

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

ANDRESSA CARVALHO NEVES

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA OVARIANA E RECUPERAÇÃO DE COMPLEXOS
Cumulus oophorus DE FÊMEAS SUÍNAS PRÉ-PÚBERES

PONTA GROSSA
2016

ANDRESSA CARVALHO NEVES

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA OVARIANA E RECUPERAÇÃO DE COMPLEXOS
Cumulus oophorus DE FÊMEAS SUÍNAS PRÉ-PÚBERES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para aprovação na disciplina de Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Zootecnia.

Orientador (a): Profa. Dra. Luciana da Silva Leal

PONTA GROSSA
2016

Dedico aos meus pais, Cleusa e Luiz, meu irmão Alex, meu namorado Bruno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, por ter me capacitado e dado forças em todas as etapas de minha vida e por nos oferecer o presente mais precioso que rege minha vida, seu filho JESUS. Obrigada DEUS, toda honra e glória seja dada a ti.

Agradeço também aos meus pais, Luiz Antônio e Cleusa Carvalho por todo cuidado, amor, paciência e princípios que levarei para vida toda. Ao meu irmão Alex, por trazer a alegria e descontração para nossas vidas. E também ao meu namorado Bruno Pacheco, por sempre estar comigo nos momentos bons e ruins, por me apoiar e incentivar sempre. Amo muito vocês.

Não poderia esquecer jamais da minha orientadora, Dr. Luciana da Silva Leal, agradeço por todos os ensinamentos que levarei para toda vida, não somente ensinamentos acadêmicos, mas também profissionais, saiba que te admiro demais e desejo a você todo sucesso do mundo, pois você merece.

Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado nesta caminhada, Jheferson, Tailana, Fabio (pelas caronas kkk) e não poderia esquecer jamais da Essamai que foi e sempre será minha parceira e amiga. Agradeço também a Gabrielle e Ingrid que me ajudaram no experimento, também a professora Adriana que gentilmente cedeu o laboratório.

Ao frigorífico Luiz Antônio, as veterinárias Luana e Juliana e funcionários que auxiliaram na obtenção do material do experimento.

Agradeço a todos os professores do curso pelos ensinamentos e também a UEPG pela oportunidade de cursar Zootecnia.

Agradeço também a toda minha família, pelo incentivo, ajuda e por acreditarem em mim, em especial meus avós Valdemar e Maria de Lourdes, meus tios Althieres e Valdinei, minhas tias Rosane, Alaíde, Jocelma. E todas as pessoas que fazem parte da minha vida.

Com amor e carinho, agradeço a todos!

Ó profundidade da riqueza, tanto da sabedoria
como do conhecimento de Deus! Quão insondáveis
são os seus juízos, e quão inescrutáveis, os seus caminhos!
Quem, pois, conheceu a mente do Senhor? Ou quem foi
o seu conselheiro? Ou quem primeiro deu a ele para
que lhe venha a ser restituído? Porque dele, e por meio
Dele, e para ele são todas as coisas. A ele, pois, a glória
eternamente. Amém!

RESUMO

O objetivo do trabalho foi caracterizar as dimensões ovarianas e avaliar dois métodos de recuperação de CCOs (complexos *Cumulus oophorus*) de ovários de fêmeas suínas com idade média de cinco meses e peso vivo médio de 80 kg. Foram utilizados ovários provenientes de abatedouro os quais foram pesados e medidos (comprimento, largura e altura) com paquímetro (n= 127 ovários). Posteriormente, dos 127 ovários, 38 passaram por aspiração folicular e 20 ovários passaram por secção (*Slicing*), totalizando 58 ovários os quais foram classificados os CCOs em graus 1, 2, 3 e 4 em estereomicroscópio. As médias de CCOs recuperados segundo o método foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As variáveis foram correlacionadas pelo Teste de Correlação de Pearson. Como resultados médios foram observados: peso do ovário 4,26 g; comprimento 2,57 cm; largura 1,99 cm e altura 1,39 cm. Ao total foram recuperados 5.871 CCOs dos 58 ovários que passaram pela recuperação, sendo 0,87; 2,23; 14,50 e 82,40% graus 1, 2, 3 e 4, respectivamente. O número total de CCOs apresentou correlação forte e significativa com CCO grau 4. O método de secção dos ovários proporcionou maior recuperação de CCOs, principalmente grau 4. O peso dos ovários apresentou correlações moderadas e significativas com medidas ovarianas e fraca com número de CCOs graus 3 e 4 e peso vivo. Conclui-se que a secção dos ovários proporciona maior recuperação de CCOs e que a baixa recuperação de CCO grau 1 pode ter ocorrido porque as fêmeas estudadas eram pré-púberes. O peso influencia mais na quantidade e qualidade dos CCOs do que as medidas ovarianas.

Palavras-chave: Folículos. Marrãs. Ovário. Oócito

ABSTRACT

The objective of the study was to characterize the ovarian dimensions and evaluate two methods of recovering COCs (*Cumulus oophorus* complexes) of ovaries of gilts with an average age of five months and average live weight of 80 kg. Ovaries from slaughterhouses were used, which were weighed and measured (length, width and height) with pachymeter (n= 127 ovaries). Subsequently, of the 127 ovaries, 38 passed through follicular aspiration and 20 ovaries passed through the section (Slicing), totaling 58 ovaries which were classified of COCs in grades 1, 2, 3 and 4 in stereomicroscope. The means of COCs recovered according to the method were compared by Tukey test ($P < 0.05$). The variables were correlated by Pearson Correlation Test. As average results were observed: ovarian weight 4.26 g; length 2.57 cm; width 1.99 cm and height 1.39 cm. A total of 5,871 CCOs were recovered from the 58 ovaries that underwent recovery, 0.87; 2.23; 14.50 and 82.40% grades 1, 2, 3 and 4 respectively. The total number of COCs showed a strong and significant correlation with grade 4 COC. The ovarian section method provides greater recovery of COCs, especially grade 4. Ovarian weight had moderate and significant correlations with ovarian measurements and weak with number of CCOs degrees 3 and 4 and live weight. It is concluded that the ovarian section provides a greater recovery of COCs and that low grade 1 COC recovery may have occurred because the females studied were prepubertal. Weight influences more on the quantity and quality of COCs than ovarian measurements.

Keywords: Folicles. Gilts. Ovary. Oocyte

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01 – Valores médios e erro-padrão da média (EPM) do peso e das medidas ovarianas de 127 ovários de fêmeas suínas pré-púberes.....15
- Tabela 02 – Valores médios de peso, medidas ovarianas e números de complexos *Cumulus oophorus* de graus 1, 2, 3, 4 e total recuperado de ovários de fêmeas suínas pré-púberes, segundo os métodos de recuperação.....16
- Tabela 03 – Estudo de correlação entre as variáveis peso vivo do animal (Kg) e peso (g), comprimento (cm), largura (cm), altura (cm) e recuperação de complexos *Cumulus oophorus* grau 1, 2, 3 e 4 de ovários de fêmeas suínas pré-púberes.....17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CCO	Complexo <i>Cumulus oophorus</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G1	CCO classificado como grau 1
G2	CCO classificado como grau 2
G3	CCO classificado como grau 3
G4	CCO classificado como grau 4
GLM	Modelo linear generalizado
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
LH	Hormônio luteinizante

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. OVÁRIOS.....	13
2.2. METODOLOGIA DE RECUPERAÇÃO DE CCO POR ASPIRAÇÃO	14
2.3. METODOLOGIA DE RECUPERAÇÃO DE CCO POR SECÇÃO	14
2.4. AVALIAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS CCO	15
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.1. ESTUDO MORFOMETRICO DOS OVÁRIOS SUÍNOS	16
3.2. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO DOS CCOs	18
3.3. EFEITO DO PESO E DAS MEDIDAS OVARIANAS NA QUANTIDADE E QUALIDADE DOS CCOS	19
4. CONCLUSÕES.....	21
5. REFERENCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

A cadeia suinícola apresenta um papel de grande importância socioeconômica no âmbito mundial e nacional, pois confere um estímulo para a permanência do produtor no campo evitando assim o êxodo rural, além disso, é responsável por gerar milhões de empregos de modo direto e indireto. A suinocultura apresenta uma grande contribuição na produção de proteína animal, a qual é a mais consumida do mundo (SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, 2016). Devido à grande demanda, a intensificação do setor de produção é inevitável e, para isso, a melhoria no desempenho reprodutivo é imprescindível (ZEN, 2015).

Para que as fêmeas alcancem seu máximo desempenho reprodutivo elas devem passar por várias alterações anatômicas e comportamentais, sendo a puberdade a fase em que a fêmea apresenta o seu primeiro cio, desencadeando o ciclo estral da reprodutora (TUMMARUK et al., 2004). Antes de entrarem na puberdade, os animais são considerados como pré-púberes (PEQUENO; ZÚNIGA; WISCHRAL, 2009).

As fêmeas da espécie suína podem entrar em puberdade entre cinco a nove meses de idade (MARTINAT-BOTTÉ et al., 2011). Muitos produtores buscam fêmeas mais precoces, as quais atinjam maturidade sexual o mais cedo possível para prolongar sua vida reprodutiva. Porém, cerca de 30 a 40% das leitoas não expressam sinais de cio, mesmo depois de oito meses de idade havendo maior descarte de animais jovens (GAGRCIN et al., 2009). O ideal é que atinjam idade (seis a sete meses) e peso (120 a 140 kg) adequados para que iniciem a fase reprodutiva e apresentem boa ovulação através da ação hormonal, com oócitos viáveis para serem fertilizados (STANCIC et al., 2012).

Após instituída a ciclicidade estral, as porcas apresentam vários cios durante todo o ano, ou seja, são denominadas como poliéstricas anuais. A única exceção para a ausência de cios nas fêmeas suínas é quando estão na fase de aleitamento ou gestantes. As fêmeas exibem também a característica de serem múltíparas, pois ocorre a parição de mais de um concepto por gestação (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O ciclo estral dura em média 21 dias (CORTEZ; TONIOLLI, 2012), podendo variar de 18-24 dias, sendo que se decompõe em: a etapa denominada estrogênica ou folicular que corresponde ao pró-estro e estro o qual apresenta uma duração de 4 a 5 dias; e outra etapa que se chama progesterônica ou luteal que corresponde ao metaestro e diestro que possui uma duração de 15 a 17 dias (ALBUQUERQUE; BARRETO FILHO; VIANA, 2004).

Os ovários na espécie suína são constituídos por um corpo maciço e elipsoide, alocando-se próximos aos cornos uterinos (DYCE; SACK; WENSING, 2004). O peso dos ovários varia de 7 a 20 g segundo Guimarães; Machado e Santos (2004), já Hafez e Hafez (2004) descreveram pesos ovarianos de 3 a 7 g. Apresentam ainda um córtex que é a zona parenquimatosa, sendo demarcado pela túnica albugínea abaixo do peritônio, onde há folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e regressão (DYCE; SACK; WENSING, 2004). As fêmeas da espécie suína possuem ainda os ovários móveis e irregulares, com os folículos e corpos lúteos projetados em sua superfície confiando um aspecto lobulado (GETTY, 1981). Esses folículos exibem diâmetro que variam de 2 a 8 mm, podendo ser pequenos ou medianos, sendo o primeiro deles em maior abundância (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O folículo ovariano é a unidade funcional da gônada feminina (ARIYARATNA; GUNAWARDANA, 1997). É uma estrutura extremamente organizada, constituída basicamente pelo oócito contornado por células foliculares e delimitado por uma membrana basal que o aparta do estroma ovariano (LANDIM-ALVARENGA, 2006). Os folículos são classificados de acordo com o tamanho, tipo, quantidade e morfologia das células da granulosa (PAULINI, 2014). Esses folículos podem ser divididos em pré-antrais e antrais. Os pré-antrais compreendem os folículos primordiais, primários e secundários. Já os folículos antrais podem envolver as fases de folículos terciários e pré-ovulatórios (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Na fase antral a grande maioria dos folículos sofre degeneração por atresia, contribuindo para que apenas alguns folículos cheguem até a fase pré-ovulatória. Os folículos são regulados pelas gonadotrofinas até que concluam seu desenvolvimento e seja desencadeada a ovulação. Tais hormônios são provenientes do sistema porta hipotalâmico-hipofisário, sendo que o hipotálamo secreta o GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) que atua na liberação de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) pela hipófise anterior, constituindo os hormônios responsáveis pelo desenvolvimento dos folículos, secreção de estrogênio e a ovulação, respectivamente (EILER, 2006). O fenômeno da ovulação é caracterizado principalmente pela liberação do oócito juntamente com o CCO (complexo *Cumulus oophurus*) (PAULINI, 2014). A morfologia desse complexo tem sido um dos parâmetros mais utilizados e conhecidos para selecionar oócitos que possuem maior capacidade para se desenvolver (OLIVEIRA et al., 2016).

Com o avanço na área da biotecnologia, uma das técnicas que podem auxiliar na intensificação do desempenho reprodutivo, como por exemplo, a produção *in vitro* (PIV) de embriões. A PIV pode ser intitulada como um procedimento de reprodução assistida, em que tal tecnologia visa a melhoria e a eficiência do desempenho reprodutivo dos animais (MERTON et al., 2003). Muitos estudos com PIV em suínos vêm sendo realizados, porém, segundo Yoshioka, Noguchi e Suzuki (2012) ainda existem muitas falhas no processo, sendo necessárias novas pesquisas para a solidificação da mesma. Pode-se citar como exemplos de falhas: a possibilidade de anormalidades do cromossomo devido à elevada frequência de polispermia e também o baixo potencial de eclosão dos embriões (DANG-NGUYEN, 2011; KAWAMOTO, 2015). Ainda não se tem um protocolo definido para a PIV na espécie suína, o que reflete em baixo desenvolvimento embrionário em comparação à produção *in vivo* (ZHANGA et al., 2012)

A PIV poderia auxiliar no estabelecimento de bancos de oócitos e embriões que ajudariam a manter a biodiversidade, conservar raças ameaçadas de extinção; como também testar a capacidade fecundante de reprodutores utilizados em centrais de sêmen, podendo assim selecionar machos com melhor potencial para desenvolvimento de embriões (XU et al., 1998). Além disso, a espécie suína é reconhecida como modelo para pesquisas com enfermidades humanas por causa da sua similaridade fisiológica; desta maneira, a PIV poderia ser aplicada para desenvolvimento de animais geneticamente modificados como possíveis doadores de tecidos e órgãos para xenotransplantes (GIL et al., 2010).

Para que se obtenham bons resultados na PIV é muito importante relacionar o processo de maturação do oócito com o estágio de desenvolvimento que o mesmo se encontra. O ponto determinante para esses bons resultados durante a PIV é a avaliação dos CCOs (APPELTANT, 2015).

As células do *Cumulus* são extremamente especializadas e possuem projeções celulares que atravessam a zona pelúcida e formam pequenas junções com o citoplasma do oócito (*gap junctions*). Essas junções intercomunicantes fornecem uma condição para a transferência direta para o oócito de moléculas de baixo peso molecular, como por exemplo: íons, metabólitos da glicose, nucleotídeos e aminoácidos os quais são essenciais para o seu crescimento (GANDOLFI et al., 2005).

As avaliações morfológicas dos CCOs são realizadas através da observação da quantidade e compactação das células da granulosa e homogeneidade do citoplasma (LONERGAN et al., 2006). Sendo assim, são classificados em quatro categorias (graus 1 a 4): sendo que os CCOs classificados como grau 1 são os que apresentam maior capacidade para o

desenvolvimento embrionário, já os classificados como grau 4, são menos favoráveis para a produção *in vitro* de embriões suínos, e demais espécies (OLIVEIRA et al., 2016).

Frente ao exposto, fica evidente que o desenvolvimento de pesquisas relacionadas às biotécnicas na espécie suína são necessárias e podem atenuar as limitações do emprego da PIV na cadeia suinícola (YOSHIOKA; NOGUCHI; SUZUKI, 2012).

Sabendo-se da importância do conhecimento anatômico e fisiológico para a obtenção de melhores resultados na reprodução das fêmeas suínas, objetivou-se caracterizar as dimensões ovarianas e avaliar a recuperação de complexos *Cumulus oophorus* (CCOs) de ovários de fêmeas suínas a partir de dois métodos: aspiração folicular e secção dos ovários, técnica também conhecida como *Slicing*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OVÁRIOS

Os ovários foram coletados no Abatedouro Luiz Antônio, localizado em Ponta Grossa/PR e foram processados no laboratório do Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite, UEPG, Ponta Grossa/PR. O experimento foi conduzido de julho a setembro de 2016.

Os ovários de fêmeas suínas pré-púberes com idade média de cinco meses e peso vivo médio de 80 kg, foram coletados na linha de abate. Dividiu-se em três dias de rotina de coleta, sendo que na primeira coleta foram recolhidos 87 ovários, dos quais 18 foram processados e realizados a morfometria ovariana para posterior recuperação de CCOs por aspiração e os restantes (n=69) foram feitas apenas a morfometria ovariana. Na segunda rotina, coletou-se 20 ovários para recuperação dos complexos pela metodologia de aspiração, ou seja, totalizaram-se 38 ovários para a aspiração folicular. E por fim a última rotina, foram coletados 20 ovários os quais foram processados segundo a metodologia de secção dos ovários (*Slicing*). Com isso, totalizaram-se 127 ovários que passaram por avaliação morfométrica, desses ovários: 38 foram aspirados e 20 foram seccionados.

Os ovários foram acondicionados em recipientes plásticos, lavados e mantidos em solução fisiológica aquecida a 39°C, temperatura aferida através de um termômetro digital. Logo após foram armazenados dentro de uma caixa de isopor isotérmica até chegar ao laboratório onde foram processados.

No laboratório, os ovários permaneceram aquecidos a 39°C em Banho Maria, equipamento da marca TECNAL (TE-056 MAG). Em ambas as metodologias os ovários foram processados de modo aleatório através de um delineamento inteiramente casualizado.

Cada ovário foi dissecado com auxílio de tesoura e pinça anatômica autoclavadas. A seguir, foram feitas as seguintes avaliações: peso (g), comprimento (cm), largura (cm) e altura (cm) do ovário. O peso do ovário foi determinado em balança digital da marca MARTE (BL320H). As medidas dos ovários foram realizadas com o uso de um paquímetro, com escala de 0,05 mm. O presente estudo empregou duas técnicas de recuperação dos CCO, sendo os procedimentos de aspiração e secção dos ovários (*Slicing*).

2.2. METODOLOGIA DE RECUPERAÇÃO DE CCO POR ASPIRAÇÃO

Para a técnica de aspiração, utilizou-se agulha 40 x 12 mm e seringa de 10 mL, sendo aspirados os folículos ovarianos Antrais para obtenção do líquido folicular. O líquido folicular foi transferido para uma placa de Petri para a classificação e contagem dos CCOs, de acordo com a metodologia proposta por Oliveira et al. (2016), como ilustra a figura 1.

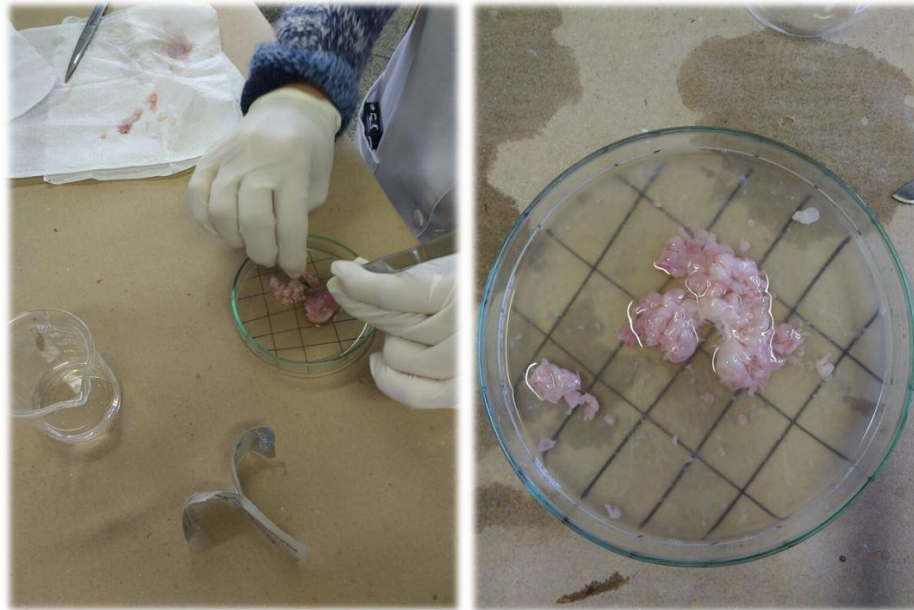
Figura 1 – Metodologia de aspiração dos ovários de fêmeas suínas.



2.3. METODOLOGIA DE RECUPERAÇÃO DE CCO POR SECÇÃO

Já para a técnica de secção dos ovários, também chamada de fatiamento, os mesmos foram seccionados em vários sentidos com o auxílio de uma lâmina de bisturi, realizando vários cortes superficiais e internos nos ovários para o rompimento de todos os folículos, como mostra a Figura 2. Feito isso o ovário foi lavado com solução fisiológica sobre as placas de Petri para evitar que permanecesse algum complexo aderido no ovário, segundo a metodologia proposta por Marques et al. (2015). Logo após o líquido folicular foi dividido em mais placas de Petri para melhor visualização dos CCOs.

Figura 2 – Metodologia de secção dos ovários de fêmeas suínas (*Slicing*).



2.4. AVALIAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS CCO

Os CCOs foram avaliados em estereomicroscópios da marca OPTECH e classificados em graus 1, 2, 3 e 4, de acordo com o aspecto do citoplasma do oócito e o número de camadas de células do *Cumulus*, conforme a classificação sugerida por Stojkovic et al. (2001), da seguinte forma:

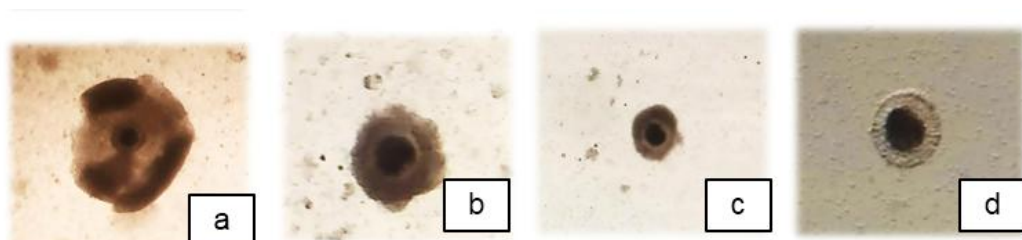
Grau 1: oócito com citoplasma homogêneo e granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do *Cumulus* (Figura 1a);

Grau 2: oócito com pequenas áreas de pigmentação, com pelo menos cinco camadas completas de células ao redor, porém menos compactas (Figura 1b);

Grau 3: citoplasma do oócito heterogêneo/vacuolizado, coberto com três camadas de células e/ou pequenas áreas desnudas (Figura 1c);

Grau 4: oócito heterogeneamente pigmentado e camadas celulares do *Cumulus* ausentes ou expandidas (Figura 1d).

Figura 3- Classificação dos Complexos *Cumulus oophorus*. a) CCO grau 1; b) CCO grau 2; c) CCO grau 3; d) CCO grau 4.



2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O *software* estatístico utilizado para a análise estatística dos resultados foi o Minitab 17.3.1 (2016). Os dados de biometria ovariana (n= 127 ovários) foram analisados por meio de estatística descritiva (média, erro-padrão e porcentagem). Os valores médios de quantidade e qualidade dos CCOs obtidos segundo o método de recuperação (n= 58; 38 ovários aspirados e 20 ovários seccionados) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com um modelo linear generalizado (GLM). Para a comparação das médias, o peso e a biometria ovariana (comprimento, altura e largura) foram considerados covariáveis. As médias que diferiram ($P < 0,05$) entre as variáveis estudadas foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados de peso e medidas ovarianas, assim como número e grau dos CCOs (n= 58 ovários) foram correlacionados entre si pelo teste de Correlação de Pearson, sendo considerada uma correlação muito fraca $r \leq 0,25$, fraca $r > 0,25$ e $\leq 0,50$, moderada $r > 0,50$ e $\leq 0,75$ e forte quando $r \geq 0,75$. Em todas as análises, os efeitos foram declarados significativos ao nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ESTUDO MORFOMETRICO DOS OVÁRIOS SUÍNOS

A tabela 1 apresenta o peso e a morfometria ovariana de 127 ovários de fêmeas suínas pré-púberes. O peso médio dos ovários foi de 4,26 g, tal peso está dentro dos descritos por Cowan e MacPherson (1996) citado por Guimarães; Machado e Santos (2014) e Hafez e Hafez (2004) os quais descreveram pesos ovarianos de 1,3 a 12,2 g e 3 a 7 g, respectivamente. Em trabalhos mais recentes como os de Oberlender et al. (2014) e Natal et al. (2016), estudando ovários de marrãs pré-púberes constataram pesos médios ovarianos de 3 a 4,7 g e 3,82 a 4,32 g respectivamente, dados os quais corroboram com o peso médio encontrados no presente estudo para fêmeas em idade similar.

Tabela 01 – Valores médios e erro-padrão da média (EPM) do peso e das medidas ovarianas de 127 ovários de fêmeas suínas pré-púberes

Variáveis	N	Média ± EPM
Peso (g)	127	4,26 ± 0,01
Comprimento (cm)	127	2,57 ± 0,03
Largura (cm)	127	1,99 ± 0,03
Altura (cm)	127	1,39 ± 0,02

Com relação às demais medidas, obteve-se médias de 2,57 cm para comprimento e 1,99 cm para largura, tais valores aproximam-se aos encontrados por Alves (2010) que foram 2,50±0,32 e 1,55±0,22 cm, respectivamente. Já Oberlender et al. (2014) observaram comprimento médio de 2,72±0,37cm; com relação a largura Bagg et al. (2004) encontraram valores de 1,5 a 2,2 cm, medidas próximas aos encontrados neste experimento. A altura média dos ovários no presente estudo foi de 1,39 cm, Vexenat (2012) obteve valores para altura de 1,15 cm em ovários de fêmeas suínas com idade média de 5 meses.

Muitos fatores podem influenciar na morfometria ovariana, como por exemplo, a espécie estudada, fase do ciclo estral, genética, peso corporal, nutrição, efeito macho e também a idade da fêmea (PRIEDKALNS; LEISER, 2006).

Os animais atualmente apresentam uma genética mais avançada quando comparada há anos atrás, com isso atingem a puberdade mais precocemente devido à heterose proveniente de cruzamentos com raças mais precoces, já outros fatores como restrições alimentares severas podem tardar a puberdade (MONTEIRO, 1999). O efeito macho também estimula a fêmea a entrar na puberdade mais cedo, isso pode ocorrer nas fêmeas alojadas em lotes mistos com a presença de machos imunocastrados, os quais possuem a produção hormonal até 20 dias antes do abate, porém, essa estimulação não é tão eficiente quando comparados a machos maduros, pois a secreção de hormônios em machos jovens é muito inferior (DEL SANTO, 2012).

Vexenat (2012) encontrou pesos ovarianos maiores em fêmeas suínas mais velhas (24 a 84 meses de idade) quando comparadas com fêmeas de cinco meses de idade. Hafez e Hafez (2004) também citaram pesos ovarianos maiores em fêmeas adultas. Nascimento et al. (2003) estudaram a morfometria ovariana de vacas em diferentes estágios reprodutivos e observaram que fêmeas pré-púberes apresentavam pesos ovarianos menores. Todas essas características que alteram a idade a puberdade influenciam a atividade ovariana o que resultará em diferentes pesos e medidas ovarianas.

3.2.COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO DOS CCOs

Na tabela 2, encontram-se as comparações dos valores médios das características avaliadas nos ovários de acordo com a metodologia empregada, ou seja, método de aspiração ou secção (*Slicing*) dos ovários de fêmeas suínas pré-púberes.

No total, foram recuperados 5.871 CCOs, sendo eles 0,87% grau 1 (n= 51); 2,23% grau 2 (n= 131); 14,50% grau 3 (n= 850) e por fim 82,40% classificados como grau 4 (n= 4.839).

Pode-se observar que não houve efeito do método de recuperação para CCOs de graus 1, 2 e 3 ($P>0,05$). Com relação à recuperação de grau 4, o método de *Slicing* obteve média superior ao método de aspiração, ou seja, houve diferença significativa ($P<0,05$) para tal característica. Houve ainda diferença significativa para o total de CCOs, o qual foi maior para o método de *Slicing*, podendo ser um método recomendado para se obter maior número de CCOs. Essa maior recuperação se obteve devido à metodologia de *Slicing* conferir uma maior superfície de exposição do ovário, ou seja, havia a possibilidade de romper mais folículos, não somente os Antrais como na técnica de aspiração. A morfometria ovariana foi considerada como covariáveis na análise estatística.

Tabela 02 – Valores médios de peso, medidas ovarianas e números de complexos *Cumulus oophorus* de graus 1, 2, 3, 4 e total recuperado de ovários de fêmeas suínas pré-púberes, segundo os métodos de recuperação

Variáveis	Método de Recuperação		P
	Aspiração (n= 38)	<i>Slicing</i> (n= 20)	
Peso (g)	4,31	4,80	0,15
Comprimento (cm)	2,49b	2,69a	0,05
Largura (cm)	1,89b	2,34a	0,00
Altura (cm)	1,30b	1,59a	0,00
G1	0,87	0,75	0,72
G2	2,68	1,47	0,07
G3	14,92	16,49	0,74
G4	39,79b	170,93a	0,00
Total CCO	58,51b	189,47a	0,00

CCO – Complexo *Cumulus oophorus*; G1 – complexo *Cumulus oophorus* grau 1; G2 – Complexo *Cumulus oophorus* grau 2; G3 – Complexo *Cumulus oophorus* grau 3; G4 – Complexo *Cumulus oophorus* grau 4.

*Médias que não compartilham a mesma letra na mesma linha indicam diferença entre as médias ($P<0,05$).

Marques et al. (2015) estudando diferentes métodos de recuperação de CCOs em fêmeas suínas, observaram uma maior recuperação de CCOs de grau 1 por intermédio da técnica de *Slicing* quando comparada com a aspiração dos ovários, o que diverge dos encontrados no presente estudo, que não apresentou diferença significativa entre os métodos

para recuperação de complexos de grau 1, mas sim para recuperação de complexos classificados como grau 4. Em outra pesquisa realizada com ovários de fêmeas caprinas, Ambili, Joseph e Vijayakumaran (2015) observaram uma maior recuperação de CCOs por ovário no método de *Slicing* quando comparado com a aspiração e punção dos ovários, do mesmo modo que foi constatado no presente estudo, quando comparamos a técnica.

3.3. EFEITO DO PESO E DAS MEDIDAS OVARIANAS NA QUANTIDADE E QUALIDADE DOS CCOS

Na tabela 3, estão representadas as correlações simples entre as características ovarianas e a recuperação de CCOs dos 58 ovários utilizados para a recuperação dos complexos.

Pode-se observar que houve correlação significativa ($P < 0,05$) e moderada do peso dos ovários com o comprimento, largura, altura, e correlação fraca para o total de CCOs e CCO de classificação 3 e 4; e ainda correlação significativa e fraca com o peso vivo do animal. Esse fato mostra que o peso varia conforme a morfometria dos ovários e o peso vivo do animal, ou seja, se tais medidas aumentarem o peso também será maior. Quanto mais pesado for o ovário, maior será o número total de CCOs recuperado e, dentre eles, os classificados como graus 3 e 4 os quais foram os mais verificados.

Tabela 03 – Estudo da correlação entre as variáveis peso vivo do animal (Kg) e peso (g), comprimento (cm), largura (cm), altura (cm) e recuperação de complexos *Cumulus oophorus* grau 1, 2, 3 e 4 de ovários de fêmeas suínas pré-púberes

Variáveis	Peso Vivo	Peso	Comprimento	Largura	Altura	Total CCO	G1	G2	G3	G4
Peso vivo	1,00	0,34*	0,31*	0,51	0,41*	0,62*	-0,00	-0,26*	0,18	0,64*
Peso		1,00	0,74*	0,68*	0,57*	0,35*	0,05	0,13	0,36*	0,31*
Comprimento			1,00	0,62*	0,54*	0,46*	0,21	0,07	0,38*	0,42*
Largura				1,00	0,72*	0,63*	0,01	-0,12	0,36*	0,61*
Altura					1,00	0,58*	0,15	-0,07	0,26*	0,56*
Total CCO						1,00	0,07	-0,21	0,43*	0,99*
G1							1,00	0,38*	0,08	0,05
G2								1,00	0,22	-0,28
G3									1,00	0,31*
G4										1,00
Peso Vivo										

CCO – Complexo *Cumulus oophorus*; G1 – complexo *Cumulus oophorus* grau 1; G2 – Complexo *Cumulus oophorus* grau 2; G3 – Complexo *Cumulus oophorus* grau 3; G4 – Complexo *Cumulus oophorus* grau 4.
Significativo * $P < 0,05$

Já o comprimento dos ovários apresentou correlação moderada e significativa para largura e altura; e por fim correlação fraca para o total de CCOs e CCO classificados como grau 3 e 4 e também para o peso vivo da fêmea. Houve ainda correlação moderada da largura

com a altura, total de CCOs e complexos classificados com 4 e também correlação fraca da largura com os CCO classificados como grau 3. A altura dos ovários apresentou correlação fraca com CCO classificado como grau 3 e peso vivo e correlação moderada para o total de CCO e CCO de classificação 4 ($P < 0,05$). Desta forma, ficou evidente que a qualidade dos CCOs não manifestou interferência importante das medidas ovarianas por possuírem correlações fracas. As medidas ovarianas interferiram muito mais na quantidade do que na qualidade, pois a última pode ser influenciada pela idade das fêmeas, as quais fêmeas mais velhas apresentam oócitos maduros quando comparados com fêmeas jovens (Ikeda, 2003; Grabowska, 2016).

Com relação às classificações do complexo *Cumulus oophorus*, pode-se observar que houve correlação fraca e significativa ($P < 0,05$) da classificação G1 com CCO de grau 2. Tem-se ainda correlação fraca negativa do G2 com o peso vivo do animal. E por último, correlação fraca do G3 com a presença de CCO classificado como 4 ($P > 0,05$). Tais resultados indicam que o número e a qualidade dos CCOs são influenciados fraca e moderadamente pelo peso e morfometria ovariana.

O total de CCOs apresentou correlação fraca (grau 3), moderada com o peso vivo e forte (grau 4), indicando que a obtenção de CCOs de grau 1 e 2 foi baixa. Oliveira (2016) afirmou que para que haja uma boa PIV de embriões suínos o ideal é que os CCOs sejam classificados como grau 1, pois apresentam maior viabilidade para que o embrião se desenvolva, já os complexos de grau 4 são os que possuem menor viabilidade para produção *in vitro*. Os ovários não apresentam proporção constante com o peso vivo do animal (DYCE, 2004), deste modo quanto maior o peso da fêmea o peso ovariano pode ser maior ou menor. A medida que as fêmeas atingem a maturidade sexual os órgãos genitais estão totalmente desenvolvidos (VERGARA, 2013). Deste modo pode-se dizer que a quantidade total de CCOs em ovários de fêmeas mais pesadas são maiores ou não. Como o total de CCO apresentaram uma correlação moderada com o peso vivo do animal isso pode influenciar na quantidade de CCO recuperados.

A baixa recuperação de CCO de grau 1 pode ser explicada pela idade das fêmeas (apenas cinco meses). De acordo com Ikeda (2003) e Grabowska (2016), fêmeas suínas pré-púberes apresentam oócitos com menor diâmetro, quando comparados com fêmeas adultas, deste modo pode-se haver correlação entre a idade dos animais (maturidade sexual) com o tamanho e qualidade dos oócitos, além de apresentarem citoplasma em desenvolvimento e imaturos. Marques et al. (2015) relataram que a maioria das fêmeas utilizadas em pesquisas

para aspiração dos folículos são pré-púberes e isso torna o método mais trabalhoso resultando em menores taxas de recuperação de oócitos.

4. CONCLUSÕES

A morfometria ovariana está dentro das características normais dos ovários de fêmeas suínas pré-púberes. A técnica de *Slicing* apresentou-se muito mais trabalhosa e com maior dificuldade de observação dos CCO quando comparado à aspiração, isso devido a maior exposição dos folículos por intermédio da secção dos ovários, porém, há uma maior recuperação de CCO sendo uma técnica recomendada para obtenção de maiores quantidades de CCOs. O peso do ovário interfere mais do que as medidas ovarianas no número e na qualidade dos CCOs. A baixa recuperação de CCO grau 1 pode ter ocorrido porque as fêmeas estudadas eram pré-púberes, deste modo são necessários mais estudos para definir o efeito da idade na recuperação de CCOs de fêmeas suínas.

5. REFERENCIAS

ALBUQUERQUE F. T.; BARRETO FILHO J. B.; VIANA, J. H. M. V. Dinâmica ovariana. In: **Manipulação do ciclo estral em bovinos de corte**. Lavras. p. 4-30. 2004.

ALVES, B.G. **Isolamento, quantificação e classificação de folículos pré-antrais de suínos**. 2010. 52 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

AMBILI, J; JOSEPH, M; VIJAYAKUMARAN, V. Effect of oocyte retrieval techniques on yield and quality of caprine oocytes. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 8, p. 50-52, 2015.

APPELTANT, R. **Cumulus expansion and in vitro maturation of porcine oocytes**. 2015. 228f. Dissertação (Mestrado) – Ghent University, Belgica, 2015.

ARIYARATNA, H. B. S.; GUNAWARDANA, V. K. Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. **Small Ruminant Research**, v. 26, p. 123-129, 1997.

BAGG, M. A; VASSENA, R; PAPASSO-BRAMBILLA, E; GRUPEN, C. G; ARMSTRONG, D. T; GANDOLGI, F. Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. **Theriogenology**, n.62, p.1003-1011, 2004.

CORTEZ, A. A; TONIOLLI, R. Aspectos fisiológicos e hormonais da foliculogênese e ovulação em suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n3, p 163-173, 2012.

DANG-NGUYEN, T. Q.; SOMFAI, T.; HARAGUICHI, S.; KIKUCHI, K.; TAJIMA, A.; RKANAI, Y.; NAGAI, T. In vitro production of porcine embryos: current status, future perspectives and alternative applications. **Animal Science Journal**, v. 82, p. 374-382, 2011.

DEL SANTO, T. A. Puberdade e a vida útil reprodutiva das fêmeas suínas. 2012. P. 66. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2012.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. Órgãos reprodutivos femininos: Ovários. In: **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3. ed. Elsevier Editora, p. 191-192, 2004.

EILER, H. Glândulas Endócrinas. REECE, W. O. In: **Dukes', fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Guanabara Koogan SA, 2006. p. 58

GAGRCIN, M; STANCIC, I; BOZIC, A; STANCIC, B; HARVEY, R; ANDRESON, R. Reproductive performance of gilts in a big farm in Vojvodina. **Veterinarski Glasnik** (Belgrade), n 63, p. 77-86, 2009.

GANDOLFI, F; BREVINI, T. A; CILLO, F; ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. **Revue Scientifique Technique**, v. 24, p.413-423, 2005.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5 ed, Rio de Janeiro: Interamericana, 1981

GIL, M. A; CUELLO, C; PARRILLA, I; VAZQUEZ, J. M; ROCA, J; MARTINEZ, E. A. Advances in swine in vitro embryo production technologies. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 40-48, 2010.

GRABOWSKA, R et al. Quality of oocytes in prepubertal and pubertal swine. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 40, p 89-94, 2016.

GUIMARÃES, G. C.; MACHADO, M. R. F.; SANTOS, A. L. Q. Variáveis morfológicas dos órgãos genitais femininos de suínos da raça Landrace (*Sus scrofa domesticus*). **Bio Sciences Journal**, v. 20, n. 2, p. 131-136, 2004.

HAFEZ, E. S, E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ed. São Paulo: Manole, 2004. 530p.

IKEDA, K; TAKAHASHI, Y. Comparison of maturational and developmental parameters of oocytes recovered from prepubertal and adult pigs. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p 215-221, 2003.

KAWAMOTO, T. S. Produção de proteína específica do oviduto (POSP) recombinante por *Escherichia coli* e sua associação com melatonina na maturação in vitro de ovócitos suínos. Dissertação (Mestrado). 56f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

LANDIM-ALVARENGA, F. C. Fecundação e clivagem. In: PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-21, 2006.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression. **Patterns. Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 259-267, 2003.

MARQUES, M. G; BARROS, F. R. O. de; GOISSIS, M. D; GIASSETTI, M. I; ASSUMPCÃO, M. E. O. D. A; VISINTIN, J. A. Effect of oocyte recovery techniques on in vitro production of swine embryos. **Open Journal of animal Sciences**, v.5, p. 467-473, 2015.

MARTINAT-BOTTÉ, F. VENTURI, É; ROYER, É; ELLEBOUDT, F; FURSTOSS, V; RIDREMONT, B; DRIANCOURT, M. A. Selection of impubertal gilts by ultrasonography optimizes their oestrus, ovulatory and fertility responses following puberty induction by PG600. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p.132-137, 2011.

MERTON, J. S; ROOS, A. P; MULLAART, E; RUIGH, L; KALL, L; VOS, P. L; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in comercial application of embryo Technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 54, p.651-654, 2003.

MINITAB. **Minitab Inc**. Versão 17, 2016.

MONTEIRO, M. H. G. V. **Aspectos reprodutivos de fêmeas da raça suína alentejana**. 1999, 107 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1999.

NASCIMENTO, A. A. do; PINHEIRO, N. L; SALES, A; VIANA, J. H. M. Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estágios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, n. 40, p.126-132, 2003.

NATAL, F. L. N; MELO, A, J, F. de; JIMENEZ, D. L. F; DUARTE, K. M. R; ALVAREZ, R. H. Indução da ovulação e características ovarianas de marrãs-púberes tratadas com

gonadotrofina coriônica humana ou kisspeptina. **Boletim de Indústria Animal**, v.73, n.1, p.9-14, 2016.

OBERLENDER, G; PONTELO, T. P; MIRANDA, J. R; MIRANDA, D. R; ZANGERONIMO, M. G; SIVAL, A. C; MENEZES, T. A; ROCHA, L. G. P. Morphological and morphometric evaluation of prepubertal gilt ovaries, uterine tubes and uterus at different oestrus cycle stages. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 34, p.83-90, 2014.

OLIVEIRA, F. A. S. A. M; PAIXÃO, D. M; AMORIM, L. S; PEREIRA, D. B; GUIMARÃES, S. E. F; GUIMARÃES, J. D. Expressão gênica em ovócitos suínos de diferentes classificações morfológicas. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n.2, p.321-326, 2016.

PAULINI, F. **Técnicas de imagem no estudo comparativo de ovários de diferentes espécies domésticas**. 2014. 98 f. Tese (Doutorado), Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

PEQUENO, A. P; ZÚNIGA, C. E. A; WISCHRAL, A. Utilização do ultrassom modo-B no estudos do sistema reprodutivo de fêmeas suínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 33, n.3, p.161-168, 2009

PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. Female reproductive system. In: EURELL, J. A.; FRAPPIER, B. L. **Textbook of Veterinary Histology**. 6. ed. Blackwell Publishing, p. 256-257, 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA - SEAB. Departamento de economia rural. **Suinocultura Paranaense**, p. 9, 2016.

STANCIC, I; BOSNJAK, D; RADOVIC, I; STANCIC, B; HARVEY, R; ANDERSON, R. Ovarian reaction and estrus manifestation in delayed puberty gilts after treatment with equine chorionic gonadotropin. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.10, n. 61, p.1-5, 2012.

STOJKOVIC, M; MACHADO, A. S; 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**, v.64, p.904-909, 2001.

TUMMARUK, P; TANTASUPARUK, M; TECHAKUMPHU; KUNAVONGKRIT, A. Age, body weight and backfat thickness at first observed oestrus in crossbred Landrace × Yorkshire gilts, seasonal variations and their influence on subsequence reproductive performance. **Animal Reproduction Science**, n. 99, p.167-181, 2007.

VAN DEN HURT, R; ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p1717-1751, 2005.

VERGARA, J. C. M. Puberdade, maturidade sexual e parâmetros gestacionais em marrãs da raça Piau e Linhagem comercial. 2013. 54.p . Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

VEXENAT, S. C. O. R. **Avaliação endócrina e morfológica do trato genital de fêmeas suínas**. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

YOSHIOKA, K.; NOGUCHI, M. SUZUKI, C. Production of piglets from in vitro produced embryos following non-surgical transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 131, p. 23-29, 2012.

XU, X; POMMIER, S; ARBOV, T; HUTCHINGS, B; SOTTI, W; FOXCROFT, G. R. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3079-3089, 1998.

ZEN, S; ORTELAN, C. B; IGUMA, M. D. Suinocultura brasileira avança no cenário mundial – Boletim Ativos Suinocultura – **Canal do Produtor**. 1. ed. CNA Brasil. Ano.1, p. 1-4, 2015.

ZHANG, W; YI, K; ZHOU, X. Advances on in vitro production and cryopreservation of porcine embryos. **Animal Reproduction Science**, n.132, p. 115-122, 2012.

