

Plan Overview

A Data Management Plan created using DMPTool-Stage

DMP ID: <https://doi.org/10.48321/D1V013>

Title: Efeito do bloqueio das vias de sinalização PI3K/AKT e HIPPO sobre a aquisição da competência oocitária e ovulação induzida in vivo em bovinos

Creator: Matheus Batista de Oliveira - **ORCID:** [0000-0002-6626-1444](https://orcid.org/0000-0002-6626-1444)

Affiliation: Universidade de São Paulo (www5.usp.br)

Principal Investigator: Matheus Batista de Oliveira

Project Administrator: Felipe Perecin

Funder: Não se aplica

Template: Template USP - Baseado no DCC

Project abstract:

O objetivo desse projeto será identificar o efeito dos moduladores da via de sinalização PI3K / AKT e Hippo na expressão gênica, na competência oocitária, no desenvolvimento embrionário inicial e no perfil de secreção de vesículas extracelulares (VEs) no fluido folicular (FF). Serão utilizados trinta ($n = 30$) vacas adultas para os procedimentos para sincronização do estro e, conseqüentemente, para a injeção intrafolicular aquelas com folículo ovariano com diâmetro mínimo de 12 mm no D9. Na primeira fase será realizada uma modulação da via PI3K / Akt. Para isso, os animais receberão os seguintes tratamentos: G1 - controle não tratado (NaCl 0,9%); G2 - LH (400 ng / mL); G3 - SC-66 (inibidor da Akt); G4 - LH (400 ng / mL) + SC-66; G5 - SC-79 (ativador da Akt) e; G6 - LH (400 ng / mL) + SC-79. Na segunda fase será realizada a modulação da via Hippo, também injetando-se por intrafolicular os seguintes procedimentos: G1 e G2 serão aproveitados da primeira fase; G3 - VP; G4 - LH 400 ng / mL + VP; G5 - P17 e; G6 - LH 400 ng / mL + P17.). O conteúdo folicular será publicado *por ovum pick-up* and centrifugado para separação das células do cumulus (CC) para análise de expressão gênica; e remoção do FF para posterior análise de EV. As VEs serão caracterizadas quanto à morfologia, tamanho e concentração pelo *Nanosight* quanto ao perfil de miRNA por expressão gênica em que será usado uma placa de 380 miRNAs. Os oócitos serão ativados partenogeneticamente com ionomicina (5mM) e 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; 2 mM) para avaliação da capacidade de desenvolvimento até blastocisto no D2 (48h), D7 (168h) e D8 (196h) pós-ativação. Será realizada a detecção e quantificação das proteínas fosforiladas (Akt e YAP) por meio da técnica de *Western blotting*.

Start date: 02-17-2021

End date: 02-17-2023

Last modified: 08-07-2023

Copyright information:

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

Efeito do bloqueio das vias de sinalização PI3K/AKT e HIPPO sobre a aquisição da competência oocitária e ovulação induzida *in vivo* em bovinos - Coleta de Dados

O projeto é composto por dois experimentos e assim serão nomeadas as pastas. Todos os arquivos serão nomeados de acordo com o experimento e data e localizados em subpastas dos protocolos. Todos os dados obtidos manualmente, como idade, peso, número de registro do animal, data de início do protocolo de sincronização do estro, tratamento recebido, diâmetro folicular, número de oócitos aspirados, classificação de oócitos, número de oócitos maturados *in vitro*, embriões cultivados *in vitro* e estágio de desenvolvimento pós-ativação partenogenética serão anotados em caderno de laboratório e digitados em planilha de dados em formato .xlsx (Excel), as quais serão armazenadas em nuvem e em HD.

Os dados processados serão gerados em outra planilha e ficarão disponíveis na pasta de acordo com o protocolo e na subpasta de acordo com a análise feita. Os dados gerados por corrida em equipamento de RT-PCR e PCR em tempo real serão armazenados no equipamento e na nuvem disponível em formato .xlsx para o laboratório que o pesquisador principal gerencia. Além disso, os dados obtidos de tamanho de vesículas extracelulares e concentração em cada amostra e dados relacionados a detecção de quantificação por *western blotting* de proteínas fosforiladas também serão armazenados em seus respectivos equipamentos e em nuvem. Adicionalmente, as imagens fotodocumentadas a partir de equipamento de quimioluminescência serão disponibilizadas em formato tif., em arquivo em formato.zip. Cada imagem será identificada por número.

Os dados digitados e interpretados são mantidos em planilhas em formato.xlsx e arquivados tanto em HD como na nuvem. Os dados gerados poderão ser reutilizados ao longo dos próximos anos após o encerramento deste projeto para produção de outras pesquisas.

Dados relacionados idade, peso e número de registro dos animais serão obtidos previamente ao início do experimento, sendo registrado em planilhas de Excel. Dados referentes ao número de oócitos aspirados e suas respectivas classificações, taxas de clivagens e taxa de blastocistos serão obtidos por meio de visualização em microscópio estereoscópio binocular (lupa).

Dados relacionados à RT-PCR e PCR em tempo real serão obtidos por meio do processamento e análise das amostras em equipamento específico para a formação do cDNA e quantificação do material amplificado (*Quant Studio 6 Flex (Life Technology, EUA)*), respectivamente. A eficiência dos *primers* desenhados será analisada a partir de uma diluição seriada em diferentes concentrações utilizando-se um modelo matemático, comparando-se os *primers* dos genes candidatos com os *primers* de genes endógenos.

Na análise de expressão gênica, ao final dos ciclos da PCR, será procedida uma curva de dissociação para confirmar a amplificação de um ou dois produtos de cDNA. A expressão dos miRNA será normalizada com a média geométrica do valor de Ct genes endógenos.

A morfologia e concentração de vesículas extracelulares serão obtidos a partir do *Nanosight (NS300; Malvern)*, sendo os dados obtidos armazenados na base de dados do computador auxiliar e na nuvem.

Dados relativos a detecção de proteínas fosforiladas (Akt e YAP) serão obtidos pelo auxílio do equipamento Bio-Rad (Trans-Blot® Turbo-Bio-Rad) e do leitor fotodocumentador chemidoc (BioRad) para leitura e documentação das imagens.
