

## **ESTRESSE CONTROLADO E MODULADORES DE CROMATINA PARA OTIMIZAR A CRIOTOLERÂNCIA E O DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS E EMBRIÕES *IN VITRO***

Camila Ceccato Ferreira<sup>1</sup>, Joana Claudia Mezzalira<sup>2</sup>, Alceu Mezzalira<sup>3</sup>

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PROBIC/UDESC.

<sup>3</sup> Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV.

<sup>1</sup> Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV – alceu.mezzalira@udesc.br.

Palavras-chave: Pressão negativa, vitrificação de oócitos, criopreservação.

A produção *in vitro* de embriões é uma das biotécnicas da reprodução animal mais empregadas atualmente, mostrando uma crescente busca por estratégias que melhorem o desempenho embrionário, oócitos bovinos provenientes de abatedouros foram submetidos a um estresse controlado, por pressão negativa, e posteriormente criopreservados pela técnica de vitrificação, sendo avaliado o posterior desenvolvimento embrionário. No primeiro experimento (18 repetições) os oócitos foram dispostos em grupos da seguinte forma: um grupo controle, sem submissão à pressão negativa e maturados conforme protocolo padrão e três grupos cujos oócitos imaturos foram submetidos às pressões negativas de 250 mBar (NC 250), 500 mBar (NC 500) e 750 mBar (NC 750). A viabilidade foi avaliada a partir do desenvolvimento embrionário após FIV. Os blastocistos (BI) e blastocistos expandidos (Bx) obtidos foram então vitrificados no dia 7 (D7) de cultivo, sendo posteriormente avaliados quanto à taxa de eclosão até 72 h após o reaquecimento. Os resultados mostram que a taxa de clivagem do grupo NC 250 (75,4%) foi inferior ( $P \leq 0,05$ ) ao grupo NC 750 (80,1%), sendo ambos semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos grupos Controle (77,5%) e NC 500 (78,6%). A produção embrionária não diferiu entre os grupos Controle (31,0%), NC 250 (29,2%), NC 500 (30,4%), NC 750 (31,6%). Os embriões frescos dos diferentes grupos apresentaram taxas de eclosão semelhante entre eles. Os embriões vitrificados dos grupos submetidos à pressão negativa tiveram taxas de eclosão semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos embriões frescos do mesmo grupo NC 250 (66,7 vs. 82,1%), NC 500 (80,0 vs. 96,0%), NC 750 (66,7 vs. 79,3%). Já o grupo controle (fresco) teve eclosão superior (82,1% -  $P \leq 0,05$ ) ao grupo vitrificado (50,0%) sem emprego da pressão negativa. O grupo NC 500 vitrificado foi o único grupo exposto a pressão negativa que apresentou eclosão superior ao grupo controle vitrificado (80,0 vs 50,0%). O segundo experimento (8 repetições) avaliou o efeito da pressão negativa nos blastocistos. Os BI e Bx obtidos no D7 foram expostos às três pressões negativas descritas acima e a sua eclosão foi avaliada até 72 h após a manipulação, sendo comparados ao grupo controle. O grupo NC 750 apresentou taxa de eclosão (67,0%) inferior ( $P \leq 0,05$ ) aos demais grupos, que foram semelhantes entre si (Controle 85,7%; NC 250 88,8%; NC 500 85,6%). Para investigar se o uso da pressão negativa nos blastocistos seria benéfica na criopreservação, Blastocistos e Blastocistos expandidos foram submetidos às pressões de 250 e 500 mBar (5 repetições), e a seguir

vitrificados (NC 250 Vitri e NC 500 Vitri), sendo comparados ao protocolo padrão de vitrificação (Controle Vitri) e a embriões Controle Frescos. Os resultados mostraram que os grupos Controle Fresco e Vitri tiveram eclosão semelhante ( $P > 0,05$ ) (90,0 e 86,0% respectivamente). A eclosão dos grupos NC 250 Vitri (65,3%) e NC 500 Vitri (72,4%) foram semelhantes entre si e ao Controle Vitri, mas inferiores ao Controle Fresco. Estes resultados sugerem que a utilização de pressão negativa em blastocistos não aumenta a eclosão de embriões vitrificados. Por fim, para a escolha da intensidade de pressão negativa a ser utilizada em oócitos, um terceiro experimento foi realizado (7 repetições) com embriões produzidos por partenogênese. A aplicação de pressão negativa nos oócitos imaturos não afetou a maturação oocitária (% de oócitos em metafase II), bem como a taxa de clivagem. A produção de blastocistos do grupo NC 250 (25,3%) foi inferior ao grupo Controle (34,0%), sendo ambos semelhantes ao grupo NC 500 (31,0%) e NC 750 (32,2%). Os grupos Controle e NC 250 apresentaram maior proporção de blastocistos iniciais (Bi), enquanto o grupo NC 500 produziu semelhante proporção de Bi, Bl e Bx, e o grupo NC 750 maiores proporções de Bl, seguido de Bx. Os embriões provenientes do grupo NC 500 apresentaram taxa de eclosão superior (40,4%) ao grupo Controle (23,6%). O grupo NC 500 mostrou boa proporção de Bl e Bx. O grupo NC 750 teve a menor proporção de Bi com boa taxa de eclosão, sendo ambos os tratamentos bons candidatos a aumentar a viabilidade dos oócitos. Conclui-se que a produção embrionária não é afetada quando oócitos são submetidos à pressão negativa, porém a eclosão após a vitrificação dos blastocistos é aumentada com o emprego de pressão negativa, possibilitando resultados comparáveis aos controles frescos. Os dados sugerem que a pressão negativa de 500 mBar é a mais indicada para ser aplicada a oócitos imaturos, para melhorar a criotolerância dos posteriores blastocistos. No caso de blastocistos expostos às pressões negativas, resultados demonstram que a pressão de 750 mBar é prejudicial aos embriões, e que as pressões de 250 e 500 mBar não influenciaram a eclodibilidade dos mesmos. Quanto à eclosão dos embriões após vitrificação, o uso de pressão negativa não aumentou a eclosão de embriões vitrificados. Ainda, os dados do terceiro experimento demonstram que a pressão negativa não interfere na maturação oocitária de oócitos. Ainda, as pressões de 500 e 750 mBar apresentaram boas taxas de eclosão, sugerindo ter boa aplicabilidade para aumentar a viabilidade oocitária.