



Universidade Federal de Pelotas
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



**Suplementação com cisteamina durante a
maturação *in vitro* de oócitos bovinos obtidos
de abatedouros ou através de aspiração
oocitária derivada melhora o desenvolvimento
embrionário sem afetar a criotolerância, taxa
de prenhez e características do bezerro**

Letícia Collares

Orientador: Márcio Nunes Corrêa

Pelotas, 30 de Agosto

Produção *in vitro* de embriões



Multiplicação de animais de alto mérito genético

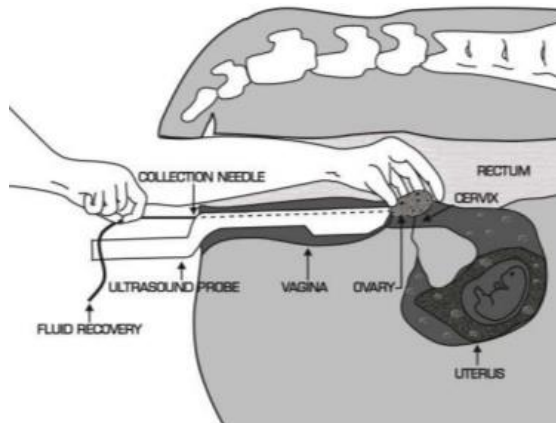


VANTAGENS:

- Não é necessário a utilização de protocolos hormonais nas doadoras;
- Menor intervalo entre gerações;
- Acasalamentos mais eficientes.

Etapas da PIV

Coleta dos oócitos



Ovum pick up-
OPU



Aspiração ovários
abatedouro

Maturação *in vitro*



Fecundação *in vitro*



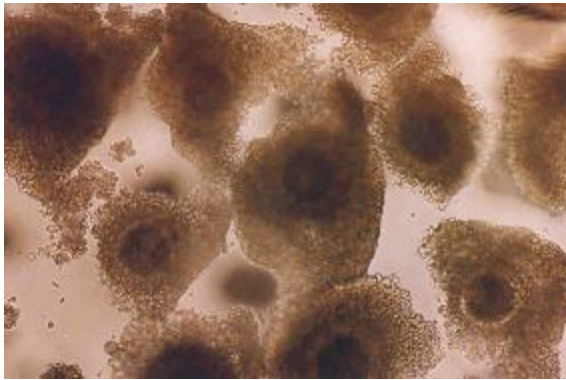
Cultivo
embrionário



Transferência ou
criopreservação

Maturação *in vitro*

✓ Seleção dos oócitos



✓ Meio de maturação

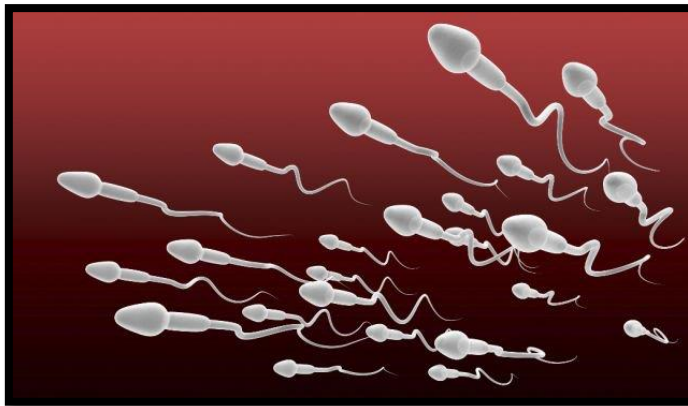


Retomada da meiose
Maturação citoplasmática
Maturação molecular

22-24 horas

Fertilização *in vitro*

✓ Preparação espermática



- Separação das células mortas;
- Separação do crioprotetor;
- Promover a capacitação espermática.

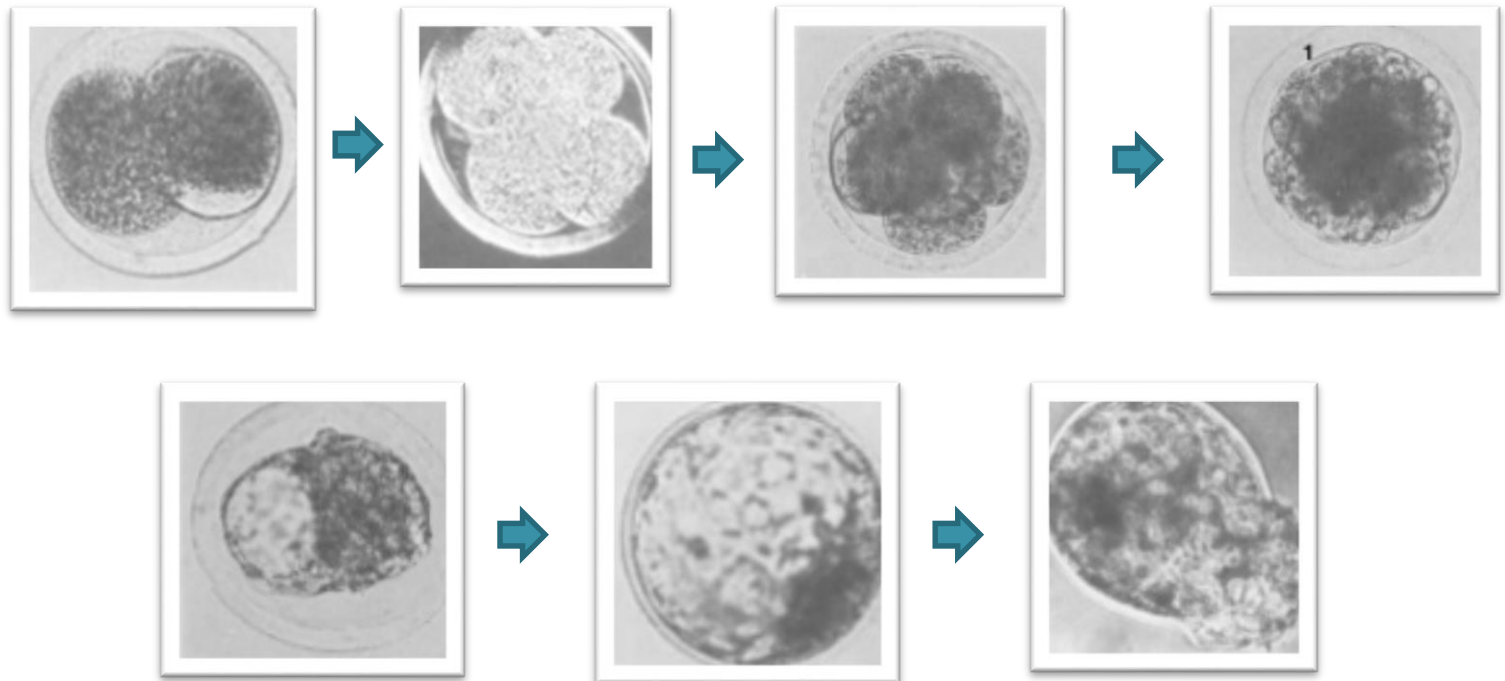
18-22 horas

1×10^6 sptz/mL

Bloqueio cortical para evitar polispermia

Cultivo *in vitro*

- Cultivo por 7 dias



Transferência ou Criopreservação

- Receptoras após 6-7 dias do cio



- Vitriificação



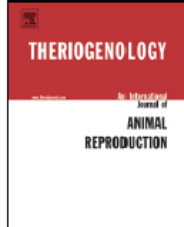


ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com



Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics

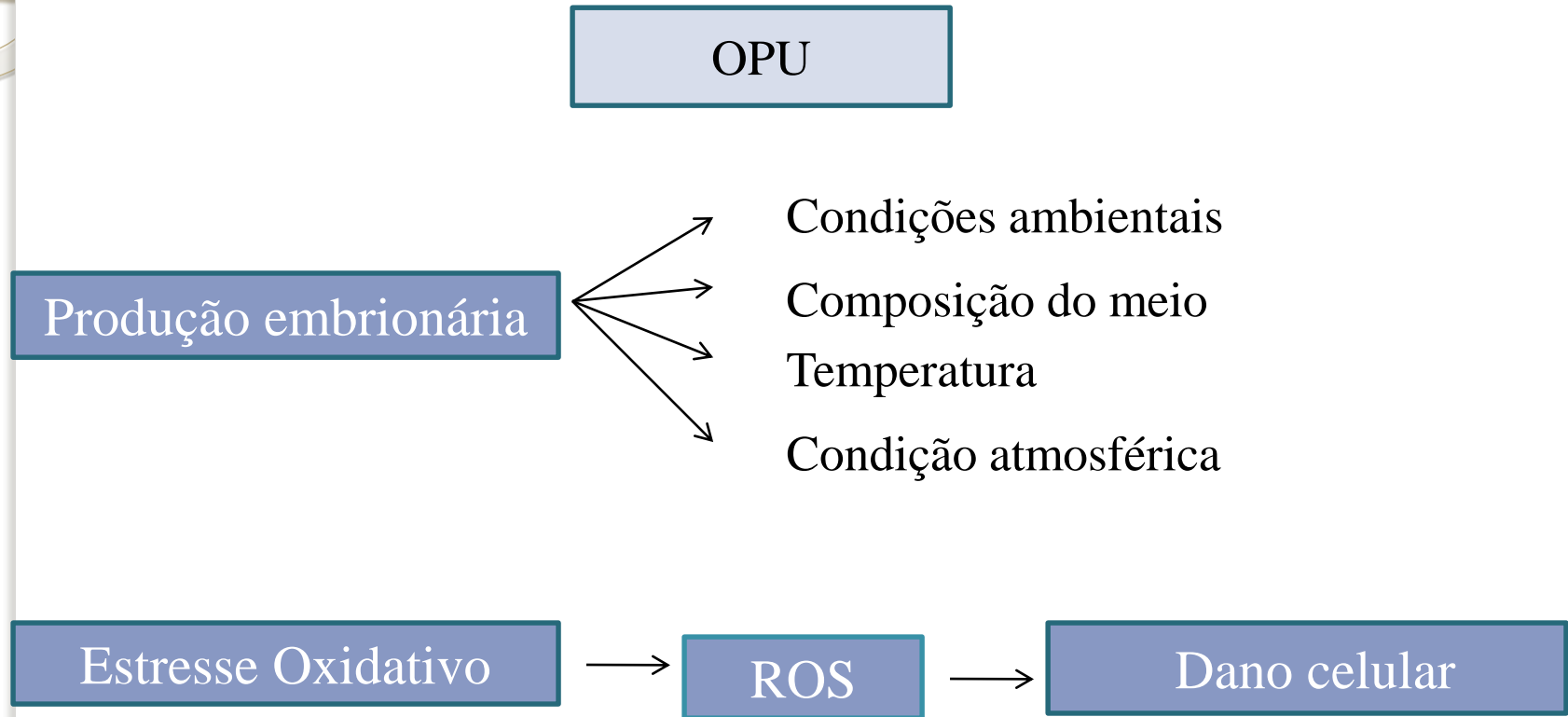
J.S. Merton ^{a,*}, H.M. Knijn ^b, H. Flapper ^a, F. Dotinga ^a, B.A.J. Roelen ^b, P.L.A.M. Vos ^b, E. Mullaart ^a

^a CRV BV, 6800 AL Arnhem, The Netherlands

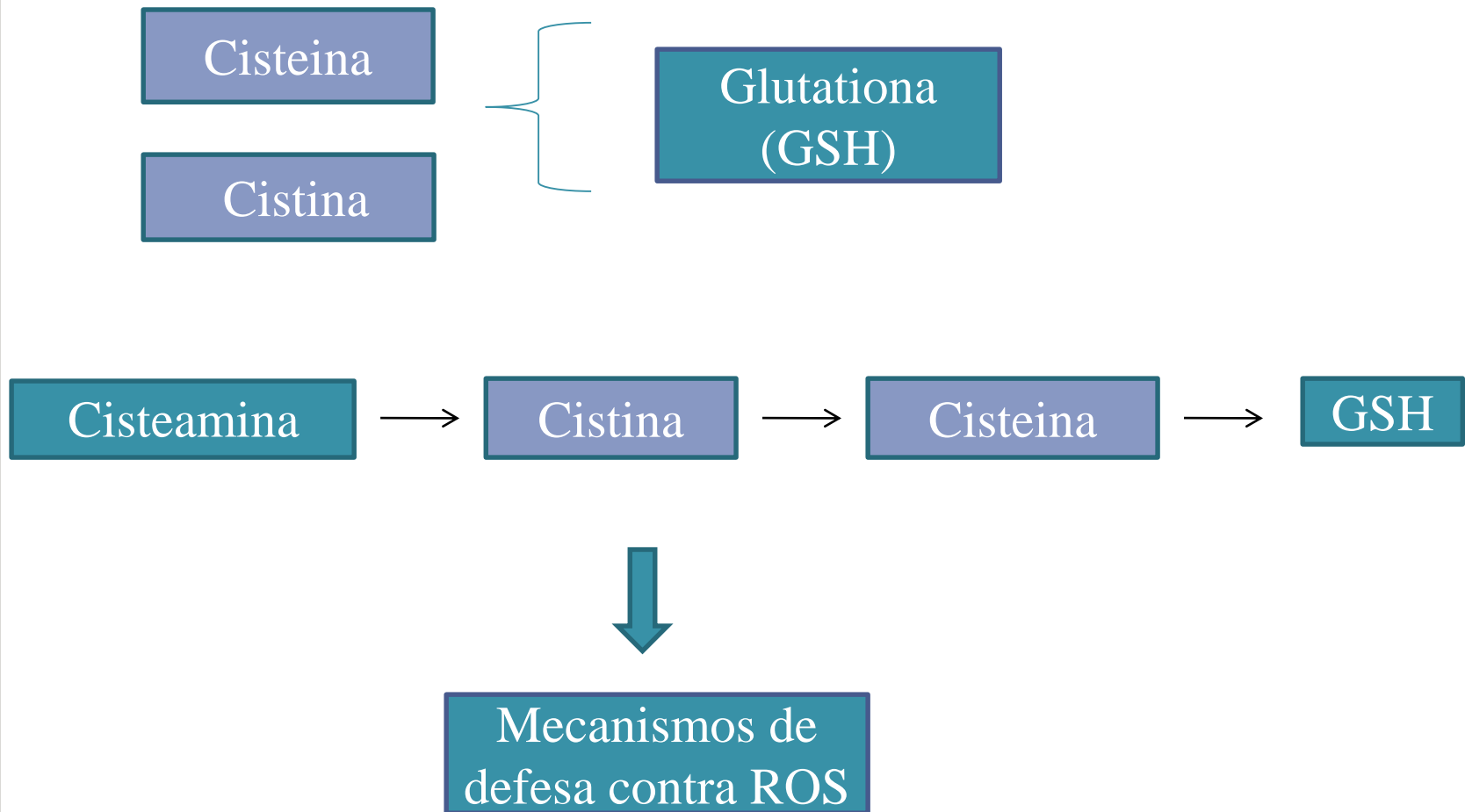
^b Department of Farm Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Yalelaan 7, 3584 CL Utrecht, The Netherlands

Ano de publicação: 2013
Fl: 1.845

Introdução

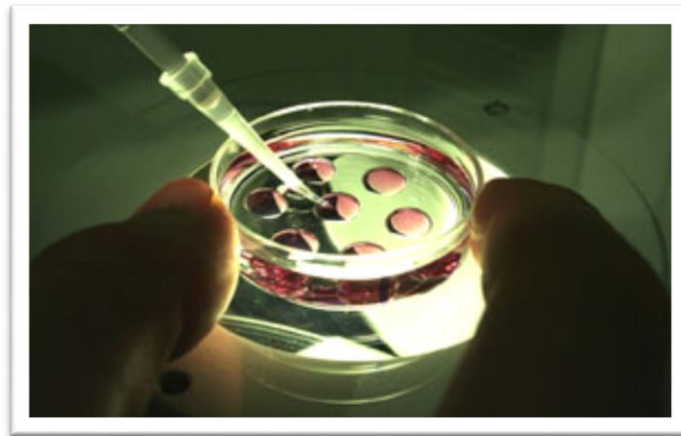


Introdução



Introdução

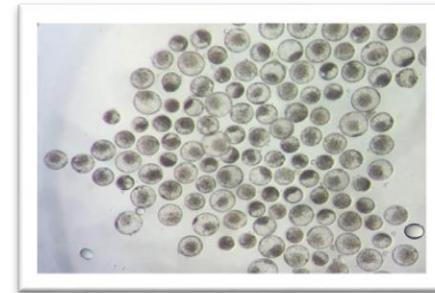
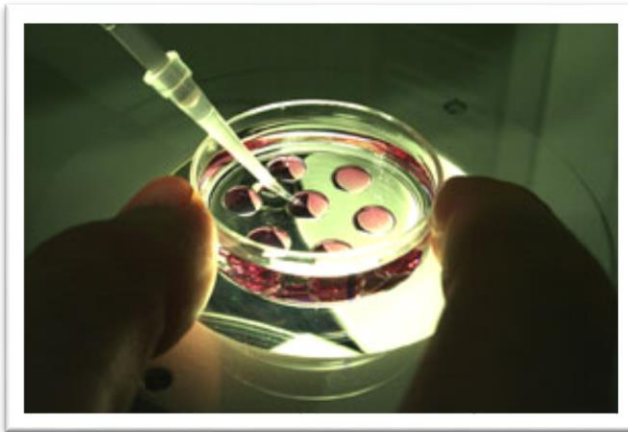
Adição de antioxidantes → Meio MIV



Efeito benéfico da Cisteamina no meio MIV sobre a produção embrionária em oócitos de abatedouros.

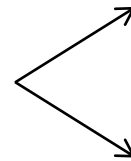
Objetivo

- Cisteamina \Rightarrow Maturação e cultura *in vitro*



Material e Métodos

⇒ Aspiração oocitária



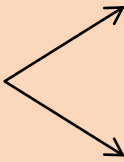
⇒ Avaliação das características dos bezerros

Material e Métodos

Experimento I:

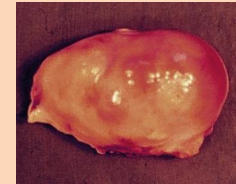


Maturação *in vitro*



0,1 mM cisteamina

Controle



Dia 07 os embriões correspondentes aos graus 1 e 2 (fase 6 e 7) foram congelados e descongelados 24 avaliaram reexpansão, depois onde foram incubados por 72 horas e avaliaram eclosão.

Resultados

Table 1
Effect of cysteamine during IVM of slaughterhouse-derived oocytes on subsequent *in vitro* embryonic development.

Group	Oocytes, ^c n	Cleavage, n (%)	Embryos at Day 7, n (%)			Relative increase
			Morulae	Blastocysts	Total	
Control	1056	586 (55.5) ^a	81 (7.7) ^a	124 (11.7) ^a	205 (19.4) ^a	
Cysteamine	1070	634 (59.3) ^a	79 (7.4) ^a	178 (16.6) ^b	257 (24.0) ^b	24%

^{a,b} Values in columns with different superscript are significantly different, $P < 0.05$.

^c Number of equally balanced replicates: 5.

Resultados

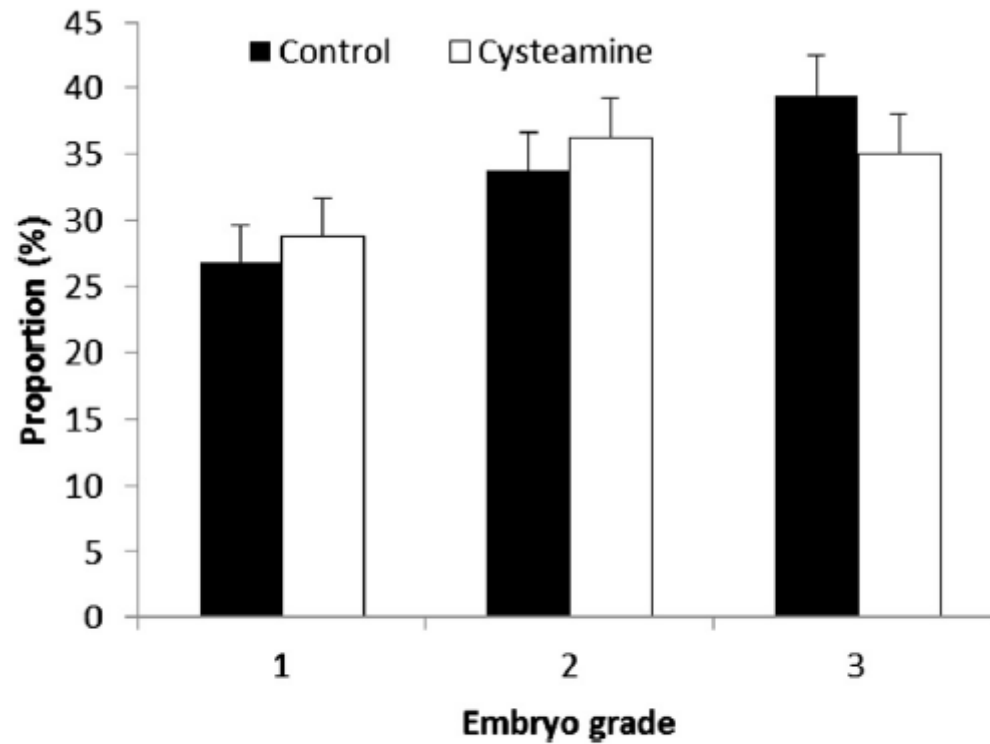


Fig. 1. Effect of cysteamine during IVM of slaughterhouse-derived oocytes on the distribution of embryo quality grades (mean percentage \pm SE; number of equally balanced replicates: 5).

Resultados

Table 2

Effect of cysteamine during IVM of slaughterhouse-derived oocytes on post-thaw *in vitro* survival of frozen *in vitro*-produced blastocysts.

Embryo grade	(% Reexpansion, 24 h)		(% Hatching/hatched, 72 h)	
	Control	Cysteamine	Control	Cysteamine
1	38/46 (83) ^a	56/63 (89) ^a	17/46 (37) ^a	28/63 (44) ^a
2	36/41 (88) ^a	52/56 (93) ^a	12/41 (29) ^a	12/56 (21) ^a
Total	74/87 (85) ^a	108/119 (91) ^a	29/87 (33) ^a	40/119 (34) ^a

^{a,b} Values in rows with different superscript are significantly different, $P < 0.05$.

Material e Métodos

Experimento II:

⇒ Maturação in vitro → 0,1 mM cisteamina → 7 dias

⇒ Cultivo in vitro

- Controle
- 0,1 mM cisteamina
- 0,05 mM cisteamina → 1 à 4 dias
- 0,01 mM cisteamina

⇒ Os embriões foram avaliados quanto a fase e o grau de desenvolvimento nos dias 7 e 8.

Resultados

Table 3

Effect of cysteamine during IVM (0.1 mM) and IVC (0, 0.1, 0.05, and 0.01 mM) during Days 1 to 4 of slaughterhouse-derived oocytes on *in vitro* embryonic development.

Treatment IVM/IVC	Oocytes, ^d n	Cleavage, n (%)	Embryos at Day 8, n (%)
0.1/0 (control)	356	197 (53.3) ^d	94 (26.4) ^a
0.1/0.01	357	179 (50.1) ^a	66 (18.4) ^{b,c}
0.1/0.05	357	191 (52.4) ^a	69 (19.3) ^b
0.1/0.1	357	197 (53.5) ^a	47 (13.2) ^c

^{a,b,c} Values in columns with different superscript are significantly different, $P < 0.05$.

^d Number of equally balanced replicates: 3.

Resultados

Table 3

Effect of cysteamine during IVM (0.1 mM) and IVC (0, 0.1, 0.05, and 0.01 mM) during Days 1 to 4 of slaughterhouse-derived oocytes on *in vitro* embryonic development.

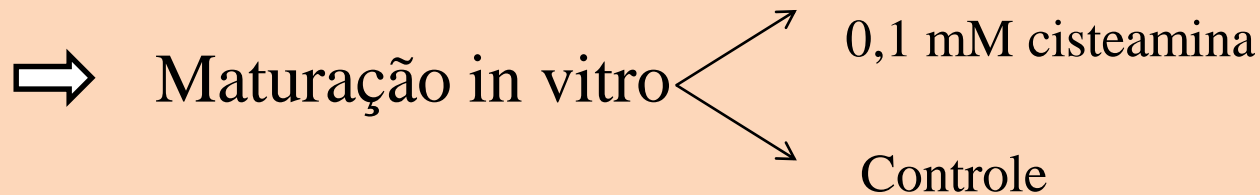
Treatment IVM/IVC	Oocytes, ^d n	Cleavage, n (%)	Embryos at Day 8, n (%)
0.1/0 (control)	356	197 (53.3) ^a	94 (26.4) ^a
0.1/0.01	357	179 (50.1) ^a	66 (18.4) ^{b,c}
0.1/0.05	357	191 (52.4) ^a	69 (19.3) ^b
0.1/0.1	357	197 (53.5) ^a	47 (13.2) ^c

^{a,b,c} Values in columns with different superscript are significantly different, $P < 0.05$.


^d Number of equally balanced replicates: 3.

Material e Métodos

Experimento III:



⇒ Embriões correspondentes aos graus 1 (fase 4) e graus 1 e 2 (fase 5 à 9) usados para TE para as receptoras



⇒ Embriões grau 1 (fase 5) e graus 1 e 2 (fase 6 à 9) para congelamento e posterior descongelamento para fazer TE

Resultados

Table 4
Effect of the presence of cysteamine during IVM of OPU-derived bovine oocytes on subsequent *in vitro* embryonic development.

Group	Sessions, N	Oocytes, N	Cleavage, n (%)	Embryos at Day 7			
				Morulae + blastocysts, n (%)	Relative increase	Transferable n Per session	
Control	696	5454	3296 (60.4) ^a	1277 (23.4) ^a		740	1.06 ^a
Cysteamine	589	4557	2939 (64.5) ^b	1569 (34.4) ^b	47%	1017	1.73 ^b

^{a,b} Values in columns with different superscript are significantly different, $P < 0.001$.

Resultados

Table 4

Effect of the presence of cysteamine during IVM of OPU-derived bovine oocytes on subsequent *in vitro* embryonic development.

Group	Sessions, N	Oocytes, N	Cleavage, n (%)	Embryos at Day 7			
				Morulae + blastocysts, n (%)	Relative increase	Transferable n Per session	
Control	696	5454	3296 (60.4) ^a	1277 (23.4) ^a		740	1.06 ^a
Cysteamine	589	4557	2939 (64.5) ^b	1569 (34.4) ^b	47%	1017	1.73 ^b

^{a,b} Values in columns with different superscript are significantly different, $P < 0.001$.

Resultados

Table 4

Effect of the presence of cysteamine during IVM of OPU-derived bovine oocytes on subsequent *in vitro* embryonic development.

Group	Sessions, N	Oocytes, N	Cleavage, n (%)	Embryos at Day 7			
				Morulae + blastocysts, n (%)	Relative increase	Transferable	
					n	Per session	
Control	696	5454	3296 (60.4) ^a	1277 (23.4) ^a		740	1.06 ^a
Cysteamine	589	4557	2939 (64.5) ^b	1569 (34.4) ^b	47%	1017	1.73 ^b

^{a,b} Values in columns with different superscript are significantly different, $P < 0.001$.

Resultados

Table 1
Effect of cysteamine during IVM of slaughterhouse-derived oocytes on subsequent *in vitro* embryonic development.

Group	Oocytes, ^c n	Cleavage, n (%)	Embryos at Day 7, n (%)			Relative increase
			Morulae	Blastocysts	Total	
Control	1056	586 (55.5) ^a	81 (7.7) ^a	124 (11.7) ^a	205 (19.4) ^a	
Cysteamine	1070	634 (59.3) ^a	79 (7.4) ^a	178 (16.6) ^b	257 (24.0) ^b	24%

^{a,b} Values in columns with different superscript are significantly different, $P < 0.05$.

^c Number of equally balanced replicates: 5.

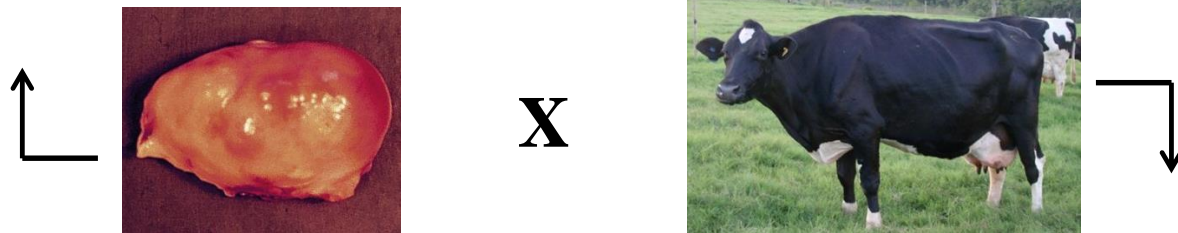


Table 4
Effect of the presence of cysteamine during IVM of OPU-derived bovine oocytes on subsequent *in vitro* embryonic development.

Group	Sessions, N	Oocytes, N	Cleavage, n (%)	Embryos at Day 7			
				Morulae + blastocysts, n (%)	Relative increase	Transferable	
						n	Per session
Control	696	5454	3296 (60.4) ^a	1277 (23.4) ^a		740	1.06 ^a
Cysteamine	589	4557	2939 (64.5) ^b	1569 (34.4) ^b	47%	1017	1.73 ^b

^{a,b} Values in columns with different superscript are significantly different, $P < 0.001$.

Resultados

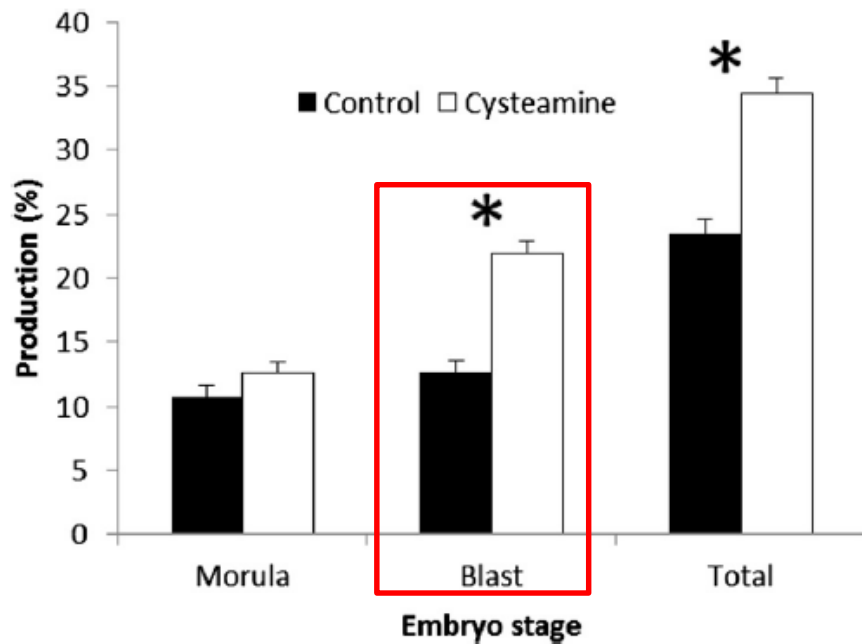


Fig. 2. Effect of cysteamine during IVM of OPU-derived bovine oocytes on the distribution of Day 7 embryo developmental stages (mean percentage \pm SE). *Significantly different, $P < 0.01$.

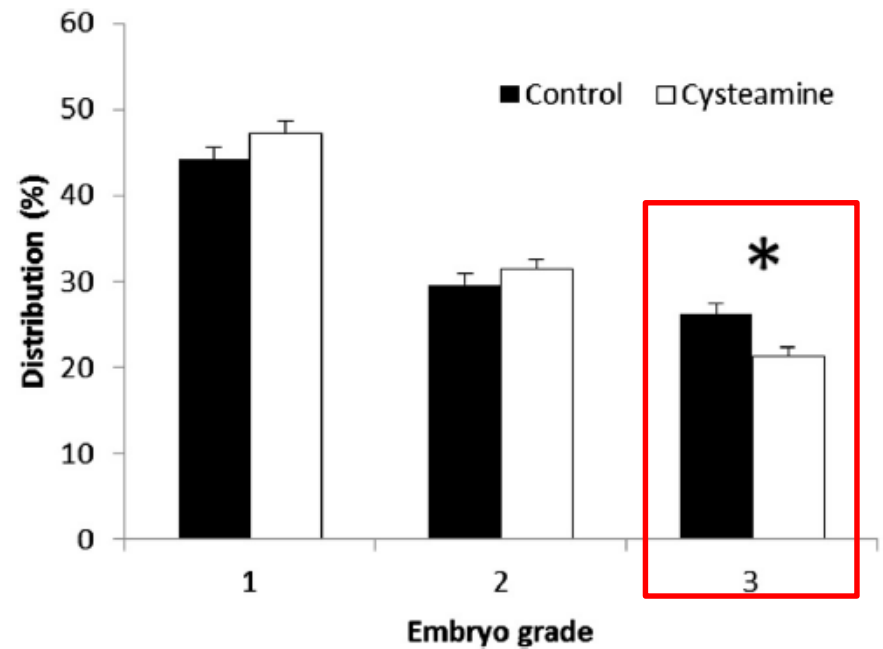


Fig. 3. Effect of cysteamine during IVM of OPU-derived bovine oocytes on Day 7 embryo quality (mean percentage \pm SE). *Significantly different, $P < 0.01$.

Resultados

Table 5

Effect of cysteamine during IVM of OPU-derived oocytes on pregnancy rates of fresh and frozen-thawed embryos.

Group	Embryo		Pregnancy rate (%)
	Type	Transfers, N	
Control	Fresh	359	45
	Frozen	213	44
Cysteamine	Fresh	451	45
	Frozen	350	45

Resultados



Discussão

- ✓ Maior número de embriões em oócitos derivados da OPU;
- ✓ No meio MIV a cistina estimula a produção de GSH em oócitos com CC, mas não em oócitos desnudados;
- ✓ A cisteamina ↑ os níveis de GSH intracelular em oócito desnudo
- ✓ Um ↑ no nível de GSH foi mostrado estar associado com uma diminuição nos níveis de ROS dentro de ovócitos
- ✓ GSH promove fertilização monospérmica (Wang et al.)
- ✓ Melhor formação do PN masculino; maiores taxas de clivagem;

Discussão

- ✓ Menor n° de embriões grau 3 no grupo cisteamina;
- ✓ Melhor sobrevivência embrionária em oócitos suplementados com 0,5 mM de cisteamina no meio CIV (Matos et al;)
- ✓ Neste estudo a cisteamina não teve efeito benéfico no meio CIV;
- ✓ ROS, através da peroxidação lipídica, atrasa a ativação do genoma embrionário. A suplementação de cisteamina diminui a produção de ROS e de forma indireta acelera o processo de ativação do genoma embrionário.

Conclusão

⇒ Cisteamina → meio de maturação *in vitro*

↑ Eficiência da produção de embriões

↑ Transferência de embriões



Obrigada!

leticiaollares@hotmail.com