

VIABILIDADE *IN VITRO* APÓS VITRIFICAÇÃO DE BLASTOCISTOS DE *Mus domesticus domesticus* CULTIVADOS A PARTIR DE EMBRIÕES DE 1-CÉLULA

IN VITRO VIABILITY AFTER VITRIFICATION OF *Mus domesticus domesticus* BLASTOCYSTS CULTURED FROM ONE-CELL

Leandro Francisco BASILE
Orientador: Professor Dr. José Luiz RODRIGUES
Departamento de Patologia Animal - UFRGS

RESUMO

Foram realizados três experimentos para se avaliar o desenvolvimento *in vitro* de blastocistos de *Mus domesticus domesticus* (CF1xSWISS) cultivados a partir de embriões de 1-célula, após exposição e vitrificação em solução crioprotetora contendo 9,0 M de EG acrescido ou não de 0,3 M de SAC. No experimento 1, após o cultivo de 755 embriões de 1-célula, foram observadas taxas de eclosão de 53,0% para o meio HTF e de 61,7% para o meio KSOM ($P>0,05$), suplementados com 4 mg/ml de BSA + 20 e 25 mM de HEPES. No experimento 2 testaram-se os possíveis efeitos tóxicos de soluções crioprotetoras propostas: VS1 = 1,8 M EG em PBS + 6% BSA (60 s) seguido de 9,0 M EG em PBS + 6% BSA (imersão direta) e VS2 = 9,0 M EG + 0,3 M SAC em PBS + 6% BSA (imersão direta) em 152 blastocistos cultivados a partir de embriões de 1-célula em meio KSOM com 25 mM de HEPES. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos controle (86%), VS1 (82,3%) e VS2

(78,4%). No experimento 3, 140 blastocistos cultivados por 72 h em meio KSOM com 4 mg/ml modificadas (OPSm) nas soluções crioprotetoras acima descritas, alcançando taxas de eclosão de 45,7 e 41,4% para VS1 e VS2 ($P>0,05$), respectivamente. Portanto, concluiu-se que ambos os meios, HTF e KSOM acrescidos de BSA e HEPES, proporcionaram o completo desenvolvimento embrionário *in vitro*. Apesar de não ter ocorrido diferença estatística ($P>0,05$), no meio KSOM observou-se que os embriões tiveram uma curva de crescimento mais homogênea e melhores taxas de eclosão, representando mais uma alternativa para o cultivo de embriões de 1-célula. Igualmente, não houve variação significativa ($P>0,05$) nas taxas de eclosão para os blastocistos de *Mus domesticus domesticus* vitrificados nas soluções crioprotetoras contendo 9,0 M de EG com ou sem o acréscimo de 0,3 M de SAC.

ABSTRACT

Three experiments were carried out in order to evaluate the *in vitro* development of *Mus domesticus domesticus* (CF1xSWISS) blastocysts cultured from one-cell embryos after exposition and vitrification in a cryoprotectant solution composed of 9.0 M EG added or not of 0.3 M SAC. In the first experiment, after the culture of 755 one-cell embryos, were observed the hatching rates of 53.0% for HTF medium and 61.7% for KSOM medium ($P>0,05$) supplemented with 4 mg/ml BSA + 20 and 25 mM HEPES, respectively. In the second experiment were evaluated the capacity of the embryos to hatching after exposition to the cryoprotectant solutions proposed (VS1 = 1.8 M EG in PBS + 6% BSA (120 s) followed by 9.0 M EG in PBS + 6% BSA and VS2 = 9.0 M EG + 0.3 M SAC in PBS + 6% BSA). First the embryos were cultured from one-cell to blastocyst stage and after 152 blastocysts were exposed to the vitrification solutions (VS1 and VS2). The

exposition don't showed significant difference ($P>0.05$) among the control (86.0%), VS1 (82.3%) and VS2 (78.4%) groups. In the third experiment 140 blastocysts cultured for 72 h in KSOM with 4 mg/ml BSA + 25 mM HEPES were vitrified in 0.25 ml modified straws (OPSm) in the cryoprotectant solutions previously described, reaching hatching rates of 45.7 and 41.4% in VS1 and VS2 ($P>0.05$), respectively. Then, it was concluded that both HTF and KSOM + BSA and HEPES produced a complete *in vitro* preimplantation embryos development. However, the embryos cultured in KSOM medium showed a homogeneous growing curvature and higher hatching rates, which can be another alternative for culture of one-cell embryos. Equally, there were no differences ($P>0.05$) in the hatching rates between *Mus domesticus domesticus* vitrified blastocysts in cryoprotectant solutions containing 9.0 m EG with or without the addition of 0.3 M SAC.