

RELAÇÃO ENTRE QUALIDADE MORFOLÓGICA DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS BOVINOS E POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*

Pereira, M.M.¹; Batista, R.I.T.¹; Wohlres-Viana, S.²; Boité, M.C.³; Serapião, R.V.⁴; Polisseni, J.^{2,4}; Iguma, L.T.⁴; Sá, W.F.⁴; Camargo, L.S.A.^{1,4}; Viana, J.H.M.^{1,4}

¹Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora 36016-000 Juiz de Fora, MG; ²Universidade Federal de Juiz de Fora 36036-330 Juiz de Fora, MG; ³Universidade Federal Fluminense 24320-340 Niterói, RJ; ⁴Embrapa Gado de Leite 36038-330 Juiz de Fora, MG 36038-330; mimunckjf@yahoo.com.br

Uma das principais fontes de variação na produção *in vitro* de embriões bovinos é o potencial de desenvolvimento dos complexos cumulus-oócitos (COCs) submetidos ao cultivo. Uma avaliação subjetiva deste potencial é realizada pela seleção morfológica dos COCs recuperados. Contudo, em diversas situações, deseja-se obter o máximo de embriões e, consequentemente, gestações, mas não necessariamente as melhores taxas de desenvolvimento. Desta forma, torna-se importante investigar o potencial de desenvolvimento de COCs de menor qualidade morfológica, usualmente não utilizados em cultivo. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação da qualidade morfológica com o potencial de desenvolvimento de COCs. Oócitos (n=1837) recuperados de ovários bovinos coletados em matadouro foram classificados morfológicamente em função do número de camadas de células da granulosa (Viana *et al.*, 2004), e separados em três grupos para a maturação *in vitro*: G1 (grau I - mais de três camadas de células compactas do cumulus, n=999); G2 (grau II - uma a três camadas de células do cumulus, n=301), G3 (grau III - parcialmente desnudos, n=219). Os COCs foram maturados em meio TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 20µg/ml de FSH por 24 horas; fecundados *in vitro* em meio FERT TALP, acrescido de 10 µl/ml de heparina com uma dose inseminante de 2,0x10⁶ espermatozoides/mL. Posteriormente os possíveis zigotos foram co-cultivados com células do cumulus oophorus em meio CR2. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada de 48 a 72h após a fecundação e a produção de blastocistos e o número total de células embrionárias no sétimo dia. As taxas de clivagem e produção de blastocistos foram analisadas pelo teste Qui-quadrado e o número de total de células por análise de variância. Do total de oócitos recuperados, 54,4% foram do G1; 16,4% G2; 11,7% G3; 4,2% desnudos; 11,2% degenerados e 1,85% oócitos com células expandidas, ou zona pelúcidas livres. Quanto ao desenvolvimento pós-fecundação, não houve diferença (P>0,05) na taxa de clivagem entre os grupos G1 e G2 (46,4%; 40,8%, respectivamente). Entretanto, o G3 (36,5%) foi semelhante (P>0,05) ao G2 e inferior ao G1 (P<0,05). A taxa de blastocistos em G1 (22,4%) foi superior (P<0,05) as observadas em G2 e G3 (10,6% e 13,6%, respectivamente). Considerando-se o conjunto dos três parâmetros de qualidade dos COCs avaliados foram produzidos 286 blastocistos, número 27,6% acima do número de blastocistos do G1(224 blastocistos), apesar da taxa de blastocistos ser inferior (P<0,05) quando comparado com a taxa obtida com COCs do G1 (18,8% para o conjunto dos três grupos de COCs e 22,4% para o COCs do G1). Não houve diferença (P>0,05) no número total de células entre blastocistos provenientes do G1 (138,5±10,5), G2 (147,5±9,8) ou G3 (122,5±13,1). A utilização de COCs de qualidade I, II e III em um sistema de produção *in vitro* de embriões aumenta o número total de blastocistos produzidos, no entanto reduz a taxa de blastocistos, sem afetar a qualidade dos embriões produzidos, quando comparado com COCs somente de grau I.

RELATIONSHIP BETWEEN MORPHOLOGICAL QUALITY AND IN VITRO DEVELOPMENT POTENTIAL OF BOVINE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES

One of the main variation sources for *in vitro* embryo production in bovine is the development potential of the cumulus-oocyte complexes (COCs) cultured. A subjective evaluation of this potential is generally performed by a morphological selection of COCs recovered both from slaughterhouses or by ovum pick-up. In many cases, however, the aim is to obtain as many embryos as possible and, consequently, pregnancies, despite of the absolute development rates. Therefore, it is important to investigate the development potential of lower morphological quality COCs, which would generally not be used for *in vitro* embryo production. The aim of this study was to evaluate the relationship between morphological quality and embryonic development potential of bovine COCs. Oocytes (n=1837) recovered from ovaries collected at slaughterhouse were ranked by morphological aspect according to the number of cumulus cell layers (Viana *et al.*, 2004), and distributed for *in vitro* maturation and embryo production into three groups: G1(grade I – more than 3 layers of compact cumulus cells, n=999); G2 (grade II – one to three cell layers, n=301), G3 (grade III – partially denuded, n=219). The COCs were matured in TCM 199 medium added with 10% of estrous cow sera and 20µg/mL of FSH for 24 hours. The *in vitro* fertilization was performed in FERT TALP medium, added with 10 µl/mL of heparin, with an inseminating doses of 2.0x10⁶ spermatozoa/mL. The presumptive zygotes were co-cultured with cumulus cells in CR2 medium. Cleavage rate was evaluated 48 to 72 hours, and the blastocyst production seven days after fertilization. The number of embryonic cells was established seven to eight days after fecundation. Cleavage and blastocyst rates were analyzed by the Chi-square method, and the number of cells by ANOVA. From the oocytes recovered, 54.4% were ranked as G1; 16.4% as G2; 11.7% as G3; 4.2% were denuded; 11.2% degenerated and 1.85% oocytes with expanded cumulus or empty zona pellucida. There was no difference (P>0.05) in cleavage rates among G1 and G2 (46.4% vs. 40.8%, respectively), but G3 rate (36.5%) was similar (P>0.05) to G2 and lower than G1 (P<0.05). The blastocyst rate of G1 (22.4%) was higher (P<0.05) than those of G2 and G3 (10.6% and 13.6%, respectively). Considering all COCs used, 286 blastocysts were produced, a number 27.6% higher than the number obtained only with G1(224 blastocysts), despite a lower total blastocyst rate (P<0.05) when compared to the rate obtained with G1 COCs (18.8% for all groups vs. 22.4% for G1). There was no difference (P>0.05) in total number of cells among blastocysts from G1 (138.5±10.5), G2 (147.5±9.8) or G3 (122.5±13.1). The use of COCs grades I, II and III in an *in vitro* embryo production system increase blastocyst yield, despite a reduction in blastocyst rates, without affecting embryo quality, when compared to the use of only grade I COCs.