

SP 7143
2016
SP-PP-SP 7143

SBTE 242 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”
Número de submissão 1596

Inibição da HSP90 durante maturação interfere na abundância relativa de transcritos específicos no oócito bovino
Eliza Diniz de Souza¹; Natana Chaves Rabelo²; Rhaisa Bernarde Silva Dias³; Michele Munk Pereira⁴; Gustavo Torres de Souza⁴; Iuri Drumond Louro¹; Luiz Sérgio de Almeida Camargo⁵

1. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)/Renorbio, Vitória, ES, Brasil; 2. Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira / Fiocruz (IFF, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); 3. Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), Juiz de Fora, MG, Brasil; 4. Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG, Brasil; 5. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

A proteína de choque térmico 90kDa (HSP90) é uma das mais abundantes chaperonas e essencial à sobrevivência da célula. Sua inibição pelo 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17AAG; Sigma, St. Louis, USA) durante a MIV reduz a competência oocitária com consequente diminuição na taxa de produção de embriões (Souza et al., 2013. AnimReprod, 10:515). Em camundongos, a redução ou a inibição da HSP90, causa uma série de anomalias que impedem a progressão da meiose em oócitos (Metchat et al., 2009). O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da inibição da HSP90 pelo 17AAG durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos na quantidade relativa de transcritos específicos associada ao desenvolvimento e maturação. Oócitos imaturos aspirados de ovários de abatedouro foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em três grupos: 0 (controle), 1 e 2µM de 17AAG nas 12h iniciais da MIV (24h) a 38°C, 5%CO2 e umidade saturada. Três pools de dez oócitos para cada grupo foram desnudados em hialuronidase 0,1% e congelados em nitrogênio líquido. Para a extração do RNA total dos oócitos foi utilizado RNeasy micro Kit® (Qiagen, São Paulo, Brasil) e para a transcrição reversa o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A quantificação relativa dos transcritos MAPK, c-MOS, MATER, ZAR, e HSP90 foi realizada por Real-TimePCR pelo método do Ct comparativo, utilizando o gene GAPDH como referência endógena e o grupo controle como calibrador. Os resultados foram analisados pelo software REST®, que usa o modelo estatístico Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST®. Os valores são mostrados como média±EP. Não houve diferença (P>0,05) entre o grupo 1µM e o grupo controle na quantidade de transcritos dos genes MAPK (0,85±0,17), c-MOS (0,86±0,13), MATER (0,93±0,14), ZAR (0,97±0,15) e HSP90 (0,70±0,11). Entretanto, o grupo com 2µM do inibidor da HSP90 apresentou menor quantidade de transcritos dos genes MAPK, ZAR e HSP90 (P<0,05; 0,63±0,10; 0,68±0,10; 0,60±0,08, respectivamente) que o grupo controle. Conclui-se que a inibição da HSP90 utilizando 2µM de 17AAG por 12h durante a MIV interfere na abundância de transcritos de genes importantes para a maturação e posterior desenvolvimento embrionário, o que ressalta a importância da HSP90 nos processos de maturação oocitária.

Palavras-chave: Expressão gênica; 17AAG; maturação

SP7142

SBTE 243 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”
Número de submissão 1597

Taxa de apoptose após vitrificação/reaquecimento de embriões Gir produzidos *in vitro*
Clara Ana Santos Monteiro¹; Beatriz Abdalla Ferraz de Barros²; Paola Maria da Silva Rosa³; Gabriela Ramos Leal¹; Agostinho Jorge dos Reis Camargo⁴; Raquel Varella Serapião⁴; Clara Slade Oliveira⁵

1. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil; 2. Fundação Educacional D. André Arcoverde-FAA, Valença, RJ, Brasil; 3. Universidade Severino Sombra-USS, Vassouras, RJ, Brasil; 4. Pesagro Rio, Niterói, RJ, Brasil; 5. Embrapa Gado De Leite, Valença, RJ, Brasil.

A raça Gir é a principal representante *Bos indicus* nos sistemas leiteiros na América do Sul, especialmente no Brasil, tendo apresentado melhora significativa na produção de leite, além da resistência às condições de clima tropical e ectoparasitas, sendo, portanto, uma importante raça doadora de oócitos para PIVE. A criopreservação de embriões é uma ferramenta vantajosa na PIVE, apresentando, as subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus* desempenhos diferentes nessa biotécnica. Apesar da importância da raça Gir no Brasil, pouco se sabe sobre seus parâmetros de tolerância a criopreservação. Sendo assim, o objetivo do estudo foi verificar a taxa de apoptose associada à criotolerância de embriões Gir puros produzidos *in vitro*. Para obtenção dos CCOs, doadoras Gir foram submetidas à aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal. Os oócitos viáveis foram maturados, fertilizados com sêmen sexado de touro Gir, e os prováveis zigotos foram cultivados durante 7 dias. Foi utilizado sistema de incubação a 38,5° C, 5%CO2 em ar atmosférico e alta umidade, e meios de MIV, FIV e CIV da Bioklone® (Jaboticabal, Brasil). No 7º dia de cultivo os embriões foram vitrificados utilizando o protocolo proposto por Vajta (Vajta, Mol Reprod Dev, 51, 53-58, 1998) com pequenas modificações. Os embriões vitrificados foram reaquecidos e cultivados por mais 3 horas, quando foi avaliada a re-expansão da blastocela. Os embriões vitrificados/reaquecidos que apresentaram re-expansão da blastocela (V+) e que não apresentaram (V-) foram corados para avaliação do número total de células (NTC) com Hoechst e apoptose com detecção de imunofluorescência da caspase-3. A comparação entre as médias do NTC e taxa de apoptose entre os grupos foi feita através do Teste de Mann Whitney. As análises estatísticas foram realizadas no software InStat GraphPad, com nível de significância de 5%. Um total de 38 embriões vitrificados/reaquecidos foi obtido em 3 repetições (V+ n= 10; V- n=28). Não houve diferença (p>0,05) entre os

SP7143

grupos, tanto na média do NTC (V+: 82,4a ± 27,1; V-: 79,5a ± 26), quanto na taxa de apoptose (V+: 5,9%a: V-: 15,4%a). Vale ressaltar que, embora, esse efeito não tenha sido significativo, foi observado, no grupo de embriões que não apresentou re-expansão da blastocela, um maior número de embriões apresentando mais de 20% de células apoptóticas. No entanto, a taxa de apoptose não parece ser a causa da não re-expansão da blastocela de embriões da raça Gir vitrificados, e por tanto que não são selecionados para transferência.

Agradecimentos: FAPERJ, FAPEMIG, CAPES, Embrapa Gado de Leite.

Palavras-chave: Caspase; OPU; *Bos indicus*

SBTE 244 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1601

Uso de marcadores moleculares CLARIFIDE Nelore para predição de índices reprodutivos em novilhas Nelore

Juliano Rodrigues Melo; Aduino José Guedes Franco Filho; Everton Rodolfo Carvalho; Rafael Carvalho; Mauro Meneguetti; Fernando Alfonso Di Croce; Ocilon de Sá Filho; Jason Barrett Osterstock

Zoetis, São Paulo, SP, Brasil.

Estudos indicam que a Predição do Valor Molecular (MVP) para características reprodutivas, como Probabilidade de Parto Precoce (PPP) e Idade ao Primeiro Parto (IPP), pode ser utilizada como ferramenta para prever o desempenho reprodutivo futuro de fêmeas bovinas (Evans et al., 1999; Doyle et al., 2000; Donoghue et al., 2004). O objetivo deste estudo foi avaliar correlações entre MVP (PPP e IPP) e índices reprodutivos de novilhas Nelore precoces. Utilizaram-se 908 novilhas Nelore (263,0 ± 27,4 Kg; 17,6 ± 1,0 meses de idade), manejadas em pasto de *Brachiaria decumbens* com suplementação proteica (0,1% PV) e avaliadas genômica (CLARIFIDE Nelore, Zoetis). Todas as novilhas foram submetidas a protocolo de indução de ciclicidade, seguido por sincronização de ovulação e IATF. As novilhas que não engravidaram à IATF foram resincronizadas e, em seguida, expostas à monta natural por 90 dias. Avaliações ultrassonográficas avaliaram a resposta ao protocolo de indução de ciclicidade (presença de CL no dia do início do protocolo de IATF) e a taxa de prenhez ao final da estação de monta. As análises estatísticas foram realizadas no SAS 9.3 (SAS Instituto, Cary-NC, EUA), utilizando o PROC LOGISTIC para avaliar as variáveis binomiais e o PROC GLM para avaliar as variáveis contínuas. Houve efeito do MVP para PPP na taxa de indução de ciclicidade (P = 0,005), de forma que cada ponto percentual de aumento no MVP incrementou em 5% a probabilidade de resposta ao protocolo de indução. Novilhas com menor valor para IPP tenderam (P = 0,1) a apresentar melhor prenhez ao final da estação de monta. Os MVP para PPP e IPP fornecidos pela ferramenta genômica CLARIFIDE Nelore permitiram identificar novilhas que responderam melhor ao protocolo de indução de ciclicidade e que tenderam a apresentar maior probabilidade de prenhez ao final da estação de monta.

Palavras-chave: Clarifide; molecular; reprodução

SBTE 245 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1614

Influência da via GMPc no conteúdo lipídico de oócitos bovinos maturados *in vitro*

Leticia Schefer¹; Katia Lancellotti Schwarz²; Daniela Martins Paschoal²; Hugo Fernandes²; Fernanda Cavallari Castro²; Cláudia Lima Verde Leal²

1. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil; 2. Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

A criopreservação de oócitos e embriões é uma das dificuldades encontradas na produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV). Oócitos e blastocistos de bovinos PIV apresentam acúmulo de lipídios mais elevados em relação aos produzidos *in vivo*. Essa característica tem sido associada com a qualidade inferior do embrião PIV e, por consequência, sua maior sensibilidade à criopreservação. Foi observado em adipócitos humanos que além da via clássica mediada pelo AMPc sobre a lipólise celular, a via GMPc também ativa enzimas importantes nesse processo, através da proteína cinase dependente de GMPc (PKG). O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da via GMPc na lipólise oocitária. Pools de 25 CCOs foram maturados *in vitro* (MIV) em TCM199 suplementado com 10% SFB e diferentes moduladores da via GMPc. A síntese de GMPc foi estimulada por 10⁻⁵ M Protoporfirina IX e 10⁻⁶ M NPPA (peptídeo natriurético atrial) e bloqueada por 10⁻⁴ M ODQ. A degradação do GMPc pela PDE5 foi inibida por sildenafil (SDF - 10⁻⁵ M) associado a 10⁻⁵ M KT5823 (inibidor da PKG). Após 24h, os oócitos foram desnudados e corados com Hoechst 33342 e Nile Red, para análise, por microscopia de epifluorescência, do estágio de maturação nuclear e teor lipídico, respectivamente (emissão 445-450nm e excitação 475-490nm e emissão 590nm e excitação 516-560nm, respectivamente). As imagens obtidas tiveram suas intensidades de fluorescência (IF) mensuradas pelo programa ImageJ. Os dados referentes a 5 replicatas/grupo foram submetidos a análise estatística por ANOVA seguida pelo teste Tukey com nível de significância de 5% (software GraphPad Prism). A maturação nuclear (%MII) não foi influenciada por nenhum dos moduladores da via GMPc (77,6%, P>0,05). A via GMPc estimulada pela Protoporfirina IX (21,5±0,94 IF) ou por SDF associado ao KT5823 (29,2±1,15 IF) resultou em oócitos com menor teor de lipídios em relação aos demais tratamentos e ao grupo controle (36,9±2,12 IF, P<0,05). No entanto, o estímulo gerado pelo NPPA não foi suficiente para reduzir o conteúdo lipídico (34,1±1,43 IF) que foi similar ao tratamento com ODQ (32,6±1,71 IF) e ao controle (P>0,05). Nossos resultados sugerem a interferência da via GMPc sobre a lipólise