



CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Gabriella Maria Gabrielli Dresler Jorge

INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NA CLASSIFICAÇÃO  
MORFOLÓGICA DOS COMPLEXOS CUMULUS OÓCITOS BOVINOS

INFLUENCE OF SEAZONALITY IN BOVINE CUMULUS OOCYTE  
COMPLEX MORPHOLOGY

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cassia Maria Barroso Orlandi

DESCALVADO - SP

2017



CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Gabriella Maria Gabrielli Dresler Jorge

INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NA CLASSIFICAÇÃO  
MORFOLÓGICA DOS COMPLEXOS CUMULUS OÓCITOS BOVINOS

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Banca Examinadora, como  
parte das exigências da matriz curricular do  
curso de graduação em Medicina  
Veterinária da UNIVERSIDADE BRASIL –  
Campus de Descalvado – SP.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cassia Maria Barroso Orlandi

Descalvado

2017

J71i Jorge, Gabriella Maria Gabrielli Dresler  
Influência da sazonalidade na classificação morfológica dos complexos cumulus oócitos bovinos / Gabriella Maria Gabrielli Dresler Jorge. – Descalvado: [s.n.], 2017. 44f. : il. ; 29,5cm.

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Banca Examinadora, como parte das exigências da matriz curricular do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Brasil – Campus Descalvado – SP.

Orientadora. Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cássia Maria Barroso Orlandi

1. Estresse térmico. 2. Fertilidade. 3. Oócitos. I. Título.

CDD 636.20824



CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA - CAMPUS DE DESCALVADO  
SETOR DE ESTÁGIOS E TCC EM MEDICINA VETERINÁRIA – SESMEV

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Acadêmico (a): GABRIELLA MARIA GABRIELLI DRESLER JORGE

Título do Trabalho: Influência da sazonalidade na classificação morfológica dos complexos cumulus oócitos bovinos.

Data da avaliação pela Banca Examinadora: 13 de novembro de 2017.

Banca:

Orientador (a):   
Prof. Dra. Cássia Maria Barroso Otlandi

Examinador 1:   
Prof. Dra. Lianira Maria Abaker Bertipaglia

Examinador 2:   
Prof. MSc. Athlete Maria Colussi

APROVADO(A) pelo SESMEV em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ com Nota: \_\_\_\_\_

Prof. MSc. Roberta Vanessa Pinho Casale  
Supervisora Geral TCC – SESMEV,  
Campus de Descalvado, SP.

# INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NA CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS COMPLEXOS CUMULUS OÓCITOS BOVINOS

## RESUMO

Complexos cumulus oócitos (CCOs) quando submetidos ao choque térmico *in vitro* e, altas temperaturas *in vivo* apresentam alterações celulares e cromossomais. No verão ocorre uma diminuição nas taxas de prenhez em vacas de alta produção, causada pelo estresse calórico junto a elevadas temperaturas e ineficiência na termorregulação. Ovários de abatedouro são usados em rotinas de PIV de embriões destinados à pesquisa e controle de qualidade em laboratórios. Este trabalho teve como objetivo descrever a morfologia dos CCOs obtidos em folículos ovarianos com diferentes dimensões (<3mm e de 3 a 9mm), durante o período de inverno ao verão. O transporte dos ovários foi feito em um container com solução fisiológica 0,9% e antibiótico a 37°C. Os ovários foram submetidos à aspiração folicular, onde foram classificados como: Fol P (<3mm) e Fol M (3 a 9 mm) de acordo com as dimensões obtidas por paquímetro. O rastreamento dos CCOs foi realizado sob estereomicroscópio e submetidos à contagem e classificação em Grau I: cumulus compacto > 3 camadas; Grau II: cumulus compacto parcial < 3 camadas; Grau III cumulus com apenas uma camada e Grau IV ou desnudo: ausência de células do cumulus. Realizou-se sete réplicas no período de inverno ao verão, correspondendo aos meses de setembro de 2016 a fevereiro de 2017. As temperaturas médias ambientes variaram durante o período de estudo, com máximas entre 26°C e 30°C, e mínimas entre 13°C e 19°C. Maior porcentagem de CCOs foi obtida de Fol P, com 573 estruturas representadas por 62% dos CCOs e 291 estruturas do Fol M, representadas por 31%. Quanto à classificação morfológica, para os CCOs oriundos de Fol P, observou-se diminuição no Grau I, Grau II da transição Inverno/primavera para primavera/verão ( $p < 0,05$ ). No entanto, houve aumento de estruturas Grau IV no período de verão ( $p < 0,05$ ). Quanto à classificação morfológica, para os CCOs oriundos de Fol M não foi observada diferença nos CCOs GI e II durante os períodos. Contudo houve um aumento nos CCOs de GIII no período de inverno/primavera quando comparado à primavera/verão, onde predominou estruturas de GIV. Estruturas GIII e GIV de Fol M foram superior a 60% em ambos os períodos.

**Palavras-chave:** estresse térmico, fertilidade, oócitos

# INFLUENCE OF SEAZONALITY IN BOVINE CUMULUS OOCYTE COMPLEX MORPHOLOGY

## ABSTRACT

The cumulus oocyte complexes (CCOs), when submitted to thermal shock *in vitro* and when exposed to high temperatures *in vivo* present cellular and chromosomal alterations. It is known that in the summer there is a decrease in pregnancy rates in high production cows, caused by caloric stress along with high temperatures and inefficiency in thermoregulation. As ovaries from slaughterhouse are constantly used in routines of *in vitro* production of embryos for research and quality control in laboratories; this work aimed to describe the morphology of CCOs obtained in ovarian follicles with different dimensions during the period from winter to summer. The transport was in a container with 0,9% physiological solution, with antibiotic at 37°C. The ovaries were submitted to aspiration of the follicles where they were classified as: Fol P (<3mm) and Fol M (3 to 9 mm) according to the dimensions obtained by caliper. The CCOs were screened under a stereomicroscope and they were counted and classified in Grade I: compact cumulus > 3 layers; Grade II: compact cumulus partial <3 layers; Degree III cumulus with only one cell layer and Degree IV or Nude: absence of cumulus cells. Seven replicates were performed in the period from winter to summer, corresponding to the months of September 2016 to February 2017. Mean environmental temperatures varied during the study period, with maximums between 26°C and 30°C, and minimum between 13°C and 19°C. A higher percentage of CCOs was from Fol P, with 573 structures represented by 62% of CCOs and 291 Fol M structures, represented by 31%. As for the morphological classification, for COCs from Fol P, a significant decrease was observed in Grade I, Grade II of the winter/spring transition for spring /summer( $p<0.05$ ). However, there was an increase in Grade IV structures in the summer period ( $p<0.05$ ). As for the morphological classification, for the CCOs from Fol M, no significant difference was observed in the GI and II CCOs during the periods. However, there was a significant increase in GIII CCOs in the winter / spring period when compared to the spring / summer period, where GIV structures predominated. Structures of GIII and GIV from fol M were higher than 60% in both periods.

**Keywords:** heat stress, fertility, oocytes

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fluxograma representando os processos da recuperação dos CCOs bovinos.....	20
<b>Figura 2:</b> Processo de lavagem dos ovários na peneira com solução salina a 37°C.	22
<b>Figura 3:</b> Remoção dos tecidos adjacentes e adiposos e outras estruturas envolvidas aos ovários. ....	22
<b>Figura 4:</b> Ovário com a presença de cisto .....	23
<b>Figura 5:</b> Classificação morfológica dos CCOs. Grau I (A), Grau II (B), Grau III (C), Desnudo (D). ....	25
<b>Figura 6:</b> Porcentagem de Complexos Cumulus Oócitos, CCOs oriundos de Folículos P, M e G durante todo período do estudo. ....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no mês de setembro de 2016. ....	26
<b>Tabela 2:</b> Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no mês de novembro de 2016. ....	27
<b>Tabela 3:</b> Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no mês de dezembro de 2016. ....	27
<b>Tabela 4:</b> Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no dia 25 de Janeiro de 2017. ....	28
<b>Tabela 5:</b> Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no dia 31 de Janeiro de 2017. ....	29
<b>Tabela 6:</b> Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no dia 01 de Fevereiro de 2017. ....	30
<b>Tabela 7:</b> Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no dia 07de Fevereiro 2017. ....	31
<b>Tabela 8:</b> Número e classificação morfológica do total de CCOs obtido em folículos ovarianos em todas as réplicas (n=7).....	31
<b>Tabela 9:</b> Número e classificação morfológica do total de CCOs obtidos na transição inverno/ primavera.....	32
<b>Tabela 10:</b> Número e classificação morfológica do total de CCOs obtidos na transição primavera/verão .....	32
<b>Tabela 11:</b> Temperaturas máximas, mínimas e as média nos momentos de coleta de ovários bovinos em abatedouro no município de Sta Rita do Passa Quatro, SP, 2017 .....	33
<b>Tabela 12:</b> Classificação morfológica dos Complexos Cumulus Oócitos (CCOs) obtidos a partir de folículos menores que 3 mm (P) durante o período de inverno ao verão. ....	33
<b>Tabela 13:</b> Classificação morfológica dos Complexos Cumulus Oócitos (CCOs) obtidos a partir de folículos entre 3 e 9 mm (M) durante o período de inverno e verão. ....	34
<b>Tabela 14:</b> Classificação Morfológica dos Complexos Cumulus Oócitos CCOs oriundos de folículos P e M na transição inverno- primavera.....	34
<b>Tabela 15:</b> Classificação Morfológica dos Complexos Cumulus Oócitos oriundos de folículos P e M na transição primavera - verão. ....	35

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

<b>µg</b>	Micrograma
<b>C</b>	Celsius
<b>CCOs</b>	Complexo cumulus oócitos
<b>Fol P</b>	Folículo Pequeno
<b>Fol M</b>	Folículo Médio
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>GI</b>	Grau I
<b>GII</b>	Grau II
<b>GIII</b>	Grau III
<b>GIV</b>	Grau IV ou Desnudo
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>LTDA</b>	Limitada
<b>MM</b>	Milímetro
<b>MIV</b>	Maturação <i>in vivo</i>
<b>ML</b>	Mililitro
<b>OPU</b>	Aspiração folicular
<b>PIV</b>	Produção <i>in vitro</i>
<b>P4</b>	Progesterona
<b>PBS</b>	Solução tampão de fosfato
<b>TE</b>	Transferência de embrião

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. JUSTIFICATIVA .....	12
3. OBJETIVO GERAL .....	12
3.1. Objetivos Específicos .....	13
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
4.1. Morfologia dos complexos cumulus oócitos (CCO's) .....	13
4.2. Dinâmica folicular - Influência do tamanho folicular no processo de maturação oocitária <i>in vivo</i> .....	14
4.3. Dimensão folicular, maturação e morfologia oocitária .....	15
4.4. Efeito do estresse térmico na qualidade do oócito e na produção embrionária .	16
4.5. Efeitos do estresse térmico nos CCOs.....	17
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
5.1. Obtenção e transporte dos CCOs .....	21
5.2. Recuperação dos CCOs.....	21
5.2.1. Lavagem e preparação dos ovários .....	21
5.2.2. Aspiração folicular e armazenamento .....	22
5.2.3 Microfiltragem .....	23
5.3. Rastreamento dos CCOs .....	24
5.4. Contagem e classificação dos CCOs rastreados .....	24
5.5. Análise Estatística .....	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
7. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
ANEXOS .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

Existem vários fatores que podem influenciar a capacidade de ovulação bovina, como por exemplo: estação do ano, precipitação pluviométrica, fotoperíodo, disponibilidade nutricional, tratamento superovulatório e interações individuais de linhagens e raças (ARMSTRONG, 2001; TORRES-JUNIOR, 2007; PONTES et al, 2010).

Com isso é possível estabelecer uma correlação entre o estresse térmico presente no verão e a função reprodutiva em vacas taurinas, principalmente Holandêsas PO de alta produção leiteira. Tais fêmeas sofrem redução na fertilidade com aumento de temperatura e umidade relativa do ar (THATCHER et al,2010).

Neste sentido, tendo como modelo os clássicos trabalhos com fêmeas taurinas destinadas à alta produção de leite, fêmeas zebuínas possivelmente também sofrem os efeitos das variações sazonais, não apenas pelo estresse térmico ambiental somado a produção interna de calor, mas pela privação de disponibilidade de pastagens e chuvas, as quais influenciam diretamente a nutrição e possivelmente afetam o desempenho reprodutivo destas raças destinadas ao corte.

As variações climáticas durante o ano podem influenciar tanto o número quanto a qualidade de complexos cumulus oócitos (CCOs) obtidos em ovários de abatedouro; fonte de material biológico para inúmeros estudos envolvendo a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos.

Diversos estudos, os quais abordam as altas temperaturas associadas ao calor metabólico, assim como o choque térmico induzido diretamente nas células germinativas, mostram que a produção *in vitro* (PIV) de embriões pode ser limitada pelo comprometimento da competência oocitária (ROTH & Hansen. 2005, ROCHA et al., 1998; AL-KATANANI et al, 2002).

A maior incidência de CCOs com classificação morfológica inadequada aos procedimentos *in vitro* nos períodos desfavoráveis do ano podem influenciar negativamente as rotinas de produção *in vitro* assim como sabidamente influenciam a fertilidade e a produção animal *in vivo*.

Danos estruturais na célula germinativa das fêmeas bovinas causados por estresse térmico sugerem modificações cromossômicas durante organização da placa metafásica, assim como no citoesqueleto; levando ao comprometimento da maturação nuclear oocitária (ROTH e HANSEN; 2005).

Desta forma, possíveis alterações na morfologia dos complexos cumulus oócitos CCOs, expostos às altas temperaturas podem inviabilizar o uso destas estruturas, resultando em baixas taxas de maturação oocitária, fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário.

A redução no número de embriões viáveis, baixa resposta aos protocolos de superovulação, diminuição na taxa de fertilização e na qualidade embrionária pré-implantação afetam negativamente a eficiência na produção de embriões associada à resposta superovulatória nos períodos mais quentes do ano (HANSEN et al, 2001). Desta forma, vacas de alta produção leiteira têm a fertilidade acometida pelo estresse térmico, resultando em efeitos deletérios sobre o crescimento folicular, a secreção hormonal, função endometrial, o fluxo sanguíneo uterino, a competência do oócito pré-ovulatório e o desenvolvimento embrionário (BADINGA et al 1985; WOLFENSON et al, 1995).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Esse estudo foi realizado para verificar o efeito da variação sazonal e possivelmente consequente estresse térmico na classificação morfológica dos complexos cumulus oócitos bovinos obtidos em abatedouro.

## **3. OBJETIVO GERAL**

Devido ao vasto uso de ovários de abatedouros em rotinas de produção in vitro (PIV) de embriões destinados à pesquisa e controle de qualidade em laboratórios, o estudo teve como objetivo descrever a morfologia de CCOs obtidos de folículos ovarianos de acordo com dimensões definidas durante o período de

inverno ao verão, dividindo-se o período em duas estações (inverno/primavera e primavera/verão).

### **3.1. Objetivos Específicos**

Realizar a comparação entre a quantidade de estruturas obtidas a partir de folículos P (<3mm) e folículos M (3 a 9mm) nos respectivos períodos, correspondentes às estações: inverno/primavera e primavera/verão.

Comparar a quantidade de estruturas obtidas a partir de folículos P e folículos M, determinando-se também a classificação morfológica, indiretamente relacionada à qualidade oocitária para seleção na PIV de embriões.

Determinar em qual das categorias foliculares (P ou M) e em qual das estações poderiam ser obtidos maior número de estruturas, assim como melhor classificação morfológica destinada à PIV.

Verificar a possível obtenção de CCOs a partir de folículos P (< 3mm) nas estações propostas e determinar as diferenças entre morfologia dos mesmos.

## **4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1. Morfologia dos complexos cumulus oócitos (CCO's)**

Para produção in vitro de embriões, a morfologia dos CCOs apresenta grande importância no processo de rastreamento, no qual ocorre a seleção de estruturas adequadas ao processo de maturação e subsequente fertilização in vitro (FIV).

Para a classificação morfológica, vários autores usam o parâmetro visual da relação que existe entre a aparência das células do cumulus e o citoplasma do oócito (WANG & SUN, 2007).

As avaliações morfológicas dos CCOs devem seguir uma série de parâmetros a serem observados como: quantidade e a compactação das células do cumulus e a homogeneidade do citoplasma, os quais são baseados em critérios de

avaliação descritos a seguir. Grau I (GI): os CCOs apresenta um citoplasma homogêneo, com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus; Grau II (GII): também apresenta com pequenas áreas de pigmentação irregular e cumulus compacto menos do que o GI; Grau III (GIII): os oócitos apresentam o citoplasma heterogêneo/vacuolizado, com pelo menos três camadas de células do cumulus e/ou com pequenas áreas desnudas, e o Grau IV ou desnudo (GIV): o oócito apresenta um citoplasma heterogêneo e pigmentado, e as células cumulus completamente/parcialmente ausente ou expandido (BLONDIN & SIRARD 1995; SIRARD et al 2006).

#### **4.2. Dinâmica folicular - Influência do tamanho folicular no processo de maturação oocitária *in vivo***

O desenvolvimento folicular de bovinos ocorre em padrão de ondas, onde cada onda folicular se caracteriza por um grupo de pequenos folículos que são recrutados, iniciando assim a fase de crescimento por aproximadamente três dias (GINTHER et al, 2003). Dentro destes folículos apenas um se torna o dominante, enquanto os demais passam por uma diminuição do seu tamanho, tornando-se os folículos subordinados (LUCY et al, 1992), isso leva ao fenômeno chamado de divergência folicular.

Após a divergência, com altos níveis de progesterona (P4), ocorre uma redução na frequência pulsátil do hormônio luteinizante (LH), fazendo o folículo dominante se tornar anovulatório, isso leva ao início da atresia e perda da dominância, iniciando assim uma nova onda folicular (GINTHER et al, 1989; WEBB et al, 1999).

As espécies *Bos taurus* e *Bos indicus* apresentam algumas diferenças na dinâmica folicular, sendo que há uma particularidade entre zebuínos e taurinos, que diz respeito ao número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Devido a estudos realizados com a raça Holandesa, observou-se a existência entre duas a três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (SAVIO et al, 1988; SIROIS & FORTUNE, 1988; GINTHER ET AL, 1989; WOLFENSON et al, 2004).

Os zebuínos, principalmente os da raça Brahman, Gir e Nelore, apresentam uma maior incidência de três ondas, como dizem em alguns relatos, sendo que pode

haver até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral (RHODE et al, 1995; VIANA et al, 2000).

Existe também relatos onde indicam que as fêmeas de *Bos indicus*, na fase de recrutamento, apresentam um maior número de folículos por onda de crescimento folicular quando comparadas as fêmeas de *Bos taurus* (CARVALHO et al, 2007). Para transferência de embriões (TE), aspiração folicular (OPU) e produção de embriões *in vitro* (PIV), essa característica tem influência direta, pois indica uma vantagem das fêmeas zebuínas sobre as taurinas. Há relatos indicando que o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular apresenta diferença entre os indivíduos, e tal característica apresenta alta repetibilidade ao longo da vida produtiva da fêmea.

Os eventos definidos pela diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, é chamada de divergência ou desvio folicular, sendo marcada pela continuidade do desenvolvimento do maior folículo e do declínio do crescimento dos demais (GINTHER et al, 1996; BERGFELT & BEG 2001).

#### **4.3. Dimensão folicular, maturação e morfologia oocitária**

A capacidade de fecundação *in vivo* e desenvolvimento dos oócitos, é maior do que *in vitro* (BLONDIN et al, 2002). Existem fatores que influenciam o crescimento dos oócitos e sua viabilidade e competência para o desenvolvimento *in vitro*. Tais fatores incluem: o tamanho folicular, pois não respondem adequadamente as condições *in vitro* folículos com dimensões compatíveis a dominância (LONERGAN et al, 1994). O dia do ciclo estral no qual a aspiração é conduzida é outro fator que influencia as fases da onda folicular no desenvolvimento oocitário (MACHATKOVÁ et al, 1996). O nível de atresia e a influência do folículo dominante, que suprime o crescimento dos demais folículos, exercem também influência sobre o desenvolvimento *in vitro* (HAGEMANN, 1999).

O evento que ocorre desde o estágio de vesícula germinativa até o término da segunda divisão meiótica, com formação do segundo corpúsculo polar é a maturação oocitária (BLANCO et al, 2011).

O oócito passa por uma série de mudanças nucleares e citoplasmática concomitantes ao seu crescimento, durante o período que compreende o início do

pico de LH e a ovulação, isso influencia diretamente a sua maturação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2012).

Os oócitos classificados apresentam competência para sustentar todo o desenvolvimento embrionário (BREVINI & GANDOLFI, 2001). Adquirida durante a foliculogenese, a competência meiótica coincide com a formação do antro (SÁNCHEZ & SMITZ, 2012).

A competência meiótica está relacionada ao tamanho do oócito, o qual também está correlacionado com o tamanho folicular. Para completarem a maturação nuclear até o estágio de metáfase II, os oócitos bovinos precisam ter diâmetro de 110  $\mu\text{m}$  (ARMSTRONG, 2001; BLANCO et al, 2011).

Diferente da maturação *in vivo* (MIV), os oócitos que são maturados *in vitro* geralmente apresentam o metabolismo alterado, com um reduzido potencial de desenvolvimento, sendo os fatores causadores de deficiências dos meios de maturação, habilidade intrínseca do oócito, ou a ambos. A regulação da disponibilidade de nutrientes e de enzimas pode ocorrer em diversos níveis (KRISHER, 2004).

Essa etapa revela o quanto é importante a seleção dos oócitos para a maturação *in vitro*, levando em conta a classificação morfológica como critério para a seleção durante o processo de rastreamento. Tal processo é realizado assim que se obtém os oócitos *in vivo* por meio da punção ovariana com o auxílio de um ultrassom (OPU), ou *in vitro* pelos métodos de fatiamento ou aspiração dos folículos ovarianos obtidos em abatedouro (GONÇALVES et al, 2001).

Considerados os mais competentes para o uso na FIV, os CCOs de grau I apresentam uma maior taxa de desenvolvimento embrionário pós-fertilização. Em contrapartida os que são menos competentes para a produção *in vitro* de embriões, são os CCOs de grau IV. Os CCOs de grau II e III, são aceitos, embora este último pode ser descartado, dependendo do procedimento e rendimento dos oócitos obtidos. No uso da PIV de embriões bovinos, é recomendado o uso de CCOs de grau I e II (SIRARD et al, 2006).

#### **4.4. Efeito do estresse térmico na qualidade do oócito e na produção embrionária**

Para incrementar o número de produtos nascidos de vacas de alto valor genético, tanto para rebanhos de leite como corte, a transferência de embriões (TE), ainda é um método prático e viável. A possibilidade de transporte de embriões congelados entre rebanhos, quando comparado ao trânsito de matrizes e reprodutores vivos, o que reduz o custo e o risco epidemiológico de deslocamento de animais, são as vantagens que a técnica possibilita (NEVES et al, 2010).

Literatura nacional e internacional passou a relatar que devido ao uso dessa biotecnologia, há uma elevada variabilidade das respostas a superovulação. Existem vários fatores que tem influenciado tais respostas, como por exemplo: a estação do ano, precipitação pluviométrica, fotoperíodo, disponibilidade nutricional, tratamento superovulatório e interações individuais, de linhagens e raças (ARMSTRONG, 2001; TORRES-JUNIOR, 2007; PONTES et al, 2010).

Há uma correlação entre o estresse térmico no verão e a função reprodutiva em vacas taurinas, onde foi possível observar que a redução da fertilidade ocorreu em períodos com um aumento de temperatura e umidade do ar (THATCHER et al, 2010).

A redução do número de embriões viáveis, baixa resposta aos protocolos de superovulação, diminuição na taxa de fertilização e na qualidade dos embriões, são os fatores que levam a uma baixa eficiência da produção de embriões associada à superovulação no período quente do ano (HANSEN et al, 2001).

As vacas de alta produção leiteira têm a fertilidade acometida pelo estresse térmico, isso induz a efeitos deletérios sobre o crescimento folicular, a secreção hormonal, a função endometrial, o fluxo sanguíneo uterino, a competência do oócito pré-ovulatório e o desenvolvimento embrionário (BADINGA et al 1985; WOLFENSON et al, 1995). Há evidências de que o estresse térmico materno tem como principal alvo os oócitos (PUTNEY et al, 1989).

#### **4.5. Efeitos do estresse térmico nos CCOs**

Efeitos diretos do choque térmico na maturação do oócito, em estudos *in vitro*, foram relatados pela literatura, onde descreve que a exposição de oócitos bovinos

às temperaturas severas (42°C) ou moderadas (40°C-41°C) leva ao choque térmico durante a maturação *in vitro* (0-12 horas MIV), e a taxa de exposição de oócitos bovinos a 43 °C por um período de 45-60 minutos na maturação (MIV) levam à redução das taxas de blastocistos expandidos (JU et al, 1999; CASTRO et al, 2013; RISPOLI et al, 2013; JU & TSENG, 2004).

Há evidências que desordens na organização do citoesqueleto cortical alterando a distribuição de grânulos e afetando a separação de cromossomos durante a fertilização, são causados pela exposição de oócitos bovinos ao choque térmico durante a maturação *in vitro*. Como consequência isso leva a diminuição da clivagem devido a baixa porcentagem de oócitos, os quais possivelmente atingem a fase final da meiose, marcados por um aumento do processo de apoptose celular (JU ET AL, 2005).

Outras biotecnologias têm contribuído para o entendimento dos efeitos do estresse térmico diretamente nos oócitos, identificando especificamente esses efeitos nas estruturas que compõe o complexo cumulus oócito. Neste caso, experimentos de transferência nuclear revelaram efeitos da exposição de núcleos de células doadoras ao choque térmico, com exposição de ooplasma receptor. Neste estudo, oócitos de *Bos taurus* apresentaram diminuição da capacidade de desenvolvimento, devido a maior susceptibilidade à temperatura elevada (BARROS et al, 2006).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo CEUA – UNIBRASIL 1-025/15 após a submissão do formulário com detalhamento do projeto. Projeto realizado com auxílio do Programa Institucional de Iniciação Científica PIBIC - 2016-2017- CAMPUS DESCALVADO.

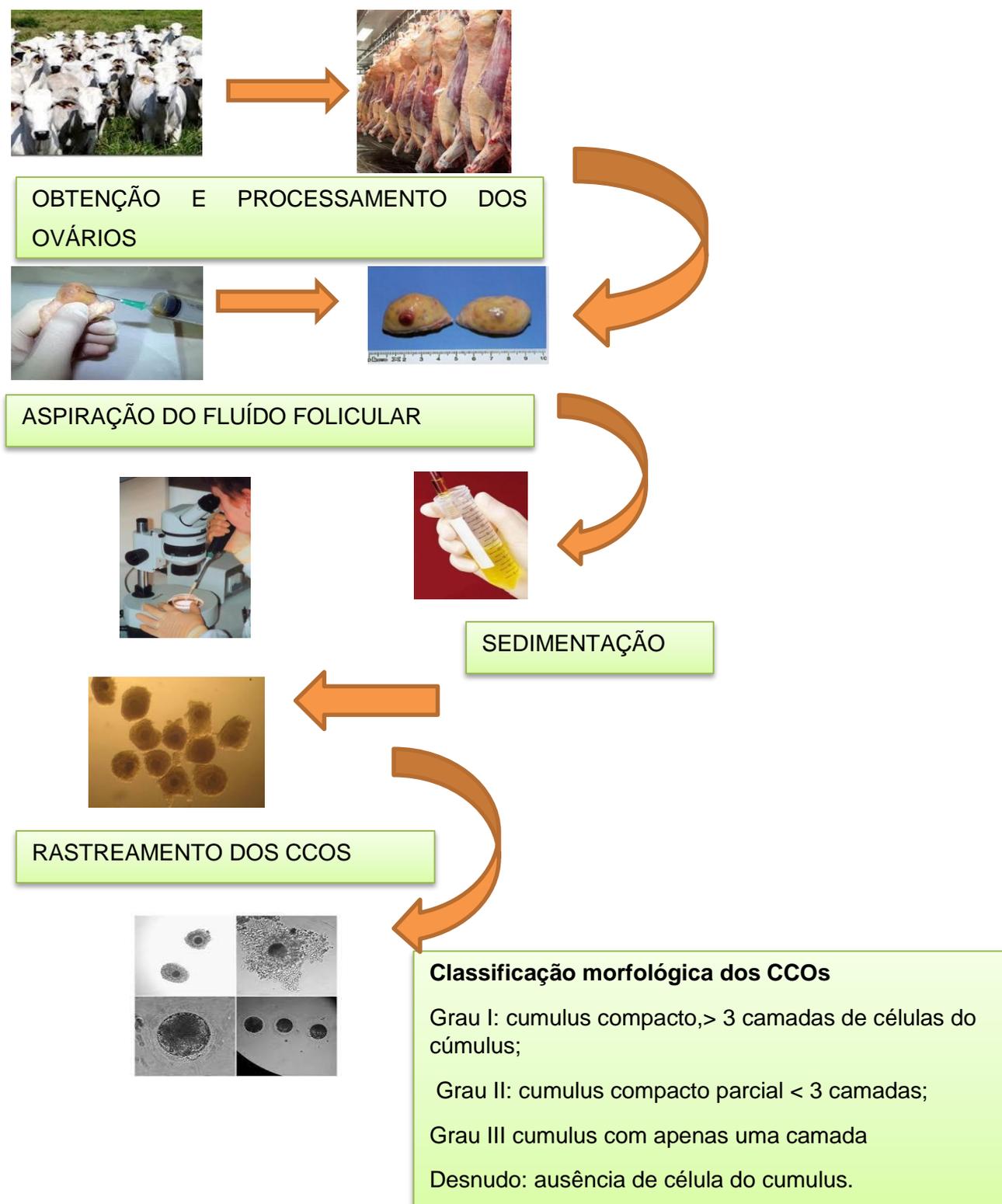
A equipe para a realização deste trabalho foi composta pela Orientadora: Dra Cássia Maria Barroso Orlandi MV, MS, PhD; Colaboradores: Dr. Vando Edésio Soares (análise estatística e delineamento), Prof Fabiola Freitas de Paula Lopes (suporte técnico e científico), Profa Thalita Blankenheim (apoio gráfico e estatístico)

juntamente com a assistência das alunas de graduação, Fernanda Marcelino e Luana Factor.

### **Delineamento experimental**

As unidades experimentais CCOs (complexos cumulus oócitos) foram obtidas a partir de dois grupos de folículos ovarianos, denominados de acordo com respectiva dimensão (P e M), os quais foram classificados em 4 categorias morfológicas. Tais CCOs foram avaliados em períodos definidos de acordo com a sazonalidade em: período de: transição inverno / primavera e primavera verão. Durante estes períodos realizou-se as coletas de ovários (n= 7 réplicas).

Na figura 1 temos um fluxograma onde é possível observar as etapas para a obtenção dos CCOs e em seguida a sua classificação.



**Figura 1:** Fluxograma representando os processos da recuperação dos CCOs bovinos

Fonte: Modificado de Fernanda Marcelino et al , 2016

## **Descrição dos procedimentos**

### **5.1. Obtenção e transporte dos CCOs**

Foram usados ovários de abatedouro para recuperação dos CCOs nos meses de Setembro de 2016 à Fevereiro de 2017, no frigorífico Martinelli LTDA, o qual forneceu o material, sendo este localizado no município de Santa Rita do Passa Quatro em SP.

Após a obtenção dos ovários, os mesmos foram transportados para o laboratório de Reprodução Animal e Biotecnologia da Universidade Brasil, no campus Descalvado SP.

O transporte dos ovários foi em um container térmico a 37°C em solução salina no mesmo dia do abate, com aproximadamente 4 horas de intervalo entre o armazenamento e o início da recuperação dos CCOs.

### **5.2. Recuperação dos CCOs**

#### **5.2.1. Lavagem e preparação dos ovários**

Primeiramente os ovários foram removidos do container em uma peneira e lavados com solução salina à 37°C (Figura 2), após esse processo foi feita a preparação dos ovários, removendo os tecidos adjacentes adiposo e outras estruturas envolvidas aos ovários, com o objetivo de evitar sangramento e contaminação na etapa de aspiração folicular. (Figura 3)

Com todo esse processo realizado, os ovários foram acondicionados em um Becker de um litro mantido em Banho-Maria à 37°C para a manutenção das condições fisiológicas.



**Figura 2:** Processo de lavagem dos ovários na peneira com solução salina a 37°C.

**Fonte:** Arquivo pessoal.



**Figura 3:** Remoção dos tecidos adjacentes e adiposos e outras estruturas envolvidas aos ovários.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

### 5.2.2. Aspiração folicular e armazenamento

Com o auxílio de uma gaze, os ovários são removidos do Becker e colocados sob uma placa de Petri, onde é possível a visualização da superfície do ovário, identificando os folículos, presença de corpos lúteos, corpos albicans, e outras estruturas como cistos ou abscessos (Figura 4). A dimensão dos folículos foi aferida por meio de uma régua graduada em milímetros e confirmada por meio de paquímetro.

De acordo com as dimensões aferidas, foram estabelecidas três categorias foliculares, sendo os Folículos pequenos, até 3 mm (Fol. P); Médios, acima de 3 a 9 mm (Fol. M); e Grandes, acima de 9 mm (Fol. G). No entanto, os folículos acima de 9mm apenas fizeram parte do dados descritivos, com exceção da réplica do mês de Dezembro, período no qual não houve possibilidade de recuperação de CCOs oriundos destes folículos. Esta categoria não foi considerada para as comparações realizadas pelas análises com dados obtidos nos respectivos períodos (inverno/primavera; primavera verão). Tal categoria folicular não é utilizada durante a

aspiração nas rotinas de PIV, pois oócitos oriundos dos mesmos normalmente encontram-se em estágios de maturação avançada não respondendo adequadamente às condições de MIV (maturação *in vitro*). Portanto, optou-se em não inclusão de CCos oriundos desta categoria para as análises.

Após aferido as medidas dos folículos, estes passaram pelo processo de aspiração folicular, utilizando seringas de 10 mL, acopladas à agulha de 0,8x18.

De acordo com a dimensão folicular o conteúdo aspirado foi armazenado em tubos cônicos graduados de 15 mL, classificados em P, M, e G; mantidos em Banho-Maria a 37°C, para a manutenção das condições fisiológicas.

Após o conteúdo da seringa ser depositado em seu respectivo tubo, aguardou-se a formação do pellet no fundo do tubo para posterior processamento do material para a microfiltração.



**Figura 4:** Ovário com a presença de cisto

**Fonte:** arquivo pessoal

### 5.2.3 Microfiltração

Ao perceber a formação do pellet em cada tubo (P, M, G) mantido inicialmente em Banho-Maria, o sedimento do pellet foi removido com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável, sendo o conteúdo aspirado transferido para a superfície do microfiltro (Cell Strainer, 100 µm Nylon, BD Falcon TM, REF 352360), encaixando em um tubo Falcon de 50 mL.

O conteúdo filtrado foi adicionado ao fluído remanescente do tubo inicial, sendo submetido à centrifugação (3000 RPM 10min) para a recuperação do

sobrenadante, o qual foi armazenado em alíquotas de 2 mL e congeladas no freezer -20°C, para outros estudos.

Após essa primeira etapa, o microfiltro foi colocado sobre um segundo tudo de 50mL, sendo lavado com solução Tampão de Fosfato (PBS) sob pressão, à 37°C para remoção do conteúdo aderido ao filtro, a lavagem do filtro ocorreu por meio de uma seringa de 10mL e agulha 0,8x18 e o conteúdo filtrado foi colocado na placa de Petri para o rastreamento dos CCOs.

### **5.3. Rastreamento dos CCOs**

O fluido que estava acondicionado em um tubo Falcon de 50 mL, foi transferido para uma placa de Petri e submetido ao rastreamento de CCOs no estereomicroscópio.

A placa de Petri foi riscada com linhas retas na superfície externa para demarcar colunas de orientação para a visualização e rastreamento dos CCOs, com tais linhas era possível a observação das estruturas movimentando a placa gentilmente de no sentido de baixo para cima e da esquerda para direita, a fim de que toda a extensão das linha fosse seguida, assim como os espaços entre as mesmas. Os CCOs foram contados, classificados (GI, GII, GIII, e Desnudo) e transferidos para uma placa de Petri-menor contendo PBS livre de cálcio e magnésio, sem a presença de debris ou células do cumulus esparsas.

Com o auxílio de pipetas de precisão acoplada à ponteira de 100 µm (Bio Centrix <sup>TM</sup>), ou adaptação de microtubo de hematócrito acoplado a um sistema de equipo.

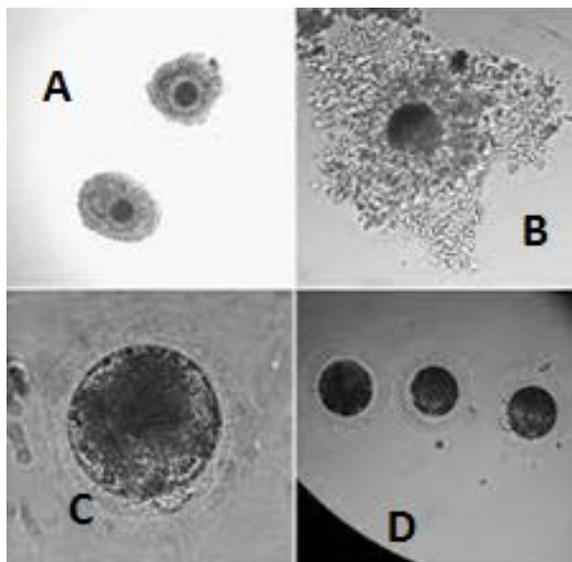
Foi realizado o procedimento descrito acima para cada pellet obtido nos respectivos tubos denominados P, M e G, de acordo com a origem do líquido oriundo de folículos com as respectivas dimensões descritas no item 5.2.2.

### **5.4. Contagem e classificação dos CCOs rastreados**

Após realizada a transferência dos CCOs para a segunda placa menor, realizou-se a contagem e a classificação dos CCOs seguindo os critérios de classificação morfológica já descritos anteriormente (BLONDIN& SIRARD, 1995; SIRARD et al, 2006).

O grau de classificação seguiu a observação das características do ooplasma oocitário e camadas de células do cumulus circundando o mesmo, como indicados na figura 5.

Os oócitos Grau I: apresentavam cumulus compacto com mais de três camadas de células do cumulus; Grau II: apresenta as células do cumulus parcialmente compactadas, com menos de três camadas; Grau III: existe apenas uma camada de células do cumulus, e Desnudo: apresenta ausência de células do cumulus.



**Figura 5:**Classificação morfológica dos CCOs. Grau I (A), Grau II (B), Grau III (C), Desnudo (D).

**Fonte:** Revista Brasileira Reprodução Animal, 2006 (Disponível em: [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br))

### 5.5.Análise Estatística

As contagens feitas das células cúmulos oócitos, oriundas dos folículos P e M foram submetidas ao teste do Qui-quadrado, sendo avaliadas dentro, e entre os períodos de inverno/primavera e primavera/verão, considerando o nível de significância de 5%. As referentes análises foram obtidas utilizando o Software Statistica versão 10 (StatSoft, Inc. (2011)).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número e percentagem de CCOs, obtidos a partir da aspiração folicular dos ovários, nas respectivas classificações (GI, II, III, IV) e fases; de acordo com a origem do folículo (pequenos, médios e grandes) obtidos no período de setembro a fevereiro de 2017 estão apresentados em forma de tabelas individuais para cada réplica realizada (n=7), as quais correspondem aos dias de coleta de ovários bovinos obtidos em abatedouro. A legenda está representada na primeira tabela, sendo válida para as demais tabelas.

**Tabela 1:** Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no mês de setembro de 2016.

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	DIMENSÃO FOLICULAR		
	Fol P N/%	Fol M N/%	Fol G N/%
<b>GRAU I</b>	41 (40,5%)	18 (32,7%)	9 (69,2%)
<b>GRAU II</b>	18 (17,8%)	5 (9,0%)	0 (0%)
<b>GRAU III</b>	7 (6,9%)	7 (12,7%)	0 (0%)
<b>GRAU IV</b>	35 (34,6%)	25 (45,4%)	4 (30,7%)
<b>TOTAL</b>	N=101 (59,7%)	N=55 (32,5%)	N=13 (7,6%)

Fol P: folículo pequeno, até 3mm; Fol M: folículo médio (3 a 9mm); Fol G: folículo grande > 9mm. Grau I (GI): CCOs apresenta um citoplasma homogêneo, com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus; Grau II (GII): apresenta com pequenas áreas de pigmentação irregular e cumulus compacto menos do que o GI; Grau III (GIII): apresentam o citoplasma heterogêneo/vacuolizado, com pelo menos três camadas de células do cumulus e/ou com pequenas áreas desnudas, e o Grau IV ou Desnuado (GIV): apresentam um citoplasma heterogêneo e pigmentado, e as células cúmulus completamente/parcialmente ausente ou expandido.

No dia 27/09/2016 a temperatura na cidade de Santa Rita do Passa Quatro foi máxima de 30°C e mínima de 13°C.

**Tabela 2:** Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no mês de novembro de 2016.

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	DIMENSÃO FOLICULAR		
	FOL P N/%	FOL M N/%	FOL G N/%
GRAU I	37 (27,2%)	6 (21,4%)	0 (0%)
GRAU II	27 (19,8%)	6 (21,4%)	0 (0%)
GRAU III	24 (17,6%)	8 (28,5%)	1 (25%)
GRAU IV	48 (35,2%)	8 (28,5%)	3 (75%)
<b>TOTAL</b>	N=136 (80,9%)	N=28 (16,6%)	N=4 (2,3%)

No dia 30/11/2016 a temperatura na cidade de Santa Rita do Passa Quatro foi máxima de 25°C e mínima de 18°C.

**Tabela 3:** Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no mês de dezembro de 2016.

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	DIMENSÃO FOLICULAR	
	FOL P N/%	FOL M N/%
GRAU I	26 (43,3%)	9 (17,3%)
GRAU II	0 (0%)	6 (11,5%)
GRAU III	6 (10,0%)	8 (15,3%)
GRAU IV	28 (46,6%)	29 (55,7%)
<b>TOTAL</b>	N= 60 (53,5%)	N= 52 (46,4%)

No dia 20/12/2016 a temperatura na cidade de Santa Rita do Passa Quatro foi máxima de 26°C e mínima de 18°C.

**Tabela 4:** Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no dia 25 de Janeiro de 2017.

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	DIMENSÃO FOLICULAR		
	FOL P	FOL M	FOL G
<b>GRAU I</b>	2 (2,7%)	4 (12,9%)	0 (0%)
<b>GRAU II</b>	6 (8,1%)	5 (16,1%)	0 (0%)
<b>GRAU III</b>	12 (16,2%)	6 (19,3%)	0 (0%)
<b>GRAU IV</b>	54 (72,9%)	16 (51,6%)	6 (100%)
<b>TOTAL</b>	74 (66,6%)	31 (27,9%)	6 (5,4%)

No dia 25/01/2017 a temperatura na cidade de Santa Rita do Passa Quatro foi máxima de 26°C e mínima de 19°C.

**Tabela 5:** Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no dia 31 de Janeiro de 2017.

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	DIMENSÃO FOLICULAR		
	FOL P	FOL M	FOL G
<b>GRAU I</b>	27 (50,9%)	13 (54,1%)	5 (23,8%)
<b>GRAU II</b>	8 (15,0%)	4 (16,6%)	0 (0%)
<b>GRAU III</b>	10 (18,8%)	4 (16,6%)	2 (9,5%)
<b>GRAU IV</b>	8 (15,0%)	3 (12,5%)	14 (66,6%)
<b>TOTAL</b>	53 (54,0%)	24 (24,4%)	21 (21,4%)

No dia 31/01/2017 a temperatura na cidade de Santa Rita do Passa Quatro foi máxima de 26°C e mínima de 19°C.

**Tabela 6:** Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no dia 01 de Fevereiro de 2017.

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	DIMENSÃO FOLICULAR		
	FOL P	FOL M	FOL G
<b>GRAU I</b>	39 (44,8%)	9 (34,6%)	2 (100%)
<b>GRAU II</b>	12 (13,7%)	1 (3,8%)	0 (0%)
<b>GRAU III</b>	11 (12,6%)	6 (23,0%)	0 (0%)
<b>GRAU IV</b>	25 (28,7%)	10 (38,4%)	0 (0%)
<b>TOTAL</b>	87 (75,6%)	26 (22,6%)	2 (1,7%)

No dia 01/02/2017 a temperatura na cidade de Santa Rita do Passa Quatro foi máxima de 25°C e mínima de 19°C.

**Tabela 7:** Número e classificação morfológica dos CCOs bovinos obtidos em folículos ovarianos no dia 07 de Fevereiro 2017.

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	DIMENSÃO FOLICULAR		
	FOL P	FOL M	FOL G
GRAU I	23 (37,0%)	25 (33,3%)	0 (0%)
GRAU II	7 (11,2%)	7 (9,33%)	0 (0%)
GRAU III	22 (35,4%)	11 (14,6%)	0 (0%)
GRAU IV	10 (16,1%)	32 (42,6%)	6 (100%)
<b>TOTAL</b>	<b>62</b> <b>(43,3%)</b>	<b>75</b> <b>(52,4%)</b>	<b>6</b> <b>(4,1%)</b>

No dia 07/02/2017 a temperatura na cidade de Santa Rita do Passa Quatro foi máxima de 28°C e mínima de 20°C.

**Tabela 8:** Número e classificação morfológica do total de CCOs obtido em folículos ovarianos em todas as réplicas (n=7).

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	DIMENSÃO FOLICULAR		
	FOL P N%	FOL M N%	FOL G N%
GRAU I	195 (34,0%)	84 (28,8%)	16 (30,7%)
GRAU II	78 (13,6%)	34 (11,6%)	0 (0,0%)
GRAU III	92 (16,0%)	50 (17,1%)	3 (5,7%)
GRAU IV	208 (36,3%)	123 (42,2%)	33 (63,4%)
<b>TOTAL</b>	<b>573</b> <b>(62,5%)</b>	<b>291</b> <b>(31,7%)</b>	<b>52</b> <b>(5,6%)</b>

**Tabela 9:** Número e classificação morfológica do total de CCOs obtidos na transição inverno/ primavera.

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	DIMENSÃO FOLICULAR	
	FOL P N%	FOL M N%
GRAU I	78 (32,9%)	24 (28,9%)
GRAU II	45 (18,9%)	11 (13,2%)
GRAU III	31 (13,0%)	15 (18,0%)
GRAU IV	83 (35,02%)	33 (39,7%)
TOTAL	237 (74,0%)	83 (25,9%)

A temperatura média obtida entre a mudança de estação inverno/primavera foi máxima de 27,5°C e mínima de 15,5°C.

**Tabela 10:** Número e classificação morfológica do total de CCOs obtidos na transição primavera/verão

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	DIMENSÃO FOLICULAR	
	FOL P N%	FOL M N%
GRAU I	117 (34,8%)	60 (28,8%)
GRAU II	33, (9,8%)	23 (11,0%)
GRAU III	61 (18,1%)	35 (16,8%)
GRAU IV	125 (37,2%)	90 (43,2%)
TOTAL	336 (61,7%)	208 (38,2%)

A temperatura média obtida entre a mudança de estação primavera/ verão foi a máxima de 29°C e mínima de 18,4°C.

**Tabela 11:** Temperaturas máximas, mínimas e as média nos momentos de coleta de ovários bovinos em abatedouro no município de Sta Rita do Passa Quatro, SP, 2017

<b>Mês</b>	<b>Temperatura Máxima</b>	<b>Temperatura Mínima</b>
Setembro	30°C	13°C
Novembro	25°C	18° C
Dezembro	26° C	18° C
Janeiro	26° C	19° C
Fevereiro	28° C	20°C
Transição inverno/primavera <i>Junho a Novembro</i>	27° C	15° C
Transição primavera /verão <i>Dezembro à Fevereiro</i>	29° C	18° C

As temperaturas durante o período de estudo sofreram alterações com aumento considerável no mês de janeiro, período que corresponde ao verão. No entanto, as temperaturas diminuem em fevereiro, com mínimas acima de todas as mínimas anteriores. Os períodos definidos como transição de inverno-primavera e primavera-verão apresentaram uma diferença de 3° C; caracterizado pelo aumento da temperatura média de uma estação para outra.

**Tabela 12:** Classificação morfológica dos Complexos Cumulus Oócitos (CCOs) obtidos a partir de folículos menores que 3 mm (P) durante o período de inverno ao verão.

<b>MORFOLOGIA</b>	<b>FOLÍCULO P</b>						<b>PROB.</b>
	<b>Inverno/primavera</b>			<b>Primavera/verão</b>			
	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>%</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>%</b>	
<b>GRAU I</b>	187	237	44,10% <sup>a</sup>	117	219	34,82% <sup>b</sup>	0,0095
<b>GRAU II</b>	70	354	16,51% <sup>a</sup>	33	303	9,82% <sup>b</sup>	0,0075
<b>GRAU III</b>	56	368	13,21% <sup>a</sup>	61	275	18,15% <sup>a</sup>	0,0606
<b>GRAU IV</b>	111	313	26,18% <sup>b</sup>	125	211	37,20% <sup>a</sup>	0,0010

Letras diferentes subscritas na mesma linha diferem (p<0,05)

+ número de folículos em relação ao total

- número total de folículos

Quanto à classificação morfológica, para os CCOs oriundos de Fol P, observou-se uma diminuição significativa no Grau I, Grau II da transição Inverno/

primavera para primavera /verão. No entanto, houve apenas aumento de estruturas normalmente não recomendadas para uso na PIV (Grau IV) no período de verão.

**Tabela 13:** Classificação morfológica dos Complexos Cumulus Oócitos (CCOs) obtidos a partir de folículos entre 3 e 9 mm (M) durante o período de inverno e verão.

MORFOLOGIA	FOLÍCULO M						PROB.
	Inverno/primavera			Primavera/verão			
	+	-	%	+	-	%	
<b>GRAU I</b>	28	89	23,93% <sup>a</sup>	60	148	28,85% <sup>a</sup>	0,3386
<b>GRAU II</b>	14	103	11,97% <sup>a</sup>	23	185	11,06% <sup>a</sup>	0,8046
<b>GRAU III</b>	40	77	34,19% <sup>a</sup>	35	173	16,83% <sup>b</sup>	0,0004
<b>GRAU IV</b>	35	82	29,91% <sup>b</sup>	90	118	43,27% <sup>a</sup>	0,0175

Letras diferentes subscritas na mesma linha diferem ( $p < 0,05$ )

+ número de folículos em relação ao total

- número total de folículos

Quanto à classificação morfológica, para os CCOs oriundos de Fol M não foi observada diferença significativa nos CCOs GI e II durante os períodos. Contudo houve um aumento significativo nos CCOs de GIII no período de inverno/primavera quando comparado ao período de primavera/verão, onde houve predominância de estruturas de GIV. As estruturas de GIII e GIV são inadequadas para o uso em PIV, sendo superior a 60% em ambos os períodos.

**Tabela 14:** Classificação Morfológica dos Complexos Cumulus Oócitos CCOs oriundos de folículos P e M na transição inverno- primavera

Estação inverno- primavera				
	MORFOLOGIA	+	-	%
Fol. P	<b>GRAU I</b>	187	354	34,57% <sup>a</sup>
	<b>GRAU II</b>	70	471	12,94% <sup>c</sup>
	<b>GRAU III</b>	56	485	10,35% <sup>cd</sup>
	<b>GRAU IV</b>	111	430	20,52% <sup>b</sup>
Fol. M	<b>GRAU I</b>	28	513	5,18% <sup>e</sup>
	<b>GRAU II</b>	14	527	2,59% <sup>f</sup>
	<b>GRAU III</b>	40	501	7,39% <sup>de</sup>
	<b>GRAU IV</b>	35	506	6,47% <sup>e</sup>

Letras diferentes subscritas na mesma coluna diferem ( $p < 0,05$ )

+ número de folículos em relação ao total

- número total de folículos

A porcentagem de estruturas GI é superior no Fol P, em relação ao M e as demais classificações dentro do mesma dimensão folicular, havendo predomínio desta categoria morfológica nesta dimensão folicular (P). Os CCOs GII também são superiores no P em relação ao M. No entanto, as classificações GIII não diferem entre P e M, embora estruturas inadequadas para PIV, G IV foram observadas na classificação de em 20% dos CCOS oriundos de Fol P.

O maior rendimento de estruturas recuperadas do Fol P, leva representativamente a uma maior porcentagem de estruturas dentro de cada categoria para esta dimensão folicular.

**Tabela 15:** Classificação Morfológica dos Complexos Cumulus Oócitos oriundos de folículos P e M na transição primavera - verão.

<b>Estação Primavera/verão</b>				
	<b>Morfologia</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>%</b>
<b>Fol. P</b>	<b>GRAU I</b>	117	427	21,51% <sup>a</sup>
	<b>GRAU II</b>	33	511	6,07% <sup>c</sup>
	<b>GRAU III</b>	61	483	11,21% <sup>c</sup>
	<b>GRAU IV</b>	125	419	22,98% <sup>a</sup>
<b>Fol. M</b>	<b>GRAU I</b>	60	484	11,03% <sup>c</sup>
	<b>GRAU II</b>	23	521	4,23% <sup>c</sup>
	<b>GRAU III</b>	35	509	6,43% <sup>c</sup>
	<b>GRAU IV</b>	90	454	16,54% <sup>b</sup>

Letras diferentes subscritas na mesma coluna diferem ( $p < 0,05$ )

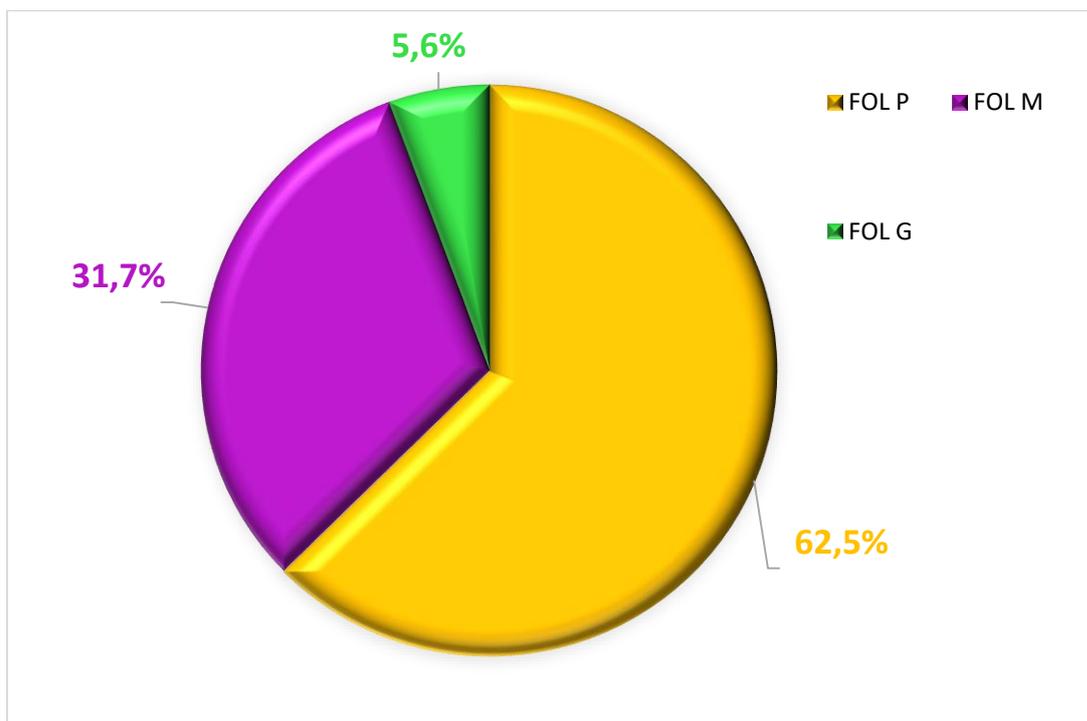
+ número de folículos em relação ao total

- número total de folículos

A porcentagem de CCOs classificados como GI predomina nos folículos P em relação ao M, sendo significativamente superior do que GII e III dentro da mesma dimensão folicular P e em relação ao M de forma geral. No entanto a porcentagem de GI é semelhante à GIV para o Fol P, possivelmente decorrente de alterações na metodologia utilizada (acoplamento de agulha no momento de colocação do fluido da seringa no tubo, conseqüente aumento de pressão), ou devido à alta temperatura observada no período, com a máxima de 40° C.

Nesta estação, há uma semelhança nas porcentagens das classificações GII e GIII do Fol P em relação ao Fol M. Dentro da mesma dimensão M, os CCOs G I, II e III apresentam-se com a mesma porcentagem, embora o G IV predomine com 16% dentro do fol M, sendo inferior a porcentagem de G IV no Fol P ( 23%). Deve se

considerar o rendimento superior de número de estruturas recuperadas no Fol P em relação ao M para interpretação desses dados.



**Figura 6:** Porcentagem de Complexos Cumulus Oócitos, CCOs oriundos de Folículos P, M e G durante todo período do estudo.

Os CCOs obtidos a partir de folículos ovarianos denominados como M, foram os quais menos sofreram variações em termos de morfologia oocitária, especificamente quanto às classificações adequadas a PIV (grau I e II), independente do período nos quais foram obtidos. Esta categoria folicular é possivelmente dotada de maior termotolerância, pois quando as mesmas classificações (I e II) são observadas para o Fol P, nota-se diferença significativa caracterizada por diminuição de CCOs classificados como ideais no período de verão comparado ao inverno.

No entanto CCOs oriundos de ambas as dimensões P e M mostraram predominância de classificação IV no período de verão quando comparado ao inverno.

## 7. CONCLUSÃO

A sazonalidade influencia na classificação morfológica dos CCOs obtidos de folículos P e folículos M, uma vez que há diferença entre as estruturas recuperadas nas respectivas estações quanto à quantidade e grau de classificação.

Na estação primavera/verão há a predominância de CCOs Grau IV, quando comparadas ao inverno/primavera, independente das dimensões foliculares.

Os CCOs obtidos dos folículos P são morfológicamente superiores (Grau I e II) na estação inverno/primavera, enquanto os folículos médios não apresentaram diferenças entre as estações.

A classificação morfológica dos CCOs é influenciada por mudanças de temperatura observadas durante o período de estudo e revelaram aumento nas estruturas classificadas como Grau III e IV no período de verão, quando oriundos de folículos P. Tais CCOs, assim classificados são considerados inadequados para PIV de embriões.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Deve-se considerar a estação na qual se obtêm os ovários no abatedouro e respectivos CCOs para melhor aproveitamento dos mesmos na rotina de PIV, quando destinados ao controle de qualidade nos laboratórios.

Desta forma, seria indicado evitar os folículos menores que 3 mm durante o verão, embora essa categoria folicular possa ser utilizada para recuperação de CCOs na estação de inverno com superioridade em quantidade e similaridade em grau de morfologia ao encontrado em Fol M.

Observa-se que os CCOS obtidos a partir dos Fol P não apresentam possivelmente a mesma termotolerância que os Fol M, a partir dos quais CCOs não sofreram variações significativas dentro da classificação grau I e II em ambos os

períodos avaliados. No entanto, o Fol P apresentou uma diminuição da porcentagem de CCOs dentro dessa categoria ideal no primavera/verão em relação ao inverno / primavera.

## ANEXOS

**Anexo A:** Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Camilo Castelo Branco (Universidade Brasil).

---



**UNIVERSIDADE CAMILO CASTELO BRANCO**  
**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **Influência da Sazonalidade na Temperatura Corpórea e na Fertilidade de Vacas Zebuínas e Taurinas**, protocolo nº 1-025/15, sob responsabilidade da Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório e com a Legislação vigente, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para uso científico de animais e o decreto nº 6.899, de 15 julho de 2009.

O projeto foi aprovado pela foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Camilo Castelo Branco (CEUA / UNICASTELO)**, em 15 de setembro de 2015

Fernandópolis, 16 de fevereiro de 2016

Profa. Dra. Dora Inés Kozusny- Andreani

Coordenadora da CEUA/UNICASTELO

CEUA/UNICASTELO

Cx Postal 121

Fernandópolis-SP

CEP: 15.600-000

Email: [comitê.eticaanimal.fer@unicastelo.br](mailto:comitê.eticaanimal.fer@unicastelo.br)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* v. 85, p. 390-396, 2002.

ARMSTRONG, D. T.; Effect of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, v.55, p.1303-1322, 2001;

BADINGA L, COLLIER RJ, THATCHER WW, WILCOX CJ. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *J Dairy Sci* 1985;68:78–85.

BARROS, C. M.; PEGORER, M. F.; VASCONCELOS, J. L.; EBERHARDT, B. G.; MONTEIRO, F. M. 2006. Importance of sperm genotype (incus versus taurus) for fertility and embryonic development at elevated temperature. *Theriogenology* 65: 210-218.

BEG M, BERGFELT D, KOT K, WILTBANK M GINTHER O. Follicular-fluid and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod* 2001,64:432-441.g

BLANCO, M. R., DEMYDA, S., MORENO MILLÁN, M., GENERO, E.; Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, v.6, n.7, p.155-165, 2011.

BLONDIN P, SIRARD MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1995; 41: 54-62.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGO, H. et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, v. 66, p.38-43, 2002

BONI R, ROELOFSEN MWM, PIETERSE MC, KOGUT J, KRUIP T. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-289, 1997.

BREVINI-GANDOLFI, T., GANDOLFI, F.; The maternal legacy to the embryo: Cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, v.55, p.1255–1276, 2001.

CARVALHO JBP, CARVALHO NAT, REIS EL, NICHI M, SOUZA AH, BARUSELLI PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 2007. (Submetido para publicação).

CASTRO SV, LOBO CH, FIGUEIREDO JR, RODRIGUES APR. Proteínas de choque térmico Hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Vet Bras*, v.7, p.261-271, 2013.

GINTHER OJ, BEG MA, DONADEU FX, BERGFELT DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER OJ, WILTBANK MC, FRICKE PM, GIBBONS JR, KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, v.55, p.1187-1194, 1996.

GINTHER OJ, KNOFF L, KASTELIC JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *J Reprod Fertil*, v.87, p.223-230, 1989.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção in vitro de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Varela Editora e Livaria Ltda. p. 195-226, 2001.

HAGEMANN, L.J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology*, v.51, p.449-459, 1999.

HANSEN, P.J., M. DROST, M., RIVERA R.M., PAULA-LOPES, F.F. AI-KATANANIT , Y.M., KRININGER III, C.E., CHASE JR., C.C..Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, v. 55, p. 91-103, 2001.

JU JC, JIANG S, TSENG JK, PARKS JE, YANG X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology* 2005;64:1677–89.

JU JC, PARKS JE, YANG X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Mol Reprod Dev* 1999;53:336–40.

JU JC, TSENG JK. Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine oocytes under hyperthermia. *Mol Reprod Dev* 2004;68:125–33.

KRISHER RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*, v.82, p.45-51, 2004.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, v.37, p.48-53, 1994.

LUCY MC, SAVIO JD, BADINGA L, DE LA SOTA RL, THATCHER WW. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J AnimSci*, v.70, p.3615-3626, 1992.

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; PETELÍKOVÁ, J. et al. Developmental competence of bovine embryo derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, v.45, p.801-810, 1996.

NEVES, J.P. ; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década de século XXI. *R.Bras. Zootec.*, v. 39, p. 414-421, (suplemento especial). 2010.

PONTES, J.H.F., SILVA, K.C.F., BASSO, A.C., RIGO, A.G., FERREIRA, C.R., SANTOS, G.M.G., SANCHES, B.V., PORCIONATO, J.P.F., VIEIRA, P.H.S., FAIFER, F.S., STERZA, F.A.M., SCHENK, J.L. e SENEDA, M.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* v.74, p.1349-1355. 2010.

PUTNEY DJ, DROST M, THATCHER WW. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology* 1989;31:765–78.

RHODES FM, DE'ATH G, ENTWISTLE KW. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim Reprod Sci*, v.38, p.265-277, 1995.

RISPOLI LA, PAYTON RR, GONDRO C, SAXTON AM, NAGLE KA, JENKINS BW, SCHRICK FN, EDWARDS JL. Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. *Reproduction*, v.146, p.193-207, 2013.

Rocha, A.; Randel, R.D.; Broussard, J.R.; Lim, J.M.; Blair, R.M.; Roussel, J.D.; Godke, R.A.; Hansel, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenolog* v. 49, p. 657-665, 1998.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* v. 129, p. 235-244, 2005.

SÁNCHEZ, F., SMITZ, J.; Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, p.1896-1912, 2012.

SAVIO JD, KEENAN L, BOLAND MP, ROCHE JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*, v.83, p.663-671, 1988.

SIRARD MA, RICHARD F, BLONDIN P, ROBERT C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006; 65: 126-36.

SIROIS J, FORTUNE JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod*, v.39, p.308-317, 1988.

THATCHER, W.W., FLAMENBAUM, I., BLOCK, J., and BILBY, T.R. Interrelationships of heat stress and reproduction in lactating dairy cows. The High Plains Dairy Conference. Amarillo, Tx. USA. p. 45- 60. March 2010.

TORRES-JUNIOR, J.R.S. Produção *in vitro* de embriões em *Bos indicus* sob estresse calórico. Tese (doutorado). FMVZ. USP. 134 p. 2007.

VAN DEN HURK, R., ZHAO, J.; Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005; SÁNCHEZ, F., SMITZ, J.; Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, p.1896-1912, 2012.

VIANA JHM, FERREIRA AM, SÁ WF, CAMARGO LSA. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesq Agrop Bras*, v.35, p.2501-2509, 2000.

WANG Q, SUN QY. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev*. 2007; 19: 1-12.

WEBB R, GOSDEN RG, TELFER EE, MOOR RM. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim Sci*, v.68, p.257-284, 1999.

WOLFENSON D, INBARA G, ROTH Z, KAIMB M, BLOCHA A, BRAW-TAL R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, v.62, p.1042-1055, 2004.

WOLFENSON D, THATCHER WW, BADINGA L, SAVIO JD, MEIDAN R, LEW BJ, ET AL. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol Reprod* 1995;52:1106–13.