

## COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA DE ACORDO COM O TAMANHO FOLICULAR – RESULTADOS PARCIAIS

Caixeta, E.S.<sup>1,2</sup>; Leme, L.O.<sup>1,3</sup>; Machado, G.M.<sup>1,2</sup>; Rumpf, R.<sup>1</sup>; Franco, M.M.<sup>1</sup>; Dode, M.A.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa/CENARGEN, PqEB s/n, W5 Norte Final, C.Postal 02372, 70770-900; <sup>2</sup>UnB, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Pós-graduação em Ciências Animais, C.Postal 04508, 70910-970; <sup>3</sup>UnB, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Pós-graduação em Ciências Agrárias, C.Postal 04508, 70910-970 – Brasília/DF.

Competência ovocitária pode ser definida como a capacidade do ovócito em completar a maturação, ser fecundado e ter desenvolvimento embrionário normal, e está relacionada com o diâmetro do ovócito e tamanho do folículo. O tamanho folicular tem sido amplamente utilizado como indicador do potencial de desenvolvimento do ovócito. Entretanto, na maioria dos estudos essa avaliação é feita na superfície do ovário, a qual não permite uma medição precisa. O presente trabalho objetivou avaliar o potencial de desenvolvimento de ovócitos provenientes de diferentes tamanhos de folículos, visando estabelecer um modelo adequado para estudos da competência ovocitária. Folículos de ovários de abatedouro foram totalmente dissecados com o auxílio de tesoura, bisturi e pinças. Os folículos dissecados foram avaliados em estereomicroscópio contendo uma ocular graduada, sendo selecionados pela presença de vasos sanguíneos e aspecto translúcido e brilhante. Aqueles selecionados foram mensurados e distribuídos de acordo com o diâmetro em 4 categorias: 1) 1,0 a 3,0 mm (n= 82); 2) 3,1 a 6,0 mm (n=160); 3) 6,1 a 8,0 mm (n=33); 4) > 8,1 mm (n=39). Os complexos cumulus-ovócitos foram classificados morfológicamente de acordo com número de camadas e aspecto das células do cumulus bem como uniformidade do citoplasma, em viáveis (graus 1 e 2) e não viáveis (grau 3, atresico e degenerado). Os ovócitos viáveis de cada grupo foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro*, ou desnudados para avaliação do diâmetro ovocitário. Uma amostra de ovócitos de cada tratamento e suas respectivas células do cumulus foram congeladas para posterior análise da expressão diferencial de genes relacionados com a competência ovocitária. O potencial de desenvolvimento dos ovócitos foi avaliado pela taxa de clivagem 48h pós-inseminação (p.i.) e taxa de blastocistos 168h p.i. As taxas de clivagem, blastocistos e porcentagem de ovócitos viáveis foram analisados pelo teste de  $\chi^2$ . Os tamanhos dos ovócitos foram comparados pela análise de variância e teste de Tukey. A porcentagem de ovócitos viáveis foi maior (P<0,05) nos grupos 3 (96,9%) e 4 (89,7%) que nos grupos 1 (60,9%) e 2 (70,65%). Os ovócitos obtidos de folículos maiores (grupos 3 e 4) apresentaram maior diâmetro (P<0,05) que os de folículos menores (grupo 1), sendo as médias de 124,8  $\mu\text{m} \pm 10,87$ ; 128,3  $\mu\text{m} \pm 8,55$ ; 131,5  $\mu\text{m} \pm 9,08$  e 132,5  $\mu\text{m} \pm 14,05$  para os ovócitos dos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. As taxas de clivagem e blastocistos foram maiores (P<0,05) nos ovócitos oriundos de folículos de 6,1 a 8,0 mm (92% e 67%), que nos obtidos de folículos menores, dos grupos 1 (63% e 23%) e 2 (66% e 27%). No grupo 4 as taxas de clivagem (80%) e blastocistos (43%) não diferenciaram (P>0,05) dos demais. Entretanto, esse grupo apresentou uma tendência (P=0,07) à maior taxa de blastocistos do que os grupos 1 e 2. Os resultados mostraram que ovócitos provenientes de folículos de 6,1 a 8,0 mm são mais competentes, o que pode ser observado não só pelo aumento no diâmetro, mas também pelo melhor potencial de desenvolvimento, sendo aqueles ovócitos de folículos de 1,0 a 3,0 mm e 3,1 a 6,0 mm os menos competentes. Portanto, este modelo realizando a dissecação dos folículos para avaliação do tamanho, pode ser utilizado com segurança para estudos de diferentes graus de competência ovocitária. Fonte Financiadora: Embrapa – Macro-programa II.

## OOCYTE COMPETENCY ACCORDING TO FOLLICLE SIZE – PREMILIARIES RESULTS

Oocyte competency can be defined as the ability of the oocyte to complete meiosis, to be fertilized and to undergo normal embryo development. This competency is related to oocyte diameter and to follicle size, being the follicle size extensively used as an indicator of the oocyte developmental potential. However, in the majority of the studies, the evaluation of the follicle size is made in the ovarian surface, which does not allow a precise measurement. The present study aims to evaluate developmental potential of oocytes originated from different follicle sizes, in order to establish a reliable model for studies of competency. Follicles were dissected from slaughterhouse ovaries using scissor, forceps and bistouries. The dissected follicles were selected, based in the presence of blood vessels and translucency under a stereomicroscope containing a graduated ocular. Selected follicles were measured and distributed according to their diameter into 4 categories: 1) 1.0 to 3.0 mm (n=82); 2) 3.1 to 6.0 mm (n=160); 3) 6.1 to 8.0 mm (n=33); 4) > 8.1 mm (n=39). Cumulus-oocyte-complexes were released by follicle rupture and were classified morphologically in viable (grade 1 and 2) and not viable (grade 3, atretic and degenerated). Viable oocytes from each group were matured, fertilized and cultured *in vitro* or denuded for diameter measurements. Viable oocyte and their respective cumulus cells, from each group were also frozen for posterior analysis of gene expression. The developmental potential of oocytes was evaluated by cleavage and blastocyst rates at 48 h and 168 h post insemination, respectively. Data from cleavage and blastocyst rates as well as for percentage of viable oocytes were analyzed by  $\chi^2$  test. For oocyte diameter an analyses of variance was performed and means differences were evaluated by Tukey test. The percentage of viable oocytes was higher (P<0.05) in the groups 3 (96.9%) and 4 (89.7%) than in the groups 1 (60.9%) and 2 (70.65%). Oocytes from larger follicles (groups 3 and 4), had a higher diameter (P<0.05) than those from smaller follicles (group 1), with means of 124.8  $\mu\text{m} \pm 10.87$ ; 128.3  $\mu\text{m} \pm 8.55$ ; 131.5  $\mu\text{m} \pm 9.08$  and 132.5  $\mu\text{m} \pm 14.05$  for oocytes from group 1, 2, 3 and 4, respectively. Cleavage and blastocyst rates were higher (P<0.05) in oocytes originated from follicles of 6.1 to 8.0 mm (92% and 67%) than those from smaller follicles, from 1.0 to 3.0 mm (63% and 23%) and 3.1 to 6.0 mm (66% and 27%). Although, cleavage (80%) and blastocyst (43%) rates in group 4 were similar to the other groups, it showed a tendency (P<0.07) to have a greater blastocyst rate than group 1 and 2. The results showed that oocytes from follicles size of 6.1 to 8.0 mm are the most competent, which can be confirmed by the higher diameter and higher developmental potential. The less competent oocytes are those obtained from follicles of 1.0 to 3.0 mm and 3.1 a 6.0 mm size. Therefore, follicle dissection to evaluate follicle size provides a reliable model to study oocytes with different degrees of competency.