



Universidade Federal de Pelotas
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária
Laboratório de Reprodução Animal -EMBRAPA



Competência Oocitária



Lucas Hax

Médico Veterinário

Doutorando em Biotecnologia

Pelotas, 09 de setembro de 2015

Distribuição

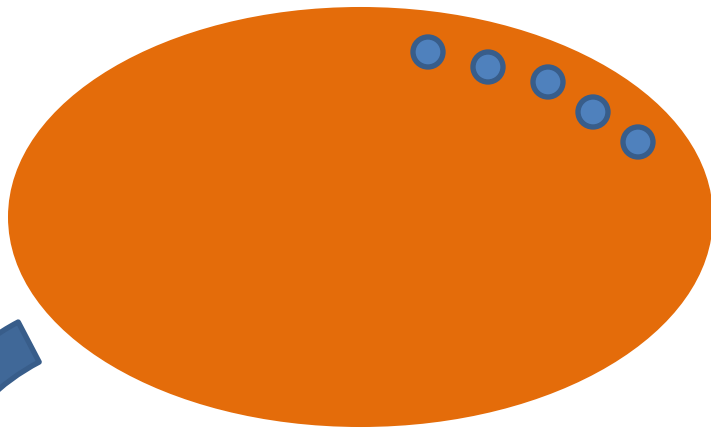
- Introdução
- Resumo da oogênese
- Maturação oocitária
- Avaliação da maturação oocitária
- Nossa rotina
- Alternativas

Introdução

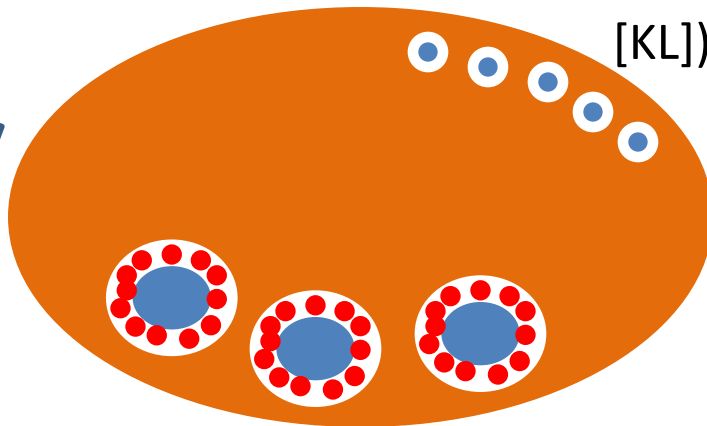
- Brasil > 50% da PIV no mundo
- 60-80% dos oócitos maturados *in vivo* são competentes
- 20-40% dos oócitos maturados *in vitro* são competentes
- Competência: capacidade do oócito passar pela maturação, ser fecundado, se desenvolver até o estágio de blastocisto e ter a capacidade de induzir uma gestação.
- MIV é um dos maiores obstáculos

Resumo da oogênese

☐ Oogênese (vida fetal – após a diferenciação sexual)



- Região Cortical
- Atividade mitótica das oogônias (período germinativo)
- C-Kit (oócito)
- Interação com céls. Mesonéfricas (Kit ligand [KL])



- Oogônia forma pré-celulas da granulosa
- Céls. Epitélio de superfície
- Céls mesonéfricas

Resumo da oogênese

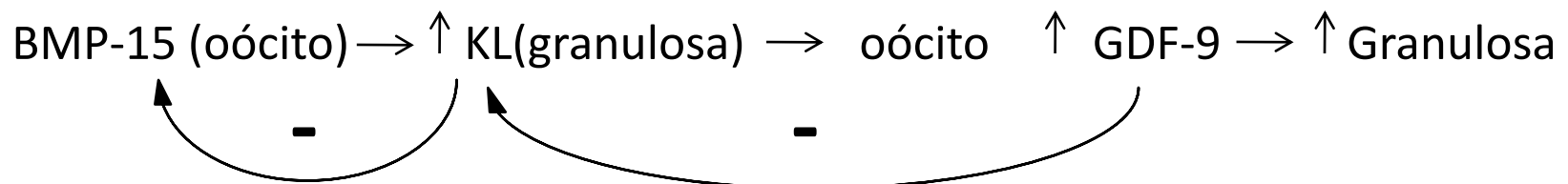
□ Oogênese

- Período de crescimento

Oogônias aumentam de tamanho **➡** mitógenos oocitários

BMP-15 ➡ Crescimento dos folículos primordiais, estimula KL

GDF-9 ➡ Crescimento das células da granulosa



Resumo da oogênese

☐ Oogênese

- Início da meiose I

Oócito I



Bloqueio da meiose - Diplóteno da prófase I

Maturação Oocitária

- ✓ Aquisição de competência meiótica
- ✓ Maturação meiótica ou nuclear
- ✓ Maturação citoplasmática
- ✓ *In vivo* – pico de LH
- ✓ *In vitro* – após a punção

Quebra da vesícula germinativa – extrusão do 1º corpúsculo polar – migração dos grânulos corticais – até Metáfase II

Maturação Oocitária

- ❑ Bloqueio e reinício da meiose
- Transcrição e estoque de mRNA até essa fase.
- Tradução permanece
- Envolvimento de várias moléculas (RAS, RAF, MOS, MEK, MAPK, MPF, cAMP)

Maturação Oocitária

☐ Bloqueio e reinício da meiose

- Adenosina 3'-5' Monofosfato cíclico (cAMP)

Efeito através da variação na concentração intra-oocitária

Derivado do ATP pela ação da adenilato ciclase

cAMP interage com a proteína quinase A (PKA)

Maturação Oocitária

☐ Bloqueio e reinício da meiose

- Adenosina 3'-5' Monofosfato cíclico (cAMP)

PKA inativa
(sem cAMP) + cAMP \longrightarrow Liberação de monômeros
ativos (subunidades
catalíticas)

PKA tipo I e PKA tipo II

Fosforilação e desfosforilação de proteínas
específicas

Maturação Oocitária

☐ Bloqueio e reinício da meiose

- Adenosina 3'-5' Monofosfato cíclico (cAMP)

PKA I – localizado nos oócitos, manutenção e bloqueio meiótico

PKA II – localizado no *cumulus*, reinício meiótico, expansão do *cumulus*

cAMP é regulado pelas fosfodiesterases (PDEs) – estímulo gonadotrófico

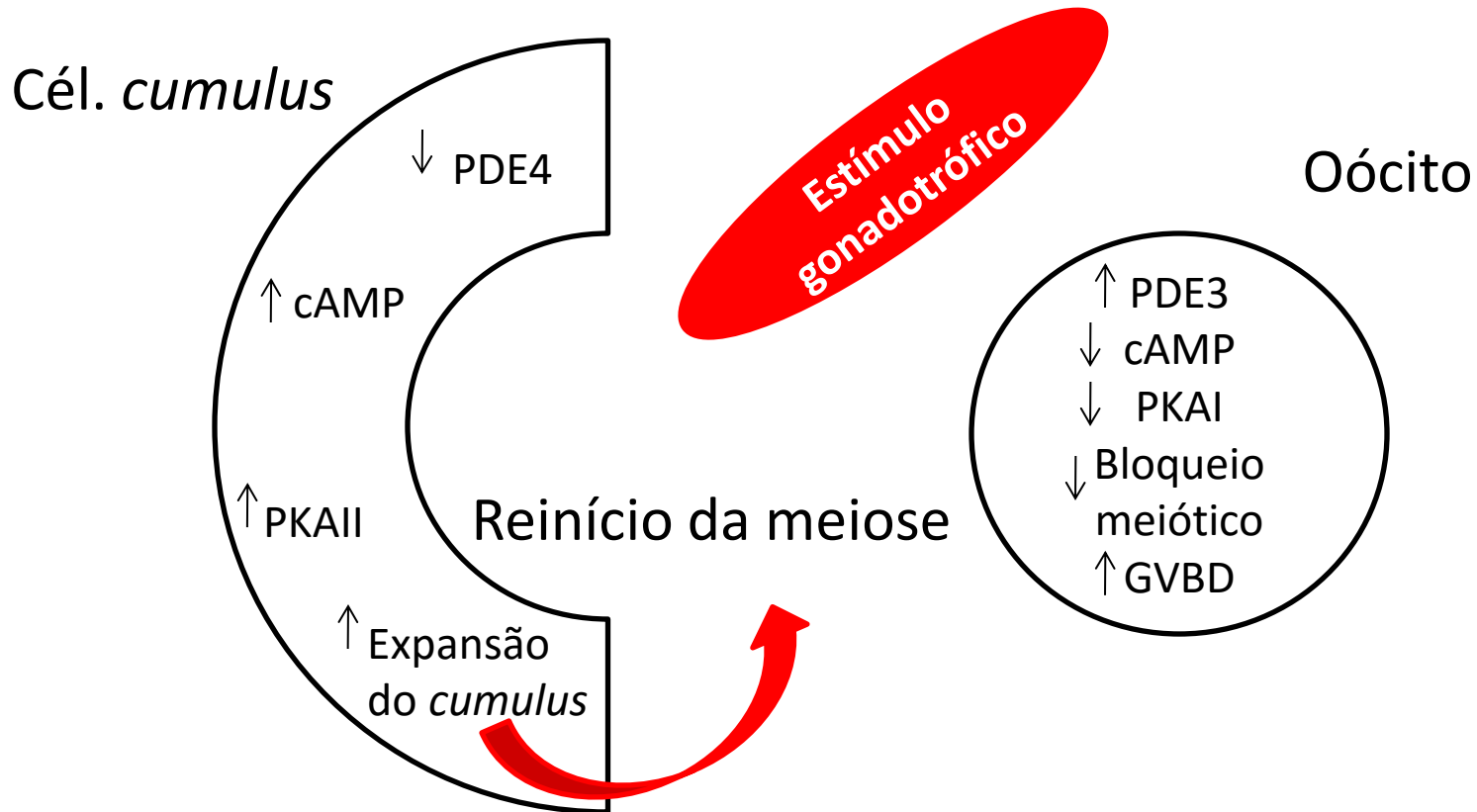
PDE subtipo 3 – oócitos

PDE subtipo 4 – células foliculares

Maturação Oocitária

□ Bloqueio e reinício da meiose

- Adenosina 3'-5' Monofosfato cíclico (cAMP)



Maturação Oocitária

- ❑ Bloqueio e reinício da meiose
- Proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK ou ERK)

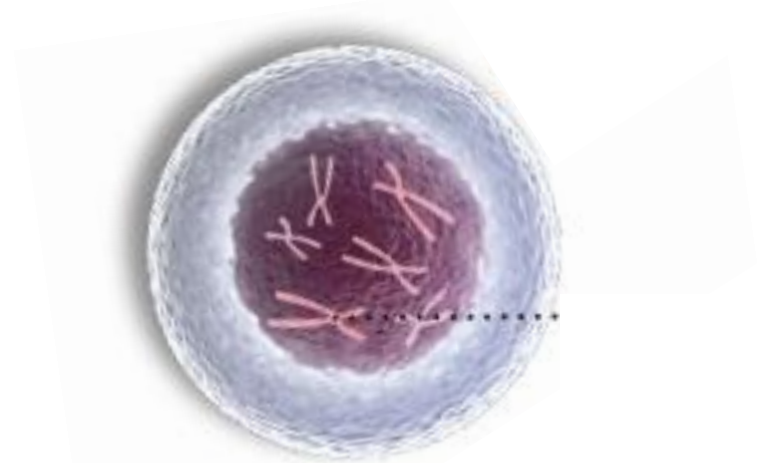
Maturação nuclear

Reorganização dos microtúbulos

Formação do fuso

Manutenção do oócito em MII

Expansão do *cumulus*



Maturação Oocitária

Bloqueio e reinício da meiose

- Proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK ou ERK)

✓ Presente nos oócitos – ativada pela proteína MOS/MAPKK

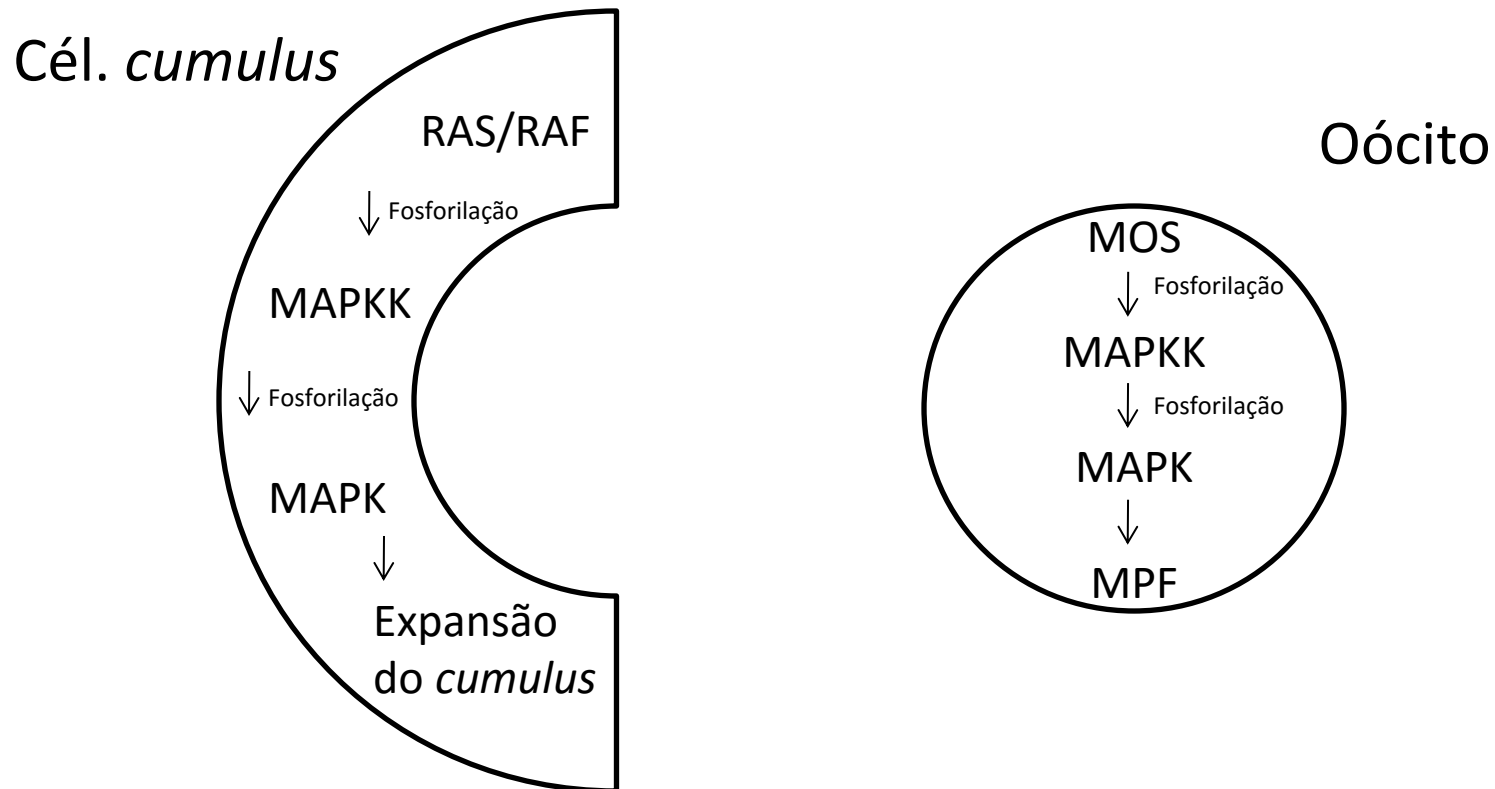
✓ Presente nas céls. do *cumulus* – ativada pelas quinases RAS e RAF/MAPKK

✓ MAPKK ou MEK (proteína quinase ativadora de MAPK) – fosforila resíduos de tirosina e treonina da MAPK, ativando-a.

✓ MAPKK é ativada por fosforilação mediada por MOS ou RAS/FAF

Maturação Oocitária

- ❑ Bloqueio e reinício da meiose
- Proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK ou ERK)



Maturação Oocitária

☐ Bloqueio e reinício da meiose

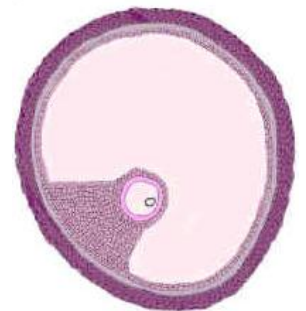
• Fator promotor da maturação (MPF)

Ativação e estabilização promovidos pela MAPK

Duas subunidades

p34^{cdc2} - controle da divisão celular, aquisição de competência meiótica . Inativa (fosforilada), pré-MPF.
cdc25 fosfatase desfosforila

ciclina B



Maturação Oocitária

□ Bloqueio e reinício da meiose

• Fator promotor da maturação (MPF)

↓ cAMP → ↓ PKAI → ↑ MOS → ↑ MAPKK → ↑ MAPK

↑ Síntese de
ciclina B1 via
PKAI

← ↑ Desfosforilação do pré-MPF ← ↑ cdc25fosfatase

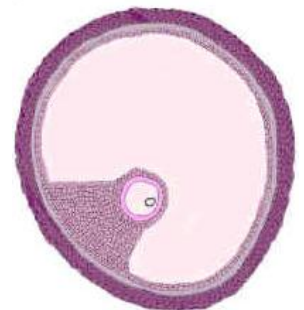


p34^{cdc2}

+

ciclina B

Retomada da meiose



Avaliação da Maturação Oocitária

☐ Competência Oocitária – Capacidade do oócito ser fecundado e formar um embrião viável

- Oócitos puncionados de folículos antrais

100% maturação nuclear

Aquisição de competência

Maturação citoplasmática e molecular

Avaliação da Maturação Oocitária

❑ Evidências da competência citoplasmática

Diminuição ou interrupção da transcrição, condensação do nucléolo

Redistribuição das organelas, ribossomos, mitocôndrias, redução do Golgi, aumento do conteúdo lipídico.

Alinhamento dos grânulos corticais próximo à membrana plasmática



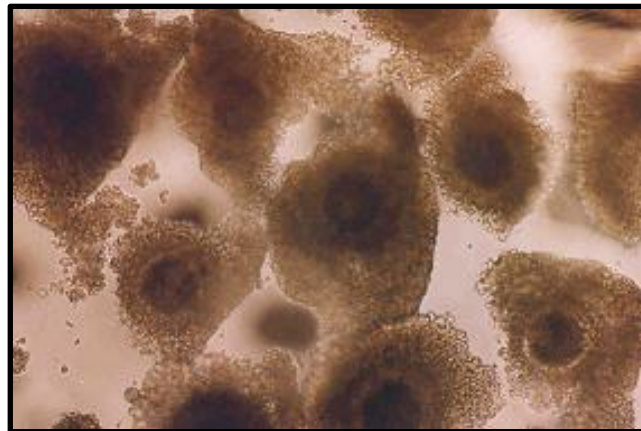
A competência citoplasmática está associada com as mudanças celulares que permitem que a fecundação ocorra com sucesso

Avaliação da Maturação Oocitária

- ❑ Parâmetros utilizados como indicativos da competência oocitária

Aparência do COC – quantidade e compactação

Aparência do citoplasma – homogeneidade



Avaliação da Maturação Oocitária

❑ Parâmetros utilizados como indicativos da competência oocitária

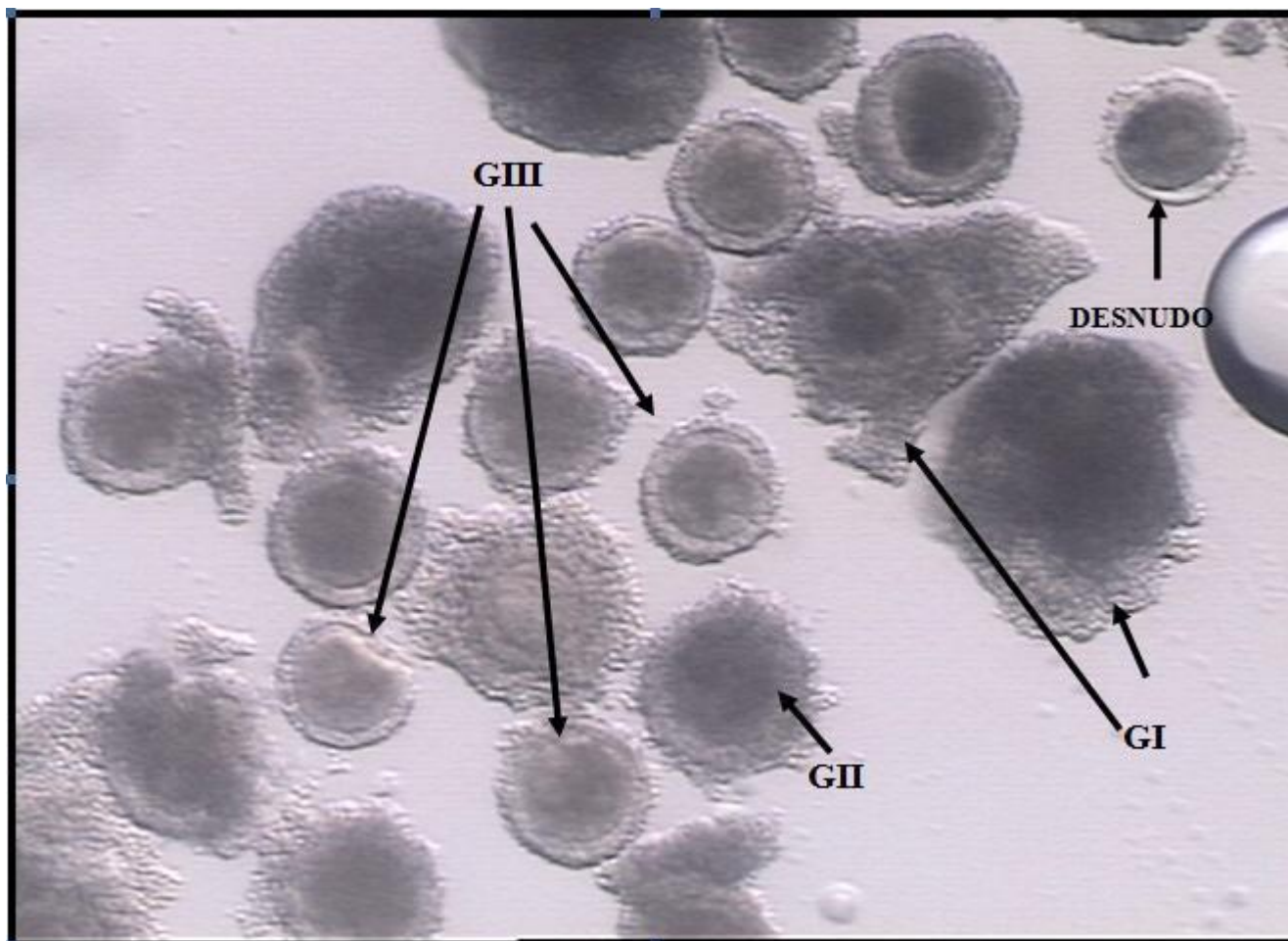
Grau 1: cumulus compacto contendo mais de uma camada. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom.

Grau 2: cumulus compacto parcialmente presente com menos de 3 camadas de células. Ooplasma com granulações heterogêneas, podendo estar concentradas em algum ponto (mancha escura). Ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida

Grau 3: cumulus expandido, ooplasma contraído, vacuolado, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida

Grau 4: oócito desnudo sem cumulus

Avaliação da Maturação Oocitária



Avaliação da Maturação Oocitária

- ❑ Corante brilliant cresyl blue (BCB)

Seleciona oócitos que atingiram o crescimento total

Determina a atividade intracelular de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD)



Oócito em fase de crescimento



Oócito maduro

Avaliação da Maturação Oocitária

☐ Corante brilliant cresyl blue (BCB)

G6PD – fornecimento de energia para síntese de nucleotídeos e ács. graxos.

G6PD reduz BCB

Citoplasma azul = BCB positivo = maduro

Citoplasma não azul = BCB negativo = imaturo

Avaliação da Maturação Oocitária

□ Hoechst

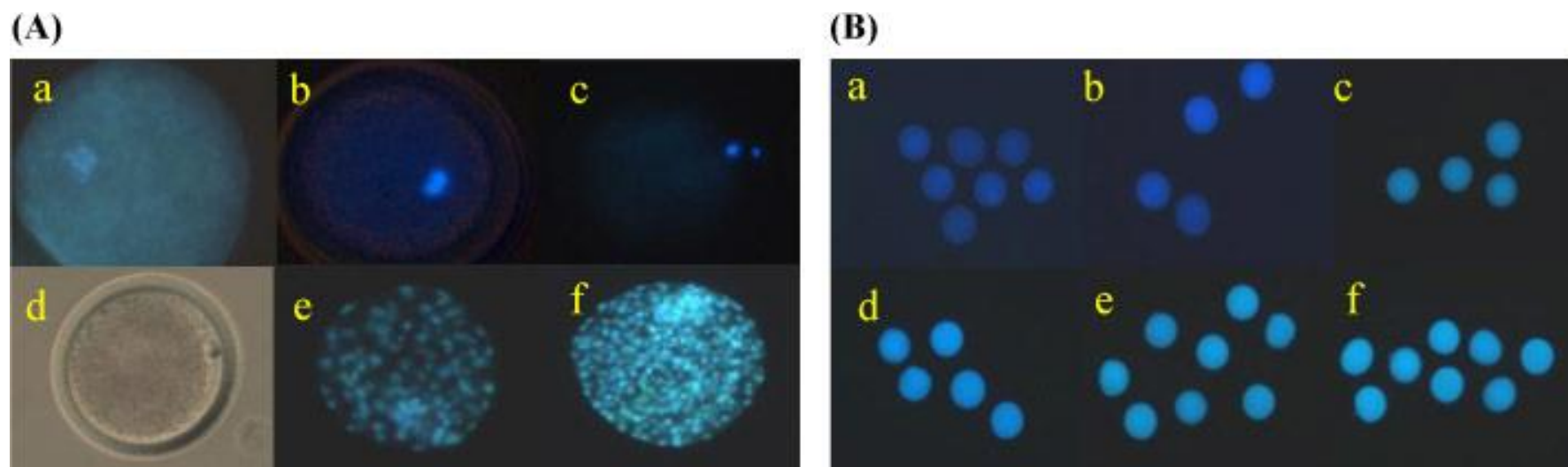
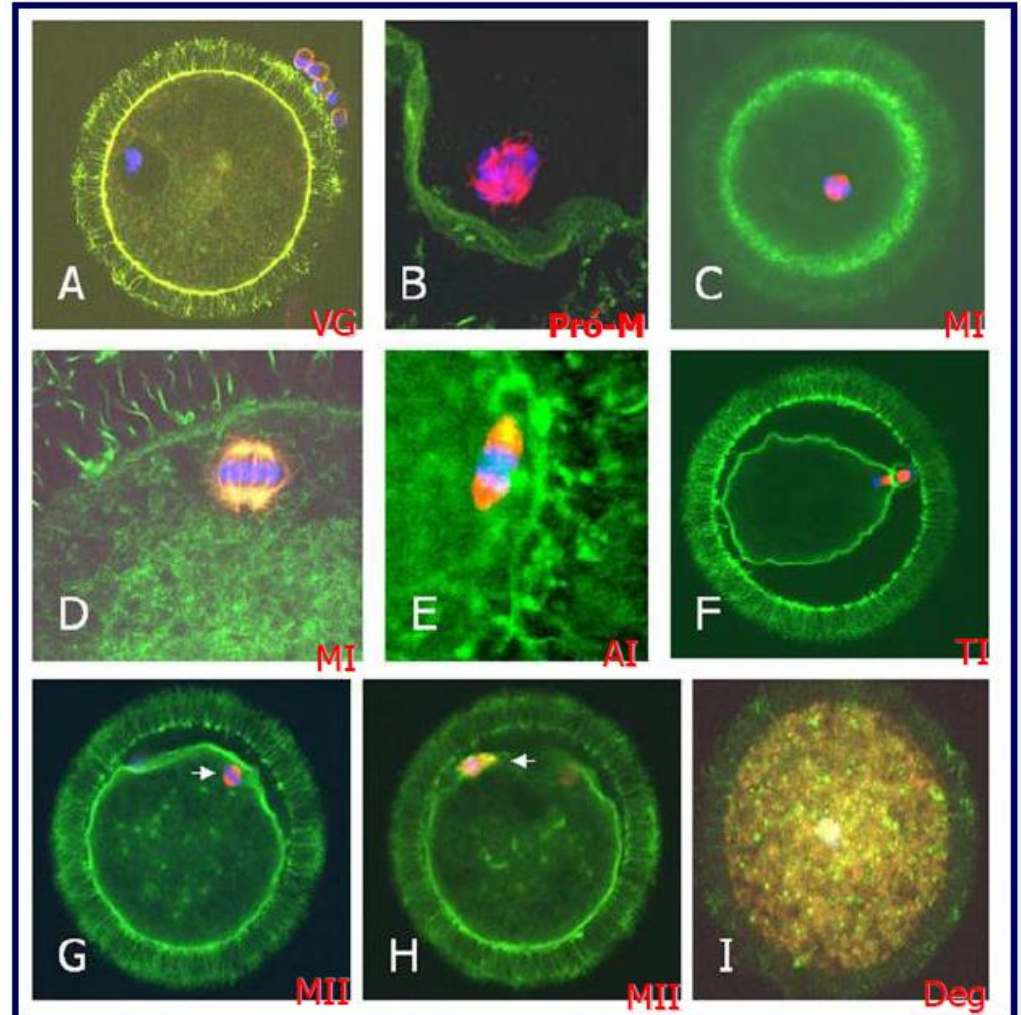


Figura 2. Coloração com Hoechst para avaliação da maturação e do número de células dos embriões (A). Oócito em vesícula germinativa (a), estágio intermediário (b), metáfase II (c), liberação do 1º corpúsculo polar (d), embrião com ± 110 células (e) e embrião com ± 360 células (f). Intensidade de fluorescência 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).

Avaliação da Maturação Oocitária

□ Microscopia Confocal



Nossa Rotina

- Ovários lavados com salina a 35°C
- Punção (bomba de vácuo – 13mmHg), ovários em banho-maria 35°C
- Coleta, seleção e lavagem dos oócitos
- MIV em TCM 199 (Tissue Culture Medium)
- Estufa - 39°C, 5% de CO₂, umidade saturada, 24h

Alternativas

- Fontes protéicas

Soro fetal bovino – fatores de crescimento, aminoácidos e proteínas

Albumina sérica bovina (BSA) – quelante de metais pesados, equilibra pH, surfactante

- Gonadotrofinas e hormônios esteróides

LH – alteração na distribuição de cálcio no ooplasma

FSH – estimula a expansão do cumulus

Estradiol – liberação de cálcio na maturação citoplasmática

Alternativas

- Tempo de MIV

18 – 24h

Envelhecimento é prejudicial

- Atmosfera gasosa

O₂ – radicais livres – estresse oxidativo

- Antioxidantes ????

Muito Obrigado!!!



lucashax@gmail.com