

Influência de uma pré-capacitação espermática e redução do tempo de interação entre gametas na formação de blastocistos bovinos *in vitro*

Jose Alfonso Echavarria Martinez

Francieli Perroni Berling, Camila Mota Mendes

Marcelo Demarchi Goissis.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo

jose.echavarria@unillanos.edu.co

Objetivos

O sucesso da edição gênica bi-alélica em zigotos por CRISPR-Cas9 pode ser influenciado pelo momento da microinjeção dos reagentes. O protocolo tradicional de fecundação *in vitro* (FIV) leva 18h, ocasionando por vezes a injeção em zigotos cujo genoma já iniciou a duplicação do DNA. Formulamos a hipótese que uma pré-capacitação espermática não influenciaria negativamente a taxa de formação de blastocistos. O objetivo geral foi reduzir o tempo de incubação conjunta dos gametas. O objetivo específico foi analisar a influência na taxa de blastocistos de uma pré-capacitação espermática por 5 horas, seguida de fecundação *in vitro* por outras 5h, comparada com um grupo controle convencional com 16h de incubação conjunta dos gametas.

Métodos e Procedimentos

Os dados foram coletados entre julho e agosto de 2023 no laboratório Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal da Universidade de São Paulo.

Delineamento experimental

Os oócitos foram obtidos por aspiração de ovários oriundos de matadouro comercial e

selecionados apenas os oócitos grau I. Estes foram distribuídos de forma randomizada em dois grupos: Grupo Controle, na qual foi realizado o protocolo convencional de produção *in vitro* de embriões (PIVE), contendo uma etapa de 18h de incubação de gametas, e grupo com a FIV reduzida (FIV-R), na qual os espermatozoides foram submetidos à capacitação em meio FIV por 5h seguida da incubação de gametas por outras 5h. Foi escolhido o tempo total de 10h, pois é o menor tempo de incubação dos gametas sem prejudicar a PIVE (Ward et al. 2002, Lamas-Toranzo et al. 2019). A taxa de blastocistos (número de oócitos/número de blastocistos formados) foi obtida para análise.

Produção in vitro de embriões

Os oócitos selecionados foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) por 22h para então serem alocados nos grupos Controle ou FIV-R. As incubações ocorreram em estufa com ambiente controlado a 38,5°C e 5% de CO₂

O sêmen foi descongelado e submetido a gradiente de Percoll com diferentes densidades, percoll 90% e 45%, para seleção dos espermatozoides viáveis. Em seguida, foram diluídos para ajuste de concentração, sendo utilizado dose inseminante de 1×10^6 espermatozoides viáveis/ml em gotas de 90 µL de meio de FIV contendo agentes capacitantes

heparina, penicilina, hipotaurina e epinefrina. No grupo controle, os espermatozoides foram adicionados às gotas contendo os oócitos maduros (0 horas pós inseminação – 0 hpi) e permaneceram por 18h em estufa. No grupo FIV-R os espermatozoides passaram por uma pré-capacitação de 5h nas gotas de 90 µL, antes da adição dos oócitos, que. A incubação dos espermatozoides e oócitos (0 hpi) ocorreu por mais 5h.

Ao fim da FIV, os oócitos foram desnudados em vórtex, lavados e transferidos para gotas contendo meio KSOM em estufa com atmosfera de 5% CO₂ e 5% O₂ para a etapa de cultivo *in vitro* (CIV). Decorridas 90hpi, foi obtida a taxa de clivagem e a troca de 30% do meio. A taxa de blastocistos foi obtida às 186hpi.

Estatística

A análise estatística utilizou ANOVA seguido da comparação de médias pelo teste de Tukey usando o PROC GLM do SAS. Os grupos experimentais foram consideradas as variáveis independentes e as taxas de clivagem e blastocisto foram as variáveis dependentes analisadas.

Resultados

A partir da média das três réplicas observou-se que o grupo FIV-R apresenta redução significativa da taxa de clivagem comparado ao grupo controle ($p=0,0432$). No entanto, a taxa de blastocistos não diferiu entre os grupos ($p=0,1568$). Os dados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1: Número de zigotos, taxas de clivagem e blastocistos dos grupos Controle e FIV-R. Dados apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média.

Grupo	Zigotos	Taxas (%)	
		Clivagem	Blastocisto
Controle	330	76,66 $\pm$ 7,43	24,56 $\pm$ 5,42
FIV-R	268	27,72 $\pm$ 7,43	7,56 $\pm$ 5,42

Conclusões

Conclui-se que não houve diferença estatística, na formação de blastocistos. Entretanto a grande redução numérica, mesmo com um baixo número de replicatas, sugere a inviabilidade da técnica na rotina de produção *in vitro* de embriões.

Agradecimentos

Agradeço à equipe do Laboratório de Fertilização *In Vitro*, Clonagem e Transgênia Animal pela oportunidade de desenvolver o experimento, ao professor Marcelo, à Francieli e Camila por me ajudarem no processo de pesquisa.

Referências

LAMAS-TORANZO, I. et al. Strategies to reduce genetic mosaicism following CRISPR-mediated genome edition in bovine embryos. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 14900, 2019.

WARD, Fabian et al. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2105-2117, 2002.

Influence of sperm pre-capacitation and reduced gamete interaction time on bovine blastocyst formation in vitro

Jose Alfonso Echavarria Martinez

Francielli Perroni Berling; Camila Mota Mendes

Marcelo Demarchi Goissis

College of Veterinary Medicine and Animal Science/University of São Paulo

jose.echavarria@unillanos.edu.co

Objectives

The success of biallelic gene editing in zygotes using CRISPR-Cas9 can be influenced by the timing of the microinjection of the reagents. The traditional in vitro fertilization (IVF) protocol takes 18 hours, sometimes leading to injection into zygotes whose genome has already begun DNA duplication. We hypothesized that sperm pre-training would not negatively influence the rate of blastocyst formation. The general objective was to reduce the joint incubation time of the gametes. The specific objective was to analyze the influence on the blastocyst rate of sperm pre-capacitation for 5 hours, followed by in vitro fertilization for another 5 hours, compared to a conventional control group with 16 hours of joint incubation of the gametes

Materials and Methods

The data was collected between July and August 2023 at the In Vitro Fertilization, Cloning and Animal Transgenesis laboratory at the University of São Paulo.

Experimental design

Oocytes were obtained by aspirating ovaries from a commercial slaughterhouse and only grade I oocytes were selected. These were randomly assigned to two groups: the Control

Group, in which the conventional in vitro embryo production (IVEP) protocol was performed, which includes an 18-hour gamete incubation stage, and the Reduced IVF Group (IVF-R), in which the sperm underwent capacitation in IVF medium for 5 hours followed by gamete incubation for another 5 hours. A total 10h of gamete incubation time was chosen because it is the shortest that does not reduce IVEP rates (Ward et al. 2002, Lamas-Toranzo et al. 2019). The blastocyst rate (number of oocytes/number of blastocysts formed) was obtained for analysis.

In vitro embryo production

The selected oocytes were subjected to in vitro maturation (IVM) for 22 hours and then allocated to the Control or IVF-R groups. Incubations took place in a controlled environment at 38.5°C and 5% CO₂.

The semen was thawed and submitted to a Percoll gradient with different densities, 90% and 45% Percoll, to select the viable sperm. They were then diluted to adjust the concentration, using an inseminating dose of 1×10^6 viable sperm/ml in 90 µL drops of IVF medium containing the capacitating reagents heparin, penicillin, hypotaurine and epinephrine. In the control group, the sperm were added to the drops containing the mature oocytes (0 hours post insemination – 0 hpi) and left for 18 hours in the incubator. In the IVF-R group, the sperm

underwent a 5-hour pre-capacitation in the 90 μ L drops before the oocytes were added. The sperm and oocytes were incubated (0hpi) for another 5 hours.

At the end of IVF, the oocytes were denuded by vortex, washed and transferred to drops containing KSOM medium in an incubator with an atmosphere of 5% CO₂ and 5% O₂ for the in vitro culture (IVC) stage. After 90hpi, the cleavage rate was assessed and 30% of the medium was changed. The blastocyst rate was assessed at 186hpi.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by ANOVA followed by comparison of means by the Tukey test using PROC GLM in SAS. The experimental groups were considered the independent variables and cleavage and blastocyst rates were the dependent variables analyzed.

Results

The average of the three replicates showed that the IVF-R group presented a significant reduction in cleavage rate compared to the control group ($p=0.0432$). However, the blastocyst rate did not differ between the groups ($p=0.1568$). The data is shown in Table 1.

Table 1: Number of zygotes, cleavage rates and blastocysts in the Control and IVF-R groups. Data is shown as mean $\pm$ standard error of the mean

Group	Zygotes	Rates (%)	
		Cleavage	Blastocyst
CTRL	330	76.66 $\pm$ 7.43	24.56 $\pm$ 5.42
IVF-R	268	27.72 $\pm$ 7.43	7.56 $\pm$ 5.42

Conclusions

It can be concluded that there was no statistical difference in the formation of blastocysts. However, the large numerical reduction, even with a low number of replicates, suggests that the technique is not viable for routine in vitro embryo production.

Acknowledgements

I would like to thank the team at the Laboratory of In Vitro Fertilization, Cloning and Animal Transgenesis for the opportunity to carry out the experiment, Professor Marcelo, Francieli and Camila for helping me in the research process.

References

LAMAS-TORANZO, I. et al. Strategies to reduce genetic mosaicism following CRISPR-mediated genome edition in bovine embryos. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 14900, 2019.

WARD, Fabian et al. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2105-2117, 2002.