

Efeito do envelhecimento nas taxas de fecundação, desenvolvimento embrionário *in vitro* e implantação em murinos

Larissa Araújo Stáble, Camilla Mota Mendes, Thais Rose dos Santos Hamilton, Mayra Elena Ortiz D' Ávila Assumpção

Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de São Paulo

larissa.stabile@hotmail.com

Objetivos

Os resultados dos impactos do envelhecimento paterno nas taxas desenvolvimento embrionário *in vitro* são escassos e controversos; uma possível explicação são os diferentes pontos de corte para a idade paterna, além da maioria dos estudos serem realizados em clínicas de reprodução assistida humana, podendo haver tendência na escolha dos controles e também por serem dados retrospectivos. O uso do modelo murino propicia grupos homogêneos e controlados, e com resposta rápida devido ao ciclo reprodutivo. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as taxas de clivagem, formação de blastocistos e desenvolvimento embrionário *in vitro* em zigotos murinos, provenientes de fêmeas acasaladas com machos jovens e senis.

Métodos e Procedimentos

O experimento (CEUA nº 7125160518) foi conduzido no Laboratório de Biologia do Espermatozoide (VRA, FMVZ, USP). Foram utilizadas fêmeas murinas (n=13; linhagem C57Bl6, com 2 a 4 meses de idade) superovuladas (eCG; hCG) para os acasalamentos com machos jovens (n=6; 4 meses de idade, representando homens de 20 anos de idade – Dutta; Sengupta, 2015) e senis (n=7; 1,5 a 2 anos de idade, correspondendo a 67 a 86 anos para homens). As fêmeas foram eutanasiadas por deslocamento cervical (RN 37 - 18/01/2018 CONCEA), 12 horas após a cópula, correspondendo ao dia 0,5 (D0,5) do desenvolvimento embrionário. Acessou-se então o trato reprodutivo feminino, sendo os presumíveis zigotos coletados e transferidos para uma placa de petri com solução salina fosfatada tamponada (PBS) com 10% de soro fetal bovino à 37°C (Nagy *et al.*, 2003). Para remoção das células do cummulus (denudação), os presumíveis zigotos foram

expostos a solução de hialuronidase (Sigma-Aldrich®) à 0,1%. Os zigotos coletados foram cultivados *in vitro* em meio KSOM (MR 020P-5D, Millipore, Massachusetts, EUA) à 38,5°C, 5% de CO₂ em ar, sob alta umidade. No D1,5 do cultivo *in vitro* foi avaliado a taxa de clivagem (número de embriões clivados/número de estruturas totais x 100). No D4,5, foram avaliadas as taxas de blastocisto (número de blastocistos/número de estruturas totais x 100) e de desenvolvimento embrionário (número de blastocistos/número de embriões clivados x 100). As avaliações foram realizadas em estereomicroscópio (SZ61, Olympus, Tóquio, Japão) na magnitude de 60x. Os dados foram analisados pelo programa SAS System for Windows 9.3. Foi realizada a análise de variância para comparação dos dois grupos experimentais, empregou-se o procedimento T TEST, e utilizou-se o nível de significância de 5% para rejeitar a hipótese de nulidade.

Resultados

Observou-se que as fêmeas acasaladas com camundongos jovens apresentaram maiores taxas de clivagem (64,92%±5,78 e 29,00%±4,83; $p=0,0012$), de formação de blastocisto (26,94%±9,20 e 2,79%±1,79; $p=0,0465$) e de desenvolvimento embrionário (58,82%±12,64 e 7,33%±4,52; $p=0,0207$) *in vitro*, quando comparado ao grupo senil, respectivamente.

Conclusões

A partir desses resultados, sugere-se que o aumento da idade paterna, em murinos, influencia negativamente nas taxas de clivagem, formação de blastocisto e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Referências Bibliográficas

Dutta *et al.* Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*, 2015. Nagy *et al.* *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2003, p. 43-45, ISBN 0-87969-574-9.

Aging effect on fertilization rates, *in vitro* embryo development and implantation in murine

Larissa Araújo Stáble, Camilla Mota Mendes, Thais Rose dos Santos
Hamilton, Mayra Elena Ortiz D Avila Assumpção

School of Veterinary Medicine – University of São Paulo

larissa.stabile@hotmail.com

Objectives

The impacts of paternal aging on *in vitro* embryo development rates are not well known and controversial. A possible explanation would be the different cut-off points for paternal age, and that the majority of the studies being carried out in assisted reproduction clinics, which may be tendentious in the choice of control group and retrospective. The murine model provides homogeneous and controlled groups. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the cleavage, blastocyst formation and embryo development rates *in vitro* in murine zygotes, from females mated with young and senile males.

Materials and Methods

The experiment (CEUA nº 7125160518) was conducted in Laboratory of Sperm Biology (VRA, FMVZ, USP). Superovulated (eCG; hCG) murine females (n=13; lineage C57Bl6, with 2 to 4 months old) were used for mating with young males (n=6; 4 months old, representing 20 year old men - Dutta; Sengupta, 2015) and senile (n=7; 1.5 to 2 years of age, corresponding to 67 to 86 years for men). The females were euthanized with cervical dislocation (RN 37 - 18/01/2018 CONCEA), 12 hours after presumed mating, corresponding to embryonic day 0.5 (D0.5). After that, female reproductive tract was accessed, and presumed zygotes collected and transferred to a petri dish containing phosphate buffered saline (DPBS) with 10% fetal calf serum at 37°C (Nagy *et al.*, 2003). To remove the cumulus cells (denudation) the presumed zygotes were exposed to 0.1% hyaluronidase solution (Sigma-Aldrich®). Collected zygotes were then *in vitro* cultured in KSOM medium (MR 020P-5D, Millipore, Massachusetts, USA) at 38.5°C, 5% CO₂ in air, under high humidity. On D1.5 of *in vitro* culture, the cleavage rate (number of cleaved embryos/number of total structures x

100) was evaluated. On D4.5, the blastocyst formation rate (number of blastocysts/number of total structures x 100) and the embryo development rate (number of blastocysts/number of cleaved embryos x 100). The evaluations were performed in a stereomicroscope (SZ61, Olympus, Tokyo, Japan) at a magnitude of 60x. Statistical analysis was performed using the SAS System for Windows 9.3, were performed T TEST procedure in dependent variables, and considered a significance level of 5% to reject the null hypothesis.

Results

Females mated with young murines showed higher cleavage rate 64.92%±5.78 and 29.00%±4.83; $p=0.0012$), blastocyst formation rate (26.94%±9.20 and 2.79%±1.79; $p=0.0465$) and embryo development rate (58.82%±12.64 e 7.33%±4.52; $p=0.0207$) *in vitro*, when compared to the senile group, respectively.

Conclusions

From the results obtained, it is suggested that the increase in paternal age, in murines, has a negative influence on cleavage, blastocyst formation and embryo development rates *in vitro*.

References

Dutta *et. al.* Men and mice: Relating their ages. **Life Sciences**, 2015. Nagy *et. al.* **Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2003, p. 43-45, ISBN 0-87969-574-9.