

Área Científica **Produção Animal**

Código PTDC/CVT-REP/2863/2012 **Início** 2013/6/1 **Termo** 2015/11/30
Título SUPEROOCYTES - Propriedades da membrana e homeostase do cálcio em oócitos: estratégias inovadoras para a otimização da criopreservação

Programa FCT **Medida** Projetos de I&D em todos os Domínios Científicos

Instituição Líder Associação da Faculdade de Farmácia para a Investigação e Desenvolvimento

Investigador Responsável INIAV Rosa Maria Lino Neto Pereira

Orçamento Total 135 063,00€

Orçamento INIAV 77 820,00€

Parceria

FARM-ID	Associação da Faculdade de Farmácia para a Investigação e Desenvolvimento	Nacional
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.	Nacional

Equipa

Rosa Maria Lino Neto Pereira
António Eduardo Monteiro Horta
Carla Maria Ferreira Cruz Varanda Marques
Maria da Conceição Grave de Sousa Cabral Baptista
Patrícia Do Carmo Bidarra Reis Mesquita

Resumo

A preservação dos recursos genéticos animais é uma prioridade internacional. Portugal possui um património genético rico e diversificado, incluindo 58 raças reconhecidas, a maioria delas em perigo de extinção. A criopreservação eficiente de gâmetas e embriões em bancos de germoplasma animal teria um efeito crucial na conservação desta biodiversidade. Também na maioria das mulheres com cancro, o início imediato da radio e quimioterapia é obrigatório e a criopreservação de oócitos imperativa para uma fertilidade subsequente. Este projeto conjuga os esforços de 2 equipas de peritos em diferentes áreas, a fim de aprofundar o conhecimento da fisiologia da criopreservação de oócitos e melhorar os protocolos existentes. No final, esperamos ter contribuído com um forte conhecimento de base permitindo aumentar substancialmente a taxa de sucesso da criopreservação de oócitos de mamíferos. Iremos investigar sistematicamente alguns fatores previamente implicados na taxa de sucesso da criopreservação: 1) fase de maturação dos oócitos, 2) presença do isómero conjugado trans10,cis12 do ácido linoleico (CLA) no meio de maturação, 3) ausência de cálcio (Ca^{2+}) nos meios de vitrificação, 4) diferentes cocktails de crioprotetores (CPA). Assim: 1) oócitos bovinos em vesícula germinal são extremamente sensíveis à criopreservação, sendo a membrana citoplasmática muitas vezes danificada e a integridade das junções comprometida, com interrupção da comunicação entre as células do cumulus e oócito. No entanto, a fase ótima da meiose para vitrificação dos oócitos continua controversa, pelo que testaremos 2 períodos de maturação diferentes: 16h e 22h. 2) resultados preliminares da nossa equipa (anexo 1) mostram que a inclusão de CLA no meio de maturação melhoram as taxas de criosobrevivência dos oócitos, diminuindo a permeabilidade da membrana à água e aos crioprotetores. Iremos testar estes efeitos investigando em mais detalhe o efeito do CLA na criosobrevivência do oócito e posterior competência para o desenvolvimento embrionário assim como na compreensão dos seus efeitos sobre o oolema. 3) ausência de Ca^{2+} durante o processo de criopreservação impede a perda de competência oocitária e melhora a penetração da zona pelúcida (ZP) pelos espermatozoides. Este projecto visa, portanto, investigar o efeito do Ca^{2+} nos resultados da criopreservação e correlacioná-los com os níveis de Ca^{2+} intracelular. 4) os CPA como o etilenoglicol (EG), dimetilsulfoxido (DMSO), 1,2-propanediol (PrOH) ou a sucrose são vitais para o sucesso de criopreservação, pois impedem a formação de cristais de gelo. No entanto, são também extremamente tóxicos se utilizados em concentrações muito elevadas e/ou prolongadamente. Alguns estudos mostram que os oócitos expostos a soluções contendo CPA sofrem aumentos transitórios nos níveis de Ca^{2+} intracelular [15]. A cinética destes aumentos de Ca^{2+} parece depender da natureza do CPA. Aqui, vamos investigar os efeitos de dois protocolos diferentes de criopreservação contendo EG, DMSO e sacarose [29] ou PrOH e sacarose [3] na viabilidade dos oócitos descongelados, propriedades da membrana e homeostasia do Ca^{2+} . Vamos identificar combinações de fatores que levam aos melhores, médios e piores resultados de criopreservação, medidos em termos de viabilidade de oócitos e posterior competência para o desenvolvimento. Vamos investigar o efeito desses protocolos de criopreservação nas propriedades da membrana, como a permeabilidade, fluidez, integridade e composição, e na homeostasia do Ca^{2+} . Além disso, propomos estudar uma nova e potencial estratégia para o sucesso da criopreservação de oócitos. Propomos que os recetores purinérgicos P2Y2 acoplados à proteína G (P2Y2Rs), cuja estimulação leva à libertação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático, podem ser diretamente implicados nos distúrbios da homeostasia do Ca^{2+} durante o processo de criopreservação. Estes recetores foram previamente identificados pela sua importância na maturação dos oócitos. A modulação dos P2Y2 pode potencialmente constituir uma nova forma de melhorar os protocolos atuais de criopreservação. A força deste estudo reside não só na análise sistemática e metódica dos fatores acima mencionados, mas principalmente na correlação que iremos estabelecer entre eles e seus efeitos sobre as propriedades da membrana e da homeostasia do Ca^{2+} e também na nova hipótese dos P2Y2Rs como intervenientes importantes para o sucesso da criopreservação. Este estudo utiliza como modelo oócitos bovinos, amplamente estudados por uma das nossas equipas. No entanto, o conhecimento vasto e concertado que iremos atingir com este projeto sobre os fenómenos fisiológicos que ocorrem durante um protocolo de criopreservação será de grande importância não só para a área de conservação das espécies animais, mas também para a tecnologia de reprodução assistida em humanos ou animais. Mais ainda, ele irá contribuir significativamente para a manutenção dos recursos genéticos animais portugueses.