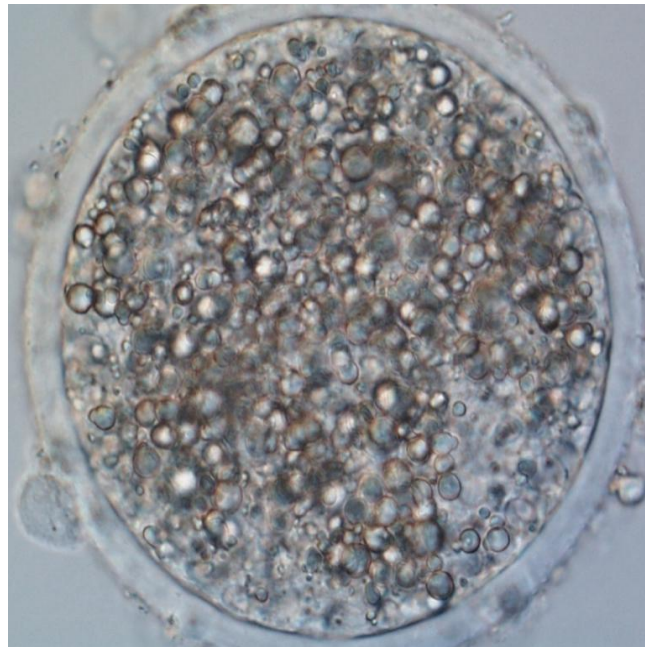


Maturação *in vitro* do oócito de suíno: efeitos da manipulação lipídica na fertilização, desenvolvimento e crio-resistência embrionários



Elsa Cristina da Graça Prates

Évora, 18 de Março de 2013

Fundamentação

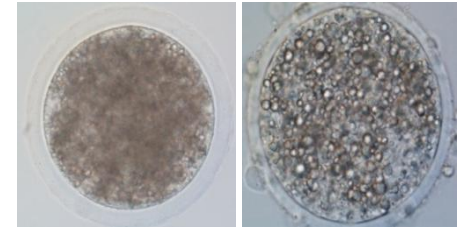
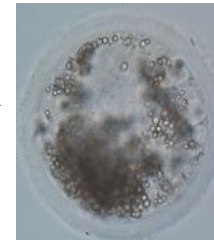
Principais dificuldades na produção *in vitro* e criopreservação de embriões de suíno resultantes da maturação

Maturação:

Morfologia caracterizada por elevado conteúdo lipídico nos oócitos →

Assincronia da maturação nuclear e citoplasmática

- fragmentação dos oócitos
- envelhecimento e/ou degeneração dos oócitos →



Fertilização:

- reacção cortical incompleta
- elevada poliespermia - embriões aneuploides e mortalidade embrionária

Desenvolvimento Embrionário:

- produção de blastocistos
- número de células dos blastocistos

Criopreservação:

- sobrevivência após vitrificação-aquecimento
- número de células dos blastocistos após vitrificação-aquecimento

Fundamentação

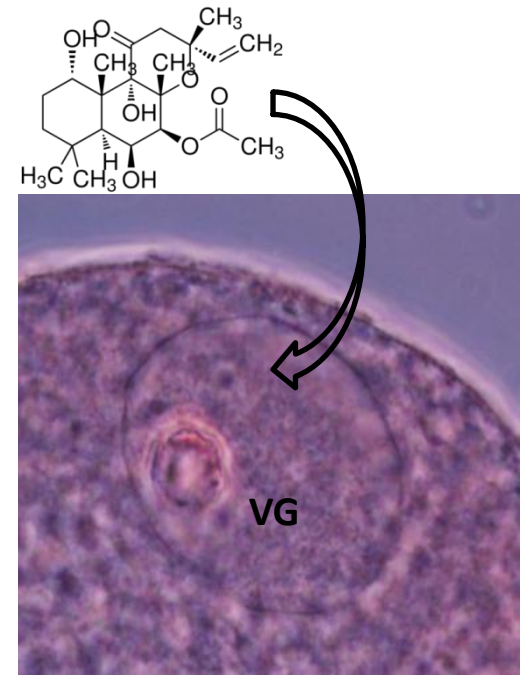
Sincronização da maturação nuclear e citoplasmática no oócito de suíno

A) Inibição reversível da meiose

- . Manutenção transitória do oócito em estadio de vesícula germinal IBMX, rolipram, ciclostamida, roscovitina

Forscolina (Fu *et al.*, 2011)*

- . Diterpenoide (lípidio isoprénico) permeável na célula
- . Ativa a adenil ciclase, eleva o AMPc e estimula a PKA
- . Interfere com os pulsos de Ca^{2+}
- . Inibe a MAPK



**Forscolina/adenil ciclase -
-AMPc/PKA**

B) Enriquecimento e crescimento do citoplasma

- . Sincronização do estadio de vesícula germinal com as sínteses no citoplasma (transcrição/tradução)
- . Nucleótidos, proteínas, RNAs, **lípidos**

Fundamentação

Origem e crescimento das gotas lipídicas

GOTA LIPÍDICA

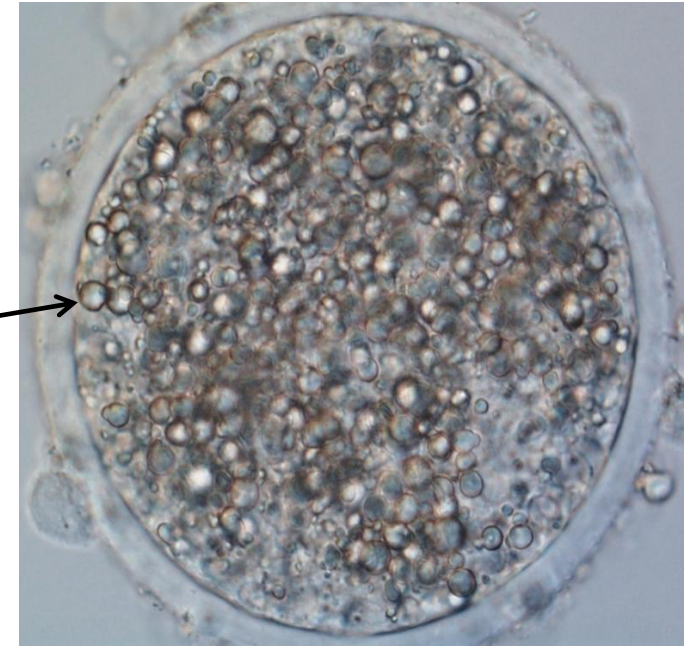
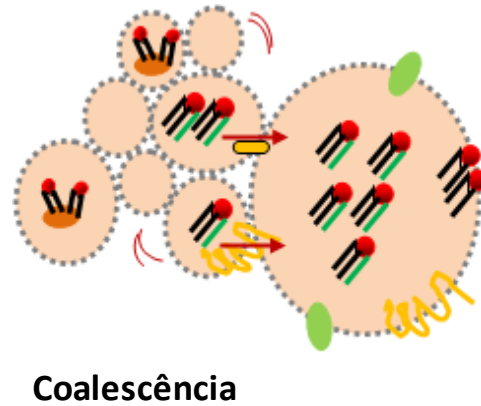
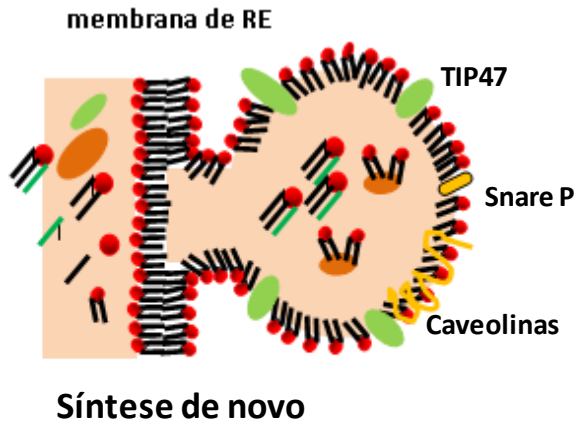
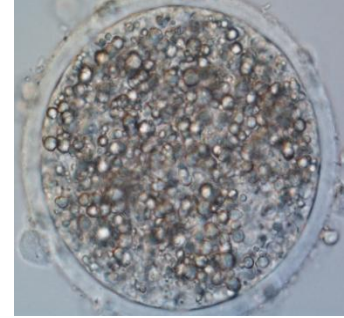


Foto da autora

- centro de triacilgliceróis e/ou ésteres de colesterol, envolto por uma monocamada de fosfolípidos com proteínas incluídas
- associa-se a outras organelas (RE, mitocôndrias, citoesqueleto, peroxissomas e endossomas)

Fundamentação

Papel dos ácidos gordos durante a maturação do oócito



- . Triacilgliceróis e ésteres de colesterol – Gotas Lípidicas
- . Fosfolípidos - Membranas
- . Metabolismo de conversão em ATP – β -oxidação mitocondrial, síntese/elongação - β -oxidação peroxissomal
- . Originam diacilglicerol (DAG) e IP3 – pulsos de Ca^{2+} envolvidos na progressão da maturação e na fertilização do oócito
- . **Ácido araquidónico** **C20:4n-6** - Reservas (GL) e membranas

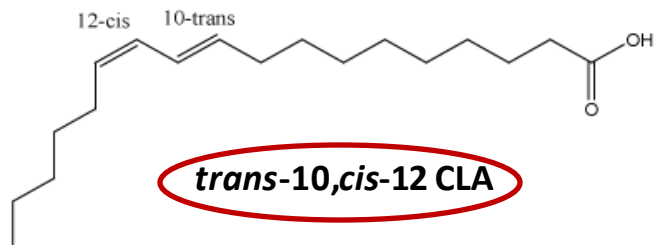


Leucotrienos (lipoxygenase)

Prostaglandinas **PGE2**, **PGF2a** (cicloxygenase)

Expansão do cumulus
Progressão da meiose

Ovulação e preparação do
endométrio para a
implantação



Regulação do conteúdo lipídico / delipidação química

.. Bovinos:

- diminui/modula a acumulação da gordura em **oócitos e embriões de bovino** (Pereira et al., 2007)*
- melhora a competência oocitária

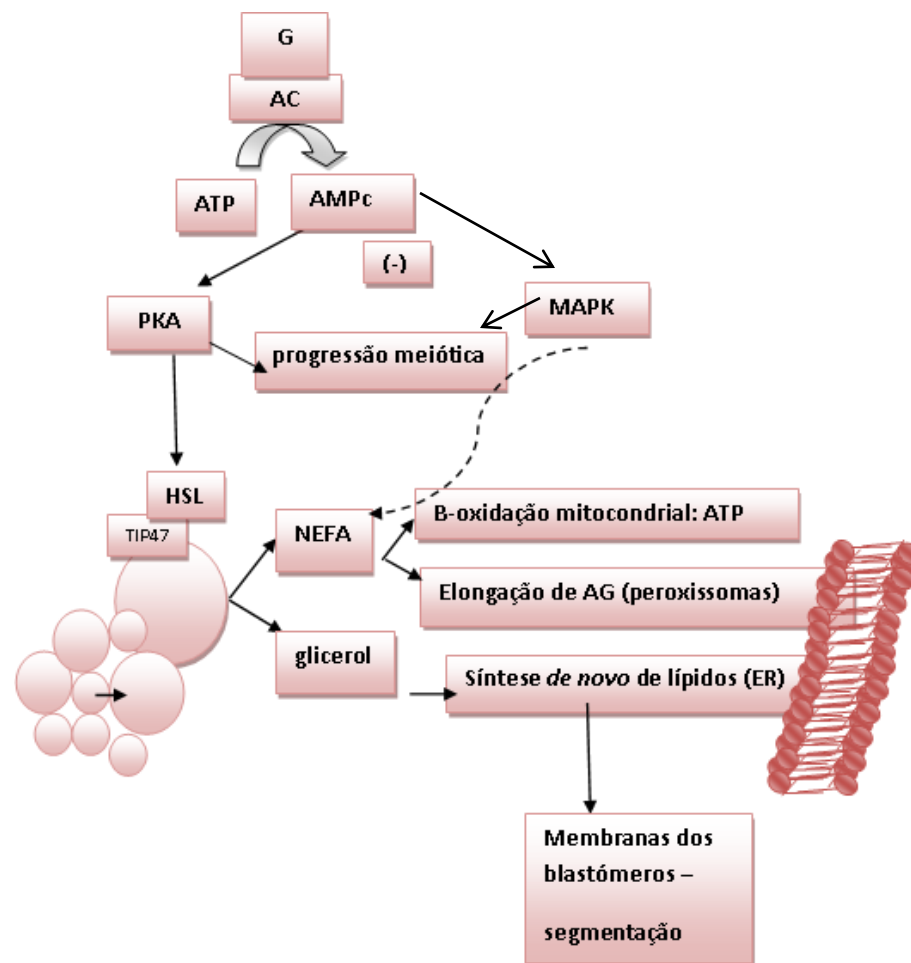
..Suínos:

- reduz a lipogenese em adipócitos

-Suplementação de trans-10, cis-12 CLA em cultura de oócitos de suíno?

Fundamentação

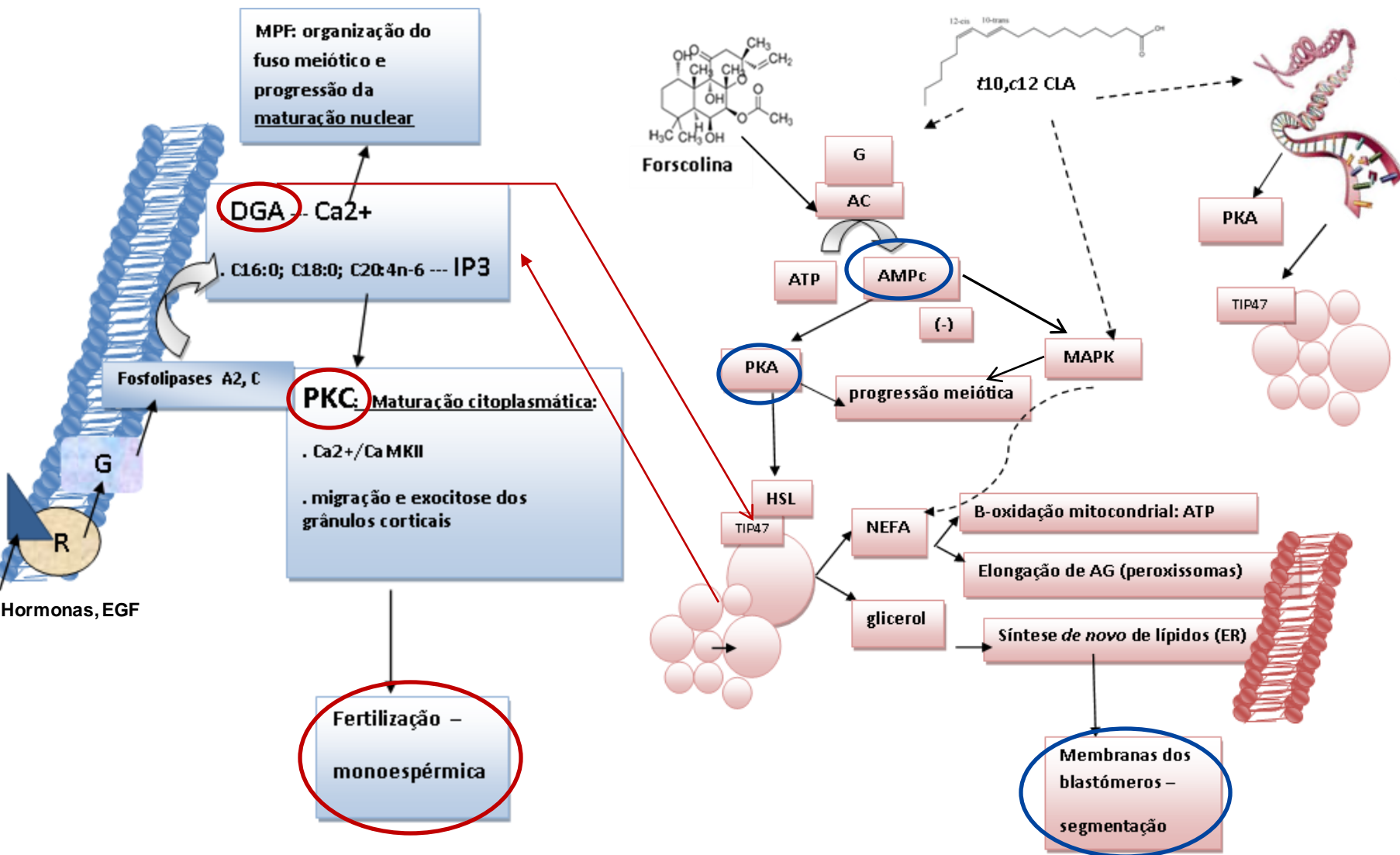
Ativação da lipólise por estimulação dos moduladores lipídicos, forskolina e *t10,c12 CLA* e interferência nas vias de regulação da maturação do oócito (“cross-talk” entre vias de regulação oocitária).



Que alterações podem ser detetadas no oócito de suíno e que efeitos se observam sobre a fertilização, desenvolvimento e crio-resistência embrionários, após MIV com suplementação destas substâncias?

Fundamentação

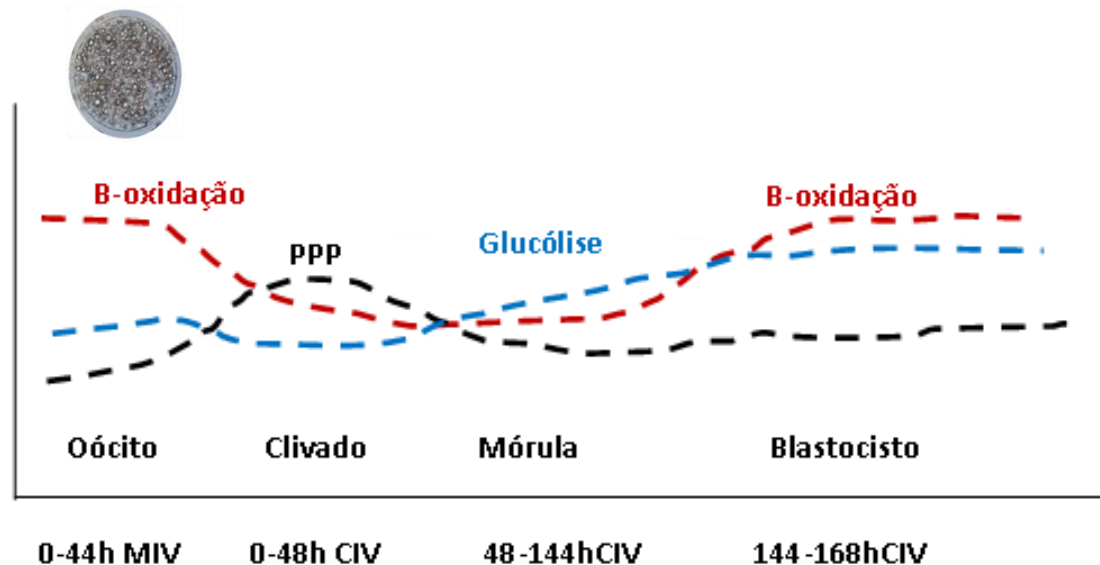
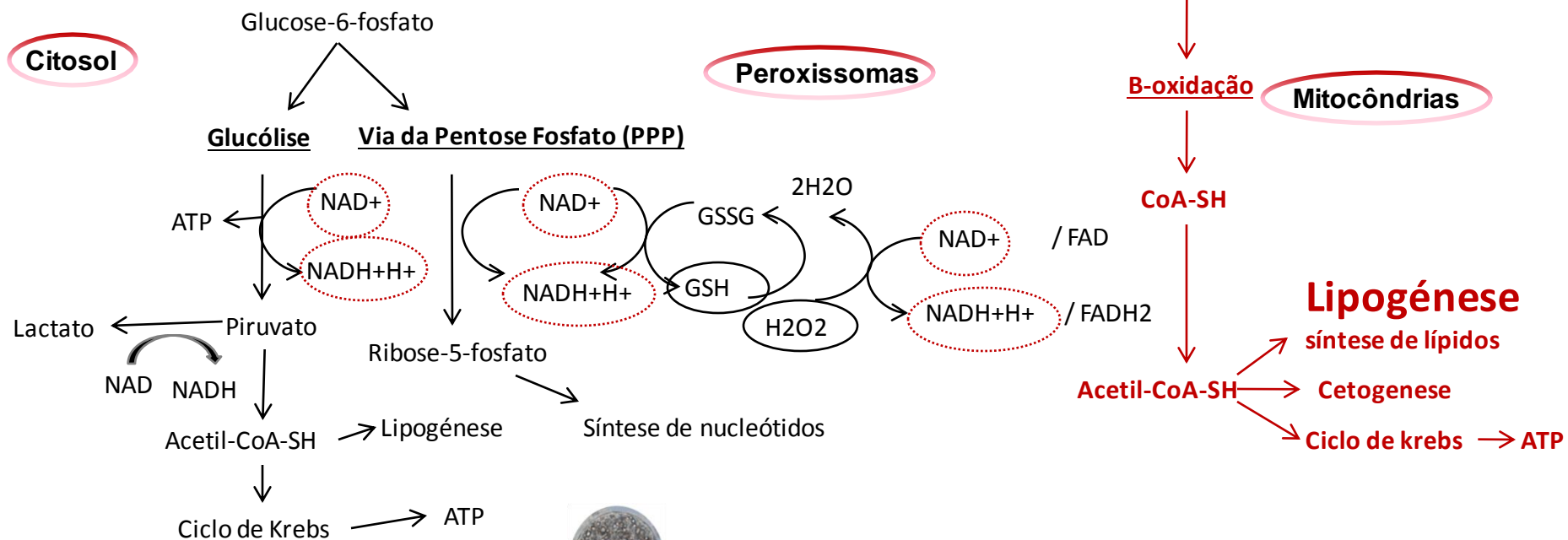
Modelo para a ativação da lipólise por estimulação dos moduladores lipídicos, forskolina e *t*10,*c*12 CLA e interferência nas vias de regulação da maturação do oócito (“cross-talk” entre vias de regulação oocitária).



Que alterações podem ser detetadas no oócito de suíno e que efeitos se observam sobre a fertilização, desenvolvimento e crio-resistência embrionários, após MIV com suplementação destas substâncias?

Fundamentação

Metabolismo energético e vias de conversão das reservas



Vias de metabolismo energético no COC e embrião de suíno.

Objectivos gerais

Espécie suína - elevada importância económica, raças autoctones em declínio populacional, inexistência de bancos de germoplasma, investigação em regulação do metabolismo lipídico e relação com distúrbios da fertilidade



Implementação da técnica de produção *in vitro* de embriões de suíno

Avaliação do efeito da suplementação de moduladores lipídicos, *trans*-10,*cis*-12 CLA (100uM) e forskolina (10uM), durante a maturação *in vitro* dos oócitos, em 3 ensaios e sobre:

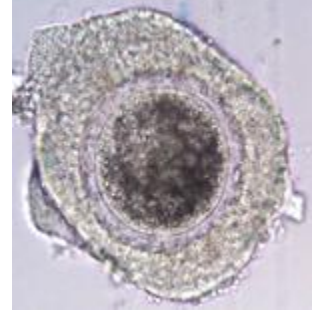
. Taxas de maturação e de fertilização /clivagem e as alterações da morfologia do oócito e das gotas lipídicas

. Taxas de maturação do oócito e a composição em ácidos gordos / dimetilacetais dos complexos cumulus-oócito

. Taxas de maturação e de fertilização do oócito, de desenvolvimento e de crio-resistência embrionários

Materiais e Métodos

Produção *in vitro* e criopreservação de embriões de suíno



1) Maturação *in vitro* de oócitos - meio de cultura indefinido (10% FF)

NCSU23 (North Caroline State University 23)

Suplementos:

- .FF
- .cisteína
- .EGF

2) Fertilização *in vitro* de oócitos - meio definido

TBMm (Tris-Buffered modificado)

Suplementos:

- . Cafeína
- . BSA

3) Cultura *in vitro* de embriões - meio indefinido (10% FCS a partir do 5º dia)

NCSU23 - glucose ou NCSU23 - piruvato e lactato de sódio

Suplementos:

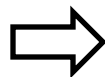
- . BSA
- . FCS (5º dia)

4) Criopreservação de embriões

Vitrificação

TCM199-Hepes

- . glutamina
- . PVA
- .16% DMSO + 16% EG + Sacarose



Aquecimento

TCM199-Hepes+Sac+glut
+PVA

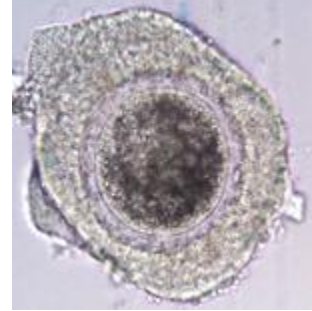


Cultura de embriões (24h)

NCSU23 +glucose + 10%FCS

Materiais e Métodos

Produção *in vitro* e criopreservação de embriões de suíno



1) Maturação *in vitro* de oócitos - meio de cultura indefinido (10% FF)

NCSU23 (North Caroline State University 23)

Suplementos:

- .FF
- .cisteína
- .EGF

Modo:

0-22h: NCSU23 + suplementos + eCG+hCG

22-44h: NCSU23 + suplementos

2) Fertilização *in vitro* de oócitos - meio definido

TBMm (Tris-Buffered modificado)

Suplementos:

- .Cafeína
- .BSA

Modo:

6h de co-cultura dos gametas: TBMm + suplementos

3) Cultura *in vitro* de embriões - meio indefinido (10% FCS a partir do 5º dia)

NCSU23 - glucose ou NCSU23 - piruvato e lactato de sódio

Suplementos:

- .BSA
- .FCS (5º dia)

Modo:

0-48hpi: NCSU23 glucose ou NCSU23 pir-lac de sódio+suplementos

48-168hpi: NCSU23 glucose + suplementos

4) Criopreservação de embriões

Vitrificação

TCM199-Hepes

. glutamina

. PVA

. 16% DMSO + 16% EG + Sacarose



Aquecimento

TCM199-Hepes+Sac+glut
+PVA



Cultura de embriões (24h)

NCSU23 + glucose + 10%FCS

1º Ensaio:

1.1. Objetivo

interferir com o ciclo celular do oócito durante a maturação *in vitro* através da suplementação com substâncias inibidoras da meiose e moduladoras dos lípidos, em diferentes tempos, para sincronizar a meiose e a maturação citoplasmática e simultaneamente reduzir o conteúdo lipídico intracelular.

Metodologia

Maturação

Grupos	Intervalos de Suplementação		
	1ª experiência	2ª experiência	3ª experiência
Imaturos	0h	0h	0h
Controlo	s/s	s/s	s/s
Excipiente	0-44h	0-22h	-
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA (100uM)	0-44h	0-22h	-
Forscolina (10um)	0-44h	0-22h	2h

+ Fertilização/Clivagem

1º Ensaio:

1.1. Objetivo

interferir com o ciclo celular do oócito durante a maturação *in vitro* através da suplementação com substâncias inibidoras da meiose e moduladoras dos lípidos, em diferentes tempos, para sincronizar a meiose e a maturação citoplasmática e simultaneamente reduzir o conteúdo lipídico intracelular.

Metodologia

Maturação

Grupos	Intervalos de Suplementação		
	1ª experiência	2ª experiência	3ª experiência
Imaturos	0h	0h	0h
Controlo	s/s	s/s	s/s
Excipiente	0-44h	0-22h	-
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA (100uM)	0-44h	0-22h	-
Forscolina (10um)	0-44h	0-22h	2h

+ Fertilização/Clivagem

Variáveis Analisadas por Microscopia e Análise de Imagem

B) Não invasiva

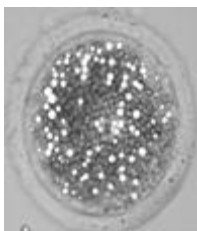
B.1) Morfometria



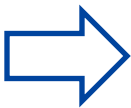
. Áreas citoplasmática e com ZP



. Área de gordura e tonalidade na escala de cinzentos



. Áreas de 100 GL/oócito

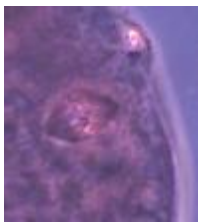


Tempos considerados para análise

. 0 h
. 22h
. 44h de MIV (A.1 e B.1)

. 48h após FIV (B.2)

A) Invasiva



A.1) Taxa de maturação

B.2) Taxa de fertilização/clivagem

1º Ensaio

Resultados e Discussão

Experiência 1

Maturação e Fertilização/Clivagem

	Intervalo de Suplementação		
Imaturos	0h ^b		
Controlo	s/s ^a	→	% Maturação 72.6%
Excipiente	0-44h ^a		% Fertilização/Clivagem 54.5%
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0-44h ^a		
Forscolina	0-44h ^b	→	% Maturação 5.1%
			% Fertilização/Clivagem 0.0%

Efeito da suplementação de *t*10,*c*12 CLA e forscolina na cultura de oócitos, durante 44h, sobre a taxa de maturação nuclear e de fertilização/clivagem. a,b,c níveis de significância para P<0.05.

1º Ensaio

Resultados e Discussão

Experiência 1

Morfometria

		Áreas						
Grupos		N	Total (μm²)	Citoplasm (μm²)	Gordura (μm²)	Índex de gordura (%)	N	Gotas lipídicas (μm²)
Imaturos	0h	10	18099 ^{de}	12445 ^{bc}	9997 ^b	54.8	800	12.4
Controlo	22h	10	19414 ^{abcd}	14173 ^{ab}	12003 ^a	61.3	800	10.8
	44h	10	19963 ^{ab}	14040 ^{ab}	10814 ^{ab}	56.5	800	11.5
Etanol	22h	9	18806 ^{bcd}	13937 ^{ab}	11416 ^{ab}	58.2	800	10.6
	44h	11	20503 ^{ab}	15533 ^a	12741 ^a	60.0	800	11.0
t10,c12 CLA	22h	9	19791 ^{abc}	14092 ^{ab}	11401 ^{ab}	57.1	800	8.7
	44h	9	20736 ^a	14373 ^a	11332 ^{ab}	55.2	800	11.4
Forscolina	22h	9	17362 ^e	11784 ^c	9759 ^b	55.8	800	10.3
	44h	9	17694 ^{de}	12063 ^c	9886 ^b	54.9	800	10.0
RSD			2014	2006	2012	7.0		7.1
P			0.002	0.001	0.015	0.311		0.129

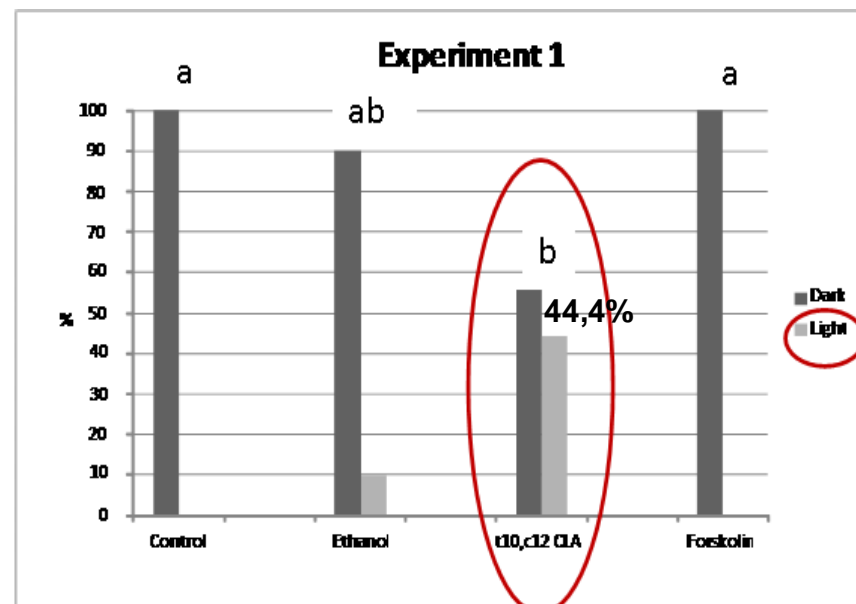
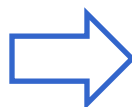
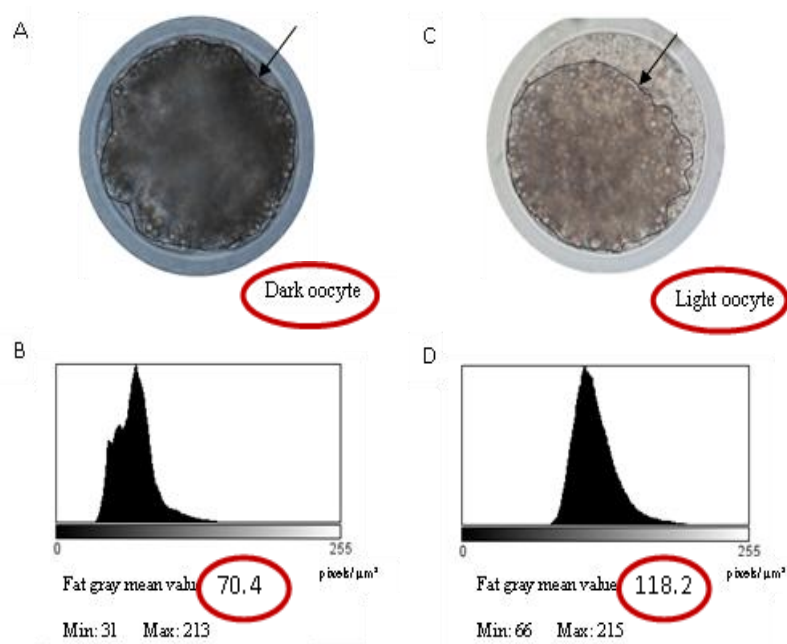
Efeito da suplementação de t10,c12 CLA e forscolina na cultura de oócitos, durante 44h , sobre a área do oócito, citoplasmática, de gordura e de gotas lipídicas. a,b,c níveis de significância para P<0.05.

1º Ensaio

Resultados e Discussão

Experiência 1

Tonalidade da mancha de gordura do oócito de suíno medida pela área do histograma e classificação do oócito



Porcentagem de oócitos de tonalidade escura ou clara



Marcado efeito do CLA aclarando a mancha de gordura - melhoria da qualidade do oócito

Oócitos em plano equatorial (mic.Nomarski) com histograma de cinzentos para mancha de gordura:

A,B) Controlo, 44h (oócito escuro)

C,D) t10,c12 CLA 44h (oócito claro)

Escala de cinzentos: 0 pixéis-escuro a 255 pixéis-claro.

1º Ensaio

Resultados e Discussão

Experiência 2

Maturação e Fertilização/Clivagem

	Intervalo de Suplementação		
Imaturos	0h ^c	→	% Maturação 2.1%
Controlo	s/s ^a	→	% Maturação 71.6%
Excipiente	0-22h ^a		% Fertilização/Clivagem 54.5%
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0-22h ^a		
Forscolina	0-22h ^b	→	% Maturação 24.3%
			% Fertilização/Clivagem 8.3%

Efeito da suplementação do meio de cultura de oócitos de suíno com *t*10,*c*12 CLA e forscolina, durante 44h, sobre a taxa de maturação nuclear e de fertilização/clivagem. a,b,c níveis de significância para P<0.05.

1º Ensaio

Resultados e Discussão

Experiência 2

Morfometria

Grupos		Áreas				Gotas lipídicas		
		N	Total (µm²)	Citoplasm (µm²)	Gordura (µm²)	Índice de gordura (%)	N	GL area (µm²)
Imaturos	0h	10	18280 ^{cd}	12499 ^b	10036 ^{cd}	54.8 ^c	800	11.9
Controlo	24h	10	19544 ^{abc}	14206 ^{ab}	12147 ^{ab}	61.9 ^{ab}	800	10.4
	44h	10	20009 ^{ab}	14054 ^{ab}	10903 ^{bcd}	57.0 ^c	800	11.1
Etanol	22h	9	18863 ^{bcd}	13961 ^{ab}	11474 ^{abcd}	58.5 ^{abc}	800	10.1
	44h	8	19747 ^{abc}	14963 ^a	12141 ^{ab}	59.4 ^{abc}	800	12.7
t10,c12 CLA	22h	9	19942 ^{abc}	14137 ^{ab}	11521 ^{abc}	57.5 ^{bc}	800	8.3
	44h	10	20995 ^a	14628 ^a	11745 ^{ab}	55.7 ^c	800	9.8
Forscolina	22h	9	17456 ^d	11805 ^c	9879 ^d	56.3 ^c	800	9.9
	44h	10	19959 ^{abc}	14116 ^{ab}	12573 ^a	62.7 ^a	800	10.3
RSD			1971	1982	1756	5.1	7.2	
P			0.010	0.024	0.011	0.011	0.152	

Efeito da suplementação do meio de cultura de oócitos de suíno com forscolina, durante as 2h iniciais, sobre a área do oócito, citoplasmática, de gordura e de gotas lipídicas. a,b,c níveis de significância para P<0.05.

1º Ensaio

Resultados e Discussão

Experiência 3

Maturação e Fertilização/Clivagem

Intervalo de Suplementação			
Imaturos	0h ^b	→	% Maturação 0.0%
Controlo	s/s ^a		
Forscolina	0-2h ^a	→	% Maturação 56.2% % Fertilização/Clivagem 45.5%

Efeito da suplementação do meio de cultura de oócitos de suíno com forskolina, durante as 2h iniciais, sobre a taxa de maturação nuclear e de fertilização/clivagem. a,b,c níveis de significância para P<0.05.

1º Ensaio

Resultados e Discussão

Experiência 3

Morfometria

Grupos		Areas					Gotas Lipídicas	
		N	Total (μm^2)	Citoplasm (μm^2)	Gordura (μm^2)	Índice de gordura (%)	N	GL area (μm^2)
Imaturos	0 h	12	17574 ^b	12280 ^b	10161 ^b	57.6 ^{bc}	1000	13.3 ^a
Controlo	22h	11	21336 ^a	16294 ^a	14148 ^a	65.6 ^a	1000	11.5 ^{ab}
	44h	11	20332 ^a	14977 ^a	11049 ^b	54.1 ^c	1000	10.7 ^{bc}
Forscolina	22h	11	19740 ^a	14132 ^{ab}	11896 ^b	59.8 ^{ab}	1000	8.0 ^c
	44 h	12	20199 ^a	14578 ^a	11054 ^b	55.0 ^{bc}	1000	11.4 ^{ab}
RSD			2402	2609	2375	6.4		7.4
P			0.007	0.011	0.003	0.0006		0.006

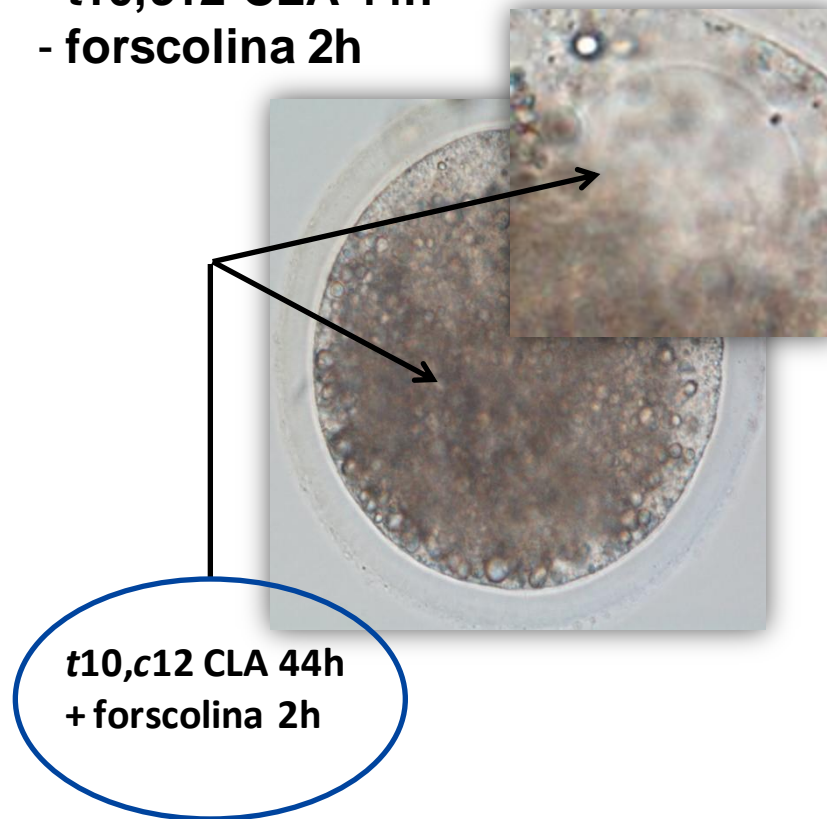
Efeito da suplementação do meio de cultura de oócitos de suíno com forscolina, durante as 2h iniciais, sobre a área do oócito, citoplasmática, de gordura e de gotas lipídicas. a,b,c níveis de significância para P<0.05.

2º Ensaio

2.1. Objetivo

Testar o efeito da maturação *in vitro* e da suplementação dos meios de cultura com *t10,c12* CLA durante 44h, forskolina durante as primeiras 2h (de acordo com os melhores resultados do ensaio anterior) e **ambos**, sobre a taxa de maturação do oócito e a **composição em ácidos gordos / dimetilacetais dos complexos cumulus-oócito**.

- *t10,c12* CLA 44h
- forskolina 2h



2º Ensaio

Metodologia	Momento da análise
COC imaturos (oócitos / CC)	0h
COC maturados (oócitos / CC)	44h após MIV
COC controlo (oócitos / CC)	44h após MIV
COC t10,c12 CLA (oócitos / CC)	44h após MIV
COC FSK 2h (oócitos / CC)	44h após MIV
COC CLA + FSK 2h (oócitos / CC)	44h após MIV
Fluído folicular	0h
Meio pré-MIV (10% FF)	0h
Meio de cultura - controlo	44h após MIV
Meio de cultura - t10,c12 CLA	44h após MIV
Meio de cultura - FSK 2h	44h após MIV
Meio de cultura - CLA + FSK 2h	44h após MIV



Investigar o efeito da maturação



Investigar o efeito dos suplementos durante a maturação

Análises:

- . **Cromatografia:** percentagens e totais de ácidos gordos / dimetilacetais de oócitos, CC, fluído folicular e meios de cultura, às 0h e às 44h de MIV
- . **Coloração:** taxa de maturação de oócitos, após 44h de MIV

2º Ensaio

Resultados e Discussão

Efeitos da maturação

Tendência (P=0.056) para aumentar os totais de AG/DMA durante a MIV – oócitos e células

	Imaturos		Maturados		Estadio de Maturação	Tipo de célula	Interação
	Oócitos	Células do cumulus	Oócitos	Células do cumulus			
SFA	61.6 ^a ±1.45	49.2 ^a ±1.45	61.3 ^a ±1.45	43.1 ^b ±1.45	0.116	<0.001	0.049
MUFA	23.0 ^c ±1.09	33.5 ^b ±1.09	23.3 ^c ± 1.09	27.0 ^a ±1.09	0.050	<0.001	0.013
PUFA	14.0 ^c ±0.50	15.7 ^c ±1.17	14.6 ^c ±0.50	27.4 ^a ±1.17	0.002	<0.001	<0.001

Totais de ácidos gordos: saturados, SFA, monoinsaturados, MUFA e polinsaturados, PUFA (P≤0.05)

No final da maturação:

Oócitos – C16:0 – conversão em ATP

- c7-16:1 – alongamento

- C18:2n-6 - sínteses

CC – aumentou e diversificou os PUFA – sínteses e membranas

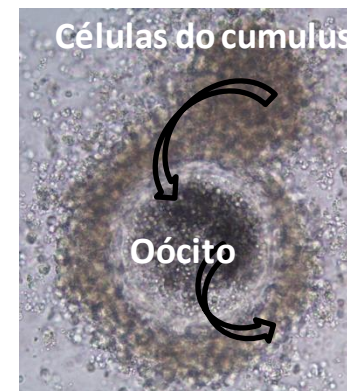
- C18:0

- C18:2n-6

- C20:4n-6 - sínteses

- DMA 16:0 } fosfolípidos

- DMA 18:0 }



2º Ensaio

Resultados e Discussão

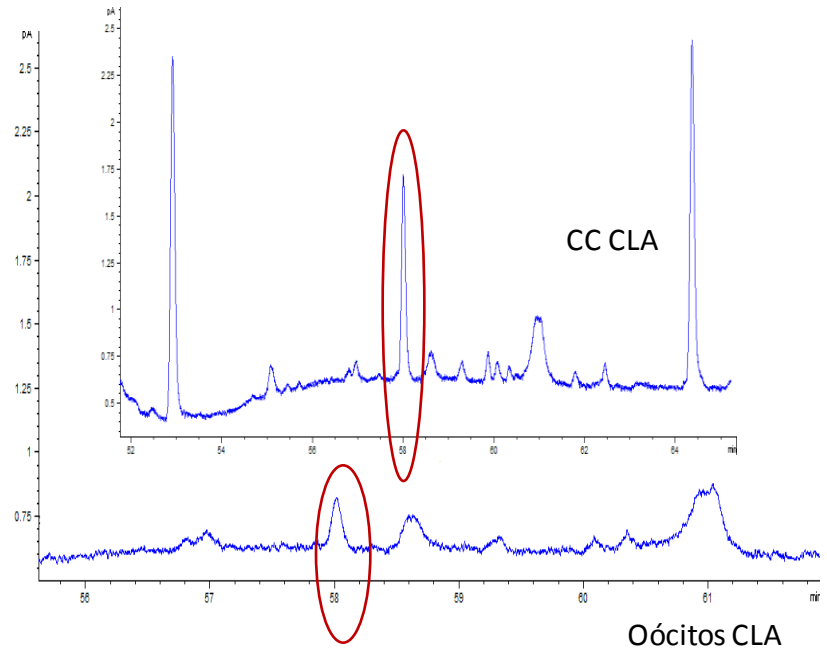
Sem interferência sobre a taxa de maturação: CO= 87.99%
CLA= 84.71%
FSK= 86.94%
CLA+FSK= 84.98%

Efeitos dos moduladores durante a maturação

	Controlo		t10,c12 CLA		FSK		t10,c12 CLA+FSK		P values				
									Contrastes/Tratmento			Tipo de célula	T x C
	Oócitos	CC	Oócitos	CC	Oócitos	CC	Oócitos	CC	CLA	FSK	CLFK		
t10,c12 CLA	nd	nd	1.17±0.29	6.46±2.05	nd	nd	1.25±0.29	6.29±2.05	0.440	0.328	0.389	<0.001	0.900
SFA	61.30±0.99	43.10±1.06	59.30±0.56	47.30±4.95	60.50±0.31	46.70±0.77	59.90±0.61	44.30±2.21	0.044	0.535	0.376	0.012	0.095
MUFA	23.30 ^{ab} ±0.60	27.00 ^c ±1.05	24.40 ^{ab} ±0.60	22.40 ^a ±1.05	24.50 ^{ab} ±0.60	27.40 ^c ±1.05	23.40 ^{ab} ±0.60	25.70 ^{bc} ±1.05	0.343	0.333	0.483	<0.001	0.017
PUFA	14.60±0.35	27.40±2.32	15.80±0.35	29.50±2.32	14.40±0.35	24.30±2.32	15.80±0.35	28.60±2.32	0.823	0.916	0.542	<0.001	0.696

Totais de ácidos gordos: saturados, SFA, monoinsaturados, MUFA e polinsaturados, PUFA (P≤0.05)

- . Acumulação de t10,c12 CLA nos COC, principalmente em CC
- . Diminuição de MUFA em CC com CLA / CLA+FSK
- . Sem alteração dos Totais de AG/DMA



2º Ensaio

Resultados e Discussão

- . Efeitos sobre AG/DMA individuais em cada tratamento e tipo de célula, mostrando interação e nos meios de cultura

trans-10,*cis*-12 CLA

- . absorção de t10,c12 CLA no oócito e CC
- . redução da concentração de **DMA-18:0** nas CC,
- . redução de **DMA-16:0**, **18:3n-6**; **c11-20:1**

Forskolina

- . reduz **15:0** nos oócitos
- . aumenta a concentração em **c9-18:1** nos oócitos vs Controlo e nas CC vs CLA

trans-10,*cis*-12 CLA+FSK

- . não há interferência na acumulação de CLA
- . FSK mantém o efeito sobre a concentração em **c9-18:1** nas CC
- . FKS anula o efeito do CLA sobre DMA **18:0**
- . decréscimo de **20:4n-6** nas CC – possível efeito aditivo

Nos meios de cultura após 44h de MIV:

- . Presença de t10,c12 CLA aquando da suplementação
- . Diminuição de **c9-18:1**, **c11-18:1** e **total de MUFA** no grupo CLA comparativamente ao grupo FSK
- . CLA e CLA+FSK apresentam maiores percentagens de **22:6n-3** vs controlo



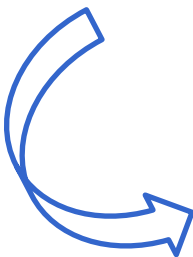
3º Ensaio

Objetivo 3.1.

avaliar os efeitos da manipulação lipídica, *t10,c12* CLA 44h, forskolina 2h e ambos, durante a maturação *in vitro* sobre as taxas de maturação e **fertilização monoespérmica do oócito, de desenvolvimento e de crio-resistência embrionários.**

Metodologia

Grupos	Intervalos de Suplementação
Controlo	0-44h
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0-44h
Forskolina	0-2h
<i>t10,c12</i> CLA + forskolina	0-44h CLA + 2h FSK



Variáveis Morfológicas

Taxa de Maturação

Taxa de Fertilização Monoespérmica

Eficiência do Sistema de Fertilização

Taxa de Produção de Blastocistos

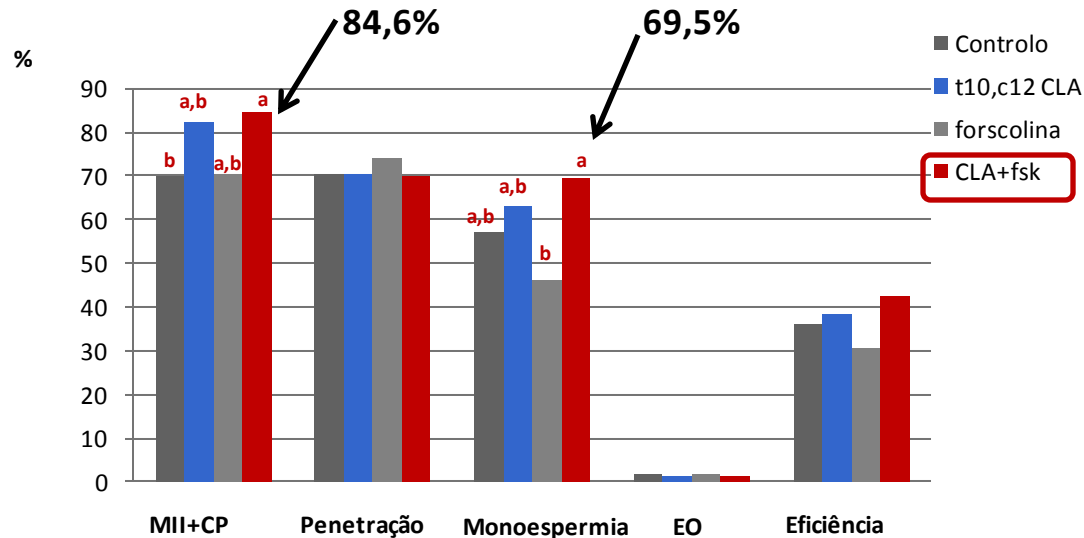
Taxa de Sobrevivência Embrionária após Vitrificação-Aquecimento

Número Total de Células do Blastocisto

3º Ensaio

Resultados e Discussão

Efeito dos moduladores sobre a competência para a fertilização



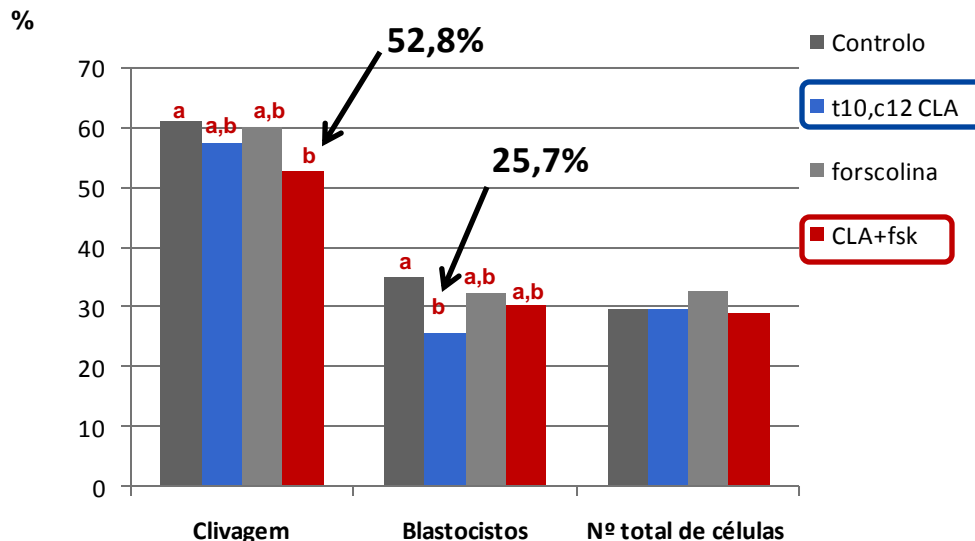
- Melhoria das taxas de maturação e de monoespermia no grupo CLA+FSK, contudo com redução da taxa de clivagem.



- Redução da taxa de produção de blastocistos no grupo CLA.

-Alteração do desenvolvimento do oócito e do embrião foram relacionadas com modificações do metabolismo lipídico induzidas pelos suplementos.

Efeito dos moduladores sobre o desenvolvimento embrionário

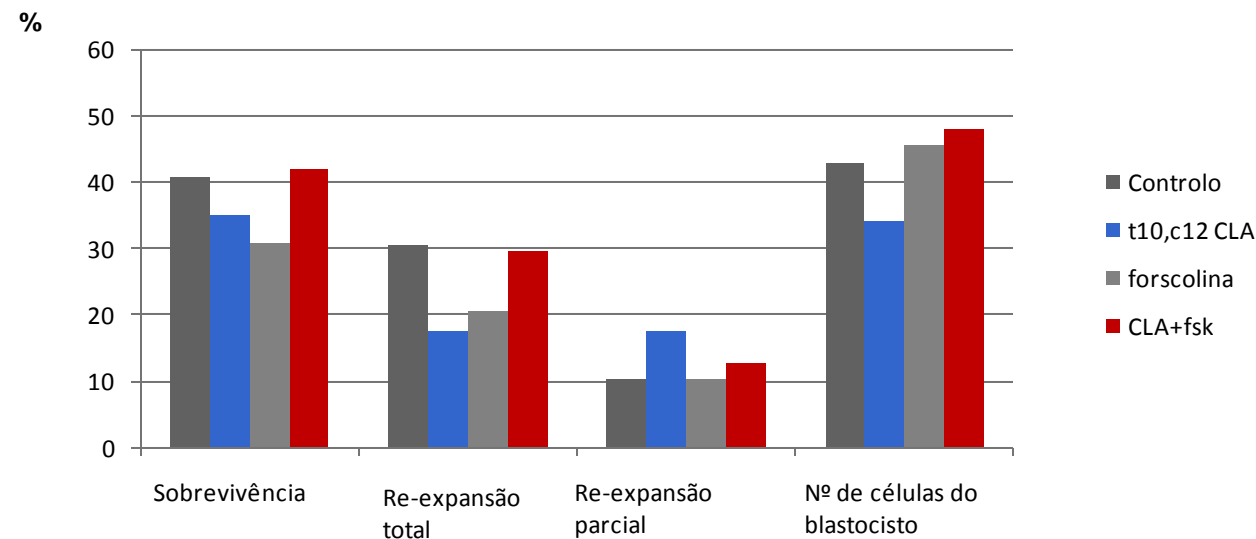


- Sem alteração da qualidade do blastocisto avaliada pelo número total de células, sugerindo capacidade para regular o metabolismo das reservas endógenas e exógenas durante o período pré-implantatório

3º Ensaio

Resultados e Discussão

Efeito dos moduladores sobre a crio-resistência embrionária



- **Sem efeitos sobre a crio-resistência.** Alterações de metabolismo lipídico induzidas por suplementação com *t10,c12* CLA e forskolina durante MIV não se reflectem na criopreservação – regulação do metabolismo e apoptose celular.

Conclusões Finais

- Expansão do citoplasma e redistribuição das gotas lipídicas (GL) durante a maturação in vitro do oócito de suíno. Agregação e polarização das GL associada à modificação da tonalidade do citoplasma.



Alterações resultantes da modulação lipídica

- Inibição da maturação nuclear do oócito tratado com **forskolina durante longos períodos** com diminuição do crescimento citoplasmático e da competência para a fertilização / clivagem.
- Sincronização da maturação nuclear e citoplasmática com forskolina durante as **2h** iniciais de MIV e indução da lipólise. Claro efeito da forskolina sobre a regulação do ciclo do oócito.
- Aclaramento da tonalidade do citoplasma no oócito maturado com **t10, c12 CLA** durante **44h**, com interferência na distribuição citoplasmática e composição das gotas lipídicas – Efeito sobre a redução/modificação do conteúdo de gordura e melhoria da qualidade morfológica do oócito.

Conclusões Finais

- O COC é uma unidade dinâmica em termos de metabolismo lipídico, com comportamentos distintos de oócitos e células do cumulus durante a maturação.
- Há seleção dos AG/DMA pelos oócitos e CC durante a maturação e por interferência de moduladores $t10,c12$ CLA e a forskolina.
- A alteração de ácidos gordos individuais dos oócitos e das CC, pode interferir com composição, metabolismo e coalescência das gotas e a capacidade para a fertilização do oócito.



Há efeito sinérgico dos dois moduladores melhorando a maturação citoplasmática e a fertilização monoespérmica, provalmente pela estimulação das vias da PKA e PKC.

A adição de $t10,c12$ CLA ao meio de cultura de oócito alterou o metabolismo e reduziu o desenvolvimento para blastocisto, sem comprometer a sua qualidade e crio-resistência..

Perspetivas Futuras

Crio-resistência embrionária

- Adição de **t10,c12 CLA** ao meio de cultura de embriões, testando doses e tempos de **suplementação**
- **Quantificação de IGF1** no fluído folicular, meios de cultura e no conteúdo lipídico celular do oócito e blastocisto, como indicador de alterações da composição lipídica por suplementação com novos moduladores lipídicos.

Transferência para fêmeas recetoras dos embriões criopreservados, em simultâneo com a inseminação artificial com sémen criopreservado, permitirá repor os efetivos nas raças autoctones em declínio populacional.

Agradecimentos

FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

SFRH/BD/42359/2007



Unidade de Investigação em Genética,
Reprodução e Melhoramento Animal
Instituto Nacional de Recursos Biológicos



**UNIVERSIDADE
DE LISBOA**

**Instituto de Histologia e Biologia do
Desenvolvimento**



**Facultad de Medicina Veterinaria
Universidad de Murcia**