

## Citogenética de ovócitos bovinos maturados *in vitro*

*Cytogenetic of bovine oocytes matured in vitro*

Hélder Silva e Luna<sup>1</sup>, Iris Ferrari<sup>2</sup>, Rodolfo Rumpf<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 76620-080 Três Lagoas, MS, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

<sup>3</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasília, Brasil.

Correspondência: hluna@ceua.ufms.br

### Resumo

Muitas biotecnologias da reprodução usam ovócitos de ovários obtidos em abatedouro ou por aspiração folicular *in vivo*. Estes ovócitos que são maturados *in vitro* e frequentemente são submetidos a choques osmóticos, processo de resfriamento ou criopreservação, e passam por meios de maturação que tem hormônios, entre outros componentes. Estes fatores podem induzir alterações cromossômicas. Ovócitos com anomalias cromossômicas levam a reduções nas taxas de embriões viáveis. A presente revisão, baseada em pesquisas realizadas em bovinos, tem o objetivo de alertar para a importância da realização de análise citogenética dos ovócitos maturados *in vitro*.

**Palavras-chave:** anomalias cromossômicas, bovino, gametas.

### Abstract

*Many reproductive biotechnology use oocytes of ovaries obtained at slaughterhouse or by follicular aspiration in vivo. These oocytes, are matured in vitro and often are submitted to osmotic shock, cooling and cryopreservation processes, and get in contact with different maturation media which contains, hormones, among other components. These factors, can lead to chromosomal changes. Oocytes with chromosomal abnormalities results in a decrease of embryo viability. The present review is based on researches done in bovine and aims to alert the need to cytogenetic analysis of oocytes matured in vitro.*

**Keywords:** chromosomal abnormalities, bovine, gamete.

### Introdução

Uma das principais causas de mortalidade embrionária é atribuída a anormalidades cromossômicas (King, 1990). Pesquisas em embriões bovinos produzidos *in vitro* mostram maior frequência de células poliploides do que aqueles embriões produzidos em sistemas *in vivo* (Viuff *et al.* 2001). Estudos relatam uma incidência de 15-30% de anormalidades cromossômicas em embriões bovinos produzidos *in vitro*, mostrando a importância do monitoramento dos gametas usados, uma vez que parte destas alterações é devida aos ovócitos e espermatozoides (Iwasaki *et al.*, 1989; Iwasaki e Nakahara, 1990; King *et al.*, 1995; Ocaña-Quero *et al.*, 1999a).

Os principais estudos citogenéticos em ovócitos bovinos referem-se às análises de ovócitos em estágio de metáfase II (MII), que em sua normalidade apresentam 30 cromossomos (n=30,X), sendo a alteração do tipo numérica mais comum. Neste sentido, existem duas formas principais de ocorrência desta anomalia nos ovócitos: aneuploidia, caracterizada pela perda ou adição de um simples cromossomo, que pode ocorrer tanto na primeira como na segunda divisão meiótica da gametogênese, não excluindo ainda, deste processo, a anáfase tardia. A outra forma é a diploidia, caracterizada por um conjunto genômico sobressalente, sendo esta a alteração numérica mais frequente em ovócitos bovinos maturados *in vitro*. A diploidia ovocitária, em sua maioria, é ocasionada pela não eliminação do primeiro corpúsculo polar (Lechniak *et al.*, 2002). Também podem ocorrer erros mitóticos de células germinativas, gerando oogônias poliploides e consequentes ovócitos diploides, após sua divisão meiótica (Funkai e Mikamo, 1980). Além dessas anormalidades identificadas nos ovócitos em estágios de metáfase II, distúrbios encontrados nos estágios de metáfase I (MI) e anáfase I (AI) são importantes na avaliação da progressão meiótica (Ectors *et al.*, 1995; Lechniak *et al.*, 2002).

Embriões triploides de bovinos têm sido relatados em estudos cromossômicos (Iwasaki *et al.*, 1989; King, 1990). Uma das causas para a ocorrência destes embriões é a fecundação de ovócitos diploides (digênia), e outra é a possibilidade da ocorrência de polispermia ou fecundação por espermatozoide diploide (diândria; Lechniak *et al.*, 1996). Estudos citogenéticos em ovócitos bovinos mostram uma frequência de 2,0-12,0% de diploidia (Jagiello *et al.*, 1974; Ectors *et al.*, 1995; Lechniak *et al.*, 1996; Sosnowski *et al.*, 1996) e 6,0-7,0% de aneuploidia (Yadav *et al.*, 1991; Lechniak e Switonski, 1998). Estas alterações citogenéticas nos ovócitos, após fecundação, contribuem de forma efetiva para o aumento da taxa de perdas embrionárias.

As pesquisas sobre desordens citogenéticas em ovócitos ganharam grande impulso com a metodologia descrita por Tarkoski (1966), que tem como base a fixação direta do ovócito na lâmina. A relevância da técnica reside no fato de proporcionar facilidades na execução, rapidez e baixo custo para a elaboração dos experimentos. É importante considerar que a análise citogenética de aneuploidias com esta técnica incorre na possibilidade de perdas cromossômicas no momento da fixação, sendo indicado que o cálculo das aneuploidias seja realizado em função do número de metáfases hiper-haploides (Yadav *et al.*, 1991). Em relação às análises de diploidias, considera-se um ovócito diploide quando  $2n = 60$  ou com mais de 50 cromossomos com presença dos dois cromossomos sexuais X, com ausência do primeiro corpúsculo - fato que caracteriza a retenção do mesmo (Lechniak *et al.*, 1996). Aperfeiçoamentos e modificações desta técnica têm sido realizados no sentido de melhorias na qualidade das análises citogenéticas dos ovócitos, tanto do número como da morfologia dos cromossomos (Ocaña-Quero *et al.*, 1998).

Atualmente, técnicas como a hibridação *in situ* por fluorescência têm sido utilizadas no estudo de ovócitos. Tais métodos proporcionam maior acurácia na identificação de aneuploidias em gametas, quando comparados com a metodologia clássica (Cheng *et al.*, 1998). Outra vantagem é que pode ser utilizado o corpúsculo polar como material de estudo para análises de alterações cromossômicas dos ovócitos (Munne *et al.*, 1995). A técnica de imunocitoquímica também é muito utilizada para observação da organização e configuração dos cromossomos e fuso meiótico, especialmente em estudos de ovócitos resfriados ou criopreservados (Aman e Parks, 1994; Saunders e Parks, 1999; Kim *et al.*, 2007). O custo, infraestrutura laboratorial e tempos de execução destas metodologias são fatores que podem limitá-las na rotina laboratorial.

Antes mesmo do estudo citogenético dos ovócitos, deve-se considerar, quando possível, a análise cromossômica dos progenitores. Em bovinos, a translocação robertsoniana 1/29 é muito comum, em que o animal apresenta um fenótipo normal, porém uma redução na fertilidade de 3-5%. Estudos em ovócitos de vacas translocadas mostram aumento de metáfases II com anomalias citogenéticas (Bonnet-Garnier *et al.*, 2008).

### Monitoramento citogenético de ovócitos maturados *in vitro*

As pesquisas sobre alterações cromossômicas em ovócitos tornam-se importantes uma vez que os sistemas de cultivo *in vitro* estão sujeitos a grandes influências de variáveis externas. Entre outras, destacam-se choques térmicos, choques osmóticos, resfriamentos, meios de cultivo, hormônios, tempo de cultivo, pH, osmolaridade, antibióticos, luz e criopreservação. Entretanto, é necessário destacar que efeitos individuais podem influenciar nas taxas de alterações cromossômicas de ovócitos bovinos maturados *in vitro*. Em estudo com ovócitos obtidos de 37 ovários de vacas colhidos de forma individualizada, 23 (62%) apresentaram ovócitos diploides sendo que, destes, 15 animais apresentaram uma célula diploide, sete apresentaram duas e, em apenas um animal havia três ovócitos diploides, mostrando considerável efeito individual na taxa de diploidia (Lechniak *et al.*, 1996).

#### *Diâmetro ovocitário e folicular*

A relação entre diâmetro do ovócito e competência para completar a divisão meiótica *in vitro* tem sido relatada em diferentes espécies, incluindo bovinos (Otoi *et al.*, 1997). Lechniak *et al.* (2002) mostraram que ovócitos bovinos com diâmetro inferior a 110  $\mu\text{m}$  apresentam aumento de distúrbios citogenéticos na progressão meiótica, em particular em estágios de metáfase I e anáfase I. Arlotto *et al.* (1996) relataram a ocorrência de eliminação tardia do primeiro corpúsculo polar em ovócitos coletados de pequenos folículos (1-3mm), quando comparado àqueles obtidos de folículos maiores (>3mm), indicando maior competência destes últimos. Ectors *et al.* (1995), ao estudarem ovócitos obtidos de classes foliculares entre 1-4, 5-8 e 9-13mm, não observaram diferenças quanto à incidência de metáfase II com anormalidades cromossômicas. Eles sugerem maior relação do diâmetro folicular com fatores citoplasmáticos e não nucleares. Entretanto, Ocaña-Quero *et al.* (1999b) verificaram que ovócitos bovinos obtidos de folículos de 11-15mm apresentaram maior taxa de ovócitos diploides. Os achados relatados acima indicam cuidados quanto aos ovócitos obtidos tanto de folículos muito pequenos quanto muito grandes, em função de maiores riscos de alterações cromossômicas.

#### *Meio de cultivo e tempo de maturação*

Em relação ao cultivo *in vitro*, Ocaña-Quero *et al.* (1999b) compararam meios de maturação compostos por TCM-199 com 0, 10, 20 e 50% de soro sanguíneo de vaca em estro e observaram 2,1; 4,3; 5,1 e 12,4% de ovócitos diploides, respectivamente. Estes achados mostram evidente influência da concentração de hormônios contida no soro sobre as alterações citogenéticas de ovócitos bovinos. Em humanos, Tarin e Pelicer (1990) reportaram aumento de ovócitos diploides obtidos de mulheres superovuladas, relacionando os hormônios com o controle da meiose ovocitária. Além dos efeitos hormonais, o tempo de cultivo pode influenciar a normalidade cromossômica. Ovócitos bovinos maturados por 48 horas apresentaram aumento significativo de diploidia quando comparado a ovócitos maturados por 24 ou 36 horas (Ocaña-Quero *et al.*, 1999b).

### Resfriamento e Criopreservação

Pesquisas mostram que o resfriamento leva à dispersão do fuso meiótico - fenômeno que pode conduzir a alterações cromossômicas nos ovócitos, em função de não disjunções cromossômicas (Moor e Crosby, 1985; Glenister *et al.*, 1987). O fuso também apresenta grande capacidade de reorganização após retorno ao cultivo (Aigner *et al.*, 1992; Aman e Parks, 1994).

O resfriamento a quatro ou 29 °C, em diferentes períodos de maturação, não induz ao aumento de aneuploidias e diploidias em ovócitos bovinos após completarem 24 horas de maturação *in vitro* (Luna *et al.*, 2007; Luna *et al.*, 2008). Entretanto, o cultivo de ovócitos bovinos em temperatura subótima de 37 °C, durante 24 horas de maturação *in vitro*, leva ao aumento significativo de alteração cromossômica do tipo diploidia, quando comparado a ovócitos cultivados a 39 °C (Ocaña-Quero *et al.*, 1999b). 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 subótima, uma vez que nestas condições aumenta o risco de ocorrer erros cromossômicos (Lechniak *et al.*, 1996).

Em relação aos efeitos da criopreservação e do estágio de maturação, diversos estudos têm sido realizados. Ovócitos imaturos (estágio de vesícula germinativa), por ainda não terem formado o fuso meiótico, seriam uma alternativa para se evitar os efeitos deletérios causados pela criopreservação, entretanto, baixos índices têm sido obtidos nas taxas de maturação, clivagens e desenvolvimento embrionário após a congelamento de ovócitos no estágio de vesícula germinativa (Costa *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007). Lim *et al.* (1992) verificaram que ovócitos bovinos criopreservados, após início da maturação ou em estágio de metáfase II, apresentam melhores resultados do que ovócitos criopreservados imaturos. A criopreservação de ovócitos bovinos com 12 horas após o começo da maturação demonstrou maior sucesso do que a congelamento de ovócitos imaturos ou com seis e 24 horas após o início da maturação (Hochi *et al.*, 1998). Neste sentido, pesquisas com ovócitos bovinos vitrificados mostram que o estágio de maturação pode influenciar na incidência de ovócitos diploides. Ovócitos vitrificados em estágio de vesícula germinativa ou após oito horas do início da maturação apresentaram aumento significativo de diploidias, após completarem a maturação, mas não naqueles vitrificados com 12 ou 24 horas de maturação *in vitro* (Luna *et al.*, 2001). Este fenômeno pode ocorrer em função de que nos períodos iniciais de maturação, o fuso encontra-se em formação e desenvolvimento, podendo haver alterações que impossibilitem a eliminação do primeiro corpúsculo polar, resultando em metáfases diploides. Contudo, não foram obtidos os mesmos resultados com relação às aneuploidias. A não ocorrência de aneuploidias poderia ser atribuída aos ovócitos que reorganizaram a estrutura do fuso meiótico, tornando-se aptos a terminar a meiose sem alterações cromossômicas (Luna *et al.*, 2005).

Considerando o exposto, é de fundamental importância o monitoramento citogenético de ovócitos bovinos maturados *in vitro*, a fim de se verificar possíveis fatores que possam reduzir a viabilidade de embriões produzidos *in vitro*.

### Referências

- Aigner S, Van der Elst J, Siebzehrubl E, Eichenlaub-Ritter U, Wildt L, Van Steirteghem A.** The influence of slow and ultra rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod*, v.7, p.857-864, 1992.
- Aman RR, Parks JE.** Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.50, p.103-110, 1994.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried-Rutledge ML.** Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocyte. *Theriogenology*, v.45, p.943-956, 1996
- Bonnet-Garnier A, Lacaze S, Beckers JF, Berland HM, Pinton A, Yerle M, Ducos A.** Meiotic segregation analysis in cows carrying the t(1;29) Robertsonian translocation. *Cytogenet Genome Res*, v.120, p.91-96, 2008.
- Cheng EY, Chen YJ, Bonnet G, Gartler SM.** An analysis of meiotic pairing in trisomy 21 oocytes using fluorescent *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, v.80, p.48-53, 1998.
- Costa EP, Guimarães JD, Torres CAA, Fagundes LM, Gioso MM.** Criopreservação de ovócitos de bovinos imaturos desnudados ou não, utilizando o etilenoglicol pelo método da vitrificação. *Rev Bras Zootec*, v.31, p.1122-1129, 2002.
- Ectors FJ, Koulischer L, Jamar M, Herens C, Verloes A, Remy B, Beckers J-F.** Cytogenetic study of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, v.44, p.445-450, 1995.
- Funkai K, Mikamo K.** Giant diploid oocytes as a cause of digynic triploidy in mammals. *Cytogenet Cell Genet*, v.28, p.158-168, 1980.
- Glenister PH, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG.** Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. *Gamete Res*, v.16, p.205-216, 1987.
- Hochi S, Ito K, Hirabayashi M, Ueda M, Kimura K, Hanada A.** Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. *Theriogenology*, v.49, p.787-796, 1998.

- Iwasaki S, Nakahara T.** Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among blastocysts fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, v.34, p.683-690, 1990.
- Iwasaki S, Shioya Y, Masuda H, Hanada A, Nakahara T.** Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization. *Gamete Res*, v.22, p.83-91, 1989.
- Jagiello GM, Miller WA, Ducaven MB, Lin JS.** Chiasma frequency and disjunctional behaviour of ewe and cow oocytes matured *in vitro*. *Biol Reprod*, v.10, p.354-363, 1974.
- Kim DH, Park HS, Kim SW, Hwang IS, Yang BC, Im GS, Chung HJ, Seong HW, Moon SJ, Yang BS.** Vitrification of immature bovine oocyte by the microdrop method. *J Reprod Dev*, v.53, p.843-851, 2007.
- King WA, Verini Supplizi A, Diop HEP, Bousquet D.** Chromosomal analysis of embryos produced by artificially inseminated superovulated cattle. *Genet Sel Evol*, v.27, p.189-194, 1995.
- King WA.** Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med*, v.22, p.151-160, 1990.
- Lechniak D, Kaczmarek D, Stanislawski D, Adamowicz T.** The ploidy of *in vitro* matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogenology*, v.57, p.1303-1308, 2002.
- Lechniak D, Switonski M.** Aneuploidy in bovine oocyte matured *in vitro*. *Chrom Res*, v.6, p.504-506, 1998.
- Lechniak D, Switonski M, Sosnowski M.** The incidence of bovine diploid oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, v.46, p.267-277, 1996.
- Lim JM, Fukui Y, Ono H.** Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, v.37, p.351-361, 1992.
- Luna HS, Ferrari I, Rumpf R.** Efeito do resfriamento na ploídia de ovócitos bovinos maturados *in vitro*. *Ciênc Anim Bras*, v.8, p.857-863, 2007.
- Luna HS, Ferrari I, Rumpf R.** Influence of stage of maturation of bovine oocyte at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.23-28, 2001.
- Luna HS, Ferrari I, Rumpf R.** Influência da vitrificação na incidência de ovócitos bovinos aneuploides maturados *in vitro*. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.6, p.78-83, 2005.
- Luna HS, Ferrari I, Rumpf R.** Influência do resfriamento na incidência de aneuploidia de ovócitos bovinos maturados *in vitro*. *Acta Vet Bras*, v.2, p.20-23, 2008.
- Moor RM, Crosby, IM.** Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. *J Reprod Fertil*, v.75, p.467-473, 1985.
- Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J.** The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod*, v.10, p.1014-1020, 1995.
- Ocaña-Quero JM, Moreno-Millán M, Pinedo-Merlín M, Ortega Mariscal, M.** An improved method for chromosome preparations from bovine oocytes and zygotes obtained by *in vitro* maturation and fertilization techniques. *Arch Zootec*, v.47, p.669-675, 1998.
- Ocaña-Quero JM, Pinedo-Merlín M, Moreno-Millán M.** Cytogenetic study of *in vitro*-derived bovine embryos. *Vet J*, v.158, p.228-33, 1999a.
- Ocaña-Quero JM, Pinedo-Merlín M, Moreno-Millán M.** Influence of follicle, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 51, 667-672, 1999b.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyoma N, Tachikawa S, Suzuki T.** Bovine oocyte diameter in relation to development competence. *Theriogenology*, v.48, p.769-774, 1997.
- Saunders KM, Parks JE.** Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.61, p.178-187, 1999.
- Sosnowski J, Switonski M, Lechniak D, Molinski K.** Cytogenetic evaluation of *in vitro* matured bovine oocytes collected from ovaries of individual donors. *Theriogenology*, v.45, p.865-872, 1996.
- Tarin JJ, Pelicer A.** Consequences of high ovarian response to gonadotropins: a cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes. *Fertil Steril*, v.54, p.665-670, 1990.
- Tarkoski AK.** An air-drying method for chromosome preparations from mouse egg. *Cytogenetics*, v.5, p.394-400, 1966.
- Viuff D, Hendriksen PJM, Vos PLAM, Hyttel P, Greve T, Thomsen PD.** Bovine embryos developed *in vivo* have a lower polyploidy frequency at days 2-5 post ovulation than *in vitro* produced embryos. *Theriogenology*, v.55, p.323, 2001. (Abstract).
- Yadav BR, King WA, Xu KP, Pollard JW, Plante L.** Chromosome analysis of bovine oocytes cultured *in vitro*. *Genet Sel Evol*, v.23, p.191-196, 1991.