

Dissecação Folicular: Um método eficiente para estudos de competência ovocitária

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

***Documentos* 260**

**Dissecação Folicular: Um método eficiente para
estudos de competência ovocitária**

Ester Siqueira Caixeta

Margot Alves Nunes Dode

Editores Técnicos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2008

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4600 Fax: (61) 3340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machaim Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Ligia Sardinha Fortes*
Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição
1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

C 138 Caixeta, Ester Siqueira

Dissecação folicular: um método eficiente para estudos de competência ovocitária. / Ester Siqueira Caixeta e Margot Alves Nunes Dode. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

21 p. -- (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110 ; 260).

1. Reprodução animal. 2. Dissecação folicular. 3. Biotecnologia. 4. Embrião. I. Caixeta, Ester Siqueira. II. Título. III. Série.

636.082 - CDD 21.

Autores

Ester Siqueira Caixeta

Universidade de Brasília
ecaixeta@gmail.com

Margot Alves Nunes Dode¹

Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia
Margot@cenargen.embrapa.br

Sumário

1. Introdução	1
2. Desenvolvimento do folículo e do ovócito	2
3. Técnica de dissecação e avaliação dos folículos	5
4. Estudo para a avaliação da técnica de dissecação dos folículos	10
Considerações finais	13
Referências	14

Dissecação Folicular: Um método eficiente para estudos de competência ovocitária

Ester Siqueira Caixeta

Margot Alves Nunes Dode

Introdução

Com o estabelecimento da produção *in vitro* (PIV) de embriões tem sido possível explorar melhor o potencial reprodutivo das fêmeas. Essa técnica tem sido amplamente utilizada em rebanhos bovinos, como uma opção para a multiplicação de animais de interesse econômico. No Brasil essa biotecnologia foi rapidamente incorporada ao setor produtivo, de tal forma que nos últimos 4 anos o país foi responsável por 50% da produção de embriões *in vitro* do mundo (VIANA e CAMARGO, 2007).

Mesmo com todos os avanços feitos nos últimos anos, a PIV ainda possui uma baixa eficiência, visto que, dos ovócitos selecionados no início do processo cerca de 40% produzem embriões viáveis após a maturação e fecundação *in vitro*. Isto sugere que a maturação ainda é um dos problemas da PIV. Mais estudos com o objetivo de entender melhor os mecanismos da maturação *in vitro* são necessários, pois somente assim será possível indicar modificações e melhoras nos protocolos para que o sistema *in vitro* possa ser o mais próximo possível do *in vivo*, e, com isso, aumentar a disponibilidade de ovócitos mais competentes para serem utilizados nas técnicas de reprodução assistida.

Na maturação ocorrem mudanças nucleares e citoplasmáticas que conferem ao ovócito a capacidade de dar origem a uma nova vida. Vários fatores podem interferir no sucesso da maturação, tais como a qualidade do ambiente folicular, tamanho do folículo de origem, morfologia do complexo cumulus-ovócito e principalmente a competência ovocitária. Somente ovócitos competentes podem sofrer maturação completa e ter desenvolvimento embrionário normal (DODE, 2006). A competência do ovócito, portanto, se refere à sua capacidade de ser fecundado e de formar um embrião viável. Entretanto, os mecanismos bioquímicos que regulam essa aquisição e os eventos envolvidos durante esse período ainda não são conhecidos.

Está clara a existência de uma relação entre o tamanho do folículo e a qualidade do ovócito em termos de morfologia e grau de competência, sendo que ovócitos derivados de grandes folículos têm um maior potencial de desenvolvimento que ovócitos obtidos de pequenos

folículos, gerando uma melhor produção de embriões *in vitro* (HAGEMANN et al., 1999; MACHATKOVA et al., 2004; LEQUARE et al., 2005). Existe também uma correlação entre o diâmetro do ovócito e tamanho do folículo e, conseqüentemente com a capacidade de desenvolvimento (GANDOLFI et al., 2005). Devido a este fato, o tamanho folicular tem sido amplamente utilizado como indicador do potencial de desenvolvimento do ovócito. Entretanto, na maioria dos estudos que utilizam esse parâmetro, a avaliação do tamanho folicular é feita na superfície do ovário, o qual não permite uma medição precisa. Portanto, o objetivo deste trabalho é apresentar e descrever a técnica de dissecação dos folículos como um método eficaz para obtenção de ovócitos a serem utilizados em estudos da competência ovocitária.

2. Desenvolvimento do folículo e do ovócito

Diferente dos espermatozoides, os quais são continuamente gerados a partir da puberdade, a fêmea tem uma população finita de ovócitos que estão presentes no ovário quando a fêmea bovina nasce. Os ovócitos presentes em um ovário adulto originam-se a partir de um número definido de células germinativas primordiais que são formadas no epitélio do saco vitelínico do embrião. Estas células migram do saco vitelínico para as cristas genitais onde vão colonizar as gônadas em formação.

A ovogênese e a foliculogênese são processos distintos, porém interdependentes. Na ovogênese ocorre a formação, crescimento e maturação do gameta feminino. O processo começa durante a vida fetal (AUSTIN e SHORT, 1982; KNOBIL e NEILL, 1994 FAIR, 2003). As células germinativas primordiais se diferenciam em ovogônias, que se proliferam por mitoses antes do nascimento e então entram em meiose, se tornando um ovócito primário que inicialmente, fica retido no estágio prófase I (AUSTIN e SHORT, 1982). Portanto, no nascimento, os ovócitos estocados nos ovários se encontram no estágio de prófase da primeira divisão meiótica (Figura 1) e necessitam da ação hormonal na puberdade para a retomada e finalização da meiose I e uma completa maturação citoplasmática (Figura 2) (HAFEZ e HAFEZ, 2004; WANG e SUN, 2007).



Foto: Laboratório de Reprodução Animal – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Figura 1. Ovócito primário no estágio de prófase da primeira divisão meiótica (Vesícula Germinativa).

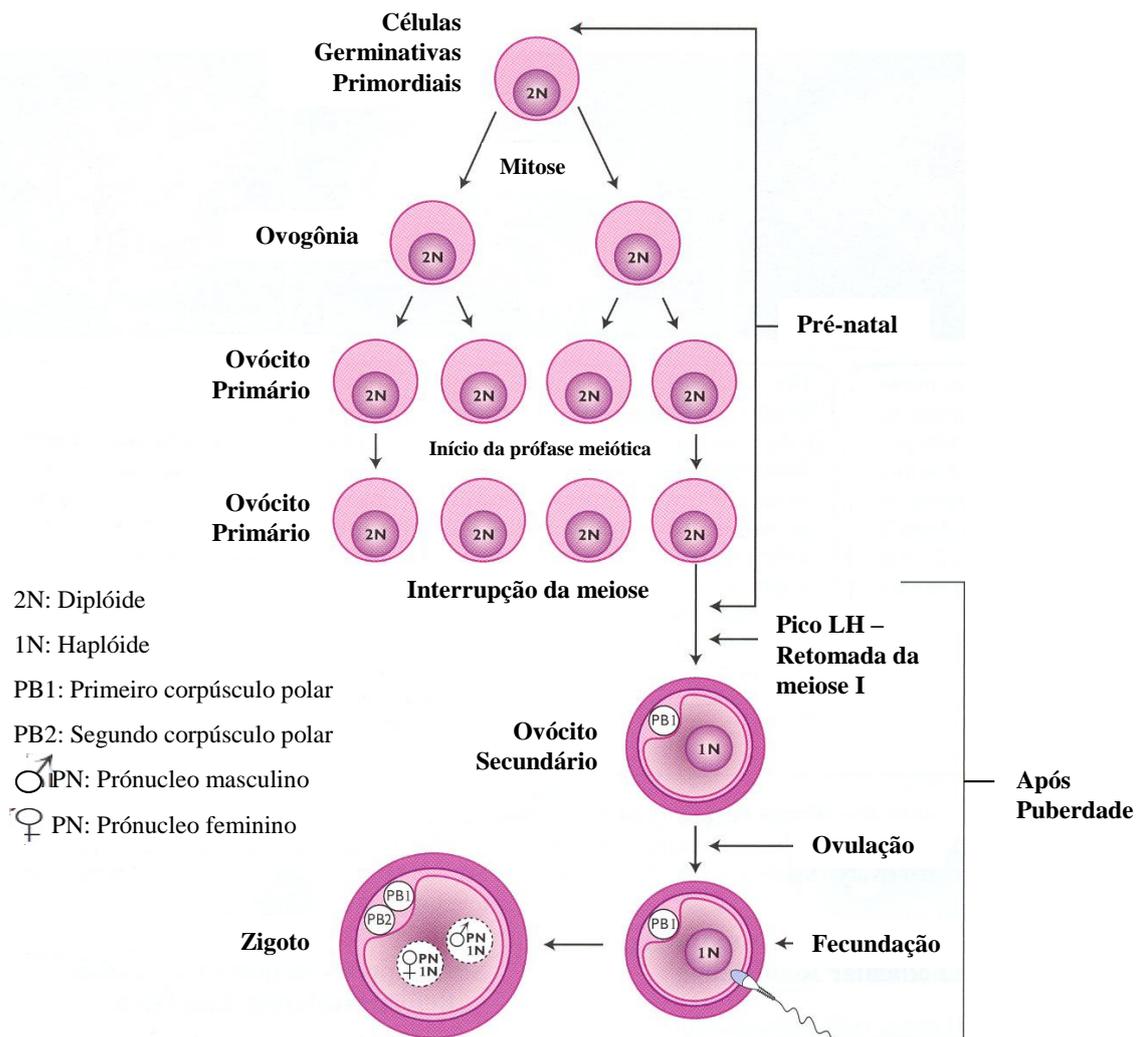


Fig. 2. Fases da ovogênese.

Fonte: Adaptado de Senger, 2003

A foliculogênese em bovinos, também começa durante a vida fetal. Logo depois que os ovócitos são formados eles se tornam circundados por uma simples camada de células epiteliais achatadas, formando o folículo primordial (AUSTIN e SHORT, 1982; FAIR, 2003). Logo que o estoque de folículos primordiais é estabelecido, começa o crescimento que ocorre somente em um grupo de folículos. O crescimento folicular é um processo contínuo durante a vida reprodutiva (AUSTIN e SHORT, 1982). Os folículos que entram na fase de crescimento passam a ser chamados de folículos primários, que se caracterizam pelo ovócito rodeado por uma completa camada de células cuboidais (FAIR, 2003) (Figura 3). Progressivamente, as células da granulosa do folículo primário aumentam em número e tornam-se mais volumosas dando origem aos folículos secundários. (AUSTIN e SHORT, 1982; HAPER, 1994). As células da granulosa começam a sintetizar um fluido que se

acumula entre as próprias células da granulosa, formando o antro inicial e o folículo terciário (Figura 4).

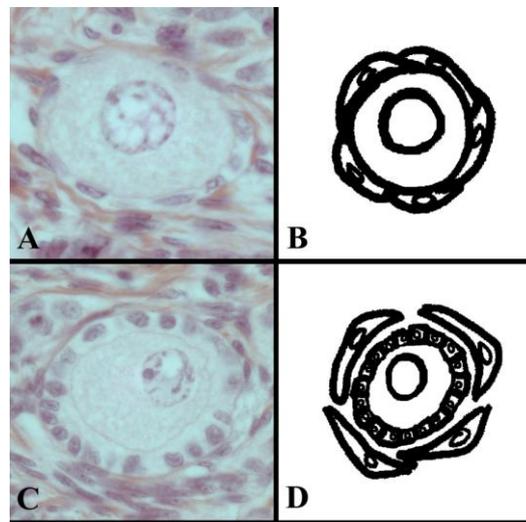


Fig. 3. A e B) Folículo primordial contendo um ovócito circundado por uma simples camada de células epiteliais achatadas. C e D) Folículo primário caracterizado pelo ovócito rodeado por uma completa camada de células cuboidais.

Fonte: www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/praticas.htm

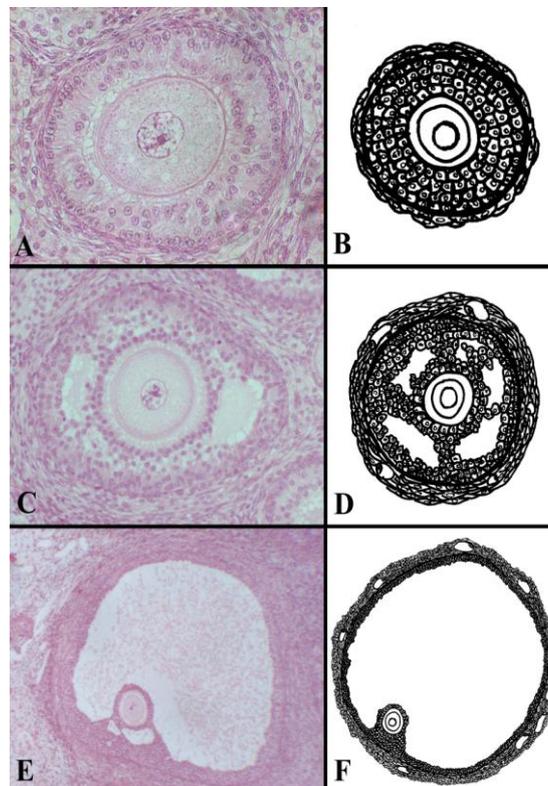


Fig. 4. A e B) Folículo secundário formado por um ovócito rodeado por mais de uma camada de células cuboidais. C e D) Acúmulo inicial de fluido entre as células da granulosa formando o antro

inicial e o folículo terciário. E e F) Folículo maduro ou folículo de Graaf.

Fonte: www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/praticas.htm

Durante todo este período de desenvolvimento folicular o ovócito permanece retido no estágio de diplóteno da prófase I. Entretanto, o seu crescimento continua, sendo que o volume da célula aumenta, indicando um período de intensa atividade metabólica, na qual ocorrem mudanças ultra-estruturais no ovócito, incluindo o surgimento de algumas novas organelas (HAPER, 1994). O crescimento do ovócito é acompanhado por um aumento no número de mitocôndrias e por mudanças na sua ultra-estrutura, se tornando altamente vacuolizadas e ovais. Concomitantemente, o complexo de Golgi sofre alterações, que são indicativas de um aumento na sua atividade. Ocorre também um acúmulo de gotículas de lipídeos, que servirão como reserva energética para o futuro embrião. O surgimento da zona pelúcida no espaço perivitelínico também ocorre neste período de crescimento do ovócito. Por último, ocorre a formação dos grânulos corticais, que são pequenas vesículas esféricas que terão a função de provocar o endurecimento da zona pelúcida no momento da fecundação, impedindo a polispermia (HAPER, 1994).

O período final do desenvolvimento folicular envolve o recrutamento, seleção e dominância. O estímulo para o recrutamento folicular é uma elevação nas concentrações séricas de FSH. Após o recrutamento apenas um folículo é selecionado e passa a exercer dominância sobre os demais ao longo da onda (FAIR, 2003).

Se o folículo dominante está presente durante a fase lútea, os altos níveis de progesterona impedem o aumento da frequência dos pulsos de LH, e não ocorrerá a ovulação.

Posteriormente, ocorrendo luteólise, as concentrações de progesterona diminuem permitindo um aumento na pulsabilidade de LH, o qual permite a maturação final do folículo e a ovulação (SIRARD et al., 2006)

O folículo pré-ovulatório ainda contém um ovócito primário, que por ação do LH é estimulado a retomar e completar a primeira divisão meiótica (I), seguida da extrusão do primeiro corpúsculo polar, e entrada na segunda divisão meiótica (II). O ovócito no estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (MII), é então, retido pela segunda vez, sendo esse o estágio em que se encontra quando é liberado do folículo na ovulação (AUSTIN e SHORT, 1982). O término da maturação meiótica do ovócito é dependente da penetração do espermatozóide durante a fecundação. Quando a região equatorial da cabeça espermática liga-se à membrana vitelínica inicia a ativação do ovócito que induz ao término da segunda divisão meiótica, e a liberação do segundo corpúsculo polar (GINTHER, 1992; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

3. Técnica de dissecação e avaliação dos folículos

3.1. Material necessário

Ovários

1 pinça pontiaguda curva

1 pinça serrilhada curva

Tesoura

Lâmina de bisturi

Placa aquecedora

Placa de Petri

Lupa

Ocular graduada (ex.: micrometer eyepiece OSM-4 Olympus®)

Meios:

Solução Salina: -NaCl 0,9% acrescido de penicilina (0,1176 mg/ml) e estreptomicina (0,11 mg/ml).

TCM-199 com sais de Hank's, glutamina e Hepes (Gibco®-12350), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB).

Deve-se colocar a quantidade de meio que será utilizada no dia na estufa (com a tampa fechada) ou no banho-maria, algumas horas antes do uso, para ser aquecido a temperatura ideal de 35°C.

3.2. Dissecação dos folículos

Para a realização do procedimento de dissecação dos folículos é necessária a coleta de ovários a partir de vacas ovariectomizadas ou vacas sacrificadas em abatedouro. Imediatamente após a coleta, os ovários devem ser transportados até o laboratório em solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de antibióticos (penicilina e estreptomicina), à temperatura de 32 a 35°C. No laboratório, os ovários devem ser conservados em banho-maria à 35°C até o início do processo de dissecação.

Os folículos são dissecados da córtex ovariana em temperatura ambiente, com o auxílio de tesoura, lâmina de bisturi e pinças (Figura 5). Para maior facilidade de dissecação e para manter a integridade dos folículos é recomendada a utilização de uma pinça pontiaguda curva e uma serrilhada curva. A pinça pontiaguda curva deve ser posicionada mais afastada do folículo e servir como um ponto de apoio para segurar o ovário (Figura 6). Com a pinça serrilhada curva bem próxima ao folículo que está sendo dissecado, puxa-se lentamente a parede do folículos em vários pontos contornando a sua superfície e liberando-o cuidadosamente da córtex ovariana (Figura 6). Geralmente em folículos maiores (> 6,0 mm), é necessário utilizar a lâmina de bisturi delimitando com um corte raso na

superfície do contorno do folículo, e em seguida realizar a dissecação com as pinças. Após a retirada completa do folículo da córtex ovariana, a tesoura deve ser utilizada para realizar o acabamento da limpeza dos folículos, retirando os restos de tecido ovariano que podem ter permanecido. Os folículos devem ser completamente dissecados, de tal forma que seja possível a sua avaliação e mensuração precisa.

Os folículos dissecados devem ser transferidos e mantidos em placas de Petri contendo meio TCM-199 com sais de Hank's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), sobre uma placa aquecedora a 36°C, onde deverão permanecer durante todo o procedimento de dissecação, o qual recomenda-se que não seja superior a 90 minutos (Figura 7).



Foto: Laboratório de Reprodução Animal
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Fig. 5. Ovários mantidos à 36 °C (seta). Material utilizado para a dissecação dos folículos (lâmina de bisturi, tesoura e pinças)

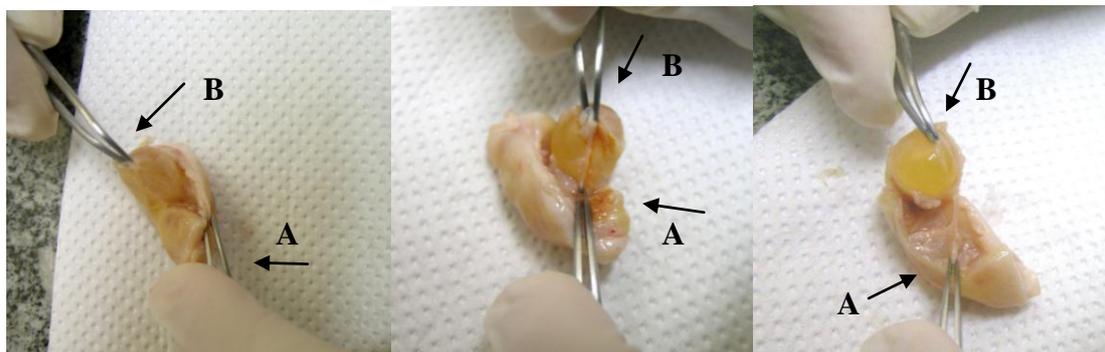


Fig. 6. Folículo sendo dissecado da córtex ovariana com o uso de pinças pontiaguda (A) e serrilhada (B).

Foto: Laboratório de Reprodução Animal
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia



Foto: Laboratório de Reprodução Animal
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Fig. 7. Folículos dissecados mantidos sobre uma placa aquecedora a 36°C durante todo o procedimento de dissecação.

Após a dissecação, os folículos devem ser mensurados e avaliados de acordo com sua qualidade. Para a mensuração, os folículos de diferentes tamanhos devem ser colocados sobre uma lupa contendo uma ocular graduada (micrometer eyepiece OSM-4 Olympus®) (Figura 8), e então, classificados e distribuídos em categorias de acordo com o tamanho (Figura 9 A e B). A qualidade morfológica dos folículos deve ser avaliada de acordo com a presença de vasos sanguíneos evidentes e aspecto translúcido e brilhoso.



Foto: Laboratório de Reprodução
Animal Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Fig. 8. Ocular graduada para ser acoplada a lupa. Micrometer eyepiece OSM-4 Olympus®.

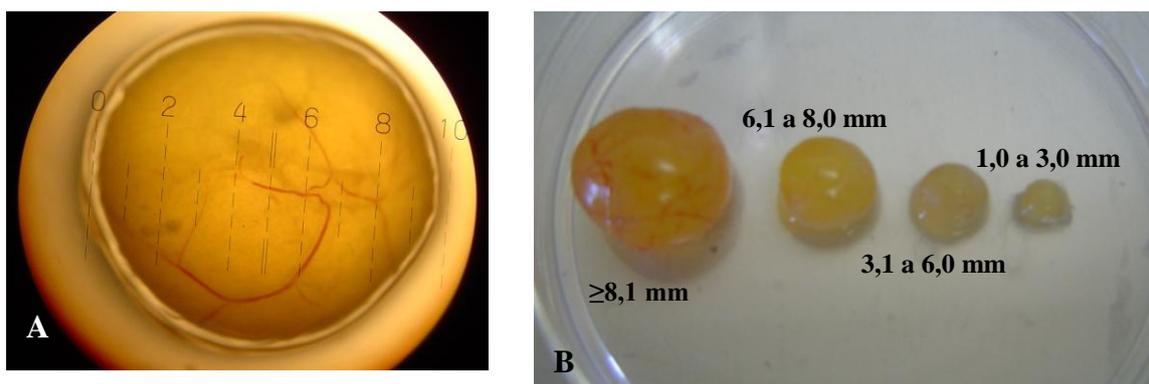


Fig. 9. A) Mensuração de foliculo de 6,1 a 8,0 mm em estereomicroscópio utilizando uma ocular graduada. B) Foliculos dissecados das várias categorias de tamanho folicular.

Foto: Laboratório de Reprodução
Animal Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

3.3. Recuperação e avaliação dos ovócitos

Os foliculos classificados e separados por categoria devem ser cuidadosa e individualmente rompidos em uma placa de petri contendo meio TCM-199 com sais de Hank's suplementado com 10% de SFB, sobre uma lupa. Para romper os foliculos utiliza-se duas pinças, que devem ser puxadas em direções opostas rasgando a parede folicular. Após a ruptura, o complexo cumulus-ovócito liberado deve ser recuperado com uma pipeta de manipulação, sendo em seguida transferidos para placas contendo gotas do mesmo meio TCM-199, sobre placa aquecedora.

Após a recuperação, os complexos cumulus-ovócitos devem ser classificados utilizando como critério a homogeneidade e coloração do citoplasma e aparência, compactação e número de camadas de células do cumulus. Existem vários sistemas para avaliação da morfologia de ovócitos. No laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é utilizada a classificação de Stojkovic et al., (2001) modificada (Figura 10 A, B, C e D) descrita a seguir:

Qualidade 1: Ovócito com citoplasma homogêneo e com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus.

Qualidade 2: Ovócito com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, cumulus compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos 5 camadas completas.

Qualidade 3: Ovócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, a zona pelúcida coberta com pelo menos 3 camadas de células do cumulus e/ou com pequenas áreas desnudas.

Qualidade 4: Citoplasma heterogeneamente pigmentado e o cumulus completamente/parcialmente ausente ou expandido.

Somente os complexos cumulus-ovócitos classificados como qualidade 1 e 2 devem ser utilizados na produção *in vitro* (PIV) de embriões.

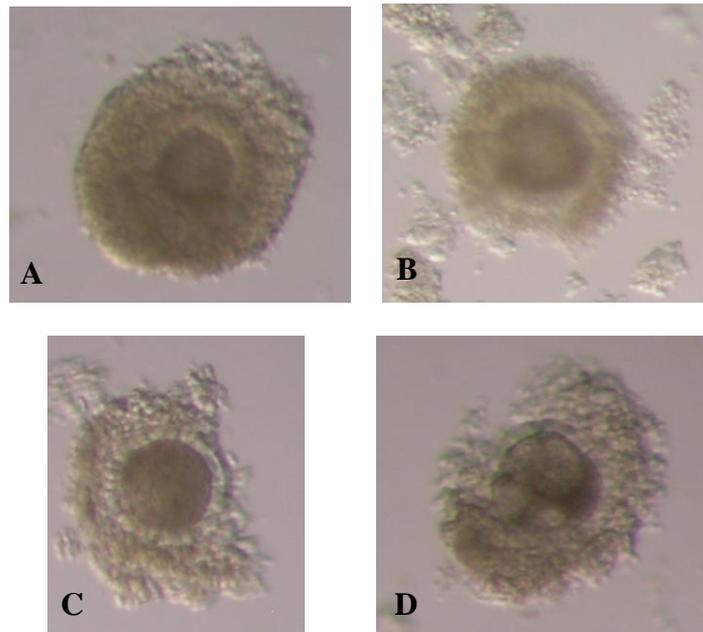


Foto: Laboratório de Reprodução Animal
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Fig. 10. A) Ovócito de qualidade 1 com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas compactas de células do cumulus. B) Ovócito de qualidade 2 com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, cumulus compacto menor do que na categoria 1. C) Ovócito de qualidade 3 com citoplasma heterogêneo, e células do cumulus com pequenas áreas desnudas. D) Ovócito de qualidade 4 com citoplasma heterogeneamente pigmentado, apresentando vários vacúolos e o cumulus parcialmente ausente.

Após a avaliação, os complexos cumulus-ovócito (COC) poderão ser utilizados para a maturação *in vitro* ou podem ser desnudados, dependendo da finalidade da técnica de dissecação.

Se o objetivo do uso dos ovócitos requer o desnudamento, os ovócitos devem ser transferidos para uma pequena gota (50 μ l até 10 ovócitos) de PBS e, com uma pipeta realizar sucessivas pipetagens até garantir a ausência completa das células do cumulus. Para facilitar o procedimento a ponta da ponteira pode ser levemente pressionada para diminuir o seu diâmetro, permitindo o desnudamento.

4. Avaliação da técnica de dissecação dos folículos

Vários estudos têm demonstrado que a capacidade de desenvolvimento *in vitro* de ovócitos bovinos pode ser afetada pelo tamanho e qualidade dos folículos dos quais são obtidos e pela qualidade morfológica do complexo cumulus-ovócito (LONERGAN et al., 1994; HAGEMANN et al., 1999; MACHATKOVA et al., 2004; LEQUARE et al., 2005; GANDOLFI

et al., 2005). De tal forma, que o tamanho folicular se tornou um modelo interessante para a avaliação dos mecanismos relacionados à competência.

Para avaliar a eficiência da técnica de obtenção de ovócitos com diferentes graus de competência, oriundos de folículos de diferentes tamanhos, foi realizado estudo na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen - DF, utilizando a técnica de dissecação de folículos descrita acima (CAIXETA et al., 2007).

Para isso, ovários de fêmeas bovinas foram obtidos de vacas de abatedouro local e foi realizado todo o procedimento de dissecação dos folículos. Os folículos dissecados foram avaliados em estereomicroscópio contendo uma ocular graduada, sendo selecionados pela presença de vasos sanguíneos e aspecto translúcido e brilhoso. Aqueles selecionados foram mensurados e distribuídos de acordo com o diâmetro em 4 categorias: 1) 1,0 a 3,0 mm; 2) 3,1 a 6,0 mm; 3) 6,1 a 8,0 mm; 4) > 8,1 mm. Os complexos cumulus-ovócitos foram recuperados dos folículos e classificados morfológicamente de acordo com a homogeneidade e coloração do citoplasma e número de camadas e aspecto das células do cumulus em viáveis (qualidade 1 e 2) e não viáveis (qualidade 3 e 4). Após serem selecionados, apenas os ovócitos classificados como grau 1 e 2 foram utilizados no sistema de produção *in vitro* de embriões já padronizado e rotineiramente utilizado pelo Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (PEREIRA et al., 2005; CORRÊA et al., 2008). Os ovócitos viáveis de cada grupo foram maturados (Figura 11), fecundados e cultivados *in vitro*, ou desnudados para avaliação do diâmetro.

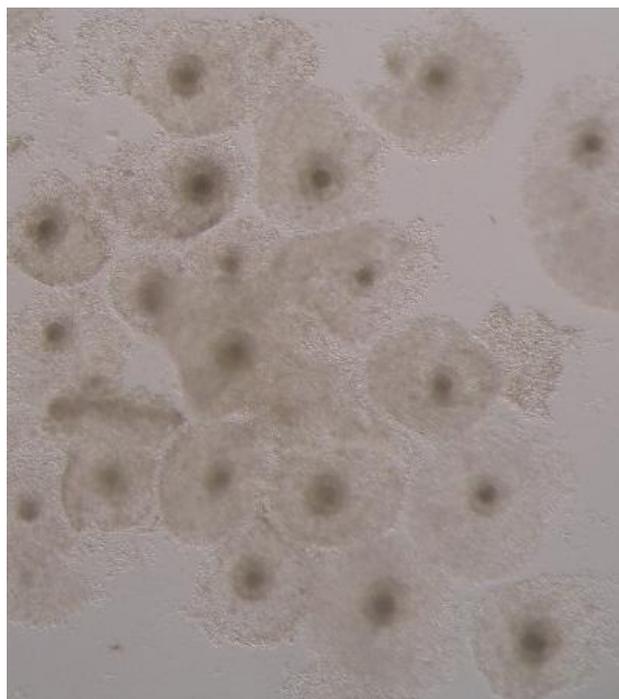


Foto: Laboratório de Reprodução Animal Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Fig. 11. Ovócitos maturados por 22 horas. Expansão das células do cumulus.

A mensuração do diâmetro dos ovócitos desnudos foi realizada utilizando uma ocular graduada acoplada à lupa (micrometer eyepiece OSM-4 Olympus®). O desenvolvimento da competência dos ovócitos foi avaliado pela taxa de clivagem no dia 2, e produção de blastocistos nos dias 6, 7 e 8, considerando dia 0 (zero) o dia da inseminação (Figura 12). As taxas de clivagem, blastocistos e porcentagem de ovócitos viáveis foram analisadas pelo teste de χ^2 . Os tamanhos dos ovócitos foram comparados pela análise de variância e teste de Tukey.



Foto: Laboratório de Reprodução
Animal Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Fig. 12. A) Embrião clivado, dia 2 pos-inseminação(PI); B) Embrião no estágio de blastocisto expandido, dia 7 p.i.

Os resultados mostraram que mais de 50% dos ovócitos obtidos de folículos dissecados são viáveis e podem ser utilizados para a maturação *in vitro*, independente do tamanho do folículo (Tabela 1). A menor porcentagem de ovócitos grau 1 e 2 obtidos no grupo de folículos de 3,1 a 6,0 mm pode ser devido, a que nesse estágio encontram-se mais folículos que foram recrutados, cresceram, mas que não continuaram seu crescimento e, portanto, estão em estágio mais avançado de atresia.

Tabela 1 - Porcentagem de ovócitos viáveis (Grau 1 e 2) e não viáveis (Grau 3, atrésico, degenerado ou expandido), oriundos de folículos de diferentes tamanhos, em relação ao número total de ovócitos (N).

Tamanho do folículo	N	Viáveis (%)	Não viáveis (%)
1. 1,0 a 3,0 mm	216	115 (53,24%) ^{a,b}	102 (46,76%) ^{a,b}
2. 3,1 a 6,0 mm	413	208 (50,36%) ^a	205 (49,64%) ^a
3. 6,1 a 8,0 mm	212	126 (59,43%) ^b	86 (40,57%) ^b
4. > 8,1 mm	235	145 (61,70%) ^b	90 (38,30%) ^b

ab Diferentes letras na mesma coluna indicam valores diferentes ($P < 0.05$).

Com relação ao tamanho, os ovócitos obtidos de folículos de 1,0 a 3,0mm, apresentaram diâmetro menor do que os de folículos maiores (Tabela 2). Estes resultados mostram que o diâmetro dos ovócitos continuam aumentando até os folículos atingirem em torno de 3,0 mm.

Tabela 2 - Diâmetro dos ovócitos oriundos dos diferentes grupos de folículos.

Tamanho do folículo	Número total de ovócitos	Diâmetro dos ovócitos média \pm desvio padrão
1. 1,0 a 3,0 mm	60	124,15 μ m \pm 9,19 ^a
2. 3,1 a 6,0 mm	60	128,0 μ m \pm 7,41 ^b
3. 6,1 a 8,0 mm	60	128,20 μ m \pm 6,04 ^b
4. \geq 8,1 mm	60	129,33 μ m \pm 8,11 ^b

ab Diferentes letras na mesma coluna indicam valores diferentes ($P < 0.05$).

O grupo de ovócitos obtido de folículos até 3 mm apresentou menor taxa de clivagem e de blastocisto em relação ao demais, possivelmente por não ter completado o seu crescimento total, como pode ser confirmado pelo diâmetro dos ovócitos obtidos desse grupo (Tabela 2). A produção de blastocistos foi maior nos ovócitos oriundos de folículos de 6,1 a 8,0 mm e \geq 8,1 mm, que nos obtidos de folículos menores, dos grupos 1 e 2 (Tabela 3). Esses resultados confirmam a relação existente entre o tamanho do folículo, diâmetro e potencial de desenvolvimento dos ovócitos. Entretanto, é importante ressaltar que outros fatores estão envolvidos na aquisição da competência ovocitária, visto que ovócitos do grupo 2 (folículos de 3,1 a 6,0 mm), apesar de terem atingindo o seu crescimento total (Tabela 2), são menos competentes do que os grupos de folículos maiores (Tabela 3).

Portanto, os resultados indicam que somente a classificação morfológica e o diâmetro do ovócito não são suficiente para indicar a competência ovocitária. Entretanto, quando essas características são associadas com o tamanho do folículo, é possível obter grupos de ovócitos com competências distintas, o que foi demonstrado pelas taxas de blastocistos, que variaram de 28% a 72 % (Tabela 3). Esses grupos podem ser utilizados para estudos na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na competência ovocitária

Tabela 3 - Taxas de clivagem no dia 2 pós-inseminação (p.i.) e blastocistos nos dias 6, 7 e 8 p.i. em relação ao número total de ovócitos (N) provenientes de diferentes tamanhos de folículos.

Tamanho do folículo	N	D2 (%)	Blastocistos		
			D6 (%)	D7 (%)	D8 (%)
1. 1,0 a 3,0 mm	98	58 (59%) ^a	23 (23%) ^a	27 (28%) ^a	27 (28%) ^a
2. 3,1 a 6,0 mm	190	141 (74%) ^b	57 (30%) ^a	67 (35%) ^a	67 (35%) ^a
3. 6,1 a 8,0 mm	89	78 (88%) ^{b,c}	46 (52%) ^b	62 (70%) ^b	64 (72%) ^b
4. \geq 8,1 mm	96	86 (90%) ^c	52 (54%) ^b	66 (69%) ^b	66 (69%) ^b

ab Diferentes letras na mesma coluna indicam valores diferentes ($P < 0.05$).

Considerações finais

Os resultados após a utilização da técnica de dissecação mostraram que o grupo de ovócitos provenientes de folículos maiores, 6,1 a 8,0 mm e \geq 8,1 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.

A dissecação dos folículos para avaliação mais precisa do tamanho, mostra que é possível obter ovócitos com diferentes graus de competência. Esse modelo, portanto, nos permite realizar estudos para identificar os mecanismos envolvidos na aquisição da competência. Essas informações permitirão criar alternativas para obtenção de ovócitos mais competentes e com isso aumentar a taxa de blastocistos e a eficiência da PIV.

Referências

AUSTIN, C. R.; SHORT, R.V. (Ed.). **Reproduction in mammals 1: germ cells and fertilization**. 2.ed. New York: Cambridge, 1982. 177p.

CAIXETA, E. S.; LEME, L. O.; MACHADO, G. M.; RUMPF, R.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Competência ovocitária de acordo com o tamanho folicular: resultados parciais. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, RS, v. 35, p. 1156, 2007. Suplemento 3.

CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, NL, v. 104, p. 132-142, 2008.

DODE, M. A. N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, RS, v. 34, p. 115-130, 2006. Suplemento 1.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, NL, v.78, p. 203-216, 2003.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. **Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.**, v.24, p.413-423, 2005.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2. ed. Madison: Equiservices, 1992. 642 p.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Monole: São Paulo, 2004. 513p.

HAGEMANN, L. J.; BEAUMONT, S. E.; BERG, M.; DONNISON, M. J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A. J.; SCHURMANN, A.; TERVIT, H. R. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, New York, US, v. 53, p.451-458, 1999.

HAPER, M. J. K. Gamete and zygote transport. In: KNOBIL, E.; NEILL, D. J. **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven press, 1994. v. 1, p. 123-187.

KNOBIL, E.; NEILL, D. J. **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven press, 1994. v.1

LEQUARRE, A. S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, Stoneham, Mass., v. 63, p. 841-859, 2005.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, New York, US, v.37, p.48-53, 1994.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, Stoneham, Mass., v. 61, p. 329-335, 2004.

PEREIRA, D.C.; DODE, M.A.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, Mass., v. 63, p. 1131-1141, 2005.

SIRARD, A. M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, Stoneham, Mass., v. 65, p. 126-136, 2006.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, p.904-909, 2001.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, RS, v. 35, p. 915-919, 2007. Suplemento 3.

WANG, Q.; SUN, Y. Q. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, Australia, AU, v. 19, p. 1-12, 2007.