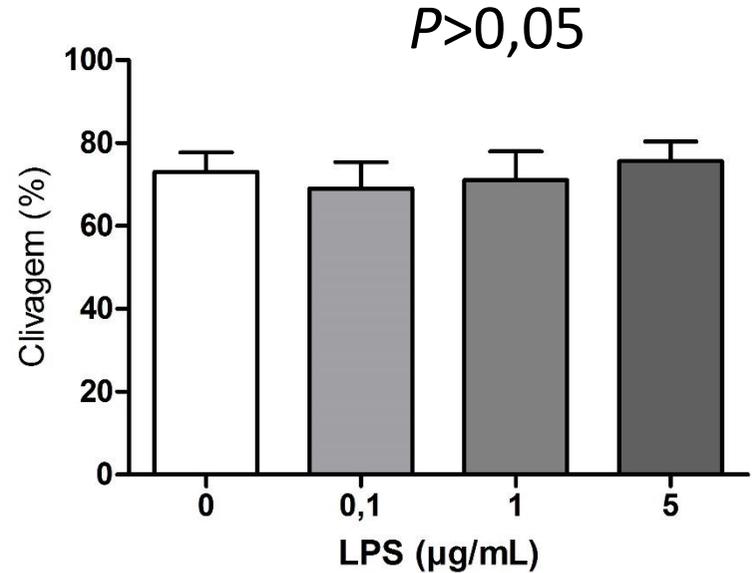
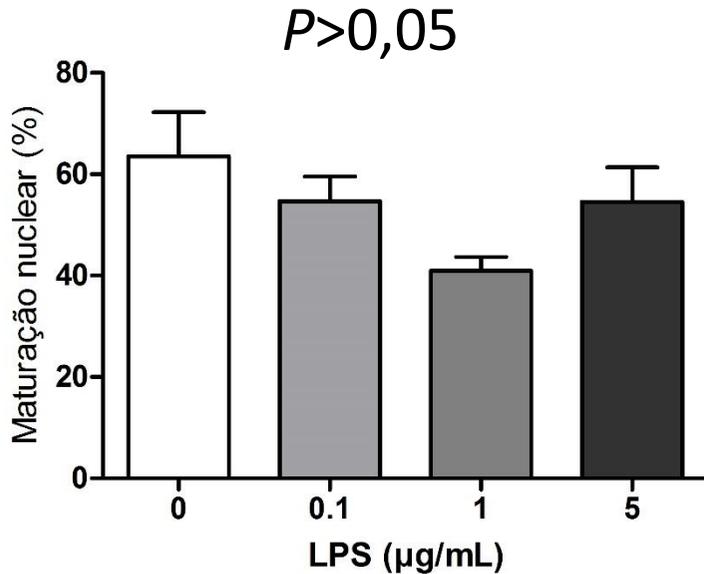
Avaliação da maturação nuclear



➤ Hoechst 33342

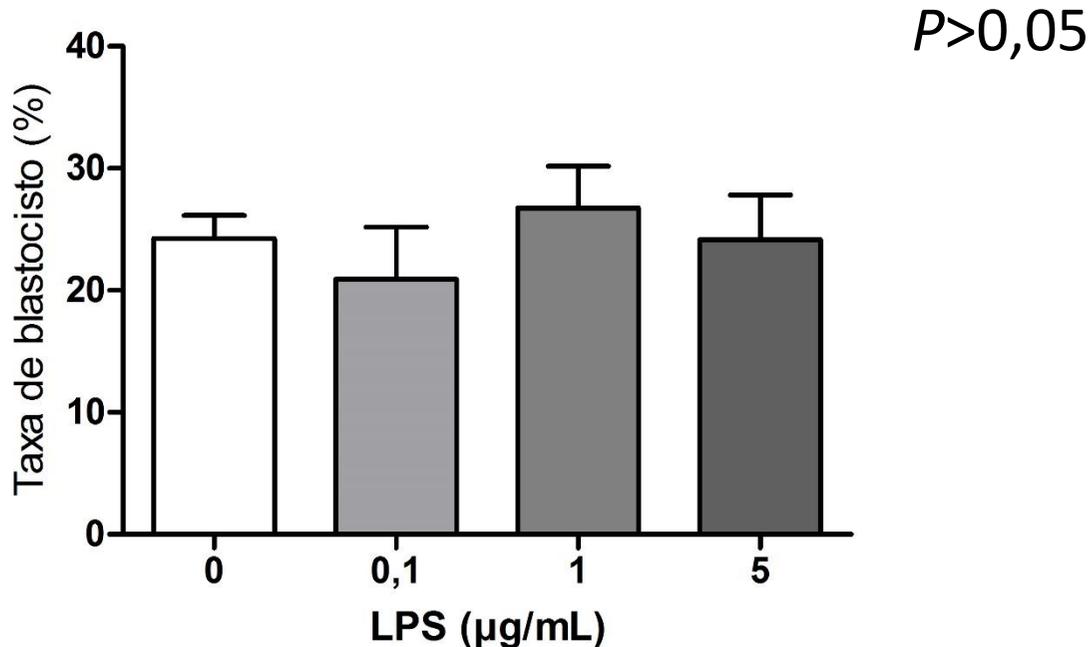
➤ 3 repetições (Total: 600 COCs)

Resultados Exp. Doutorado



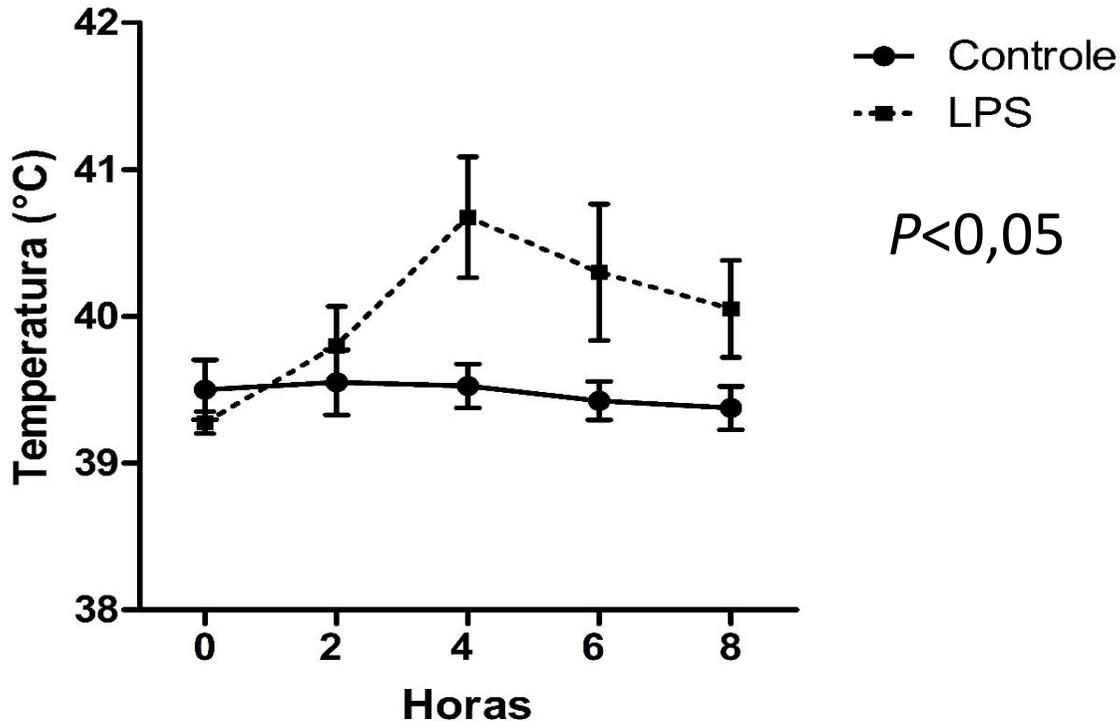
Taxa de maturação nuclear (22h) e taxa de clivagem (D3) de oócitos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de LPS.

Resultados Exp. Doutorado



Taxa de blastocisto (blastocistos / inseminados) em D7 de oócitos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de LPS durante 22 h.

Resultados Exp. Doutorado



Temperatura retal (°C) de ovelhas desafiadas com LPS IV (2,5µg/Kg de peso vivo) ou com solução salina IV (2mL/animal).

Artigo 2



www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 3), pp: 4656-4667

Research Paper

Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte *in vitro* and its possible mechanisms

Shan-Jiang Zhao^{1,*}, Yun-Wei Pang^{1,*}, Xue-Ming Zhao¹, Wei-Hua Du¹, Hai-Sheng Hao¹, Hua-Bin Zhu¹

¹Embryo Biotechnology and Reproduction Laboratory, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Hua-Bin Zhu, email: zhuhuabin@caas.cn



Fator de impacto da revista: 5.168

Objetivo

Efeitos do LPS na maturação oocitária de bovinos *in vitro*.

Possíveis mecanismos envolvidos:

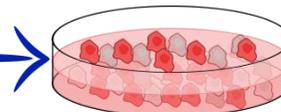
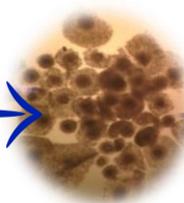
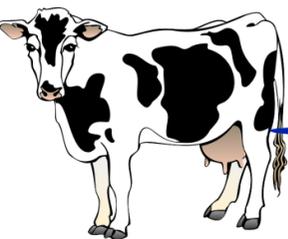
- Dinâmica estrutural do citoesqueleto;
- Estresse oxidativo;
- Modificações epigenéticas.

Metodologia

Aspiração
folicular

MIV

Análises



1 $\mu\text{g/ml}$
10 $\mu\text{g/ml}$



Tratamento com LPS

Metodologia

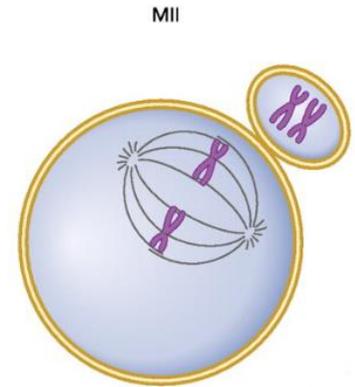
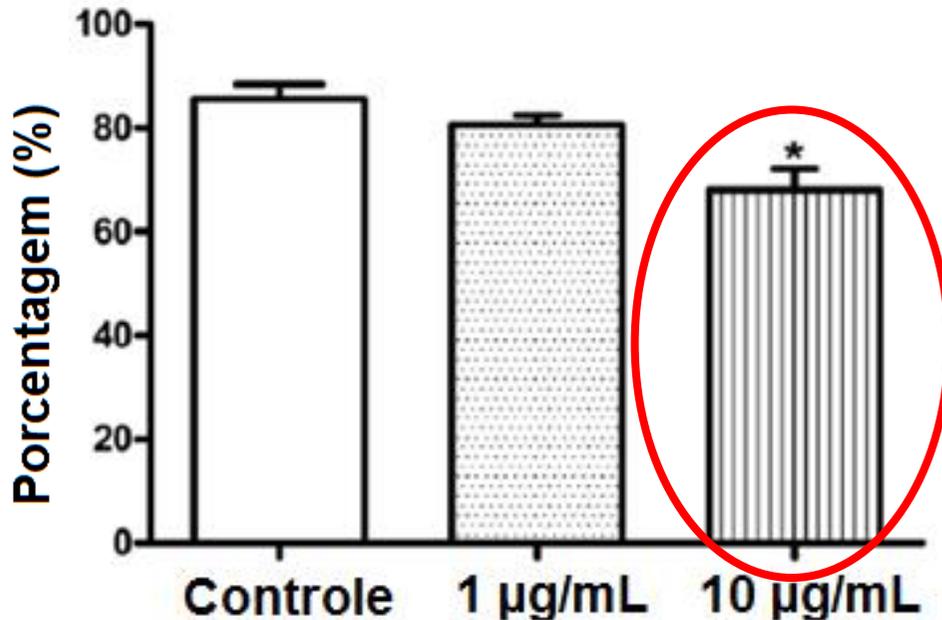
Análises estatísticas

- Análise de variância (ANOVA)
- Teste de Duncan
- Valores = média \pm erro padrão
- $P < 0,05$ diferença significativa

Parâmetros e análises avaliadas

(Metodologias e resultados)

Maturação Nuclear



Oócitos desnudados.
Microscopia confocal.

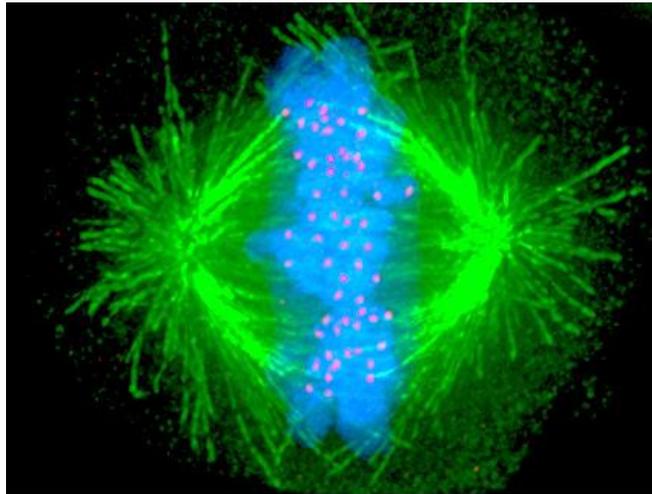
Taxa de extrusão do corpúsculo polar de oócitos bovinos maturados *in vitro* com concentrações de 1 ou 10 µg/ml de LPS.
n= 901 COCs

Ciclo celular (22h)

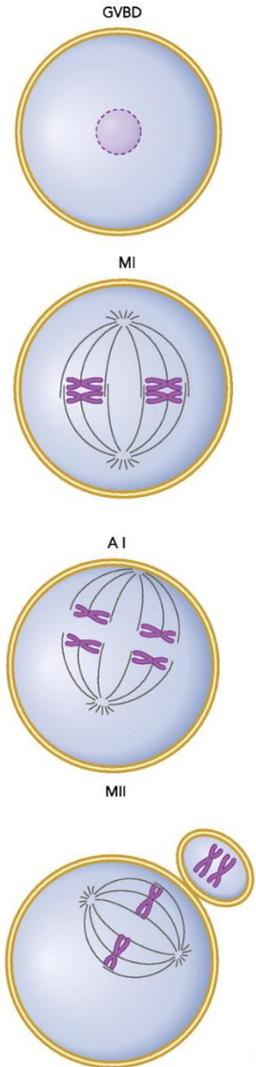
Análise citoquímica:

Tubulina: FITC

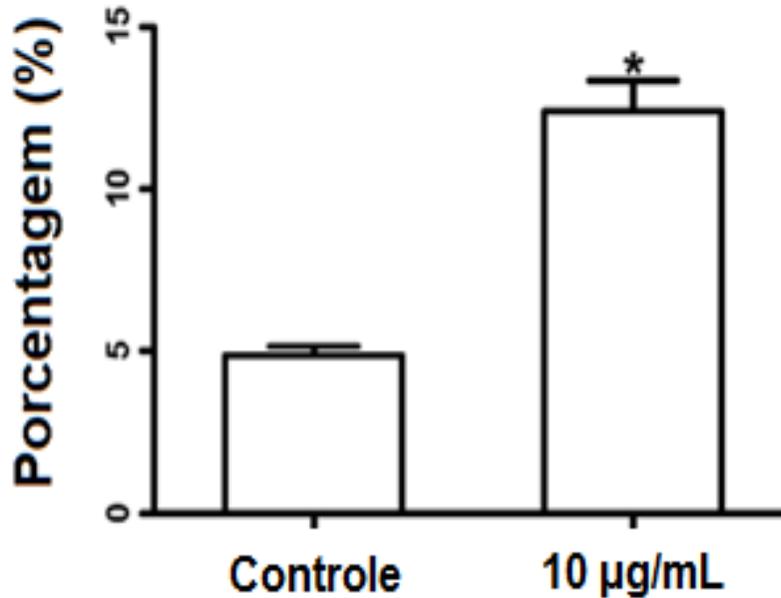
Cromatina: DAPI



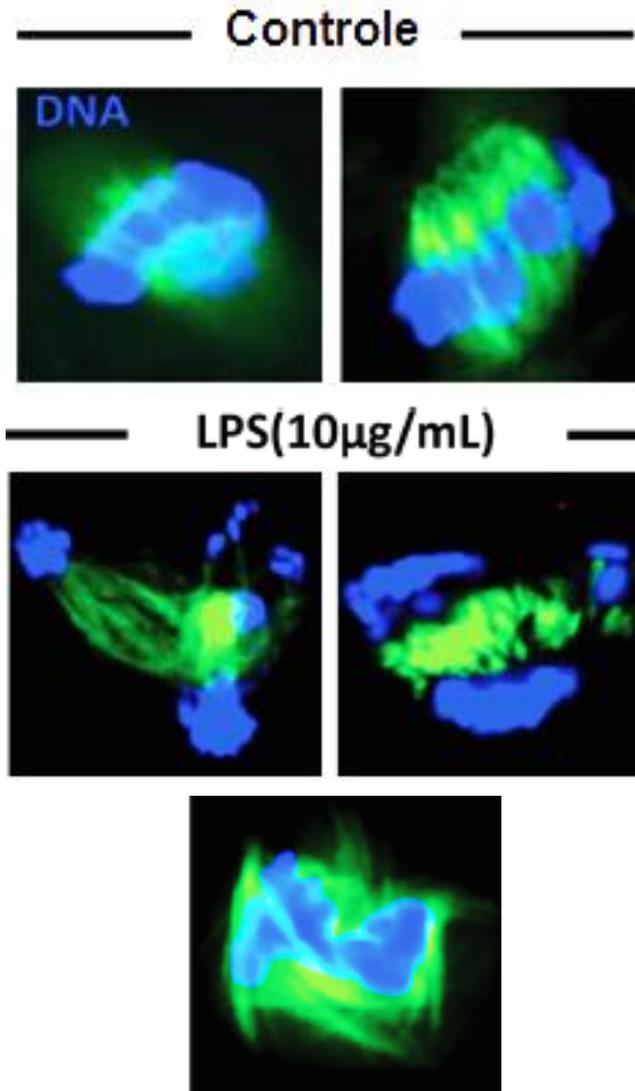
Ciclo celular de oócitos bovinos maturados *in vitro* com 0 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. $n = 258$ COCs (3 repetições).



Ciclo celular (22h)

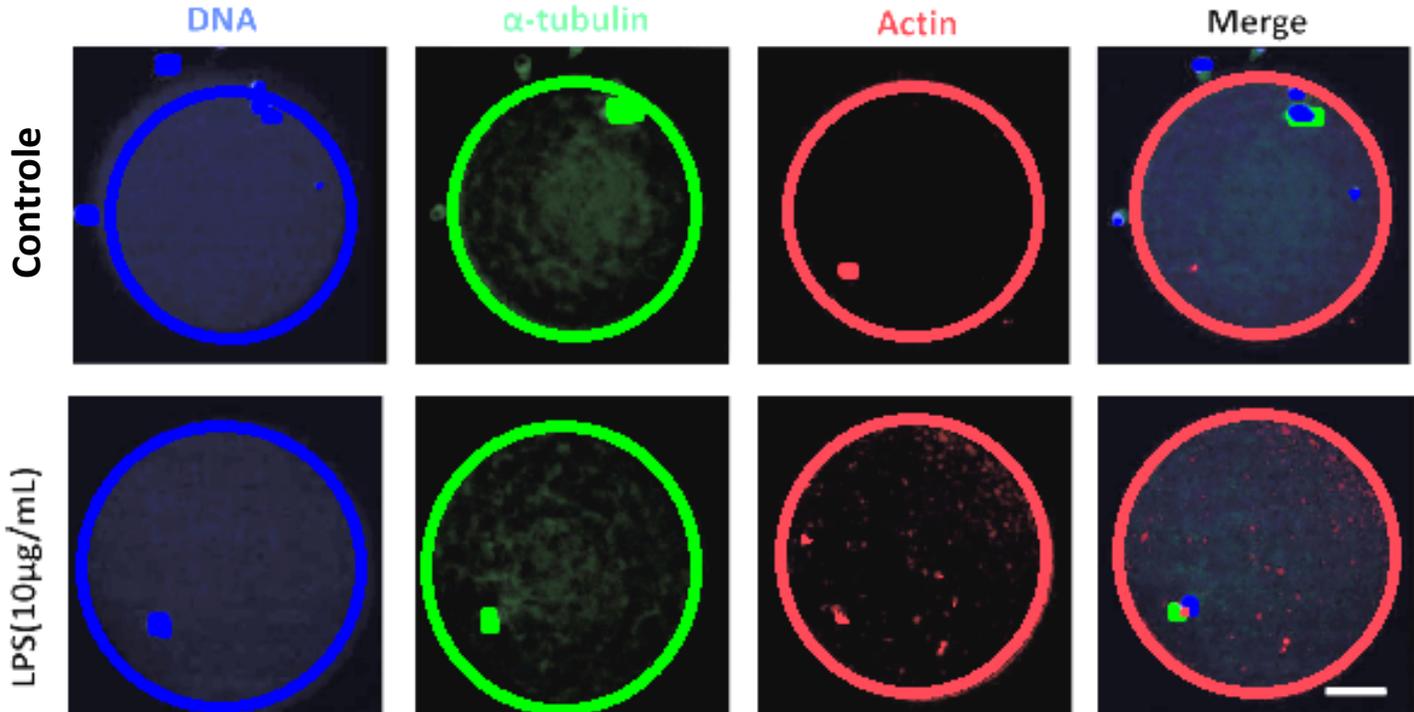


Taxa de fuso anormal de oócitos bovinhos em MI maturados *in vitro* com 0 ou 10 µg/ml. de LPS $n = 267$ COCs (3 repetições)



Ciclo celular (22h)

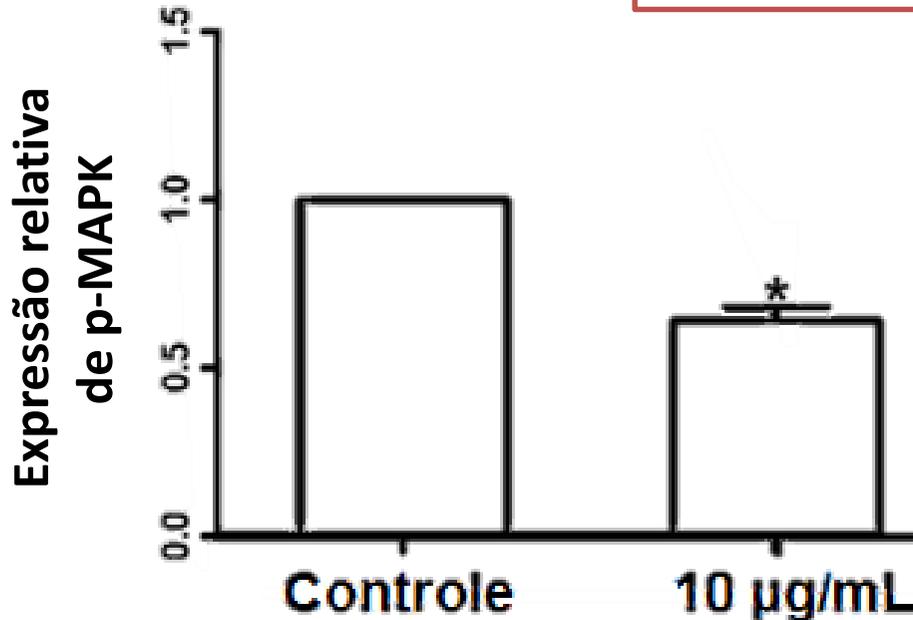
Actina: phalloidin-TRITC



Observações na montagem da Actina de oócitos bovinos maturados *in vitro* com 0 ou 10 μ g/ml de LPS. n = 10- 15 COCs /grupo (3 repetições)

Ciclo celular (22h)

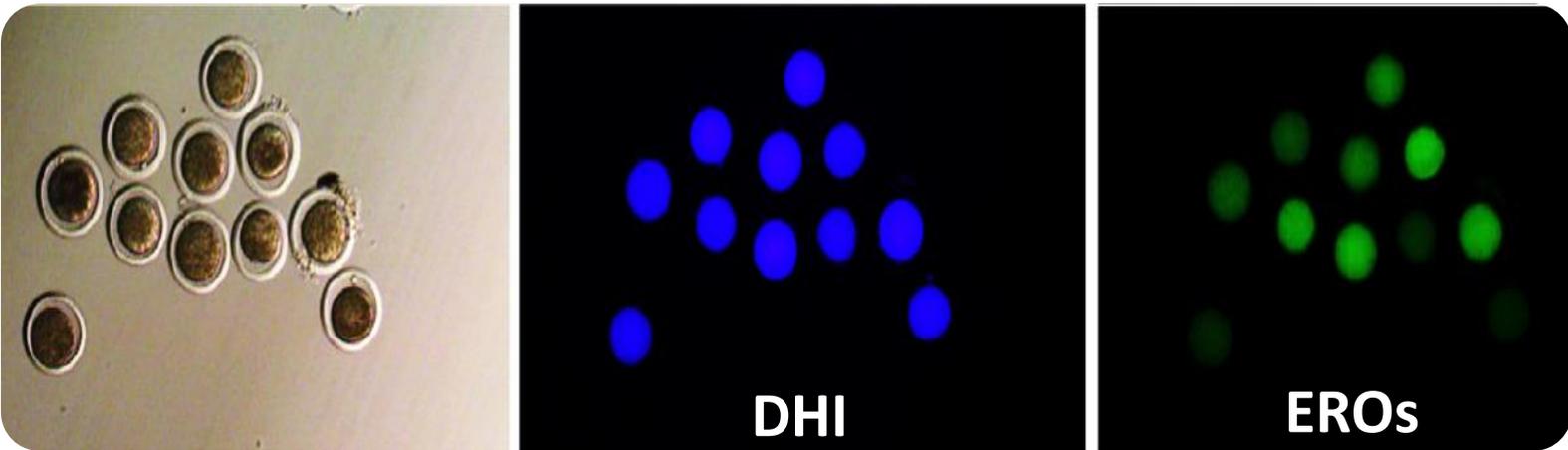
Western blot: 150 oócitos (MI)



Nível da proteína quinase ativada por mitogenos (p-MAPK) em oócitos bovinos maturados *in vitro* com 0 ou 10 µg/ml de LPS.

Estresse oxidativo

Geração de compostos oxidantes X
Atuação dos sistemas de defesa antioxidante

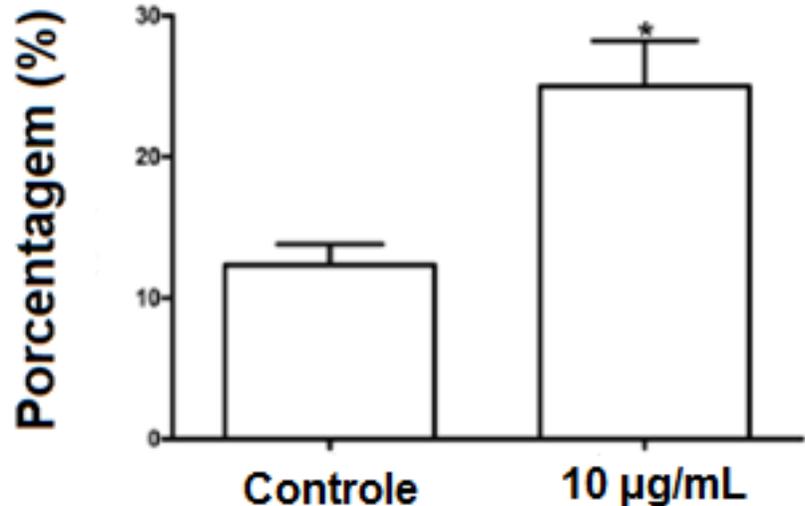


Mensuração dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) e dihidroetídio intracelular (DHI) de oócitos bovinos maturados *in vitro* com 0 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. $n = 10-15$ COCs /grupo (3 repetições).

Estresse oxidativo

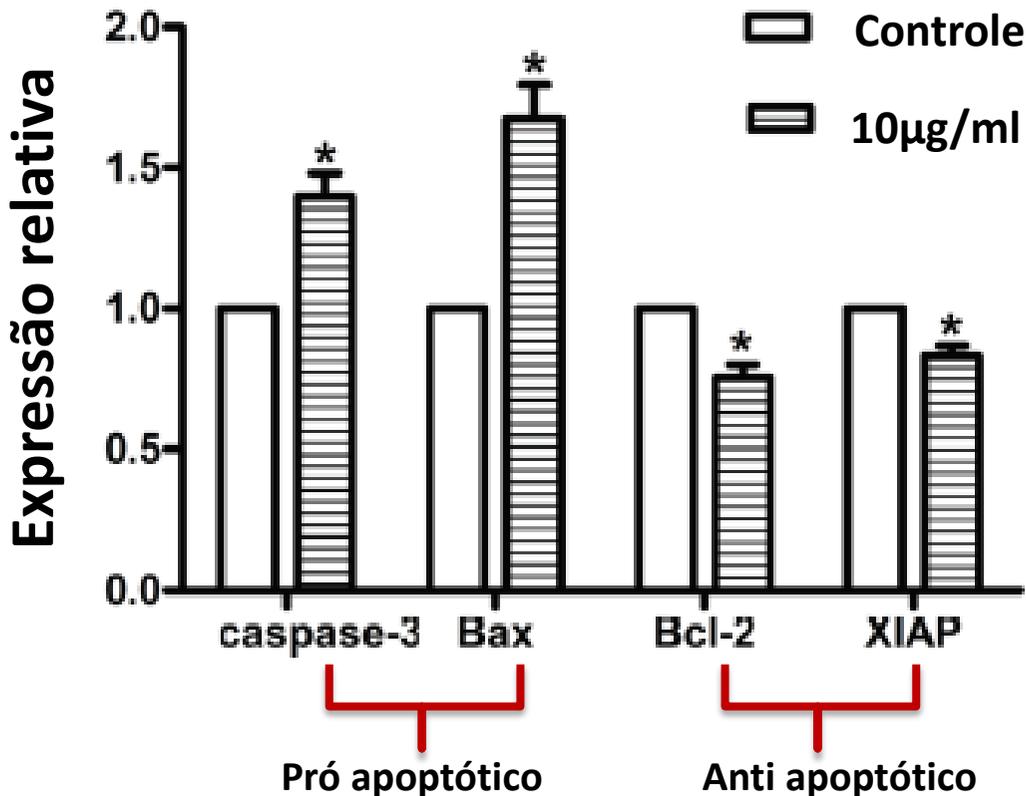
FITC Annexin – V
Fosfatidilserina (PS)

Taxa de apoptose



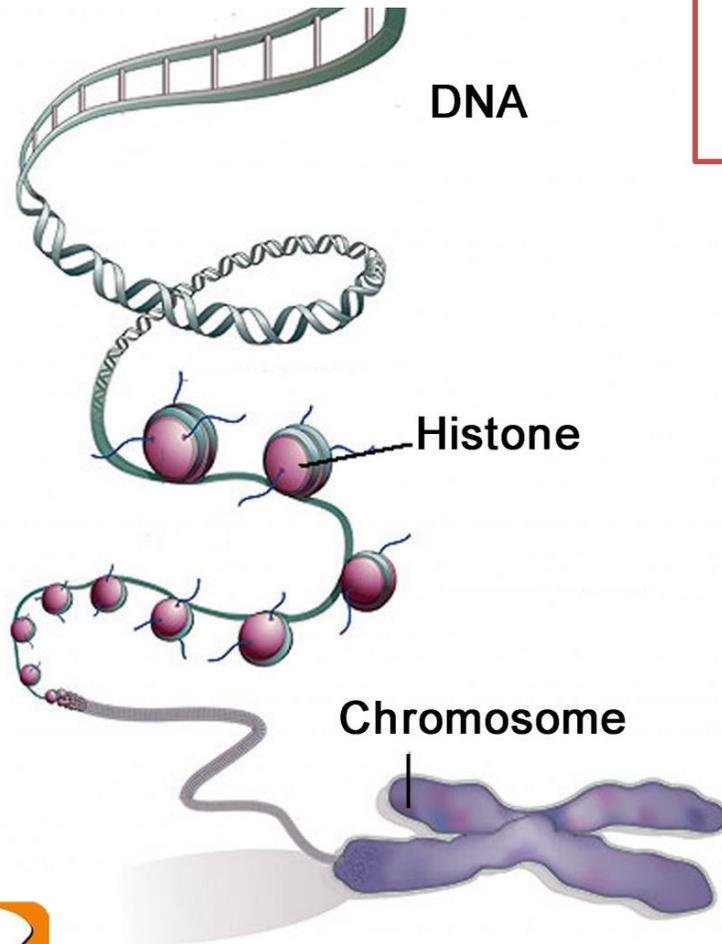
Taxa de apoptose de óocitos bovinos maturados *in vitro* com 0 ou 10 µg/ml de LPS. $n = 83$ COCs (3 repetições).

Estresse oxidativo



Avaliação da expressão gênica de oócitos bovinos maturados *in vitro* com 0 ou 10 µg/ml de LPS durante 12 h , através de PCR real time. $n = 100$ oócitos.

Epigenética



Mudanças na expressão de genes que não alteram a sequência do DNA.

Gene ativo X Gene inativo

Metilação do DNA.

Modificações nas Histonas:

- Metilação;
- fosforilação;
- Acetilação.

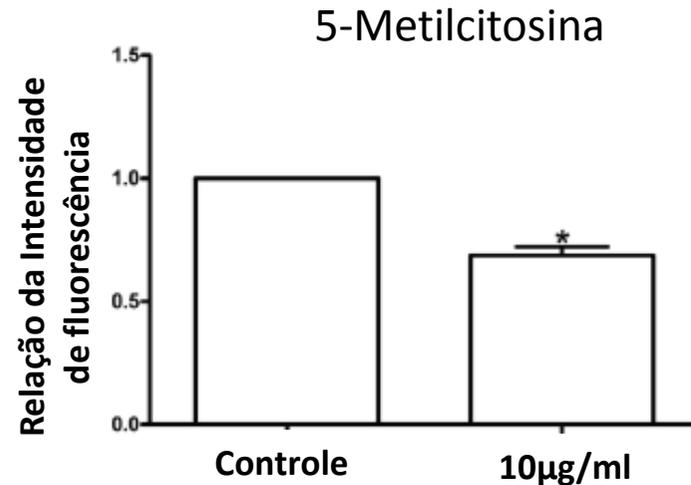
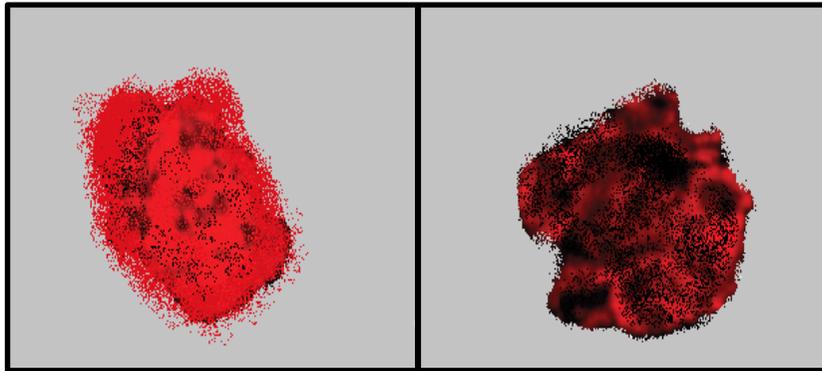


Epigenética

Cromatina: DAPI

Controle

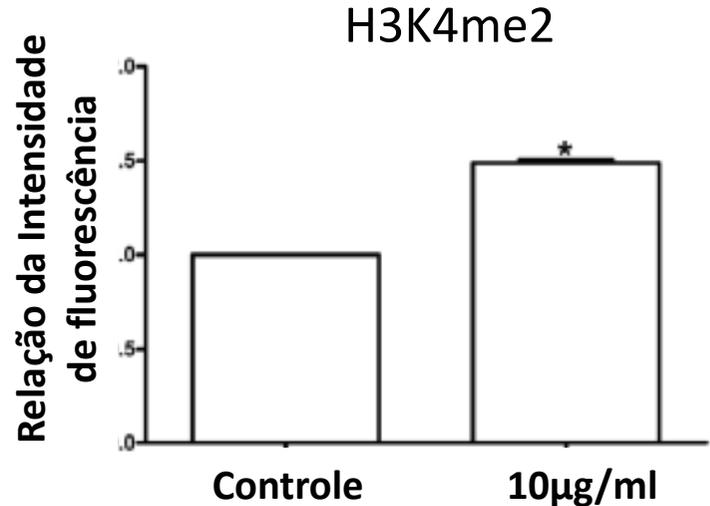
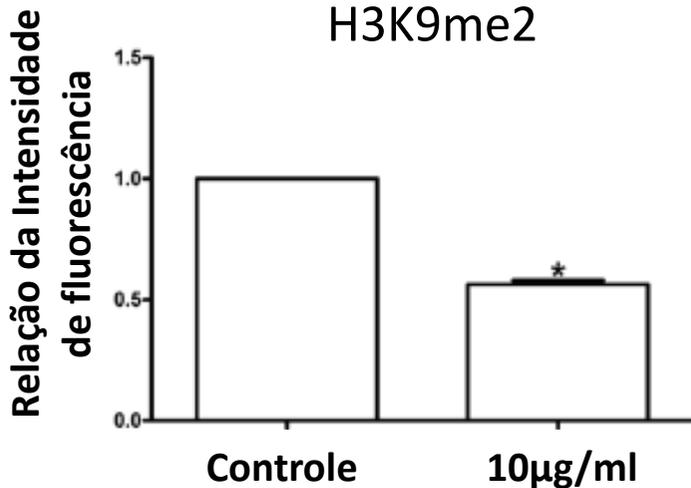
10 μ g/ml



Níveis de metilação global de DNA (5mC) em oócitos bovinos maturados *in vitro* com 0 ou 10 μ g/ml. $n = 10-15$ COCs/grupo (3 repetições).

Epigenética

Cromatina: DAPI
Anticorpo H3K9me2
Anticorpo H3K4me2



Níveis de metilação global de H3K9 (H3K9me2) e H3K4 (H3K4me2) em oócitos bovinos maturados *in vitro* com 0 ou 10 µg/ml de LPS. $n = 10-15$ COCs/grupo (3 repetições).

Conclusão: Artigo 2

LPS (10 μ g/mL) MIV:

- ↓ Ciclo celular;
- ↑ Deformação na estrutura do fuso meiótico;
- ↑ Estresse oxidativo e apoptose;
- ↑ Alterações epigenéticas.

Conclusões Painel Temático

LPS

- 1) Maturação oocitária:
 - Extrusão CP e fuso meiótico (Ciclo celular)
 - Estresse oxidativo e apoptose
 - Expressão gênica
 - Epigenética
- 2) Desenvolvimento embrionário inicial
 - Clivagem
 - Expressão gênica

CIV?

**Dose de LPS
in vitro?**

**Concentração de LPS FF
(subclínica vs clínica)**



Universidade Federal de Pelotas
Faculdade De Veterinária
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária
www.ufpel.edu.br/nupeec



Perguntas?

OBRIGADO!

