

EFFECT OF COOLING DONOR OVARIES ON *IN VITRO* BOVINE EMBRYO PRODUCTION AND CULTURE OF GRANULOSA CELL MONOLAYERS.

Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M.

Departamento de Reprodução, Estação Zootécnica Nacional - INIA,
Vale de Santarém, Apartado 17, 2000 Vale de Santarém, Portugal

Summary:

Donor ovaries for granulosa cell and oocyte *in vitro* cultures, collected at slaughter house were conditioned at 4°C and 37°C. The effects of conditioning temperatures of donor ovaries on granulosa cell viability at the onset of *in vitro* culture, oocyte maturation, *in vitro* fertilisation and embryo development as well as on D8 embryo quality, were evaluated.

The percentage of viable granulosa cells at the beginning of culture was significantly higher when donor ovaries were conditioned at 4°C (29.7% vs. 24.6%, $P < 0.01$). On the other hand, cooled ovaries provoked a significant decrease on oocyte maturation (56.8% vs. 76.4%, $P < 0.0002$) and tended to decrease cleavage rate (77.4% vs. 83.1%, $P < 0.10$). The decrease on oocyte maturation formerly checked by observing fresh oocytes, was confirmed by nuclear staining of previously fixed oocytes (56.3% vs. 73.6%, $P < 0.005$). The conditioning temperature of donor ovaries did not influence either the rates of D8 or hatched embryos. Quality of transferable embryos (D8) was impaired by cooling, the proportion of good quality grade 2 embryos being significantly decreased (2.7% vs. 27.2%, $P < 0.001$) and that of poor quality grade 4 embryos being increased (42% vs. 23.3%, $P < 0.003$).

Results above show that cooling bovine donor ovaries at 4°C before processing, significantly improve the viability of granulosa cells to be used in monolayers co-incubated *in vitro* with embryos. On the other hand, cooled donor ovaries significantly decrease the meiotic competence of collected oocytes and the quality of transferable embryos with 8 days old.

INFLUÊNCIA DA REFRIGERAÇÃO DE OVÁRIOS DADORES NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS E CULTURA DE CÉLULAS DA GRANULOSA *IN VITRO*

Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M.

Departamento de Reprodução, Estação Zootécnica Nacional - INIA,
Vale de Santarém, Apartado 17, 2000 Vale de Santarém, Portugal

Sumário:

Ovários bovinos colhidos em matadouro e utilizados como dadores de células da granulosa e oócitos para a produção de embriões *in vitro* foram acondicionados a 4°C e 37°C. Estudou-se o efeito da temperatura de acondicionamento quer sobre a viabilidade inicial das células da granulosa a serem utilizadas na co-cultura dos embriões, quer sobre a maturação dos oócitos, as taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*, e a qualidade dos embriões obtidos.

A percentagem de células da granulosa viáveis no início das culturas foi significativamente superior quando as células eram oriundas de ovários refrigerados (29,7% vs. 24,6%, $P < 0,01$). Por outro lado, o acondicionamento por refrigeração diminuiu significativamente a taxa de maturação oocitária (56,8% vs. 76,4%, $P < 0,0002$), e só tendencialmente se verificou uma diminuição da taxa de fertilização neste grupo (77,4 vs. 83,1, $P < 0,10$). A diminuição da taxa de maturação anteriormente avaliada a fresco, foi confirmada numa amostragem através de coloração nuclear (56,3% vs. 73,6%, $P < 0,005$). A temperatura de acondicionamento dos ovários não influenciou a taxa de produção de embriões com 8 dias de idade (D8) nem a percentagem de embriões extrusados. A qualidade dos embriões D8 foi significativamente afectada pelo processo de refrigeração dos ovários, tendo-se observado neste grupo uma diminuição significativa na proporção dos embriões de boa qualidade (grau 2: 7,2% vs. 27,2%, $P < 0,001$) e um aumento relativo dos de má qualidade (grau 4: 42% vs. 23,3%, $P < 0,003$).

Os resultados apresentados mostram que a viabilidade das células da granulosa cultivadas *in vitro* é favoravelmente influenciada pelo acondicionamento dos ovários dadores a 4°C. Por outro lado, a refrigeração dos ovários a 4°C, diminui significativamente a competência meiótica dos oócitos e a qualidade dos embriões obtidos ao 8º dia (embriões transferíveis).

Trabalho parcialmente financiado pelo projecto PRAXIS/3.2/AGR/01/94

Introdução

Na recolha dos ovários de bovinos em matadouro para posterior utilização das células da granulosa e oócitos na cultura *in vitro*, põe-se a questão de saber qual o efeito da temperatura de acondicionamento sobre a qualidade das células utilizadas.

Os estudos realizados até hoje têm centrado a sua atenção somente no efeito da temperatura de acondicionamento dos ovários sobre a capacidade dos oócitos maturados e fertilizados *in vitro* na produção de embriões (Gordon, 1994). Porém, nos sistemas que utilizam

os mesmos ovários como dadores de células da granulosa utilizadas em monocamadas na co-cultura de embriões, não se sabe de que modo a temperatura de acondicionamento pode influenciar os resultados.

Neste trabalho compararam-se duas situações com dois objectivos: acondicionamento dos ovários a 4 °C e a 37 °C sobre a viabilidade inicial das células da granulosa utilizadas na co-cultura *in vitro* de embriões, e sobre a produção e qualidade dos embriões (taxa de maturação, taxa de fertilização, taxa de embriões em D8 e extrusados).

Materiais e Métodos

Os ovários foram recolhidos em matadouro e transportados para o laboratório no prazo máximo de duas horas e trinta minutos. Após a recolha, os ovários foram colocados em garrafa térmica contendo uma solução de PBS com albumina sérica bovina (BSA, 0,15% p/v) e sulfato de kanamicina (0,05 mg/ml). Durante o transporte organizaram-se dois grupos, de acordo com as temperaturas de acondicionamento: 4 °C e 37 °C.

No laboratório, procedeu-se à aspiração dos folículos com 2 a 6 mm de diâmetro para obtenção do complexo cumulus-oócito e das células da granulosa. O líquido folicular recolhido foi diluído em meio de lavagem 1 (TCM 199 + 5% SOCS + antibióticos) e as células da granulosa foram separadas por centrifugação da suspensão (100 G durante 5 min), após a recolha dos oócitos. A suspensão celular obtida foi submetida a contagem (câmara de Neubauer) e coloração vital (azul tripan a 0,4%). Esta suspensão foi diluída para obter 1×10^6 células/ml e colocaram-se 8 gotas de 100 µl submersas em óleo mineral em placas de cultura (Nunclon®, Nunc). As placas assim preparadas permaneceram na incubadora a 39 °C, 5% de CO₂ e 100% de humidade.

Os complexos cumulus-oócito (n=4400) foram incubados em meio de cultura de oócitos (TCM 199 + 10% SOCS + antibióticos) durante 22 a 24 horas para permitir a maturação *in vitro*, nas condições descritas anteriormente. Após a maturação, uma amostragem de oócitos (n=251) foi submetida a fixação (75% etanol + 25% ácido acético) e coloração nuclear com acetolacmoid (Suss et al., 1988). Dos restantes oócitos (n=4149), foram identificados por exame a fresco os maturados (n=2994), através da expansão das células do cumulus e da densidade uniforme do ooplasma. Parte desta população (n=1555) foi submetida à fertilização *in vitro* (Pereira et al, 1997) e transferida para as monocamadas de células da granulosa 22 horas depois. A clivagem foi avaliada 48 h depois da inseminação e os embriões prosseguiram em cultura até à fase de extrusão.

No estudo das células da granulosa, compararam-se as viabilidades iniciais entre os dois grupos (ovários acondicionados a 4°C e 37°C) em 7 sessões através de análise de variância (ANOVA/LSD; StatSoft Inc., 1995). Os critérios relativos à taxa de maturação oocitária, clivagem, produção de embriões em D8 e extrusados, foram comparados entre os dois grupos por ANOVA em 19 sessões. A taxa de maturação dos oócitos fixados e corados (5 sessões) e a qualidade dos embriões D8 (19 sessões) foram comparadas por qui-quadrado (StatSoft Inc., 1995). A qualidade dos embriões em D8 baseou-se numa classificação de 1 (excelente) a 4 (mau).

Num estudo prévio (resultados não publicados), avaliou-se o estadio de maturação dos oócitos submetidos a 4°C durante o transporte, imediatamente após a aspiração folicular, por

coloração nuclear (n=257). Verificou-se que o arrefecimento não afectou o grau de sincronização no reinício da meiose, por avaliação da presença da vesícula germinal.

Resultados

Os ovários acondicionados a 4 °C forneceram células da granulosa com viabilidades iniciais significativamente superiores aos acondicionados a 37 °C (Tabela 1).

Tabela 1. Influência da temperatura de transporte dos ovários sobre a viabilidade das células da granulosa no início da cultura *in vitro*.

	Número de sessões	Células viáveis (%)
		Média ± ep
Ovários a 4 °C	7	29,74 ± 0,026 a
Ovários a 37 °C	7	21,64 ± 0,028 b
ANOVA		P ≤ 0,0104

Relativamente à maturação oocitária, verificou-se que a temperatura de acondicionamento dos ovários a 4 °C diminuiu significativamente a percentagem de oócitos maturados, quer na avaliação a fresco quer por coloração nuclear (Tabela 2). O coeficiente de variação entre sessões neste grupo atingiu 33% enquanto que no grupo de ovários acondicionados a 37 °C foi de 9%.

Tabela 2. Certificação da maturação dos oócitos em ambos os grupos (avaliação a fresco e coloração nuclear).

	Avaliação a fresco			Oócitos fixados e corados		
	Sessões	Oócitos (n)	% maturação média ± dp	Sessões	Oócitos (n)	% maturação
Ovários a 37°C	18	3381	76,4 ± 7,0	5	164	73,78
Ovários a 4°C	17	768	56,8 ± 18,7	3	87	56,32
Significância		ANOVA	P≤0,0002		$\chi^2 = 7,92$	P≤0,005

n=população inicial

A taxa de fertilização mostrou uma tendência (P≤0,101) para ser inferior no grupo de ovários acondicionados a 4 °C, não se tendo verificado diferenças significativas quanto às taxas de produção de embriões D8 e extrusados (Tabela 3).

Tabela 3. Influência da temperatura de transporte dos ovários sobre as taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

	Clivagem (%)		D8 (%)		Extrusados (%)	
	n	média ± dp	n	média ± dp	n	média ± dp
Ovários a 37°C	18	83,1 ± 6,9	18	19,1 ± 7,9	17	71,2 ± 32,9
Ovários a 4°C	19	77,4 ± 12,5	19	18,0 ± 13,9	17	50,9 ± 44,9
ANOVA		P≤0,101		P≤0,78		p≤0,14

n = número de sessões de cultura

Relativamente à qualidade dos embriões em D8, houve mais embriões de grau 1 e 2 no grupo de ovários acondicionados a 37 °C. Por outro lado, houve significativamente mais embriões de pior qualidade (grau 4), no grupo acondicionado a 4 °C (Tabela 4).

Tabela 4. Influência da temperatura de transporte dos ovários sobre a qualidade dos embriões com oito dias de idade.

	Embriões em D8 (n)	Distribuição da classificação (%)			
		Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Ovários a 37°C	180	6,1	27,2	43,3	23,3
Ovários a 4°C	69	1,5	7,2	49,3	42,0
χ^2		P≤0,124	P≤0,001	P≤0,399	P≤0,003

Discussão

A co-cultura de embriões com células somáticas revelou-se determinante na produção *in vitro* de embriões, permitindo ultrapassar o bloqueio que se verifica no estadio de 8-16 células e prosseguir o desenvolvimento (Fukui et al., 1989). Os trabalhos realizados revelam que os factores embriotróficos presentes nas culturas celulares não parecem depender da espécie nem do órgão de origem das células (Goto et al., 1992). Relativamente às células da granulosa, parece existir um compromisso entre a concentração e a viabilidade inicial das células, sendo frequente encontrarem-se concentrações de 1×10^6 /ml com 50% de viabilidade (Wang, 1991). Outros autores utilizam concentrações inferiores (1×10^5 /ml) mas com viabilidades superiores (80%, Goto et al., 1992). No nosso sistema raramente se atingem viabilidades de 50%, e quando as células são transportadas a quente (37 °C) observam-se por vezes viabilidades muito baixas (9%). Outros autores também referem viabilidades mais baixas, da ordem dos 30-40%, nos seus sistemas de cultura celular (Kuran et al., 1995). Os resultados mostram que o transporte dos ovários dadores a 4 °C, aumentam a viabilidade das células em cerca de 8%, justificando-se a utilização desta técnica nos sistemas que normalmente têm viabilidades iniciais baixas.

Em relação ao efeito da temperatura a que são submetidos os ovários dadores de oócitos, sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*, existem trabalhos que indicam haver um efeito negativo das temperaturas baixas sobre a taxa de clivagem e percentagem de blastocitos obtidos (Yang et al., 1990). Estes autores observaram taxas de blastocitos extremamente baixas quando armazenam os ovários a 4 °C (0 a 3,7%), em comparação com os valores obtidos para temperaturas de armazenamento de 24 °C e 37 °C (80,3% e 69,4%, respectivamente). No nosso trabalho, não houve diferenças significativas entre os grupos relativamente à taxa de fertilização e produção de embriões, tendo-se verificado somente uma tendência para os valores serem mais baixos no grupo dos 4 °C, relativamente à taxa de fertilização e de embriões extrusados. Contudo, este efeito das baixas temperaturas de armazenamento diminuiu significativamente a taxa de maturação dos oócitos e a qualidade dos embriões em D8 (embriões transferíveis). Os resultados mostram que o choque térmico provocado nos ovários após o abate, compromete a competência maturacional dos oócitos que se reflecte, por sua vez, na qualidade dos embriões com 8 dias de idade. O choque térmico parece afectar a maturação oocitária inicialmente antes

da quebra da vesícula germinal, tal como é sugerido por Barnes et al. (1997), sendo menos evidente este efeito quando os oócitos já se encontram em estádios ulteriores de maturação.

Os resultados permitem concluir que a viabilidade das células da granulosa cultivadas *in vitro* é favoravelmente influenciada pelo acondicionamento dos ovários dadores a 4°C. Por outro lado, a refrigeração dos ovários dadores de oócitos a 4°C, diminui significativamente a competência meiótica dos oócitos e a qualidade dos embriões obtidos ao 8º dia (embriões transferíveis). Assim, deverão considerar-se acondicionamentos diferentes dos ovários durante o transporte consoante a finalidade a que se destinam (produção de culturas de células da granulosa ou de embriões).

Bibliografia

- Barnes, F.L., Damiani, P., Looney, C.R., Duby, R.T. (1997). The meiotic stage affects subsequent development of cooled bovine oocytes. *Theriogenology*, 47: 183.
- Fukui, Y., Urakawa, M., Sasaki, C., Chikamatsu, N., Ono, H. (1989). Development to the late morula or blastocyst stage following *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 18: 139-148.
- Gordon, I. (1994). *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Ed. Ian Gordon, Biotechnology in Agriculture Nº 11, CABI, Cambridge.
- Goto, K., Iwai, N., Takuma, Y., Nakanishi, Y. (1992). Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70: 1449-1453.
- Kuran, M., Broadbent, P.J., Hutchinson, J.S.M. (1995). Follicle-stimulating hormone stimulated differentiation and progesterone production of bovine granulosa cells in culture. *Anim. Reprod. Sci.*, 39: 237-249.
- Pereira, R.M., Vasques, M.I., Marques, C.C., Baptista, M.C., Horta, A.E.M. (1997). Efeito do soro de vacas em cio superovuladas sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos e a síntese de progesterona por monocamadas de células da granulosa. 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal, 3-6 Julho, Estoril.
- StatSoft Inc., (1995). *STATISTICA for Windows (computer program manual)*. Tulsa, OK.
- Suss, U., Wüthrich, K., Stranzinger, G. (1988). Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 38: 871-880.
- Wang, W. (1991). *Factors affecting metabolic requirements and *in vitro* culture of bovine embryos*. Ph.D. Thesis, The National University of Ireland.
- Yang, N.S., Lu, K.H., Gordon, I. (1990). *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*, 33: 352.