

INFLUÊNCIA DO RESFRIAMENTO NA INCIDÊNCIA DE ANEUPLOIDIA DE OVÓCITOS BOVINOS MATURADOS *in vitro*

[Influence of cooling on the incidence of aneuploidy of *in vitro* matured bovine oocytes]

Hélder Silva Luna^{1,*}, Iris Ferrari², Rodolfo Rumpf³

¹ Laboratório de Embriologia, Departamento de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

² Laboratório de Citogenética, Departamento de Genética, Universidade de Brasília.

³ Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

RESUMO - O objetivo do estudo foi verificar o efeito do resfriamento de ovócitos bovinos na incidência de aneuploidia. Ovócitos bovinos foram obtidos de ovários de abatedouro e divididos em cinco grupos: grupo controle (ovócitos não resfriados); grupo 0/4 (ovócitos resfriados a 4 °C antes do início da maturação); grupo 0/29 (ovócitos resfriados a 29 °C antes do início da maturação); grupo 12/4 (ovócitos resfriados a 4 °C após 12 de maturação); e grupo 12/29 (ovócitos resfriados a 29 °C após 12 horas de maturação). Os ovócitos permaneceram resfriados por 45 minutos. Em todos os grupos os ovócitos completaram 24 horas de maturação. Em seguida, os ovócitos foram fixados em lâminas e corados com orceína acética. Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) na incidência de metáfase II aneuplóides entre o grupo controle (0/21; 0%) e os grupos resfriados a 4 °C (25/26; 3,8%) e 29°C (27/29; 6,8%) antes do começo da maturação e 12 horas após o início da maturação (21/24; 12,5% e 27/30; 10%, respectivamente). Conclui-se que o resfriamento a 4 e 29 °C antes do início da maturação ou 12 após não afeta a taxa de aneuploidia, de ovócitos bovinos, após completarem 24 horas de maturação *in vitro*.

Palavras-Chave: Cromossomos, citogenética, maturação *in vitro*, bovino.

ABSTRACT - The objective of the study was to verify the incidence of bovine aneuploid oocytes when cooled. Bovine cumulus-oocyte complexes were recovered from ovaries at a slaughterhouse and then divided into five groups: control group (uncooled oocytes), 0/4 h group (composed of oocytes cooled before the onset of maturation at 4°C), 0/29 (composed of oocytes cooled before the onset of maturation at 29 °C), 12/4 (cooled 12 h after the onset of maturation at 4°C), and 12/29 h group (cooled 12 h after the onset of maturation at 29 °C). The oocytes remained cooled for 45 min. In all groups, the oocytes completed 24 h of maturation. Subsequently, the cumulus cells were removed, and the denuded oocytes fixed on slides and stained with aceto-orcein. No differences ($P > 0.05$) in the incidence of aneuploid metaphase II oocytes were observed between the control group (0/21; 0%) and oocytes cooled at 4°C and 29 °C before (3.8% and 6.8%) and after 12 h the onset of maturation (12.5% and 10%). It is concluded that the cooling at 4 and 29 °C before the maturity or 12 after not affect the rate of aneuploidy of bovine oocytes, after completing 24 hours of *in vitro* maturation.

Keywords: Chromosome, cytogenetic; *in vitro* maturation; bovine.

INTRODUÇÃO

A formação de bancos de gametas femininos encontra-se atualmente como uma destacada alternativa para a conservação de recursos genéticos animais, em especial, espécies ameaçadas de extinção (Andrabi & Maxwell, 2007). Entre os procedimentos de manipulação dos gametas femininos, o resfriamento apresenta importante aplicação, como o transporte dos gametas para

laboratórios que estejam distantes dos locais de obtenção das células ou mesmo como parte do processo de criopreservação. Além disso, com frequência as células permanecem em temperatura ambiente por curtos períodos de tempo durante sua manipulação *in vitro*. Neste sentido, estudos que avaliem as estruturas celulares, a exemplo da análise citogenética, são de fundamental importância (Lechniack & Switonski, 1998; Ocaña-Quero et al., 1999).

* Autor para correspondência. E-mail: hluna@ceua.ufms.br

Entre as estruturas celulares que podem ser alteradas pelo resfriamento, encontra-se o fuso. O fuso meiótico do ovócito é uma estrutura sensível a temperaturas não fisiológicas, fato que pode levar a anormalidades cromossômicas, como aneuploidias e diploidias nos gametas (Pickering et al., 1990). Estas anormalidades cromossômicas nos ovócitos, após fecundação, produzem embriões com reduzidas possibilidades de sucesso de desenvolvimento após implantação, em função de disfunções cromossômicas. Relatos mostram redução da taxa de fertilização, clivagem e formação de blastocistos em ovócitos bovinos que sofreram resfriamento durante a maturação *in vitro* (Martino et al., 1996; Azambuja et al., 1998).

Aman & Parks (1994) mostraram que ovócitos bovinos expostos à temperatura de 4 °C, em diferentes períodos de tempo, mostraram dissolução completa do fuso. Entretanto, o retorno ao cultivo *in vitro*, por 30 minutos à temperatura de 39°C, mostraram evidente regeneração do fuso celular, em função de uma re-polimerização dos microtúbulos. Estes achados, referentes a re-organização do fuso meiótico de ovócitos resfriados e re-cultivados tem sido confirmado (Magistrini & Szollosi, 1980; Sathananthan et al., 1992). O presente trabalho teve como objetivo verificar a incidência de aneuploidia em ovócitos bovinos resfriados a 4 °C ou mantidos a temperatura ambiente (29 °C) antes ou 12 horas após o início da maturação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovários (n=130) foram obtidos em abatedouro e imersos em solução de PBS acrescido de 100 UI/ml de penicilina e 50 µg de estreptomicina e transportados ao laboratório a 37 °C. O tempo de transporte entre o local de coleta e o início do processamento do material foi de 60-90 minutos. Folículos ovarianos, cujas medidas variaram entre 2 e 8 mm foram aspirados. Foram considerados inadequados e, descartados os ovócitos com reduzida quantidade de células da corona radiata, ausência das mesmas ou expandidas. Foram utilizados 975 ovócitos, os quais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos estudados. O meio de cultivo foi composto por TCM 199 sem HEPES (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) com 10% de Soro Fetal Bovino, 10 µg/mL de hormônio foliculo estimulante (FSH), 24 U.I. de hormônio luteinizante (LH) e 50 µg/mL de Gentamicina. A maturação foi realizada em estufa úmida com atmosfera de 5% de

CO₂ a 39 °C, por um período de 24 horas.

Foram formados 5 grupos: grupo controle (ovócitos maturados por 24 horas, sem resfriamento); grupo 0/4 (resfriados antes do começo da maturação a 4 °C por 45 minutos); grupo 0/29 (resfriados antes do começo da maturação à temperatura ambiente por 45 minutos); grupo 12/4 (resfriados com 12 horas após começo da maturação a 4 °C por 45 minutos e re-cultivados por mais 12 horas); grupo 12/29 (resfriados com 12 horas após início da maturação à temperatura ambiente por 45 minutos e re-cultivados por mais 12 horas). O meio em que os ovócitos foram resfriados, foi composto por TCM 199 com 25 mM de Hepes (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido de soro fetal bovino. Uma placa foi colocada diretamente na bancada do fluxo laminar para estabilização da temperatura ambiente a 29±0,5 °C e a outra colocada em uma câmara refrigerada para estabilização a 4,0±0,1 °C. A mensuração das temperaturas foi realizada com medidor automático digital (IOPtherm42; Resolução = -40 a 199,9 °C de 0,1 °C; Fabricado em São Paulo-SP). O resfriamento foi realizado de forma abrupta, retirando-se os ovócitos do cultivo à temperatura de 39 °C e introduzindo-os diretamente no meio resfriado. O aquecimento também procedeu-se de forma abrupta, recolocando os ovócitos em meio de cultivo a 39 °C. Todos os grupos completaram 24 horas de MIV. O período de resfriamento foi de 45 minutos.

Após completarem 24 horas de maturação, foram colocados em solução de hialuronidase a 0,3% por 5 minutos em estufa a 39 °C. As células da corona radiata foram removidas por repetidas pipetagens. Para a hipotonização e fixação dos ovócitos, utilizou-se a técnica descrita por Tarkoski (1966) com pequenas modificações (Ectors et al., 1995). As lâminas foram coradas com orceína acética a 2% por 30 segundos. A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico com aumento de 1000 X e os ovócitos foram classificados como hipo ou hiper-haplóides, sendo que o parâmetro para essa classificação foram os erros na disjunção meiótica. A frequência de ovócitos aneuplóides foi calculada sobre o número de ovócitos hiper-haplóides que apresentavam adequado espalhamento dos cromossomos e ausência de sobreposição. Todos os ovócitos hipo-haplóides (que apresentaram < 30 cromossomos) foram descartados do estudo (Lechniack & Switonski, 1998). Para cada tratamento, foram realizados cinco repetições (26 ovários por repetição) e após a tabulação dos dados foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e o

teste de Tukey, quando encontrada variação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 260 metáfases II haplóides obtidas, em todos os grupos do experimento, 130 metáfases (50%), permitiram análise dos cromossomos. Foram considerados como metáfase normal haplóide aquelas que apresentavam 30 cromossomos com a presença do cromossomo X. As metáfases II hip-haplóides foram descartadas em função da possibilidade de perdas cromossômicas durante a fixação (Yadav et al., 1991; Tiveron et al., 1992; Lechniak et al., 2007). O resultado relacionado à incidência de aneuploidia, está apresentado na Tabela 1. O teste estatístico utilizado não mostrou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos comparados.

A normalidade cromossômica em ovócitos proporciona adequado desenvolvimento de embriões que podem ser destinados a programas conservacionistas ou de melhoramento genético animal. Entre as alterações celulares, a aneuploidia pode ocorrer em ovócitos de mamíferos, incluindo bovinos. A aneuploidia é caracterizada pela redução ou aumento de cromossomos no conjunto genômico de uma determinada espécie, resultando em anormalidades cromossômicas que levam a perdas embrionárias (King, 1990).

Estudos em ovócitos bovinos mostram a ocorrência de aneuploidias. Os procedimentos de manipulação expõem os gametas a ambientes que os induzem ao estresse celular, como a exposição à temperaturas não fisiológicas (Ocaña-Quero et al., 1999). Neste sentido, procurou-se, no presente estudo, verificar possíveis efeitos do resfriamento celular na frequência de ovócitos bovinos aneuplóides.

Além das aneuploidias em ovócitos, existe a diploidia, ocasionada pela retenção do primeiro

corpúsculo polar. Estudos mostram que o resfriamento de ovócitos bovinos a 4 °C não leva ao aumento de diploidias em ovócitos bovinos (Luna et al., 2007). Entretanto, o cultivo de ovócitos bovinos em temperatura sub-ótima de 37 °C, durante 24 horas de maturação *in vitro*, induz ao aumento significativo de alteração cromossômica do tipo diploidia, quando comparado ao grupo controle cultivado a 39 °C (Ocaña-Quero et al., 1999).

Muitos pesquisadores utilizam o resfriamento de ovócitos como estratégia para aumento de tempo de sobrevivência dos gametas após sua coleta. Naio et al. (2007) mantiveram ovários de gatas por 24 horas, em três tratamentos: resfriados por 4 °C; em temperatura ambiente; ou em temperatura de 38 °C. Obtiveram uma taxa de maturação de 54%, 20% e 2,4%, respectivamente. O resfriamento foi benéfico aos gametas que mostraram um índice superior de maturação quando comparado aos outros grupos. Em bovinos, Wang et al. (1995) também resfriaram ovários por 24 horas a 4 °C obtendo-se embriões viáveis. Porém, estudos mostram que o resfriamento leva a dispersão do fuso meiótico, fenômeno que pode conduzir a alterações cromossômicas, em função de não disjunções cromossômicas (Moor & Crosby, 1985; Glenister et al., 1987), por outro lado, Van der Elst et al. (1993) relata que o aspecto morfológico do fuso tem pouca relação ou não é um pré-requisito para a ocorrência de aneuploidias ou poliploidias, uma vez que o fuso celular apresenta capacidade de organização após retorno ao cultivo (Aigner et al., 1992).

No presente estudo os ovócitos foram resfriados a 4 ou 29 °C por 45 minutos antes do início da maturação ou 12 horas após o início da maturação, os quais, após período de resfriamento, foram imediatamente re-cultivados para completarem a maturação *in vitro*. Acredita-se, que apesar da possibilidade da desorganização do fuso meiótico pelo resfriamento ter ocorrido, o período de re-cultivo proporcionou uma nova organização do fuso

Tabela 1 - Taxa de hiper-haploidia em ovócitos bovinos resfriados *in vitro*.

Grupos ^a	Número de Metáfases Analisadas	Metáfases com 30 cromossomos (%)	Metáfases hiper-haplóides >30 cromossomos (%)
Controle	21	21 (100)	-
0/4 ^b	26	25 (96,1)	1 (3,8)
0/29	29	27 (93,1)	2 (6,8)
12/4	24	21 (87,5)	3 (12,5)
12/29	30	27 (90)	3 (10)

^aNão houve diferença significativa entre os grupos estudados ($P > 0,05$).

^b0/4 = resfriados a 4 °C antes do início da maturação; 0/29 = resfriados a 29 °C antes do início da maturação; 12/4 = resfriados a 4 °C com 12 horas após começo da maturação; 12/29 = resfriados com 12 horas após começo da maturação a 29 °C.

e prosseguimento da meiose, sem aumento da frequência de aneuploidias. Entretanto, alerta-se para o controle da temperatura do meio de cultivo ovocitário durante o período de maturação *in vitro*, o qual não deve sofrer oscilações contínuas ou mesmo maturação em temperatura sub-ótima, uma vez que nestas condições corre-se o risco de uma não re-organização do fuso completa, durante o período de maturação, com conseqüentes erros cromossômicos.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que ovócitos de bovinos resfriados antes do início da maturação ou 12 horas após e re-cultivados, não apresentam aumento da incidência de ovócitos aneuploides.

REFERÊNCIAS

- Aigner S., Van Der Elst J., Siebzehnrubl E., Eichenlaub-Ritter U., Wildt L. & Van Steirteghem A. 1992. The influence of slow and ultrarapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.* 7:857-864.
- Aman R.R. & Parks J.E. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 50:103-110.
- Andrabi S.M.H. & Maxwell W.M.C. 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim. Reprod. Sc.* 99:223-243.
- Azambuja R.M., Kraemer D.C. & Wethusin M.E. 1998. Effect of low temperatures on *in-vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenol.* 49:1155-1164.
- Ectors F.J., Koulischer L., Jamar M., Herens C., Verloes A., Remy B. & Beckers J.F. 1995. Cytogenetic study of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenol.* 44:445-450.
- Glenister P.H., Wood M.J., Kirby C. & Whittigham D.G. 1987. Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. *Gamete Res.* 16:205-216.
- King W.A. 1990. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. *Adv. Vet. Sc. Comp. Med.* 46:267-277.
- Lechniak D. & Switonski M. 1998. Aneuploidy in bovine oocytes matured *in vitro*. *Chromosome Res.* 6:504-505.
- Lechniak D., Warzych E., Pers-Kamczyc E., Sosnowski J., Antosik P. & Rubes J. 2007. Gilts and sows produce similar rate of diploid oocytes *in vitro* whereas the incidence of aneuploidy differs significantly. *Theriogenol.* 68:755-762.
- Luna H.S., Rumpf R. & Ferrari I. 2007. Efeito do resfriamento na ploidia de ovócitos bovinos maturados *in vitro*. *Ciência Animal Bras.* 8:857-863.
- Magistrini M. & Szollosi D. 1980. Effects of cold and of isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 22:699-707.
- Martino A., Pollard J.W. & Leibo S.P. 1996. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 45:503-512.
- Moor R.M. & Crosby I.M. 1985. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. *J. Reprod. Fertil.* 75:467-473.
- Naio H., Shimamura T., Karja N.W., Aqng B., Shimizu R., Taniguchi M. & Nagai T. 2007. Development competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24 h. *J. Reprod. Dev.* 53:271-277.
- Ocaña-Quero J.M., Pinedo-Mérlin M. & Moreno-Millán M. 1999. Influence of follicle, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenol.* 51:667-672.
- Pickering S.J., Braude P.R., Jhonson M.H., Cant A. & Currie J. 1990. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of meiotic spindle in human oocyte. *Fertil. Steril.* 54:102-108.
- Tarkoski A.K. 1966. An air-drying method for chromosome preparations from mouse egg. *Cytogenetics* 5:394-400.
- Tiveron C., Marchetti F., Bassani B. & Pacchierotti F. 1992. Griseofulvin-induced aneuploidy and meiotic delay in female mouse germ cells. Cytogenetic analysis of metaphase II oocytes. *Mut. Res.* 266:143-150.
- Van der Elst J., Nerinckx S. & Van Steirteghem A.C. 1993. Association of ultrarapid freezing of mouse oocytes with increased polyploidy at the pronucleate stage, reduced cell numbers in blastocysts and impaired fetal development. *J. Reprod. Fert.* 99:25-32.
- Wang S., Holyoak G.R., Liu Y. & Bunch T.D. 1995. Developmental capacity and nuclear changes of bovine oocytes from ovaries stored for varied times and temperatures. *Theriogenol.* 43:347.
- Yadav B.R., King W.A., Xu K.P., Pollard J.W. & Plante L. 1991. Chromosome analysis of bovine oocytes cultured *in vitro*. *Genet. Sel. Evol.* 23:191-196.