

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DO ESTÁDIO REPRODUTIVO E
SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO COM
PROGESTERONA E/OU SORO DE CADELA EM ESTRO, NAS
TAXAS DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE FÊMEAS
CANINAS**

Ana Paula Coelho Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

Jaboticabal – SP
Agosto de 2007

Ribeiro, Ana Paula Coelho
R484i Influência do estágio reprodutivo e suplementação do meio de cultivo com progesterona e/ou soro de cadela em estro, nas taxas de maturação *in vitro* de oócitos de fêmeas caninas / Ana Paula Coelho Ribeiro. – – Jaboticabal, 2007
vii, 129 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Banca examinadora: Francisca Elda Ferreira Dias, Ivo Walter dos Santos, Paulo Henrique Franceschini, Francisco Guilherme Leite
Bibliografia

1. Cadela. 2. Oócitos. 3. Maturação. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA PAULA COELHO RIBEIRO – Natural de São Bernardo do Campo – SP, nascida em 05 de outubro de 1976, ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, em março de 1996, concluindo-o em dezembro de 2000. Em fevereiro de 2001, iniciou Aprimoramento na área de Reprodução e Obstetrícia Veterinária, no Hospital Veterinário desta mesma Universidade, concluindo-o em fevereiro de 2003. Em março de 2003 iniciou curso de mestrado em Cirurgia Veterinária na mesma unidade universitária, concluindo-o em julho de 2004. Neste mesmo mês, ingressou no curso de Doutorado, pelo Programa de Pós Graduação em Cirurgia Veterinária, desta Universidade, concluindo-o em agosto de 2007.

Dedico,

Ao meu grãozinho de ouro, **Mariana**, que desde tão
pequenina já compreende a minha dedicação à profissão. Filha
minha, você é que me concedeu o título mais honroso do mundo: **Mãe**.

Esse sim, quero exibir sem humildade por toda minha vida.

Depois que você chegou, tudo adquiriu novo sentido e
valor. Seu sorriso a cada manhã é o que me inspira a querer ser
sempre melhor. Minha princesa , você é meu orgulho!

Te amo!!!

Dedico,

Ao meu marido, **Glauco**, companheiro, incentivador e pai maravilhoso. Deus me deu você pra construirmos uma santa família e descobrirmos nela o que é a verdadeira felicidade. Essa descoberta diária tem sido maravilhosa e por todo seu amor e dedicação à nossa família, digo que te amo cada dia mais e mais!!!

Cada conquista nos une, cada conquista nos fortalece, cada passo adiante me faz olhar o passado e agradecida te dizer:

"O amor estava aqui mas eu nunca saberia, o que um dia se revelou quando te vi"

Te amo tudo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pelo dom da vida, pela saúde física e espiritual e pela vida de todos os que me ajudaram na realização desse trabalho e à Nossa Senhora, por sua companhia inspiradora.

Ao professor Dr. WILTER Ricardo Russiano Vicente, pela orientação, oportunidade, confiança, apoio, incentivo e valorosa amizade. Desejo que seu caminho seja sempre repleto de pessoas especiais que o façam se sentir valorizado, como assim o fez comigo. Muito obrigado por isso e por seu carinho.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Mabel Freitas Cordeiro, Dra. Euzylene Léga, Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, Prof. Dr. Francisco Guilherme Leite, agradeço a prestativa contribuição para a conclusão deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias, Prof. Dr. Ivo Walter dos Santos, Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini, Prof. Dr. Francisco Guilherme Leite, agradeço todo esmero na leitura e correção final deste trabalho, bem como pela amizade e profissionalismo inspiradores. Agradeço também à Profa. Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcanti por todo incentivo e amizade.

A minha querida amiga ELIANDRA. Tudo isso serviu pra que eu alcançasse um bem muito precioso, sua amizade. Não há palavras pra descrever o que passamos, derrepente nossas dificuldades geravam risos sem fim e a cada dia, a cada dificuldade, a cada oócito, fui descobrindo a pessoa maravilhosa que estava ao meu lado durante esse doutorado. Muito obrigada, companheira, por sua presença, sua calma e sua amizade. Mariana saberá muito bem quem ajudou a mamãe a concluir essa etapa e que Deus te conserve sempre prestativa como és. Te adoro.

Às pós graduandas e amigas, CARLA, MARICY, ARACÉLLE, GABRIELA e KAREN, direta ou indiretamente vocês fazem parte desse trabalho e agradeço imensamente por isso.

Aos colegas do departamento de Reprodução Animal, que me fizeram entender um pouco sobre biotecnologia, mundo até então desconhecido. Agradeço especialmente aqueles que com seu carinho e paciência muitas vezes transformaram aquele ambiente de tensão em um lugar mais agradável. MABEL, NAIARA, MAX, ELIANA, JULIANA, ANA PAULA, ALINE (DIRCE), KELLEN, JUNIOR, vocês foram essenciais!!!

Aos residentes do setor de Obstetrícia e aos estagiários, pela ajuda incondicional. A contribuição de vocês foi muito importante.

A todos os amigos da Comnet, especialmente TATHY, MICHEL E MARIA LUÍZA. Família querida, sem vocês a vida teria sido bem sem graça no Pará. Vocês são simplesmente maravilhosos e tornam nossos dias repletos de alegria. Queremos sempre estar por perto, pra que nossos pequenos cresçam juntos educados nos valores cristãos que tanto acreditamos. Amo vocês.

Aos meus queridos, ANDRÉ (MUROTE) e PEDRO (JAPA), não há como descrever a contribuição dos “conoscos” para esse meu doutorado. Vocês são pessoas inesquecíveis, verdadeiros amigos pra toda vida.

Aos meus amigos eternos, ROBERTA, ROGÉRIO, GISELA, MAURÃO, EVELINE, ANGELA (ANZOL), pelas diversas manifestações de apoio que me foram essenciais.

Aos meus familiares, mãe, pai e irmãos, agradeço pelas orações e apoio em todos os momentos. À você MÃE, agradeço seu amor pela Mariana e por estar de novo ao meu lado, me ajudando a ser mãe e ao mesmo tempo, profissional. Deus te mantenha assim. Te amo.

Aos proprietários dos animais que fizeram parte deste experimento, pela confiança em mim depositada e por acreditarem nos bons propósitos de nossas pesquisas.

Aos animais, sem os quais, nada seria realidade em minha vida profissional.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, Jaboticabal, pelo ensejo da realização da pós-graduação.

À Fapesp, pela bolsa concedida, o que foi imprescindível para a conclusão desse curso de doutorado.

Ao Setor de Obstetrícia Veterinária, pelo uso das instalações e equipamentos.

Ao Departamento de Reprodução Animal, pelo uso do laboratório e equipamentos.

Ao Laboratório de Patologia Clínica Endomed - Jaboticabal, pelo indiscutível profissionalismo e cordialidade de seus funcionários e médicos responsáveis.

SUMÁRIO

	página
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Considerações sobre a fisiologia reprodutiva da fêmea canina.....	1
2. Aspectos da MIV de oócitos caninos.....	3
2.1. Obtenção e seleção de oócitos caninos.....	3
2.2. Animais doadores.....	6
2.3. Considerações sobre meios e outras condições de cultivo.....	10
2.4. Avaliação da maturação oocitária.....	17
3. Considerações sobre a indução farmacológica do estro em cadelas.....	18
3.1. O estro fisiológico.....	18
3.2. O estro induzido.....	20
Referências.....	23
 OBJETIVOS GERAIS.....	 36
 CAPÍTULO 2. INFLUÊNCIA DO ESTÁDIO REPRODUTIVO E SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO COM PROGESTERONA E/OU SORO DE CADELA EM ESTRO NAS TAXAS DE MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS DE FÊMEAS CANINAS.....	 37
Resumo.....	37
Summary.....	38
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	42
Resultados.....	47
Discussão.....	53
Referências.....	61

CAPÍTULO 3. TAXA DE MATURAÇÃO NUCLEAR INTRAOVARIANA DE OÓCITOS DE FÊMEAS CANINAS EM ANESTO, ESTRO E ESTRO INDUZIDO.....

	67
Resumo.....	67
Summary.....	68
Introdução.....	69
Material e Métodos.....	71
Resultados e Discussão.....	75
Referências.....	79

CAPÍTULO 4. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO OOCITÁRIO DE ACORDO COM O STÁDIO REPRODUTIVO DE FÊMEAS CANINAS.....

	83
Resumo.....	83
Summary.....	84
Introdução.....	85
Material e Métodos.....	87
Resultados e Discussão.....	90
Referências.....	94

CAPÍTULO 5. AVALIAÇÃO DA CITOLOGIA VAGINAL, DOSAGEM SÉRICA DE PROGESTERONA E MACROSCOPIA OVARIANA E UTERINA DE FÊMEAS CANINAS SUBMETIDAS À INDUÇÃO DO ESTRO COM GONADOTROFINAS.....

	97
Resumo.....	97
Summary.....	98
Introdução.....	99
Material e Métodos.....	104
Resultados e Discussão.....	106

CONCLUSÕES GERAIS.....	119
Lista de Abreviaturas.....	iv
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Apêndices.....	vii

LISTA DE ABREVIATURAS

AI-TI.....	Anáfase / Telófase
AMPc.....	Adenosina monofosfato cíclico
ANA I	Anáfase I
BSA.....	Albumina sérica bovina
CIV.....	Cultivo <i>in vitro</i>
COCs.....	Complexos oócito <i>cumulus</i>
DNA.....	Ácido dextrorribonucleico
eCG.....	Gonadotrofina coriônica eqüina
EGF.....	Epidermal growth factor
E ₂	Estrógeno
FIV.....	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH.....	Hormônio folículo estimulante
GSH	Glutationa
hCG.....	Gonadotrofina coriônica humana
IA.....	Inseminação Artificial
IGF-I.....	Fator de crescimento derivado de insulina tipo I
IGF-II.....	Fator de crescimento derivado de insulina tipo II
IM.....	Intra muscular
ITS.....	solução de insulina transferrina selênio
LH.....	Hormônio luteinizante
M1,M2,M3,M4.....	meios 1,2,3,4
MI.....	Metáfase I
MII.....	Metáfase II
MIV.....	Maturação <i>in vitro</i>
OSH.....	Ovariossalpingohisterectomia
PBS.....	Phosphate buffer solution
PI.....	Prófase I
P ₄	Progesterona

QVG.....	Quebra de vesícula germinativa
ROS	Radicais livres
SCE.....	Soro de cadela em estro
SF.....	Solução Fisiológica
SFB.....	Soro fetal bovino
SOF.....	Fluido sintético de oviduto
SVE.....	Soro de vaca em estro
TCM 199.....	Meio de cultivo de tecidos 199
TE.....	Transferência de embriões
VG.....	Vesícula germinativa

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 A	Fotomicrografia de oócito canino em estágio de vesícula germinativa (VG) após MIV.....
	120
Figura 1 B	Fotomicrografia de oócito canino em estágio de quebra de vesícula germinativa (QVG), após MIV.....
	120
Figura 1 C	Fotomicrografia de oócito canino em estágio metáfase I (MI), após MIV.....
	120
Figura 1 D	Fotomicrografia de oócito canino em estágio metáfase II (MII), após MIV.....
	120
Figura 1 E	Fotomicrografia de oócito canino degenerado ou em estágio não passível de identificação, após MIV.....
	120
Figura 1 F	Fotomicrografia de oócitos em VG imediatamente após a colheita.....
	120
Figura 2 A	Ovários em solução de transporte (SF 0,9%) imediatamente após a OSH.....
	121
Figura 2 B	Processo de obtenção dos oócitos através de fatiamento ovariano em placa de Petri.....
	121
Figura 2 C	Processo de seleção dos oócitos em placa aquecida após fatiamento.....
	121
Figura 2 D	Complexos cumulus-oócito em diferentes graus.....
	121
Figura 2 E	Mensuração nuclear dos oócitos através de retículo milimetrado de medição.....
	121
Figura 2 F	Oócitos desnudos após passagem por solução de hialuronidase.....
	121
Figura 3A/B	Ovários estimulados com gonadotrofinas exógenas (com folículos protrusos, corpo hemorrágico e folículos rompidos).....
	122
Figura 3 C	Processo de seleção de oócitos provenientes de ovários estimulados com gonadotrofinas exógenas.....
	122
Figura 3 D	Oócitos observados em microscópio estereoscópio, e envoltos por fluido folicular viscoso.....
	122

LISTA DE APÊNDICES

	Página
A. Número absoluto e relativo de oócitos, recuperados de fêmeas em anestro, em diferentes graus de maturação nuclear.....	123
B. Número absoluto e relativo de oócitos recuperados de fêmeas em estro, em diferentes graus de maturação nuclear.....	124
C. Número absoluto e relativo de oócitos, recuperados de fêmeas em estro induzido, em diferentes graus de maturação nuclear.....	124
D. Número absoluto de oócitos grau I e números absolutos e relativos dos oócitos com diâmetro inferior e superior ou igual a 110 µm, obtidos de ovários de fêmeas caninas em fase de anestro.....	125
E. Número absoluto de oócitos grau I e números absolutos e relativos dos oócitos com diâmetro inferior e superior ou igual a 110 µm, obtidos de ovários de fêmeas caninas em fase de estro.....	126
F. Número absoluto de oócitos grau I e números absolutos e relativos dos oócitos com diâmetro inferior e superior ou igual a 110 µm, obtidos de ovários de fêmeas caninas em estro induzido.....	127
G. Protocolo de composição de solução de lavagem padrão TCM199, utilizado para MIV em cães.....	127
H. Protocolo de composição de meio de maturação padrão TCM199, utilizado para MIV em cães.....	128
I. Método de Romanowsky utilizado para coloração de esfregaços vaginais.....	128
J. Lista de reagentes e hormônios utilizados.....	129

CAPITULO 1 . CONSIDERAÇÕES GERAIS

A aplicação de biotécnicas à reprodução animal tem sido fundamental para assegurar ganho genético desejável nas espécies domésticas inseridas na escala de produção de alimentos, sendo que a inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) são os exemplos mais significativos da importância que os estudos *in vitro* possuem, para maior controle dos processos fisiológicos que ocorrem *in vivo*.

Durante muito tempo, as pesquisas na área de biotecnologia da reprodução se restringiram à estudos com animais de produção e somente a partir da década de 90, com o interesse da comunidade científica pela preservação da biodiversidade é que a espécie canina mereceu atenção. Esse aspecto deveu-se ao fato de a fêmea canina constituir-se modelo experimental para canídeos ameaçados de extinção, dentre eles o cachorro-do-mato vinagre (*Spheothos venaticus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), que são espécies da fauna brasileira.

O processo de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos de fêmeas caninas tem sido objeto de exaustivos estudos, pois o domínio do mesmo constitui-se o fator primordial para o desenvolvimento e implementação adequados da fecundação *in vitro* (FIV) e do cultivo *in vitro* (CIV), fato que permitiria portanto o alcance do objetivo final que é a obtenção de embriões das espécies de canídeos em extinção (PIRES, 2006).

Dentro desse aspecto porém há um entrave que pode explicar os baixos índices atuais de MIV *in vitro* dos oócitos de fêmeas caninas, a peculiaridade da fisiologia reprodutiva canina.

1. Considerações sobre a fisiologia reprodutiva da fêmea canina

O ciclo estral das cadelas compreende um período de inatividade sexual, conhecido como anestro, que é seguido por outro de atividade reprodutiva, cuja manifestação principal é definida como estro. Esta forma de apresentação cíclica e os espaçamentos interestro de 5 a 12 meses fazem com que a fêmea canina seja referenciada na literatura como uma espécie monoéstrica estacional (CONCANNON et

al., 1989). Ainda, o ciclo reprodutivo apresenta fases distintas estabelecidas por alterações hormonais que induzem transformações de ordem morfológica e clínica, sendo as fases, o proestro, estro, metaestro/diestro e anestro (JÖCHLE & ANDERSEN, 1977).

O processo de interrupção do anestro e as alterações endócrinas relacionadas são eventos ainda não totalmente esclarecidos (KOOISTRA, 1999), porém há sugestões de que o desenvolvimento dos folículos nessa espécie se inicia aproximadamente 30 dias antes da ocorrência da ovulação, com ondas foliculares anteriores ao proestro (ENGLAND & HEWITT, 1999).

Ao final do proestro, a queda dos níveis de estradiol ocorre concomitantemente à elevação da concentração plasmática de progesterona refletindo a maturação folicular, que ocorre vários dias antes da ovulação (FELDMANN & NELSON, 1997). Segundo LEAVITT et al. (1971), o aumento da progesterona tem origem nos folículos pré-ovulatórios e nas células intersticiais ovarianas. A dominância da progesterona neste ambiente folicular pré-ovulatório, diferencia grandemente os canídeos de outros mamíferos domésticos (FARSTAD, 2000).

Os oócitos são células haplóides que iniciam processo de mitose quando migram do saco vitelínico embrionário para o local de desenvolvimento gonadal, onde são denominados oogônias (WASSARMAN & ALBERTINI, 1994). Quando a mitose é cessada, inicia-se a meiose que ocorre em momentos distintos de acordo com a espécie animal, sendo que em canídeos inicia-se algumas semanas após o nascimento (ANDERSEN, 1970). A meiose ocorre em duas etapas, meiose I e meiose II e cada etapa é compreendida por quatro fases: prófase (com cinco estágios : leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e vesícula germinativa), metáfase, anáfase e telófase (BAKER, 1982). Ainda, segundo DULCIBELLA (1998), na maioria dos mamíferos, o processo de desenvolvimento oocitário sofre dois momentos de estagnação, em PI e em MII. A primeira estagnação é interrompida com o processo de crescimento folicular, quando, caracterizando o processo de maturação oocitária, há transição do estágio VG ao estágio de MII e a segunda estagnação é quebrada com a fecundação (DEW, 2001).

Porém, como citado por LUVONI et al. (2005), oócitos caninos são ovulados imaturos, em estágio de VG, enquanto que outras espécies ovulam oócitos em metáfase II. Assim, outra peculiaridade dos canídeos é o fato de o oviduto sustentar, por longo período, oócitos imaturos e ser o sítio da evolução à MII, bem como da fecundação e desenvolvimento à blastocisto (HOLST & PHEMISTER, 1971). Segundo OTOI et al. (2000) os oócitos caninos necessitam de dois a cinco dias para completarem a maturação meiótica no oviduto.

O oócito canino é também distinto pela presença de grande quantidade de material lipídico em seu interior, que lhe confere um aspecto escuro e homogêneo. Essa síntese lipídica é incrementada em oócitos em crescimento e caracteriza um dos aspectos da maturação oocitária (TESORIERO, 1982).

Destarte, aspectos relacionados à fisiologia endócrina da fase pré-ovulatória, às características bioquímicas intrínsecas do oócito e aos eventos de ovulação e maturação intra-tubárica, tornam a MIV canina um processo desafiador e atual objeto de inúmeros estudos.

2. Aspectos da Maturação *in Vitro* (MIV) de oócitos caninos

2.1. Obtenção e seleção dos oócitos para a MIV

Segundo OTOI et al. (2000), a localização cortical dos folículos no tecido ovariano da cadela dificulta a punção isolada dos mesmos, que somente tornam-se aparentes pouco antes da ovulação. Porém alguns autores, dentre eles, YAMADA et al. (1992) obtiveram oócitos puncionando folículos pré antrais de cadelas submetidas à protocolos de superovulação. Por outro lado, NICKSON et al. (1993) citaram que a técnica de fatiamento ovariano, realizada com lâminas de bisturi em cortes seriados com 1mm de espessura, permite a liberação de um número maior de oócitos comparativamente à técnica de punção.

Os oócitos caninos podem também ser obtidos por digestão ovariana. Por esse método, os ovários são colocados em uma solução enzimática, geralmente composta por collagenase e Dnase, por uma hora à 37°C . O produto obtido da digestão é filtrado

e colocado em uma solução para lavagem (DURRANT et al., 1998; BOLAMBA et al., 2002).

No folículo antral observa-se dois tipos de células da granulosa com funções distintas. As células granulosas do *cumulus oophorus* são organizadas como um epitélio pseudo-estratificado e envolvem o oócito, já as células granulosas murais constituem as camadas internas do folículo (BUCCIONE et al., 1990). As células do cumulus são portanto, uma subpopulação de células da granulosa cuja função é fornecer nutrientes aos oócitos durante seu crescimento, participar na formação da zona pelúcida e sintetizar a matriz extracelular composta por proteínas e pelo polissacarídeo ácido hialurônico, de importância no transporte e na atração dos espermatozoides no oviduto (BREDFORD & KIM, 1993; TOSHIMORI, 2000)

Alterações morfológicas que ocorrem no oócito canino durante os diferentes estágios do ciclo estral podem afetar a habilidade do oócito em se comunicar com as células do *cumulus* e alterar a capacidade de competência meiótica. LUVONI et al. (1995) citaram que existem junções do tipo “gap” entre as células do *cumulus* e o oócito e essas estão envolvidas na regulação da diferenciação meiótica e maturação dos mesmos.

A característica do número de camadas de células do *cumulus* constitui-se portanto um dos critérios para a adequada seleção dos oócitos e deve ser associado à avaliação do aspecto citoplasmático, o qual deve ser escuro e homogêneo, caracterizando a grande quantidade de lipídeo em seu interior. Dessa forma, é possível classificar os complexos oócito- *cumulus* (COCs) em três graus: Grau I – pigmentação escura com uma ou mais camadas de células do *cumulus*; Grau II – pigmentação clara com camadas incompletas de células do *cumulus*; Grau III – pigmentação pálida, sem formato definido e sem células do *cumulus* aderidas, sendo considerados degenerados. Apenas COCs grau I devem ser selecionados para a MIV (HEWITT & ENGLAND, 1997).

Outro fator que pode ser considerado no momento da seleção dos oócitos é o diâmetro oocitário. Segundo WASSARMAN & ALBERTINI (1994), o oócito e as células foliculares que o rodeiam crescem coordenadamente, progredindo por uma série de

estágios morfológicos definidos. Em ratos sexualmente maduros, os oócitos completam seu crescimento antes da formação do antro folicular, conseqüentemente a maior parte do crescimento folicular ocorre após o fim do crescimento do oócito. O crescimento folicular termina com a ovulação de um oócito maduro ou atresia de oócito e seu folículo. Nesse processo, os oócitos crescem de um diâmetro de cerca de 12µm para diâmetro final de 80µm. Por tanto, durante essa fase de crescimento, enquanto ele ainda está em estágio de vesícula germinativa, o oócito de ratos aumenta consideravelmente seu volume, tornando-se a maior célula do corpo.

O oócito em estágio dictiato ou VG adquire habilidade para sofrer a meiose reducional (competência meiótica) durante o processo de crescimento oocitário. Isto se aplica para oócitos *in vivo*, bem como para aqueles submetidos às condições *in vitro*. Essa aquisição de competência meiótica aparentemente ocorre em dois passos: oócitos em crescimento primeiro adquirem capacidade de passar pela QVG com progressão para MI, seguido pela aquisição de capacidade de progredir da MI para a MII. Esses autores citam ainda que, oócitos de ratos somente maturam *in vitro*, se tiverem diâmetro superior a 60µm .

De fato, se o crescimento folicular inicia após o crescimento oocitário, é de se esperar que em períodos onde há maior atividade ovariana, com a formação aparente de diversos folículos ovarianos, haja , neste ovários, maior número de oócitos crescidos. Neste contexto, YAMADA et al. (1992), no intuito de obter maior número de oócitos com maior diâmetro, submeteram fêmeas caninas ao protocolo de indução de estro, obtendo taxa de maturação à MII de 32% e no ano seguinte, os mesmos autores encontraram que, uma alta proporção de oócitos de folículos pré-ovulatórios de cadelas estimuladas com gonadotrofinas atingiram MII quando comparados com oócitos de folículos obtidos de fêmeas não estimuladas.

THEISS (1997), foi quem primeiro demonstrou evidências de que a habilidade do oócito canino em recomençar a meiose *in vitro* é maior quando seu diâmetro é superior a 110µm.

OTOI et al. (2000) descreveram que quando os oócitos foram divididos em três grupos baseados nos diferentes diâmetros (>100µm; 100µm; < 100µm), apenas oócitos

com mais de 100µm de diâmetro avançaram do estágio de MI para MII em altas taxas (20%), comparativamente à oócitos pequenos (4-10%). Em estudo subsequente, OTOI et al. (2001) demonstraram que as melhores taxas de maturação de oócitos ocorrem quando os mesmos são colhidos durante proestro e estro, o que pode ser explicado como consequência do maior diâmetro oocitário encontrado nessas fases do ciclo estral canino, já que este está diretamente relacionado à competência meiótica. Esses autores, em estudo sobre a distribuição do tamanho dos oócitos de acordo com a fase do ciclo estral, encontraram na fase folicular, anestro e diestro, respectivamente 50,8%, 5,5% e 13,3% de oócitos com mais de 120µm de diâmetro.

HEWITT & ENGLAND (1998a) também citaram que quanto maior o tamanho do oócito, maior sua habilidade em transpor a fase de QVG para atingir as fases de MI, ANA I e MII e que aqueles com diâmetro superior a 120µm apresentaram maior competência meiótica para os estádios finais de maturação. Em acréscimo, HAY et al. (1997) recomendaram para o uso na MIV, somente oócitos com diâmetro superior a 100µm, desde que sejam obviamente de grau I.

Assim, um oócito de boa qualidade deve conter os seguintes padrões morfológicos: citoplasma escuro e homogêneo, diâmetro superior a 100µm e estar totalmente rodeado por uma ou mais camadas de células do *cumulus*. Oócitos com citoplasma pálido, pigmentado, com camadas incompletas ou ausência de células do *cumulus*, com diâmetro inferior a 100µm, devem ser descartados (LUVONI et al., 2005).

2.2. Animais doadores : idade, aspectos clínicos e estágio reprodutivo

A idade da cadela doadora de oócitos influencia diretamente o número de oócitos recuperados (RODRIGUES & RODRIGUES, 2003), sendo que a taxa média de recuperação diminui cerca de 4,7 COCs por ano (STROM HOLST et al., 2001). Segundo HEWITT & ENGLAND (1998), a habilidade de maturar *in vitro* também fica comprometida em fêmeas com idade superior a 7 anos, quando comparada à animais mais jovens.

De acordo com NICKSON et al. (1993), os ovários de fêmeas caninas pré-púberes possuem número reduzido de oócitos, sendo os mesmos, pequenos e com camada incompleta de células do *cumulus oophorus*. Relataram ainda que, comparando-se a taxa de maturação de animais jovens (até 6 anos) e idosos (mais de 7 anos), constataram que oócitos de animais mais jovens apresentam maior taxa de maturação.

DURRANT et al. (1998) também afirmaram que oócitos de cadelas idosas tem capacidade de maturar *in vitro*, mas esta habilidade é comprometida quando comparada às fêmeas jovens. Fêmeas caninas com idade inferior a 6 meses apresentam menor porcentagem de folículos pré-antrais e antrais e ainda, alta taxa de oócitos degenerados, indicando fase de atresia acelerada durante os primeiros meses de vida do animal, enquanto cadelas doadoras de meia idade apresentam maior número de folículos em relação às fêmeas jovens.

HAY et al. (1997) ao confrontarem a quantidade de oócitos fornecidos por indivíduos em diferentes idades, verificaram que cadelas com 9 meses fornecem maior número de oócitos em relação às fêmeas com mais de 12 meses. Esse fato também foi mencionado por McDOUGALL et al. (1997), que afirmaram haver um aumento no número total de pequenos folículos em cadelas com idade próxima à puberdade (6 a 10 meses), principalmente pela população de folículos em preparação para a ovulação no primeiro ciclo; já para as fêmeas com histórico de um ou mais ciclos, observa-se grande número de folículos desenvolvidos em processo de maturação.

Com relação ao estado clínico das doadoras, a hipótese de a higidez das fêmeas, influenciar nas taxas de maturação oocitária, vem sendo descartada, especialmente após recente estudo, onde RODRIGUES & RODRIGUES (2003) demonstraram a possibilidade de oócitos de cadelas com piometra atingirem a maturação completa *in vitro*.

Quando considerado o estágio reprodutivo sobre a influência nas taxas de MIV, encontram-se resultados muito controversos, de forma que essa questão continua a ser alvo de pesquisas. Os autores tem buscado relacionar o efeito dos eventos endócrinos pré ovulatórios *in vivo* sobre os oócitos e MIV dos mesmos (HEWITT & ENGLAND,

1997; LUVONI, 2001; OTOI et al., 2001; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003; WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003; SONGASSEN et al., 2004; YAMADA et al., 1993).

O ciclo estral da fêmea canina é caracterizado por uma fase folicular (proestro e estro inicial), tempo no qual os folículos ovarianos estão se desenvolvendo e aumentando de tamanho com a aproximação da ovulação (HOSZEL, 1975). Depois da ovulação há a formação do corpo lúteo, que permanece por determinado período, que é seguido por outro de duração variável, chamado anestro. Um aumento na secreção do LH sinaliza o final do anestro e o retorno à atividade ovariana (CONCANNON, 1993; VAN HAFTEN, 1994).

Como mencionado anteriormente, na espécie canina, os oócitos são espontaneamente ovulados em prófase da primeira divisão meiótica (FARSTAD, 2000), 24-50 horas após o pico de LH, (CONCANNON et al., 1989; HASE, 2000). Ainda, 48-72 horas são necessárias para que se complete a maturação à MII, evento que ocorre no oviduto (CONCANNON et al., 1989).

Considerando o aspecto do diâmetro oocitário, DURRANT et al. (1998) citaram que dentro de um folículo em crescimento, o oócito canino se desenvolve e aumenta de tamanho. Pequenos oócitos (com cerca de 25µm de diâmetro) com uma única camada de células do *cumulus* são encontrados em folículos primordiais, oócitos pálidos (com cerca de 78µm de diâmetro) caracterizados por camadas incompletas de células do *cumulus* estão contidos em folículos pré-antrais e em folículos pré-antrais avançados (com cerca de 212µm de diâmetro) são encontrados oócitos (com cerca de 115µm de diâmetro) que apresentam um citoplasma lipídico denso, múltiplas camadas de células do *cumulus*, caracterizando um oócito pré-ovulatório. Assim, durante essa fase de crescimento, o oócito aumenta seu diâmetro de 20 µm para aproximadamente 120µm, o que o torna, segundo esses autores, progressivamente competente e capaz de evoluir à MII.

O processo de crescimento intrafolicular do oócito é constituído por um conjunto de modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (SCRIBAN, 1999). Ainda segundo esse mesmo autor, pode-se distinguir três tipos de maturação, a nuclear, que corresponde ao início da meiose e expulsão do primeiro corpúsculo polar pelo núcleo

do oócito; a citoplasmática, caracterizada pela capacidade do citoplasma descondensar o núcleo do espermatozóide e transformá-lo em pró-núcleo masculino e a maturação de membrana, que permite à zona pelúcida do oócito reconhecer os espermatozoides de sua espécie. Com base nessas afirmações a que se considerar a influência positiva do tempo que o oócito passa dentro do folículo em crescimento, sobre as taxas de MIV.

Segundo GRAZUL-BILSKA (1997), a aquisição de competência meiótica e competência citoplasmática é controlada por comunicações intercelulares, entre as células do *cumulus* e o oócito, pelas quais ocorre a passagem de nutrientes, íons e pequenas moléculas, como o Ca^{2+} e AMPc. De acordo com LUVONI et al. (2001), estas comunicações, denominadas junções “gap”, não estão abertas durante o período de anestro, em comparação à 89% de junções abertas encontradas em oócitos provenientes de ovários em fase de proestro.

A despeito dessas informações, CINONE et al. (1992) e HEWITT & ENGLAND (1997), demonstraram que os eventos hormonais pré-ovulatórios não afetam a subsequente MIV de oócitos de alta qualidade, lembrando que oócitos de alta qualidade são os denominados de Grau I, que possuem o citoplasma escuro e homogêneo e ainda são rodeados por uma ou mais camadas de células do *cumulus* (HEWITT et al., 1998). Ainda, FUJII et al. (2000) encontraram proporções semelhantes de COCs em cadelas de diferentes fases do ciclo estral, considerando o número total de recuperados e o grau de qualidade (Grau I). Os mesmos autores citaram que a presença de tecido luteal, não está associado à recuperação de poucos COCs grau I, mas por outro lado, NICKSON et al. (1993) cita que a presença de tecido luteal pode estar associada à recuperação de poucos oócitos Grau I.

RODRIGUES & RODRIGUES (2003), pesquisando a influência do estágio do ciclo reprodutivo na taxa de maturação oocitária, concluíram que a MIV não é influenciada pelo estágio do ciclo estral, sendo a qualidade do oócito, o indicador mais confiável do potencial de competência meiótica. Da mesma forma, HEWITT & ENGLAND (1997) não encontraram diferenças nas frequências de maturação oocitária entre os oócitos colhidos de cadelas no período de anestro e diestro, mas afirmaram que a obtenção de oócitos no final do proestro e início de estro, é mais adequada pois

as concentrações de progesterona e estrogênio durante esses períodos tem influência positiva na maturação. Ainda, LEIBFRIED & FIRST (1979) relataram que para oócitos bovinos, não há relação entre o estágio do ciclo estral e a frequência de maturação.

No entanto, NICKSON et al. (1993) e YAMADA et al. (1993), citaram que o número de oócitos colhidos e a taxa de maturação dos mesmos, *in vitro*, é influenciada pela fase do ciclo estral. Neste contexto, YAMADA et al. (1993) submeteram fêmeas caninas à protocolo de indução de estro, obtendo taxa de maturação à MII de 32%. Os autores concluíram que cadelas estimuladas com gonadotrofinas apresentam alta proporção de oócitos de folículos pré-ovulatórios (e maior taxa de MIV) em comparação à oócitos de folículos obtidos de fêmeas não estimuladas. MARTINS (2005) concluiu em seu estudo que a maturação oocitária é beneficiada pela interação entre fase do ciclo estral-estro-meio de maturação *in vitro* e que os oócitos submetidos à maturação intrafolicular prévia apresentam taxa de MIV mais alta.

WILLINGHAM-ROCKY et al. (2003) indicaram aumento significativo na proporção de oócitos que maturaram à MII quando os mesmos foram colhidos de ovários de fêmeas em estro ou diestro, comparativamente às fêmeas que estavam em anestro e proestro. Eles atribuíram esse resultado à um processo de atresia dos folículos em estro ou diestro, visto que foi demonstrado por SIRARD (2001) que, em vacas, folículos em atresia perdem a habilidade de inibir a competência meiótica, fato que determina aumento nas taxas de maturação *in vitro*.

Em conclusão, como citado por LUVONI et al. (2005), apesar de alguns estudos demonstrarem que oócitos advindos de fêmeas em anestro não apresentarem capacidade para evoluir à MII, nenhuma conclusão adicional pode ser tirada em relação à influência do ciclo estral sobre a competência meiótica.

2.3. Considerações sobre meios e outras condições de cultivo

Os ovários ao serem removidos precisam ser mantidos em condições adequadas nos chamados meios de preservação e transporte. Estes tem constituição variável de acordo com o autor, sendo que os mais adotados são: solução salina a 35°C (OTOI et al., 2000), solução salina com gentamicina a 37°C (NICKSON et al. 1993; YAMADA et

al.,1992), solução salina a 38°C (HAY et al., 1997), PBS com penicilina e estreptomicina a 39°C (HEWITT & ENGLAND, 1997; HEWITT et al., 1998; HEWITT & ENGLAND, 1998a) e solução salina suplementada com penicilina, estreptomicina e anfotericina (BOLAMBA et al., 1998; DURRANT et al., 1998).

Da mesma forma, para a lavagem e fatiamento dos ovários diversos meios são sugeridos pela literatura, dentre eles: solução salina com gentamicina a 37°C (YAMADA et al.,1992), lavagem com PBS a 37°C e fatiamento em TCM199 com gentamicina (NICKSON et al., 1993), fatiamento em PBS com gentamicina a 37°C (OTOI et al., 2000), fatiamento em PBS com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) (HOLST et al., 2000) e lavagem e fatiamento em TCM199 com 20% de SFB (HEWITT et al., 1998).

Nos recentes estudos muita atenção tem sido dada para a definição de um meio ideal para a MIV de oócitos caninos. O desenvolvimento de um meio definido e ideal no qual os oócitos caninos possam avançar à MII antes de serem fertilizados pelo espermatozóide, em um processo de FIV, logicamente aumentará as chances de obtenção de um embrião multicelular (ABD el RAZEK et al., 2001).

De forma geral, as pesquisas conduzidas com a espécie canina utilizam meios de cultivo semelhantes aos empregados para as outras espécies.

Segundo GUÉRIN (1998), a composição de um meio de maturação deve obedecer os seguintes requisitos: conter produtos que se assemelhem aos de células tubáricas, por exemplo, o TCM 199 e ser suplementado com BSA ou SFB; conter elementos capacitadores, como a heparina, taurina, hipotaurina; conter hormônios e fatores de crescimento como as gonadotrofinas e o EGF; conter substâncias antibacterianas e/ou anti-fúngicas, como a penicilina, gentamicina, estreptomicina ou anfotericina B.

Assim, os meios mais utilizados são SOF (HEWITT & ENGLAND,1997; HEWITT & ENGLAND,1998; HEWITT & ENGLAND,1999; BOLAMBA et al., 2002; VANUCCHI, 2003; MARTINS, 2005), e principalmente o TCM199 (NICKSON et al., 1993; HEWITT & ENGLAND, 1999; FUJII et al., 2000; OTOI et al., 2001; SONGSASSEN et al., 2004;

RODRIGUES e RODRIGUES, 2003), acrescidos de proteínas, hormônios, antioxidantes e fatores de crescimento.

Em relação ao meio SOF, este foi desenvolvido por TERVIT et al.(1972) que buscavam mimetizar as características fisiológicas do fluido do oviduto de ovelhas e bovinos. Este meio tem sido utilizado com sucesso na MIV de oócitos bovinos, porém os resultados são limitados em relação à maturação nuclear *in vitro* de oócitos de fêmeas caninas (HEWITT & ENGLAND, 1999). Em consonância, VANUCCHI (2003), concluiu em seu estudo que não há influência significativa do co-cultivo de células da tuba uterina na maturação oocitária de oócitos caninos, em comparação aos meios de cultivo, sem a presença das mesmas células, mas suplementados com hormônios esteróides.

Por outro lado, o TCM199 é classificado por CINONE et al.(1992), como o meio que fornece as melhores condições para o oócito canino completar sua maturação a MII.

Em relação à suplementação hormonal dos meios de cultivo, deve-se considerar que, em cadelas, as concentrações de FSH estão ao redor de 100ng/mL durante o proestro e aumentam durante a onda pré-ovulatória de LH. Durante o proestro, os níveis de LH são baixos e os pulsos não detectáveis, devido ao “feed-back” negativo pelo estradiol. O LH aumenta de 8 para 50ng/mL (em média 20ng/mL) durante 1-2 dias na onda pré-ovulatória. As concentrações de estradiol são variáveis, mas durante o final do proestro e início do estro, a concentração do mesmo atinge pico de 50-110pg/mL. Concomitantemente há aumento da concentração de progesterona sérica, que passa de 0,8ng/mL no início de proestro para mais de 1ng/mL durante a onda pré-ovulatória de LH (CONCANNON, 1991).

Assim, comparativamente à outras espécies domésticas, a cadela é a única que apresenta essa característica de microambiente folicular: a luteinização pré-ovulatória das células foliculares da granulosa, que expõe o oócito à altas concentrações de progesterona. A concentração desse hormônio, encontrada no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios, está ao redor de 7700ng/mL (nível encontrado quando a concentração sérica era superior a 7ng/mL) (WILLINGHAM-ROCKY, 2003).

Em resumo, a suplementação hormonal nos meios de cultivo é baseada no fato de que os oócitos caninos em fase de vesícula germinativa da PI estão sujeitos, *in vivo*, à concentrações decrescentes de estrógeno e crescentes de progesterona no folículo pré-ovulatório (HEWITT & ENGLAND, 1997; NICKSON et al., 1993). De fato, a influência hormonal intra-folicular pode ser o fator principal responsável pelo aumento das proporções de maturação à MII (31,9%) de oócitos caninos colhidos de cadelas superovuladas (YAMADA et al., 1993).

A grande maioria dos oócitos caninos colhidos para a MIV, geralmente derivam de folículos imaturos e poucas vezes de folículos pré-ovulatórios, e como nos folículos imaturos eles não estiveram expostos à ação hormonal, a adição de gonadotrofinas ao meio de cultivo poderá ser necessária. Tem sido demonstrado, em outras espécies, que a adição de FSH induz o retorno à meiose *in vitro* pela regulação dos níveis de AMPc no COC (KNOBIL & NEILL, 1994). Além disso, o FSH é considerado responsável pela expansão das células do *cumulus* o que geralmente tem uma correlação positiva com a aquisição de competência meiótica (SUTOVSKY et al., 1993).

HEWITT & ENGLAND (1997) iniciaram os estudos sobre a influência da suplementação hormonal na MIV de oócitos caninos. Utilizaram meios suplementados com estrógeno e progesterona em doses fixas (1 µg/mL) e concluíram que não houve efeito positivo sobre a maturação. Da mesma forma, WILLINGHAM-ROCKY et al. (2003), comparando diferentes concentrações de progesterona (0, 20, 200, 2000 ng/mL) não observaram aumento nas taxas de oócitos em MII. No entanto, VANUCCHI (2003) avaliando o efeito da suplementação de hormônios esteróides no meio de maturação, observaram que, a associação de 20 µg/mL de estrógeno e 20 µg/mL de progesterona proporcionaram maiores índices de MII, às 72 horas, em comparação ao meio sem suplementação hormonal; porém às 96 horas, os resultados se inverteram, sendo que o meio sem suplementação hormonal apresentou as melhores taxas de maturação.

KIM et al. (2005) citaram que a associação de hormônios esteróides (estrógeno e progesterona) na concentração de 2 µg/mL apresenta melhor efeito sobre a maturação

de oócitos caninos (16,6% a MII) quando comparada com a mesma concentração isoladamente (com estrógeno, 14,7% e com progesterona, 10,8%).

BOLAMBA et al. (1998), por sua vez, utilizaram meios suplementados com FSH, hCG, estradiol para cultivar oócitos de folículos pré-antrais avançados e antrais precoces. O procedimento acarretou porcentagem muito pequena de oócitos que progrediram de MI à MII.

Os achados sugerem que a definição das concentrações foliculares e ovidutais de gonadotrofinas e esteróides é imprescindível para a determinação de uma dosagem adequada desses hormônios na suplementação dos meios de cultivo (LUVONI et al., 2005).

Com relação à suplementação dos meios com fontes protéicas, na MIV de oócitos caninos, têm-se utilizado principalmente a adição de SFB, soro de fêmea em estro e BSA, sendo que o uso dessas substâncias está comprovadamente relacionado ao aumento das taxas de sobrevivência e maturação de oócitos bovinos. YOUNIS et al. (1989) e FUNAHASHI & DAY (1993) também descreveram que o soro tem efeito positivo na maturação de oócitos *in vitro* e na sua subsequente capacidade de desenvolvimento. Estudos reportam a utilização de 5 a 20% de soro bovino ou canino e 0,3 a 4% de BSA (LUVONI et al., 2005).

Segundo HEWITT et al. (1998), o SFB apenas suporta a viabilidade de oócitos caninos quando adicionado em concentrações superiores a 10%, porém sem benefício às taxas de maturação. Esses mesmos autores em estudo utilizando o meio TCM 199, demonstraram que a suplementação com 0,3% de BSA aumentou as taxas de maturação até MI, AI e MII às 48 horas de cultivo e a suplementação com 20% de SFB às 96 horas. Porém enquanto alguns autores tem demonstrado efeito positivo das fontes protéicas sobre as taxas de MIV, HEWITT & ENGLAND (1999) e BOLAMBA et al. (2002) relataram que essa suplementação no meio SOF parece não ter efeito positivo significativo.

RODRIGUES & RODRIGUES (2003) estudaram o efeito de diferentes fontes protéicas sobre a MIV e ao compararem soro de cadela em estro ao soro de vaca em

estro, concluíram que o primeiro apresentou maior eficiência na promoção da maturação oocitária canina.

OTOI et al. (1999) avaliaram a influência de várias concentrações (5, 10 e 20%) de soro de cadela em anestro, estro e diestro na MIV canina e concluíram que devido à maior concentração de estrógeno e progesterona no soro de cadelas em estro, uma proporção mais elevada de oócitos submetidos à tal suplementação, reassumiu a meiose até estágios de MI e MII e que ao se empregar esse soro na concentração de 10%, os eventos pré-ovulatórios *in vivo* são mimetizados.

NICKSON et al. (1993) utilizaram um meio contendo 10% de soro de cadela em estro e 20µg/mL de estradiol para a MIV canina e encontraram cerca de 39% de oócitos que alcançaram MII após 72 horas de cultivo, sendo essa a maior taxa de maturação *in vitro* canina descrita na literatura.

De fato, é bem conhecido que o soro sanguíneo contém, além de componentes protéicos, vários hormônios, como gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento e por essa razão é difícil atribuir à um componente específico, o efeito positivo sobre a maturação oocitária (LUVONI et al., 2005).

Uma das principais preocupações durante o processo de maturação e fecundação *in vitro* são os danos causados pelos ROS produzidos normalmente no metabolismo oxidativo (DEW, 2001). Os radicais livres são os mais importantes oxidantes biológicos, pois são potentes eletrófilos e agem em centros nucleófilos, como as terminações OH, NH₂, SH, de pequenos componentes e macromoléculas celulares, como DNA, proteínas e polissacarídeos, com conseqüências irreversíveis como a morte celular, via apoptose e necrose (AVELINO, 2004). Entretanto, a maioria das células apresenta um potente sistema de defesa contra radicais livres, representado pela GSH, que possui como principal função a detoxicação e antioxidação de componentes endógenos e exógenos, mantendo a condição redox intracelular (GASPARRINI et al., 2005; LUBERDA, 2005).

Apesar de a GSH ser sintetizada tanto no processo de maturação *in vivo*, como *in vitro*, sua concentração é mais elevada nos oócitos maturados *in vivo*. Uma possível explicação é que a tensão de oxigênio no lume do trato reprodutivo feminino é um terço

do que ocorre na maturação *in vitro*. Desta forma oócitos cultivados em condições artificiais, mobilizam maior quantidade de GSH para combater os radicais livres, provocados pelo estresse oxidativo, o que resulta no declínio de seus níveis, fato que pode justificar a baixa competência de oócitos maturados *in vitro* (BRAD et al., 2003). Desta forma, a adição ao meio de cultivo de compostos antioxidantes é aconselhável, assim como o uso de substratos energéticos, para a promoção da sobrevivência celular e suporte da maturação (LUVONI et al., 2005).

Nesse sentido, suplementos como a combinação de insulina transferrina e selênio (ITS), podem ser utilizados para o fim acima descrito. Segundo AUGUSTIN et al. (2003), a insulina melhora o desenvolvimento embrionário de mamíferos pré-implantados, pelo controle do transporte da glicose e exercem ações mitogênicas e anti-apoptóticas (importantes na MIV), pois o transporte desse substrato de energia é essencial para a sobrevivência do embrião. Outros fatores podem ser adicionados ao meio, associado à insulina, como o selênio, que age como estimulador da síntese de GSH. Também a transferrina foi identificada como um dos maiores constituintes protéicos nas células da granulosa e no fluido folicular e antral, tendo ação de quelar radicais hidroxila, facilitar o transporte de ferro e outros metais para dentro do embrião e servir de fator de crescimento (LIM & HANSEL, 2000).

Sobre os sistemas de cultivo de oócitos caninos, pode-se afirmar que o cultivo em gotas de meio cobertas por óleo mineral é o mais amplamente utilizado. Nesse sistema, o principal fator biofísico é representado pela proporção entre número de oócitos e volume de meio (LUVONI et al., 2005). Porém, VANUCCHI (2003), PIRES (2006) e APPARÍCIO (2006), utilizaram cultivo em placas de quatro poços, sem aparente prejuízo para os oócitos.

Quanto aos períodos de cultivo, deve-se levar em consideração que após a ovulação, os oócitos permanecem na tuba uterina, onde sofrem o processo de maturação nuclear, ou seja, atravessam a fase de vesícula germinativa para MII (expulsão do primeiro corpúsculo polar) (VANUCCHI, 2003).

Segundo YAMADA et al. (1992), a primeira divisão meiótica não está completada até pelo menos 48 horas após a ovulação. Em face disto, os pesquisadores utilizaram

período de cultivo de 72 horas com avaliação após 24 e 48 horas (momento no qual observou-se expansão das células do *cumulus*). Já NICKSON et al. (1993) optaram por períodos de 96 horas e HEWITT & ENGLAND (1997) não verificaram diferenças de MIV à MII em cultivos de 48 e 96 horas. Diversas pesquisas estabeleceram 72 horas como o período de maturação oocitária para cães (OTOI et al., 2000; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003), embora LUVONI et al. (2001) tenham observado aumento na taxa de oócitos degenerados quando estenderam o período de cultivo de 30 para 48 horas.

2.4. Avaliação da maturação oocitária

Os métodos descritos para avaliar o ooplasma do oócito canino preconizam a retirada mecânica de material lipídico ou utilização de marcadores nucleares fluorescentes que permitem a visualização do ooplasma sem a necessidade de se remover o material lipídico. Cabe salientar que o ooplasma canino, rico em lipídeos, torna difícil a visualização de núcleo, citoplasma, e portanto a avaliação da maturação (HEWITT et al., 1998). Uma das técnicas descritas é a utilização de aceto-orceína com prévia fixação em ácido e álcool (MAHI-YANGIMACHI, 1976; YAMADA et al., 1992; HEWITT & ENGLAND, 1997; DURRANT, 1998) e fixação adicional em citrato de sódio para tornar o ooplasma mais claro e de melhor visualização (HEWITT et al., 1998), sendo que a visualização da morfologia nuclear deve ser realizada em microscopia de interferência ou contraste de fase.

A utilização de corantes fluorescentes, como o HOESCHT 33258 também vem sendo utilizada para avaliar a maturação nuclear em microscópio invertido e lâmpada ultra-violeta (HEWITT & ENGLAND, 1997). Essa técnica permite a visualização de material nuclear, mas não distingue individualmente os cromossomos, como ocorre com a coloração de aceto-orceína. Ademais, a coloração de HOESCHT 33258 é um método muito mais rápido e não causa morte celular como pode ocorrer quando se utiliza a aceto-orceína (DEW, 2001).

Em função da intensidade de condensação cromossômica e da configuração da cromatina dos oócitos após cultivo, visualizada por meio de técnicas fluorescentes, é

possível classificá-los nos diferentes estágios de divisão celular da meiose (HEWITT et al., 1998).

Para avaliação da maturação citoplasmática, CHERR et al. (1988) propuseram a avaliação de oócitos bovinos por meio da coloração dos grânulos corticais, considerando-se maduros aqueles cujos grânulos tivessem migrado para a periferia do oócito.

3. Considerações sobre a indução farmacológica do estro em cadelas

3.1. O estro fisiológico

O ciclo reprodutivo da cadela apresenta quatro fases bem distintas, estabelecidas por alterações hormonais que induzem transformações de ordem morfológica e clínica, citológicas, vaginais e cervicais. Essas fases são conhecidas como proestro, estro, metaestro/diestro e anestro, sendo que o período de atividade reprodutiva é conhecido como estro (JÖCHLE & ANDERSEN, 1977). As alterações endócrinas relacionadas ao mecanismo de interrupção do anestro na cadela não se encontram totalmente esclarecidas (KOOISTRA et al., 1999). O FSH e o LH são folículo-tróficos e é possível que elevações na secreção de LH em conjunto com aumentos discretos de FSH dêem início à atividade cíclica nesta espécie e que para o início da atividade folicular o FSH não seja tão importante quanto o LH (CONCANNON, 1993).

O proestro nesta espécie é caracterizado por duração média de 7-10 dias (CONCANNON et al., 1989), edema de lábios vulvares e secreção sanguinolenta que pode ser observada na rima vulvar (JÖCHLE & ANDERSEN, 1977). O caráter sanguinolento dessa secreção é resultado de diapedese de hemácias proveniente da ruptura de vasos subepiteliais endometriais (FELDMAN & NELSON, 1997) em conjunto à secreção das glândulas endometriais (HOFFMANN et al., 1996). Já o estro tem duração média de 5-9 dias. A turgidez vulvar observada no proestro dá lugar à maciez e flacidez, que se fazem acompanhar de supressão e modificação da secreção vaginal de

sanguinolenta para serosanguinolenta e permissão à cópula (FELDMAN & NELSON, 1997).

Nos esfregaços vaginais, a proporção relativa de diferentes tipos de células pode ser usada como identificadora do ambiente endócrino (ARTHUR et al., 1996). O número de células basais e parabasais sediadas nas camadas mais profundas do epitélio, reduz-se à medida que o ciclo avança para o estro e dá lugar ao aparecimento de células intermediárias superficiais e células superficiais, que compõem o estrato espinhoso e superficial, de modo que nos quatro ou cinco dias precedentes ao pico de LH, o índice de células parabasais torna-se inferior a 5% (CONCANNON & DIGREGORIO, 1986).

Sob a influência da elevação progressiva de estrógeno ocorre a estratificação epitelial e proliferação celular. As células mais distantes do estrato basal, sofrendo com a redução de aporte nutricional e de oxigênio, perdem a sua capacidade de exocitose e acabam degenerando-se (FELDMAN & NELSON, 1997; VERSTEGEN, 1999). O predomínio de células superficiais no esfregaço é indicativo de progressão do ciclo e está associado ao efeito estrogênico máximo alcançado assinalando a expressão hormonal deste momento (FELDMAN & NELSON, 1997).

Segundo MIALOT (1988), o esfregaço vaginal do anestro é caracterizado quase que exclusivamente por células parabasais e também algumas intermediárias; o diestro por células intermediárias e parabasais isoladas; o proestro tem predominância de células intermediárias e superficiais nucleadas, além de numerosos glóbulos vermelhos e o estro caracteriza-se por células superficiais anucleadas ou com núcleo picnótico e poucos glóbulos vermelhos.

A concentração sérica de estradiol 17β atinge seu ápice 24 a 48 horas antes do estabelecimento da elevação sérica máxima pré-ovulatória do LH, isto é, antes do pico de LH, o qual marca o início do estro (VALTONEN & JALKANEN, 1993). As concentrações iniciais de estradiol de 90pg/mL reduzem-se para 10 a 20pg/mL ao final do proestro (HOFFMANN et al., 1996; VERSTEGEN, 1999). Esse declínio que ocorre concomitante à elevação plasmática de progesterona, reflete a maturação folicular vários dias antes da ovulação (FELDMAN & NELSON, 1997). A queda de estrógeno e

a elevação inicialmente discreta na progesterona induzem a secreção de FSH e especialmente de LH, que é mediada por um vigoroso mecanismo de retroalimentação positiva (FELDMAN & NELSON, 1997).

Contrariamente à liberação de FSH, a de LH é importante e sua elevação pré-ovulatória determina, na cadela, o fim da fase folicular e o ingresso na fase luteal (SHILLE & STABENFELDT, 1980). O pico de LH é o momento marcante do ciclo estral dessa espécie pois todos os eventos, da ovulação à parição, lhe são retroativos (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002). No proestro, após o pico de LH, que persiste por 12 a 24 horas, segue-se a ovulação.

A concentração hormonal de progesterona eleva-se acima do nível basal antes do estabelecimento do pico de LH, devido à capacidade de síntese e secreção mediada pelas células foliculares ovarianas, que se tornam funcionais mesmo antes do desenvolvimento do corpo lúteo (FELDMAN & NELSON, 1997). Os níveis de progesterona que no início do proestro se encontravam abaixo de 1ng/mL, aumentam de forma que valores de 2 a 3ng/mL, registrados no momento do pico de LH, sobem para $4,9 \pm 1,0$ ng/mL no instante da ovulação (BOUCHARD, 1991), embora estudos recentes tenham revelado índices médios de 2,3ng/mL no dia da ovulação (HASE et al., 2000). Segundo JHONSTON et al. (2001), uma concentração plasmática de progesterona entre 1,0 a 1,9 ng/mL indica ovulação em até 48 horas, entre 2,0 a 3,9 indica ovulação em até 24 horas e 4,0 a 10,0 indica que o animal já ovulou ou está ovulando.

Assim, foi demonstrado que o processo ovulatório mantém relação estreita com o aumento de progesterona. A falha na sua elevação faz com que a proporção na concentração sérica progesterona/estradiol não se modifique, o que impede o desencadeamento do pico de LH e a ovulação (VERSTEGEN, 1999).

3.2. O estro induzido

A indução do estro em cadelas vem sendo realizada com diferentes objetivos, entre eles, a busca de acasalamento em tempo determinado pelo proprietário, o término de um anestro prolongado por causas não determinadas ou falhas para iniciar o período

de puberdade. Mais recentemente, alguns estudos tem usado a indução de estro para a obtenção de oócitos supostamente mais competentes destinados à MIV.

Diversos protocolos de indução são usuais. Atualmente a prolactina é conhecida como principal luteotrofina em caninos (VERSTEGEN, 1997). Assim, tem sido verificado que o uso de agonistas da dopamina ocasionam supressão na secreção de prolactina, diminuindo o intervalo interestro. Dentre os agonistas mais utilizados estão, a bromocriptina (ZÖLDAG et al., 2001; KOOISTRA et al., 1999) e a cabergolina (ONCLIN et al., 1993).

Estudos prévios tentaram induzir estro fértil em cadelas usando gonadotrofinas e componentes estrogênicos, sem grandes sucessos nas taxas de prenhez. O uso desses compostos não resultou em dados reais e com repetibilidade (ZÖLDAG et al., 2001).

SHILLE & STABENFELDT (1980), citaram que o uso das gonadotrofinas visa mimetizar a interação hipófise-ovário para o desenvolvimento folicular, maturação oocitária e ovulação, mas afirmaram que esses compostos não proporcionam indução de estro fértil. Segundo CONCANNON (1989), os resultados insatisfatórios dos protocolos de indução de estro, utilizando gonadotrofinas com ou sem estimulação prévia com estrógeno, resultam da falta de conhecimento dos eventos hormonais e foliculares responsáveis pelo término do anestro nas cadelas e afirmou que a eficiência diminuída desses protocolos pode ser devido à uma hiperestimulação ovariana, falhas nos processos de ovulação, luteólise prematura ou formação de anticorpos.

Os principais protocolos de indução usando gonadotrofinas e compostos estrogênicos incluem aplicação de 20 UI/kg por 5 a 10 dias consecutivos de eCG, seguido de 500-1000UI/animal, em aplicação única de hCG (ENGLAND & ALLEN, 1991); 5 mg/kg, ao dia, de diethilelbestrol (DES), até início do proestro, seguido de 5mg/kg de FSH, no quinto, nono e décimo primeiro dias do proestro (MOSES & SHILLE, 1988); e ainda o uso de GnRH em administração pulsátil (CONCANNON et al., 1997).

A despeito desses dados, protocolos de indução de estro utilizando gonadotrofinas têm sido utilizados para provocar crescimento folicular e proporcionar,

assim, a colheita de oócitos pré-ovulatórios para a MIV, já que é sabido que a competência meiótica de oócitos de outras espécies é influenciada pelo tamanho de ambos, folículo (LONERGAN et al., 1994; MARTINO et al., 1994; MOTLIK & FULKA, 1986) e oócito (FAIR, 1997 e OTOI et al., 1997).

YAMADA et al. (1992) e YAMADA et al. (1993) realizaram MIV e FIV de oócitos caninos pré-ovulatórios. Estes autores utilizaram protocolo de indução de estro com 100-400 µg/dia de estrone, até o aparecimento de secreção vaginal sanguinolenta. Três dias depois, 400 UI/animal de eCG e 1000 UI/animal de hCG, via subcutânea, seguido de duas aplicações de estradiol, uma três e outra quatro dias após a aplicação de eCG e hCG. O primeiro dia do estro foi determinado pela citologia vaginal e nesse dia os animais receberam aplicação de 1000UI/animal de hCG. Esses autores realizaram punção folicular para colheita dos oócitos, e consideraram os folículos repletos de fluido claro e protrusos sobre a superfície ovariana (com mais de 3mm de diâmetro), como grandes folículos, e os folículos colapsados, hemorrágicos e com ponto de ruptura, foram considerados folículos ovulados. Ainda, concluíram por essas características morfológicas que a ovulação nas cadelas ocorreu 72 horas após a aplicação do hCG, sendo que os ovários colhidos 96 horas após a aplicação de hCG possuíam apenas folículos colapsados.

Assim, o presente estudo teve como escopo geral, estudar a MIV de oócitos de fêmeas caninas. Especificamente buscou-se pesquisar se as taxas de MIV são influenciadas pelo estágio reprodutivo e suplementação dos meio de cultivo com progesterona e soro de cadela em estro; descrever a incidência de maturação intra folicular; analisar a distribuição de diâmetro oocitário de acordo com o estágio reprodutivo; elucidar aspectos de citologia vaginal, concentração sérica de progesterona e macroscopia ovariana em fêmeas submetidas à indução de estro.

REFERÊNCIAS

ABD EL RAZEK, I.M.; CHARPIGNY, G.; KODJA, S.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; MERILLOD, P.; GUYADER-JOLY, C.; HUMBLDT, P. Differences in lipid composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, abstract, p. 346, 2001.

ANDERSEN, A.C. Reproductive System. B/Female. In: ANDERSEN, A.C.; GOOD, L.S. (Eds): **The beagle as an experimental dog**. Iowa: Iowa State University Press, 1970, p.321-326.

APPARÍCIO, M.F. **Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática in vitro de oócitos de cadelas (Canis familiares) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia**. 61f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2006.

ARTHUR, G.H. Infertility in bitch and queen. In: **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. 7. Ed. London: WB Saunder, 1996, p.536.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; FICHER, B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.91-99, 2003.

AVELINO, K.B. **Efeito da estimulação e inibição da síntese de glutatona durante a maturação in vitro de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária**. 2004. 82f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

BAKER, T.G. Germes cells and fertilization. 2 ed. In: **Reproduction in mammals**. Cambridge, England, Cambridge University Press, p.17-45, 1982.

BOLAMBA,D.; BORDEN-RUSS, K. D.; DURRANT, B. S. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultures in advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v. 49, n.5, p. 933-942, 1998.

BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K.D.; DURRANT, B.S. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicle in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essencial. **Theriogenology**, v.58, p.1689-1703, 2002.

BOUCHARD, G. Seasonality and variability of the interoestrus interval in the bitch. **Theriogenology**, v.36, n.1, p. 41-50, 1991.

BRAD, A.M.; BORMANN, C.L.; SWAIN, J.E.; DURKIN, R.E.; JOHSON, A.E.; CLIFFORD,A.L. Gluthathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**,v.64, p.492-498, 2003.

BREDFORD, J.M.; KIM, H.H. Cumulus oophorus as sperm sequestering device *in vitro*. **Journal of Experimental Zoology**, v.265, p.321-328, 1993.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interation between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 543-547, 1990.

CHERR, G. N.; DROBNIS, E. Z. ; KATZ, D.F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **Journal of Experimental Zoology**, v. 246, p. 81-93, 1988.

CINONE, M.; GHNEIM, A.; CAIRA, M.; DELL'AQUILA, M.E.; MINOIA, P. Collection and maturation of oocytes in the bitch. In: Internacional Congress Animal Reproduction 12., 1992, The Hague. **Proceedings**. The Hague, 1992, v.4, p.1767-1769.

CONCANNON, P.W.; DIGREGÓRIO, G.B. Canine vaginal cytology. In: T.J. BURKE (ed). **Small Animal Reproduction and Fertility**. Ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986, p. 96-111.

CONCANNON, P.W.; MC CANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and Endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39 , suppl, p.3-25, 1989.

CONCANNON, P.W. Reproduction in the dog and cat. In: Cupps P.T. **Reproduction in Domestic animals**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1991, p.517-554.

CONCANNON, P.W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, suppl, p. 3-27, 1993.

CONCANNON, P.W.; LASLEY, B.; VANDERLIP, S. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrus dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, suppl, p.41-54, 1997.

DEW, E.V. **In vitro maturation of the canine oocyte**. 56f. Thesys (Master of Sciences) – University of Georgia, 2001.

DULCIBELLA, T. Biochemical and cellular insight into the temporal window of normal fertilization. **Theriogenology**, v.49, p.53-65, 1998.

DURRANT, B.S.; PRATT, N.C.; RUSS, K.D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, p.917-932, 1998.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Repeatibility of events during spontaneous and gonadotrophin-induced oestrus in bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, n.2, p.443-448, 1991.

ENGLAND, G.C.W.; HEWITT, D.A. Follicular growth and ovulation in dogs. In: **EVSSAR Annual Symposium** , Lyon, 1999, p.51.

FAIR, T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embriology**. v. 195, p. 327-336, 1997.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60, n.1, p.375-387,2000.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. The ovarian cycle & vaginal cytology in the bitch. In: DI BRYDEN (Ed) Internal Medicine. **Proceedings** 284, The Post-Graduate Foundation in Veterinary Science of the University of Sydney, 1997, p. 273-288.

FUJII, M.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; TANAKA, M.; UNE, S.; SUZUKI, T. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, n.3, p.305-307, 2000.

FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. Effects of the duration of exposure to hormone supplementa on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 179-185, 1993.

GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; MARCHANDISE, J.; DI PALO, R.; GEORGE, F.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, 2005, *in press*.

GRAZUL- BILSKA, A.T. Effects of second messengers on gap junctional intercellular communication of ovine luteal cells throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.57, p. 947-957, 1997.

GUÉRIN, C. Fecondation in vitro chez la chienne.Ou en est-on? **Pratique Médicale et Chirurgicale des.Animaux de Compagnie**, v.33, p.151-161,1998.

HASE, M. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dog. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.62, n.3, p.243-248, 2000.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Canine spermatozoa – cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v.28, n.8, p.1329-1342, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p.83-91, suppl, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.957-966, 1998a.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Incidence of oocyte nuclear maturation whitin the ovarian follicle of the bitch. **Veterinary Record**, v. 143, p.590-591, 1998b.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. **Veterinary Record**, v.144, p.237-239, 1999.

HEWITT D.A.; WATSON, P.F.; ENGLAND, G.C.W. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.1083-1128, 1998.

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.2, p. 275-288, 1996.

HOLST, P.A.; PHEMISTER R.D. The prenatal development of dog, preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v.5, p. 771-779, 1971.

HOLST, B.S.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.119, n.1, p.77-83, 2000.

HOSZEL, J.F. Genital Cytology of the bitch. **Veterinary Scope**, v. 11, p. 2-15, 1975.

JHONSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Sexual differentiation and normal anatomy of the bitch. In: **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. v. 1, p. 1-14.

JOCHLE, W.; ANDERSEN, A.C. The estrous cycle in the dog: a review. **Theriogenology**, v.07, n.03, p. 113-140, 1977.

KIM, M.K.; FIBIRANTO, Y.H.; GOO JANG, H.J.O.; KIM, H.J.; LEE,K.S.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. Effects of estradiol-17 β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1342-1353, 2005.

KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press, 1994.

KOOISTRA, H.S. Concurrents pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of estrous cycle and anestrus in beagle bitches. **Biology of Reproduction**, v. 60, n.1, p.65-71, 1999.

LEAVIT, W.W.; BOSLEY, C.G.; BLAHA, G.C. Source of ovarion preovulatory progesterone. **Nature New Biology**, v.234, n.52, p. 283-284, 1971.

LIEBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro* . **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 76-86, 1979.

LIM, J.M.; HANSEL, W. Exogeneous substances affecting development of *in vitro*-derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. **Theriogenology**, v.53, p.1081-1091, 2000.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOZ, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, D. Effects of follicle size on bovine oocytes quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48-53, 1994.

LUBERDA, Z. The role glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v.5, n.1, p. 5-17, 2005.

LUVONI, G.C.; COLOMBO, C. Effect of L-cysteine on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. In: ENNE, G.; GREPPI, G.F.; LAURI, A. (Eds), **Reproduction and Animal Breeding** : Advances and Strategy. Paris: Elsevier, p.403-404, 1995.

LUVONI, G.C.; LUCIANO, A.M.; MODINA, S.; GANDOLF, F.; Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.57, suppl.30, p.141-146, 2001.

LUVONI, G.C; CHIGIONI,S.; ALLIEVI, E.; MACIS,D. Factors involved in vivo and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.41-59, 2005.

MAHI, C.A.; YANAGIMACI, R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. **Journal of Experimental Zoology**, v.196, p.189-196, 1976.

MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M.J.; PARAMIO, M.T. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes . **Theriogenology**, v. 41, p. 969-980, 1994.

MARTINS, L.R. **Maturação nuclear de ovócitos de cadelas em estro e anestro submetidos à maturação *in vitro*** . 74f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2005.

McDOUGALL, K.; HAY, M.A.; GOODROWE, K.L.; GARTLEY, C.J.; KING, W.A. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, prepubertal and mature bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, supp. 51, p.25-31, 1997.

MIALOT, J.P. **Patologia da Reprodução dos Carnívoros Domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1988, p.34-40.

MOSES D.L.; SHILLE, V.M. Induction of estrus in greyhound bitches with prolonged idiopathic anestrus or with suppression of estrus after testosterone administration. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 192 (11), p. 1541-1545, 1988.

MOTLIK, J.; FULKA, J. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. **Journal Exp. Zoology**, v. 198, p. 155-162, 1986.

NICKSON, D.A.; BOYD, J.S.; ECKERSALL, P.D.; FERGUSON, J.M.; HARVEY, M.J.; RENTON, J.P. Molecular biology methods of monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl v.47, p.231-240, 1993.

ONCLIN, K. Patterns of circulating prolactin LH and FSH during dopamine-agonist induced termination of anestrus in beagle dog. . **Biology of Reproduction**, v.52, suppl, p.314, 1993.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v. 48, p. 769-774, 1997.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.;OOKA, A.; SUZUKI,T. Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, n. 7-8, p. 387-390, 1999.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.;OOKA, A.; SUZUKI,T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v. 54, p. 535-542, 2000.

OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI,M.; KARJA, N.W.K.; SUZUKI, T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrus cycle. **Journal and Fertility Development**, v. 13, p. 151-155, 2001.

PIRES, E. A. **Efeito da Suplementação de cistéina e cisteamina sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (Canis familiares) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia durante a fase pré-ovulatória do estro.** 66p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Endocrinologia Reprodutiva na cadela. **Clínica Veterinária**, n.40, set/out, p. 50-58, 2002.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dog. **Theriogenology**, v. 60, p. 59-66, 2003.

SCRIBAN, R. Les biotechnologies de la reproduction animal. cap 6. In: **Biotechnologie**, 5 ed. Paris: TEC et DOC, 1999.

SHILLE, V.M.; STABENFELDT, G.H. Current concepts on reproduction of the dog and cat. **Advances in Veterinary Science and Cooperative Medicine**, v.24, p.211-243, 1980.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p. 1241-1254, 2001.

SONGSASSEN, N.; SPINDLER, R.; WILDT, D.E. Follicular size, but not stage of reproduction or season, influences meiotic maturation of domestic dog oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, n.2, p. 282-283, 2004.

STROM HOLST, B.; LARSSON, B.; RODRIGUES-MARTINEZ, H.; LAGERSTEDT, A.S.; LINDE-FORSBERG, C. Prediction of the oocytes recovery rate in the bitch. **Journal Veterinary Medicine**, v.48, p.587-592, 2001.

SUTOVSKY, P.; FLECHON, J.E.; MOTLIK, J.; PEYNOT, N.; CHESNE, P. Dinamic changes of gap-junctions and cytoskeleton during *in vitro* culture of cattle oocyte cumulus complexes. **Biology of Reproduction**, v. 49, p.1277-1287, 1993.

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A.; Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, supp 30, p.493-407, 1972.

TESORIERO, J.V. A morphologic, cytochemichal and chromatographic analysis of lipid yolk formation in the in the oocytes of dogs. **Gamete Research**, v.6, p.267-, 1982.

THEISS, T. **Investigations on the collection, in vitro maturation and fertilization of dog oocytes**. 97f. Tese. Tierartzliche Facultat der Ludwig-Maximilian Universitat Munich, 1997.

TOSHIMORI, K. Sperm plasma membrane modifications associated associated with fertilization in mammals. **Journal of Reproduction and Development**, v.46, n.2, p. 65-78, 2000.

VALTONEN, M.; JALKANEN, L. Species-specific features of oestrus development and blastogenesis in domestic canine species. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, suppl, p.133-137, 1993.

VAN HAFTEN, B. Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, n.1, p. 221-225, 1994.

VANNUCCHI, C.I. **Estudo da maturação in vitro de oócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina.**, 2003, 77p., Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

VERSTEGEN, J. Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in the dogs by administration of purified pig LH. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.111, n.1, p. 35-40, 1997.

VERSTEGEN, J. Hormonal cycle and vaginal cytology in the bitch. In: Reproduction Hos Hund. **Proceedings**. Frederiksberg Dansk Veterinaer forening for Husdyrreproduction. Escandinávia, 1999, p. 7-21.

ZOLDAG, L.; FEKETE, S.; CSAKY, I.; BERSENYI, A. Ferile estrus induced in bitch by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. **Theriogenology**, v.55, p. 1657-1666, 2001.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: **The Physiology of Reproduction**, 2 ed. Edited by E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press, ITD, New York, 1994, p.79-122.

WILLINGHAM-ROCKY, L.A.; HINRICHS, K.; WESTHUSIN, M.E.; KRAEMER, D.C. Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.501-508, 2003.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Maturation, fertilization and development of dog oocyte in vitro. **Biology of Reproduction**, v.46, n.5, p. 853-858, 1992.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl 47, p. 227-229, 1993.

YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G.; FAYRER-HOSKEN R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. **Gamete Research**, v.23, p.189-201, 1989.

OBJETIVOS GERAIS

A presente pesquisa teve como escopo geral:

1. Estudar a influência da fase do ciclo estral e da suplementação de meio de cultivo com progesterona e/ou soro de fêmea canina em estro, nos índices de MIV de oócitos caninos;
2. Investigar a incidência de maturação oocitária intraovariana de cadelas em anestro, estro natural e estro induzido;
3. Descrever a distribuição de diâmetro oocitário em fêmeas caninas em anestro, estro natural e estro induzido;
4. Descrever a evolução da citologia vaginal, mensurar a dosagem de progesterona e analisar a morfologia macroscópica ovariana no momento pré-ovulatório de cadelas submetidas à indução do estro com gonadotrofinas.

CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DO ESTÁDIO REPRODUTIVO E SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO COM PROGESTERONA E/OU SORO DE CADELA EM ESTRO, NAS TAXAS DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE FÊMEAS CANINAS

RESUMO – O presente estudo avaliou a influência das diferentes condições reprodutivas, anestro, estro e estro induzido e de diferentes meios de maturação (suplementados com progesterona e/ou soro de cadela em estro) sobre os graus de configuração cromossômica nuclear de oócitos de fêmeas caninas. Pesquisou-se também se a fase do ciclo influencia no número de oócitos adquiridos por animal e nas taxas de perda oocitária durante os processos de coloração. Os oócitos foram colhidos por fatiamento ovariano, mantidos em cultivo por 72 horas e após corados com bisbenzimida. Concluiu-se que o grupo estro induzido forneceu maior número de oócitos Grau I e com diâmetro superior a 110µm por animal, comparativamente ao anestro; o grupo estro induzido apresentou menor porcentagem de perda oocitária comparativamente ao estro, que apresentou a maior perda; quanto ao efeito da suplementação de progesterona, não houve efeito positivo na retomada e progressão da meiose; quanto ao efeito da suplementação com soro de cadela em estro, houve efeito positivo na retomada, mas não na progressão da meiose, sendo esse efeito observado apenas no grupo estro induzido; quanto à influência do estágio reprodutivo, o estro induzido foi superior quando utilizamos meio suplementado com progesterona e soro, por apresentar menores taxas de VG, porém nas taxas de MI, anestro e estro mostraram-se semelhantes e superiores ao estro induzido. Ainda o grupo estro induzido apresentou maiores taxas de oócitos degenerados ou não passíveis de identificação, após a coloração.

Palavras-chave – oócito, maturação, cadela, estro, cultivo *in vitro*

CHAPTER 2 – THE INFLUENCE OF REPRODUCTIVE STAGE AND CULTURE MEDIUM SUPPLEMENTATION USING PROGESTERONE AND/OR BITCH SERUM IN ESTRUS, IN THE MATURATION INDEXES *IN VITRO* OF CANINES FEMALE OOCYTES

ABSTRACT – The present study evaluates the influence of different reproductive conditions, anestrus, estrus and estrus-induced, as well the different maturation medium (supplemented with bitch's progesterone and in estrus bitch's serum) under the canine female oocytes' nuclear chromosomic configuration degrees. It was evaluated also if the cycle's phase would influence the number of acquired oocytes per animal and the oocyty's loss indexes during the coloration processes. The oocytes were collected by slicing of ovaries, cultivated for 72 hours and after that colored with bisbenzimidazole. It was concluded that the estrus-induced group provided higher amount of oocytes Grade I with a diameter higher than 110 μm per animal. When compared with anestrus, the estrus-induced group presented lower oocyty losses percentage when compared to the estrus group, which presented the higher lost. Regarding to the progesterone supplementation effect, there was no positive effect in the meiosis progression and resumption. Related to the supplementation with bitch serum in estrus, there was positive effect in the progression, but there was no effect positive in the meiosis progression, being this effect observed just in the estrus-induced group. Regarding to the reproductive stage influence, it was observed that the estrus-induced group was superior when the supplemented medium with progesterone and serum was used, due it present lower VG rates, however the MI, anestrus and estrus rates were similar and superior to the estrus-induced group. The estrus-induced group still presented higher degenerates oocytes and possible no identifiable oocytes rates after coloration.

Keywords – oocytes, maturation, bitch, estrus, *in vitro* culture

Introdução

Durante muito tempo, as pesquisas na área de biotecnologia da reprodução se restringiram a estudos com animais de produção e somente a partir da década de 90, com o interesse da comunidade científica pela preservação da biodiversidade é que a espécie canina mereceu atenção. Esse aspecto deveu-se ao fato de a fêmea canina constituir-se um modelo experimental para os canídeos ameaçados de extinção, dentre eles o cachorro-do-mato vinagre (*Spheothos venaticus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), que são espécies da fauna brasileira.

O processo de maturação oocitária in vitro (MIV) de oócitos de fêmeas caninas tem sido objeto de exaustivos estudos pois o domínio do mesmo constitui-se o fator primordial para o desenvolvimento e implementação adequados da FIV e do CIV, fato que permitiria portanto o alcance do objetivo final que é a obtenção de embriões das espécies de canídeos em extinção (PIRES, 2006).

Dentro desse aspecto porém há um entrave que pode explicar as baixas taxas atuais de MIV dos oócitos de fêmeas caninas : a peculiaridade da fisiologia reprodutiva canina.

O processo de interrupção do anestro e os eventos endócrinos relacionados são eventos ainda não totalmente esclarecidos (KOOISTRA, 1999) sendo que há sugestões de que o desenvolvimento dos folículos nessa espécie se inicia aproximadamente 30 dias antes da ocorrência da ovulação, com ondas foliculares anteriores ao proestro (ENGLAND & HEWITT, 1999).

Ao final do proestro, a queda da concentração de estradiol ocorre concomitantemente à elevação da concentração plasmática de progesterona, refletindo a maturação folicular, que ocorre vários dias antes da ovulação (FELDMANN & NELSON, 1997). Segundo LEAVITT et al. (1971), o aumento da progesterona tem origem nos folículos pré-ovulatórios e nas células intersticiais ovarianas. Esse aspecto diferencia grandemente os canídeos de outros mamíferos domésticos, pois naqueles é o estrógeno que predomina no ambiente folicular pré-ovulatório (FARSTAD, 2000).

Em acréscimo, segundo DULCIBELLA (1998), na maioria dos mamíferos, o processo de desenvolvimento oocitário sofre dois momentos de estagnação, PI e MII. A primeira estagnação é interrompida com o processo de crescimento folicular, quando, caracterizando o processo de maturação oocitária, há transição do estágio de VG ao estágio de MII e a segunda estagnação é quebrada com a fecundação (DEW, 2001).

Porém, como citado por LUVONI et al. (2005), oócitos caninos são ovulados imaturos, em estágio de vesícula germinativa, enquanto que outras espécies ovulam oócitos em metáfase II. Assim, outra peculiaridade dos canídeos é o fato de o oviduto sustentar, por longo período, oócitos imaturos e ser o sítio da evolução à metáfase II, bem como da fecundação e desenvolvimento à blastocisto (HOLST & PHEMISTER, 1971). Segundo OTOI et al. (2000), os oócitos caninos necessitam de 2 a 5 dias para completarem a maturação meiótica no oviduto.

Alterações morfológicas que ocorrem no oócito canino durante os diferentes estágios do ciclo estral podem afetar a habilidade do oócito em se comunicar com as células do *cumulus* e alterar a capacidade de competência meiótica. LUVONI et al., (1995) citam que existem junções do tipo “gap” entre as células do *cumulus* e o oócito e essas estão envolvidas na regulação da diferenciação meiótica e maturação dos mesmos. E segundo esses autores, estas comunicações não estão abertas durante o período de anestro, em comparação à 89% de junções abertas encontradas em oócitos provenientes de ovários em fase de proestro.

As pesquisas sobre a influência nas taxas de MIV, de acordo com o *status* reprodutivo, trazem resultados muito controversos e diversos autores tem buscado relacionar o efeito dos eventos endócrinos pré ovulatórios *in vivo* sobre os oócitos e MIV dos mesmos (HEWITT & ENGLAND, 1997; LUVONI et al., 2001; OTOI et al., 2001; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003; WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003; SONGSASSEN et al., 2004; YAMADA et al., 1993).

O processo de crescimento intra folicular do oócito é constituído por um conjunto de modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (SCRIBAN, 1999). Ainda segundo esse mesmo autor, pode-se distinguir três tipos de maturação, a nuclear, que corresponde ao início da meiose e expulsão do primeiro corpúsculo polar pelo núcleo

do oócito, a citoplasmática, caracterizada pela capacidade do citoplasma descondensar o núcleo do espermatozóide e transformá-lo em pró-núcleo masculino e a maturação de membrana, que permite à zona pelúcida do oócito reconhecer os espermatozoides de sua espécie. Com base nessas afirmações deve-se considerar a influência positiva do tempo que o oócito passa dentro do folículo em crescimento, sobre as taxas de MIV.

Ao se abordar o aspecto de suplementação de meios de cultivo a que se considerar o fato de que os oócitos caninos em fase de vesícula germinativa da Prófase I estão sujeitos, *in vivo*, à concentrações decrescentes de estrógeno e crescentes de progesterona no folículo pré-ovulatório (HEWITT & ENGLAND, 1997; NICKSON et al., 1993).

Segundo WILLINGHAM-ROCKY et al. (2003), a concentração de progesterona encontrada no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios, está ao redor de 7700ng/mL (nível encontrado quando a concentração sérica era superior a 7ng/mL). KIM et al. (2005) citaram que a associação de hormônios esteróides (estrógeno e progesterona) apresenta melhor efeito sobre a maturação de oócitos caninos (16,6% a MII) quando comparada com a mesma concentração isoladamente (com estrógeno, 14,7% e com progesterona 10,8%). VANUCCHI (2003) concluiu em seus estudos que, houve influência positiva da suplementação hormonal no desenvolvimento *oocitário in vitro*, particularmente com referência à adição de progesterona, associada ou não ao estrógeno. Da mesma forma, APPARÍCIO (2006), concluiu que a suplementação com hCG, progesterona e estradiol interferiu de forma positiva na maturação MIV de oócitos caninos.

Com relação à suplementação dos meios com fontes protéicas, na MIV de oócitos caninos, têm-se utilizado principalmente a adição de SFB, soro de fêmea em estro e BSA, sendo que o uso dessas substâncias está comprovadamente relacionado ao aumento das taxas de sobrevivência e maturação de oócitos bovinos. YOUNIS et al. (1989) e FUNAHASHI & DAY (1993) também descreveram que o soro tem efeito positivo na maturação de oócitos *in vitro* e na sua subsequente capacidade de desenvolvimento. Estudos reportam a utilização de 5-20% de soro bovino ou canino e 0,3 a 4% de BSA (LUVONI et al., 2005).

RODRIGUES & RODRIGUES (2003) estudaram o efeito de diferentes fontes protéicas sobre a MIV e ao compararem soro de cadela em estro ao soro de vaca em estro, concluíram que o primeiro apresentou maior eficiência na promoção da maturação oocitária canina.

OTOI et al. (1999) avaliaram a influência de várias concentrações (5, 10 e 20%) de soro de cadela em anestro, estro e diestro na MIV canina e concluíram que uma proporção mais elevada de oócitos submetidos à suplementação com soro de cadelas em estro, evoluiu até estágios de MI e MII.

De fato, é bem conhecido que o soro sanguíneo contém, além de componentes protéicos, vários hormônios, como gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento e por essa razão é difícil atribuir a um componente específico, o efeito positivo sobre a maturação oocitária (LUVONI et al., 2005).

Neste contexto, a presente pesquisa objetivou estudar a influência da fase do ciclo estral e da suplementação de meio de cultivo com progesterona e/ou soro de fêmea canina em estro, nos índices de MIV dos oócitos de fêmeas caninas.

Material e Métodos

Local e animais

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Reprodução Animal, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal. Foram utilizadas 36 cadelas que forneceram parte da sua população oocitária para este estudo (662 oócitos). Os animais encontravam-se em diferentes condições reprodutivas (anestro, estro natural e estro induzido), eram de raças variadas, idade entre um e sete anos e apresentavam-se hígidos ao exame clínico.

Determinação da fase do ciclo estral

Durante a realização de cadastro dos animais para a introdução dos mesmos no experimento, foram obtidas informações sobre o último ciclo reprodutivo e a partir desse dado, os mesmos eram direcionados para constituírem os grupos dos animais em anestro, estro ou estro induzido.

Os animais destinados a compor o grupo ANESTRO foram submetidos à citologia vaginal e dosagem sérica de progesterona para a confirmação da fase. Destinaram-se a fornecer oócitos para esse grupo, os animais que apresentavam na citologia vaginal, baixa celularidade com predomínio de células basais e parabasais e dosagem sérica de progesterona inferior a 1ng/mL. A citologia vaginal era realizada segundo técnica descrita por MIALOT (1988). Após a confirmação dessa fase do ciclo estral, as fêmeas foram submetidas à OSH para colheita dos ovários. Todas as dosagens de progesterona, neste experimento, foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas - Endomed, na cidade de Jaboticabal- SP, através do método de quimioluminescência.

As cadelas destinadas a compor o grupo ESTRO foram, imediatamente após os primeiros sinais de proestro, submetidas à citologia vaginal em dias alternados para acompanhamento da progressão da fase folicular. Esse exame era realizado até a determinação do início do estro, quando na citologia vaginal denotava-se presença de cerca de 90% de células superficiais e superficiais anucleadas. Doze horas após, amostra de sangue era colhida e encaminhada para dosagem sérica de progesterona a fim de se predizer o momento da ovulação, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Relação entre dosagem sérica de progesterona e estimativa do momento da ovulação em fêmeas caninas.

[P4] ng/ml	Momento estimado da ovulação
1.0-1.9	Em até 48 horas
2.0-3.9	Em até 24 horas
4.0-10.0	Houve ovulação ou está ovulando

JHONSTON et al. (2001)

Com base nos resultados de dosagem de progesterona realizou-se a OSH para colheita dos ovários, em tempo médio de 12 horas antes da ovulação estimada.

Os animais que formaram o grupo ESTRO INDUZIDO foram submetidos à uma triagem, de modo que somente foram selecionados animais em anestro comprovado por citologia vaginal e dosagem sérica de progesterona. Isto posto, o protocolo de indução era aplicado conforme esquema abaixo:

eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	hCG		OSH
d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	

d0 a d1 : dia 0 ao dia 11

eCG (gonadotrofina coriônica eqüina): 30UI/kg, IM, uma vez ao dia

hCG (gonadotrofina coriônica humana): 500UI/ animal, IM, em aplicação única

O protocolo de indução utilizado foi adaptado de ENGLAND & ALLEN (1991) e no 12º dia de tratamento (d11), realizou-se a OSH para colheita dos ovários.

Obtenção e classificação dos oócitos

Após a OSH, os ovários foram colhidos assepticamente, imersos em solução fisiológica 0,9% a 37°C (Figura 2A) imediatamente encaminhados ao Laboratório de Reprodução Animal desta Universidade. Em placa aquecida, os mesmos foram fatiados em solução de PBS com 10% de SFB, a 37°C, para liberação dos COCs (Figura 2B).

Os oócitos foram localizados sob lupa estereomicroscópica, avaliados com relação à homogeneidade do citoplasma, número de camadas de células do cumulus, conforme os critérios morfológicos adotados por HEWITT & ENGLAND (1997). Os oócitos também foram selecionados pela mensuração de seu diâmetro por meio de retículo milimetrado de medição (10mm/100partes) para ocular de 10x de Microscópio

Estereoscópio, sendo que somente foram destinados à MIV oócitos com diâmetro superior a 110 µm em COCs Grau I.

Os COCs selecionados foram então passados em três gotas de meio de lavagem (Apêndice G) antes de incubados para maturação.

Obtenção do soro de cadela em estro

O sangue foi colhido de uma fêmea canina em estro, cinco dias após a determinação do dia 0 (início do estro), dia este determinado pela análise da citologia vaginal (90% de células superficiais) associada ao comportamento de receptividade ao macho. Após a colheita, o sangue foi centrifugado a 3000rpm, por 10 minutos, duas vezes, para separação do soro. O soro foi então inativado por aquecimento a 56°C, por 30 minutos, em seguida filtrado em membrana 22µm, aliquotado e congelado a 20°C.

O soro sangüíneo dessa fêmea apresentava concentração de progesterona de 14,9ng/ml, indicativa do quinto dia de estro, momento no qual os oócitos, *in vivo*, se encontram na tuba, em processo de maturação.

Maturação *in vitro*

Após a lavagem, grupos de até 10 oócitos (pertencentes à fêmeas sob a mesma condição reprodutiva) foram transferidos para 500µL de meio de maturação, em placas de quatro poços. Posteriormente a placa foi acondicionada em estufa 38°C em atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 72 horas, sendo que após período de 48 horas, realizou-se retirada de 250µL de meio de cada poço com posterior reposição de mesma quantidade de meio, recém preparado. Cada poço continha meio específico para cada tratamento experimental, porém todos com a mesma base de constituição (meio TCM199), conforme descrito no Apêndice H.

Assim, os quatro meios de cultivo utilizados neste experimento foram:

- Meio 1 : meio TCM199
- Meio 2 : meio TCM199 acrescido de 2 μL / mL de progesterona (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
- Meio 3 : meio TCM199 acrescido de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de SCE
- Meio 4 : meio TCM199 acrescido de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de progesterona (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de SCE.

Avaliação do estágio de maturação nuclear

Após 72 horas de cultivo, os oócitos foram colocados em placas contendo 200 μL de solução de hialuronidase 0,2% e aspirados repetidas vezes com pipeta de 100 μL para remoção completa das células do *cumulus*. Na sequência, foram passados três vezes em meio de lavagem para inativação da enzima. Ato contínuo, transferidos para solução de paraformaldeído 4%, onde permaneceram por 5 minutos para fixação. Após, foram novamente passados em meio de lavagem por três vezes e transferidos para solução de Triton 100 em PBS (1%) por 10 minutos. Ao término deste processo, os oócitos foram colocados em lâmina de microscopia contendo uma gota de bisbenzímide (Hoechst 33342) em glicerol (0,001%), a seguir foram cobertos por lamínula e avaliados.

Uma lista composta pelas especificações sobre reagentes e hormônios utilizados neste experimento, encontra-se sob título de Apêndice J.

Classificação dos estádios de maturação

A classificação do estágio de maturação nuclear foi realizada segundo os critérios adotados por HEWITT & ENGLAND (1997), baseado na morfologia do DNA, por graus variados de condensação cromossômica (Figura 1). A avaliação foi realizada em microscópio invertido equipado com luz ultravioleta e filtro para comprimento de onda entre 365-420 de excitação/emissão. Assim, os graus avaliados foram:

1. Vesícula Germinativa (VG – estágio dictiata da prófase I) – presença de núcleo vesicular com cromossomos pouco condensados.

2. Quebra de Vesícula Germinativa (QVG) – cromossomos apresentam algum grau de condensação com dispersa distribuição, porém ainda com núcleo de aspecto vesicular.
3. Metáfase I (MI) – cromossomos atingem grau mais elevado de condensação não sendo possível a visualização individual dos mesmos.
4. Metáfase II (MII) – apresentam grupo denso de cromossomos formando o primeiro corpúsculo polar e outro grupo, mais afastado, caracterizado pela placa metafásica.
5. D/NI : degenerados ou não passíveis de identificação.

Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS (Statistical Analysis System) para Windows (2000) e Statistica 6.0. Para avaliação do número de oócitos adquiridos e porcentagem de perda oocitária em diferentes estágios reprodutivos, foi realizado o Teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Para a análise da maturação oocitária, o efeito dos meios de cultivo e do estágio do ciclo estral foram verificados pelo Teste Qui-quadrado. A hipótese H0 determinou que a proporção de oócitos com as diferentes configurações cromossômicas (VG, QVG, MI, AT, MII, DEG) era a mesma em diferentes meios de cultivo e em diferentes status reprodutivos. Assim, quando essa hipótese foi rejeitada, o teste Qui-quadrado foi desmembrado em vários testes e realizadas comparações múltiplas com os tratamentos comparados dois a dois.

Resultados

Avaliação da taxa de recuperação e perdas oocitárias

No presente experimento, foram utilizados ovários provenientes de 36 cadelas, que permitiram a recuperação de 849 oócitos Grau I e com diâmetro superior a 110µm, sendo que parte desses oócitos (662) foi destinada ao presente estudo. Esse dado permitiu o registro do número médio de oócitos adquiridos por animal nas diferentes condições reprodutivas e ainda revelou a extensão das perdas oocitárias ocorridas durante o processo de coloração para avaliação do material nuclear (Tabela 4).

Os resultados mostram que houve variação no número de oócitos recuperados por animal, nas diferentes fases reprodutivas analisadas, sendo que a maior média (45,5 oócitos) foi encontrada em ovários provenientes de cadelas submetidas à indução do estro, e a menor média (24,4 oócitos) encontrada em animais em anestro. Animais em estro natural forneceram em média 28,36 oócitos. A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa entre as médias dos grupos anestro e estro induzido ($p < 0,05$).

Em relação à perda oocitária, observou-se maior perda em oócitos provenientes de cadela em estro (31,91%) e menor perda em animais em estro induzido (10,45%). Animais em anestro apresentaram frequência de perda de 23,05%. Houve diferença estatística entre as frequências dos grupos estro e estro induzido ($p < 0,05$).

Tabela 2. Número de oócitos (Grau I e com diâmetro superior à 110 μm) recuperados de cadelas em diferentes estádios reprodutivos e porcentagem de perda oocitária decorrente do processo de coloração para análise da maturação nuclear. Jaboticabal, 2007.

Parâmetros avaliados	Estádios reprodutivos		
	Anestro	Estro natural	Estro induzido
Oócitos/ animal	24,45 ^a	28,36 ^{ab}	45,55 ^b
% perda oocitária	23,05 ^{ab}	31,91 ^a	10,45 ^b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Avaliação da influência de diferentes meios de cultivo e estádios reprodutivos nas taxas de maturação oocitária

Na tabela 3 pode-se observar a frequência dos diferentes estágios de maturação nuclear de oócitos de cadelas em diferentes condições reprodutivas (anestro, estro e estro induzido) e submetidos à condições de cultivo diversas. Os resultados foram dispostos de forma a permitir a análise individual de cada classificação de configuração cromossômica e uma visão completa dos dados.

Tabela 3. Percentual de oócitos obtidos de fêmeas em anestro, estro e estro induzido, classificados de acordo com os diferentes graus de maturação nuclear, após 72 horas de cultivo em diferentes meios - Jaboticabal- SP, 2007.

Configuração cromossômica	ANESTRO				ESTRO				ESTRO INDUZIDO			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
PI (VG)	12,12	28,23	12,19	17,5 ^A	11,30	14,28	5,45	4,08 ^{AB}	17,24 ^{ab}	24,42 ^a	10 ^{bc}	2,6 ^{cb}
RM (QVG)	33,33	28,20	21,95	22,5	20,97	12,24	32,73	20,40	28,73	23,26	26,25	24,68
MI	12,12	25,64 ^A	24,39	17,5	19,35	22,45 ^A	18,18	22,45	8,04	9,3 ^B	10	14,29
A-T I	6,06	0 ^B	0 ^B	0	4,84	6,12 ^A	5,45 ^A	4,08	2,30	0 ^B	0 ^B	1,29
MII	3,03	0	2,43	10	8,06	4,08	10,91	8,16	8,04 ^a	0 ^b	3,75 ^{ab}	2,6 ^{ab}
DEG	33,33	17,94 ^B	39,02 ^{AB}	32,5	35,48	40,81 ^A	27,27 ^B	40,81	35,63	43,02 ^A	50 ^A	54,54

- Letras minúsculas diferentes na linha diferem entre si na comparação entre meios dentro do mesmo estágio reprodutivo (P< 0,05). Letras maiúsculas diferentes na linha diferem entre si na comparação entre estádios reprodutivos dentro do mesmo meio (P<0,05).

PI-VG: prófase I - vesícula germinativa; RM-QVG:retomada da meiose - quebra de vesícula germinativa; MI: metáfase I; A-T I: anáfase-telófase I; MII: metáfase II; DEG: degenerados ou não passíveis de identificação; M1: meio TCM199; M2: meio TCM199 + progesterona; M3: meio TCM199 + soro de cadela em estro; M4: meio TCM199 + progesterona + soro de cadela em estro.

Vesícula germinativa

Ao se analisar dentro de cada condição reprodutiva, a ação dos diferentes meios, tem-se que, o M2 (meio TCM199 com progesterona) foi o que gerou maior porcentagem de VG nos três grupos de animais, anestro (28,23%), estro (14,28%) e estro induzido (24,42%), mas somente no grupo estro induzido, essa porcentagem diferiu significativamente de outros meios. Assim, no referido grupo houve diferença estatística nas porcentagens de VG entre os grupos M1xM4 ($p<0,01$), M2xM3 ($p<0,05$) e M2xM4 ($p<0,01$). Os menores valores de VG nas fêmeas em anestro foram encontrados no M1 (12,12%), nas em estro e estro induzido, no M4, 4,08% e 2,6% respectivamente, ressaltando que apenas no grupo estro induzido essa porcentagem diferiu das porcentagens dos outros meios (M1 e M2).

Quando se fixa a variável meio, nas diferentes fases reprodutivas, temos que quando utilizado o M1, as maiores valores de VG foram encontrados no grupo estro induzido (17,24%) e os menores (11,30%) no grupo estro, porém não houve diferença estatística entre todos os valores de VG observados no M1. Quando utilizado o M2, observamos maiores valores de VG no grupo anestro (28,23%) e menores no grupo estro (14,28%), mas da mesma forma, não houve diferença estatística entre nenhum valor de VG observado nos M2. O M3 proporcionou maiores valores de VG, para o grupo anestro (12,19%) e menores para o grupo estro (5,45%) e assim como para M1 e M2, estatisticamente não foi observado efeito da fase estral nos oócitos cultivados neste meio. Em relação ao M4 observamos os maiores valores para as fêmeas em anestro (17,5%), sendo que as em estro apresentaram 4,8% de VG e os menores valores foram verificados nas cadelas em estro induzido (2,6%). Neste meio podemos verificar diferença estatística ($p<0,01$) quando comparado os grupos anestro e estro induzido.

Quebra de Vesícula Germinativa (QVG)

Analisando primeiramente o grupo anestro, observou-se maior número de oócitos em QVG no M1 (33,33%) e os menores valores nestas fêmeas foram encontrados no M3 (21,95%). No grupo estro, a maior porcentagem foi observada no M3 (32,73%) e a menor no M2 (12,24%). No estro induzido, o M1 proporcionou maior

porcentagem de QVG (28,73%) e o M2, a menor (23,26%). Nos três grupos não observou-se diferença estatística nas porcentagens de QVG nos diferentes meios utilizados.

Ao se fixar a variável meio, observou-se que, quando utilizado o M1, os maiores valores de QVG foram encontrados no grupo anestro (33,33%), os menores no estro (20,97%). Ao se utilizar o M2, o grupo que apresentou maiores valores de QVG, foi o grupo anestro (28,20%) e os menores valores foram observados no grupo estro (12,24%). Com a utilização do M3, observou-se maiores valores no grupo estro (32,73%) e menores no anestro (21,95%). Ao se analisar a frequência de QVG no M4, verificou-se maiores valores no estro induzido (24,68%) e menores no estro (20,40%). Todos esses valores, ou seja as porcentagens de QVG no mesmo meio analisadas nas diferentes fases, não diferiram entre si ($p < 0,05$).

Metáfase I

No grupo anestro observou-se maior porcentagem de MI, no M2 (25,64%) e menor no M1 (12,12%), mas todos os valores deste grupo não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$). No grupo estro, M2 e M4 proporcionaram os maiores índices de MI (22,45%) e M3, a menor porcentagem (18,18%) e da mesma forma, para esse grupo os valores de MI não diferiram entre os meios ($p < 0,05$). Nas fêmeas em estro induzido, o maior valor de MI foi encontrado no M4 (14,29%) e o menor, no M1 (8,04%) e como para os outros grupos, não houve diferença entre os meios ($p < 0,05$).

Ao se fixar a variável meio tem-se que, utilizando-se o M1, os maiores valores de MI, foram encontrados no grupo estro (19,35%) e os menores valores observados no grupo estro induzido (8,04%), mas não houve diferença estatística entre as fases ($p < 0,05$). Em relação ao M2, observamos no grupo anestro 25,64% de MI, no estro, 22,45% e no grupo estro induzido, 9,3% de MI. Para esse meio podemos observar diferença estatística quando comparamos anestro x estro induzido e estro x estro induzido, sendo que anestro e estro não diferiram entre si ($p < 0,05$). Quando analisado o M3, os maiores valores foram observados no grupo anestro (24,39%) e os menores no estro induzido (10%). Em relação ao M4, observamos maiores valores no grupo estro

(22,45%) e menores no estro induzido (14,29%), porém para esses dois meios não observou-se diferenças significativas entre as fases ($p < 0,05$).

Anáfase-Telófase

Nas cadelas em anestro, o único meio onde foram encontrados oócitos em A-T, foi o M1 (6,06%), porém esse valor não foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Nas em estro, observamos maiores valores no M2 (6,12%) e menores no M4 (4,08%), mas não houve diferença estatística entre os quatro meios utilizados. Nas cadelas em estro induzido os grupos que proporcionaram A-T foram M1 (2,30%) e M4 (1,29%), mas também esses valores não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Ao se fixar a variável meio observamos que quando utilizado o M1, não houve efeito da fase do ciclo estral sobre as porcentagens de A-T. Quando utilizado o M2, só se pode observar oócitos em A-T nas fêmeas em estro (6,12%) e esse valor difere dos valores encontrados em anestro e estro induzido ($p < 0,05$), o mesmo foi verificado ao se utilizar o M3. Quando se analisa o efeito das fases no M4, pode-se afirmar que não há diferença entre as fases ($p < 0,05$).

Metáfase II

No grupo anestro observou-se maior porcentagem de MII, no M4 (10%) e menor no M2 (0%), mas todos os valores deste grupo não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$), ou seja, os meios, no grupo anestro não influenciaram nas taxas de MII. No grupo estro, M3 proporcionou maior índices de MII (10,91%) e M2, a menor porcentagem (4,08%) e da mesma forma, para esse grupo os valores de MII não diferiram entre os meios ($p < 0,05$). Nas fêmeas em estro induzido, o maior valor de MII foi encontrado no M1 (8,04%) e o menor, no M2 (0%), sendo que esses valores foram os únicos a apresentarem diferença significativa entre si ($p < 0,01$).

Ao se fixar a variável meio temos que, utilizando-se o M1, os maiores valores de MII, foram encontrados nos grupos estro (8,06%) e estro induzido (8,04%). Com o M2, o grupo estro apresentou 4,08% de MII. Com o M3, o grupo estro apresentou 10,91% de MII e com o M4, o grupo estro apresentou 10% de MII. Na análise dos dados constatou-

se não haver influência da fase estral sobre as taxas de MII, independente do meio utilizado ($p < 0,05$).

Degenerados ou não passíveis de identificação

As taxas de degenerados que se mostraram altas no presente estudo não apresentaram variabilidade dentro de cada fase estral quando analisados os diferentes meios.

Quando fixa-se a variável meio, pode-se observar que utilizando-se o M1, não houve diferença entre os diferentes estádios reprodutivos. Quando utilizou-se o M2, observou-se que o grupo anestro apresentou a menor taxa de oócitos degenerados (17,94%) em comparação aos outros grupos, sendo que estes (estro e estro induzido) não diferiram entre si nas porcentagens de degenerados ou não passíveis de identificação. Quando analisados os oócitos maturados no M3, observou-se que o grupo estro induzido apresentou a mais alta taxa de degenerados (50%), esse valor diferiu apenas do grupo estro que apresentou 27,27% de oócitos degenerados ($p < 0,01$). Quando utilizou-se o M4 não observou-se diferença entre as fases.

Pode-se observar que embora não haja diferenças estatísticas quando utilizou-se o M1 e o M4, independente do meio utilizado, o grupo estro induzido sempre apresentou as maiores taxas de oócitos degenerados ou não passíveis de identificação.

Discussão

Os protocolos de maturação atuais buscam mimetizar as condições hormonais *in vivo*, porém os experimentos até agora efetuados não alcançaram êxito considerável, com taxas de maturação completa reduzidas, variando de 0 a 42% (FARSTAD, 2000). Dentro deste contexto, questões relativas à suplementação hormonal dos meios de cultivo, bem como a fase reprodutiva em que se encontra a doadora de oócitos, têm sido estudadas por inúmeros autores que buscam na manipulação desses fatores, aumentar as taxas de MIV canina.

Baseando-se no fato de que a recuperação dos oócitos caninos predispõe a perda ovariana, já que os ovários são submetidos à fatiamento, tem se buscado também estudar em qual fase reprodutiva da cadela há maior recuperação de oócitos Grau I. Esses estudos são ainda justificados principalmente ao se remeter o motivo nobre que suporta as pesquisas com MIV canina, que é a preservação de material genético. Considerando a necessidade de se manipular oócitos de uma fêmea canídea em extinção, é imprescindível que se conheça em qual fase do ciclo estral da mesma, haverá maior taxa de recuperação oocitária.

No estudo de MACHADO (2007), a maioria das doadoras (54,05%) estava em diestro, obtendo-se nesta fase 39,2 COCs Grau I por doadora. Do total de doadoras, 18,91% estavam em anestro com, 38 estruturas por fêmea, e 5,40% em estro com 59 estruturas por fêmea.

APPARÍCIO (2006) trabalhando com MIV de cadelas em diferentes fases do ciclo estral relatou média de 56,7 oócitos recuperados em fêmeas em fase folicular, 57,3 oócitos de fêmeas em fase luteal e 32,0 oócitos de fêmeas em anestro, sendo esses números relativos à oócitos Grau I. OTOI et al. (2001) analisando o número de oócitos Grau I e com diâmetro superior à 110µm, encontraram média de 8,37 oócitos por fêmea em anestro, 34,25 oócitos por fêmea em fase folicular e 13,67 oócitos por fêmea em diestro, demonstrando haver influência da fases do ciclo sobre o número de oócitos recuperados. Em discordância FUJII et al. (2000) e RODRIGUES & RODRIGUES (2003) não observaram diferenças entre as proporções de oócitos recuperados de fêmeas em anestro e estro.

Os dados do presente estudo demonstram números inferiores aos encontrados pelos referidos autores, com exceção do número de oócitos recuperado por fêmea em anestro, citado por OTOI et al. (2001), pois encontramos média superior (24,45 oócitos). Podemos supor que o autor supra citado tenha trabalhado com fêmeas em estágio mais precoce do anestro, em comparação às nossas cadelas. Ainda, consideramos nossos números muito satisfatórios visto que selecionamos apenas oócitos grau I e com diâmetro superior a 110µm.

A média do número de oócitos adquiridos de fêmeas submetidas à indução do estro (45,45 oócitos), foi superior à dos outros grupos e estatisticamente diferente do grupo anestro, o que demonstrou a eficiência do protocolo de indução utilizado ($p < 0,05$). Assim, embora os índices de fertilidade não sejam satisfatórios quando se realiza a indução do estro com gonadotrofinas, observamos que esse protocolo de indução é muito eficaz para proporcionar o crescimento folicular e oocitário. Ainda nossos resultados corroboram com FUJII et al. (2000) e RODRIGUES & RODRIGUES (2003) pois, estatisticamente, não houve diferença no número de oócitos fornecidos pelas fêmeas em estro e anestro.

A perda de oócitos foi descrita em altas proporções por THEISS (1997), HEWITT et al. (1998) e ROTA & CABIANCA (2004), tanto na colheita quanto após o cultivo. Essas perdas são atribuídas aos processos de maturação, retiradas da camada de células do *cumulus*, retirada da zona pelúcida, passagem por solução ácida e várias outras lavagens em soluções, etapas necessárias para os processos de coloração nuclear e citoplasmática e descritas na metodologia de coloração.

Como sabido o oócito Grau I, que é o apto à MIV, apresenta uma ou mais camadas de células do *cumulus*, compactas e muito resistentes. O processo inicial de coloração exige a retirada dessas células, o que foi feito com pipetagens sucessivas dos mesmos em solução de hialuronidase. Muitas oócitos já se degeneraram nessa fase, perdendo as características de núcleo escuro, apresentando quebra de zona pelúcida e perda de material nuclear para o meio exterior. Essas alterações degenerativas muitas vezes aconteceram antes mesmo que as células do *cumulus* tivessem sido totalmente removidas.

Admitindo-se que a solução de hialuronidase é preparada dentro de um protocolo de diluição padronizado para oócitos bovinos, pode-se supor que a concentração preconizada não seja a ideal para manter a integridade e ao mesmo tempo remover as células do *cumulus* de oócitos caninos.

VANUCCHI (2003) relatou perda oocitária de 22,09% durante todo o processo de maturação, PIRES (2006) referiu perda de 34,6%, mas MARTINS (2005) descreveu perda de apenas 4,07%. APPARÍCIO (2006) descrevendo as taxas de perda nas

diferentes etapas de coloração, encontrou perda de até 49%, muito embora esse autor tenha trabalhado com coloração nuclear e citoplasmática, fato que certamente aumentou as perdas.

As porcentagens de perdas na presente pesquisa mostraram-se estatisticamente diferentes somente quando comparamos o grupo estro ao estro induzido, sendo que esse último apresentou a menor porcentagem de perda (10,45%). Não há até então, relatos de comparação de perdas oocitárias em procedimentos de coloração comparando-se diferentes fases do ciclo estral, mas acreditamos que a baixa porcentagem de perdas no grupo estro induzido está diretamente relacionada às altas taxas de oócitos degenerados ou não passíveis de identificação após coloração, ou seja, esses oócitos foram mais resistentes em suportar as etapas de coloração, mantendo-se estruturalmente íntegros, porém essa integridade foi aparente já que o material nuclear mostrou-se degenerado.

Em relação aos índices de MIV, é consenso que atualmente, a taxa de maturação oocitária em fêmeas caninas é caracterizada por resultados variáveis e inexpressivos, fato que provavelmente se deva à baixa competência dos oócitos selecionados ou às condições inadequadas de cultivo (FARSTAD, 2000; LUVONI et al., 2005).

Sabe-se que a maturação oocitária canina ocorre sob altas concentrações de progesterona, em um microambiente (tuba uterina) previamente modificado por ações estrogênicas (KIM et al., 2005). Esses mesmos autores analisando o efeito da suplementação de progesterona e estradiol ao meio de maturação concluíram que a associação desses hormônios esteróides, na concentração de 2µg/mL, apresenta melhor efeito sobre a maturação de oócitos caninos (16,6% a MII) quando comparada com a mesma concentração isoladamente (com estrógeno, 14,7% e com progesterona 10,8%). Os meios do presente estudo continham P₄ na concentração de 10µg/mL, baseado na citação de WILLINGHAM-ROCKY et al. (2003), de que a concentração de progesterona encontrada no fluido folicular pré ovulatório é de cerca de 7,7µg/mL, valor encontrado após a onda de LH e quando a concentração plasmática de P₄ era superior a 7ng/mL.

Ainda dentro deste contexto e em concordância, VANUCCHI (2003) evidenciou um efeito benéfico da progesterona sobre as taxas de QVG (35,29%), principalmente nos períodos mais avançados de maturação (72 horas). Descreveu também que em uma avaliação realizada após 48 horas, encontrou as menores taxas de VG (30,0%) e a maior proporção de oócitos em MII (3,33%).

No presente estudo, não podemos afirmar que houve superioridade dos meios suplementados com progesterona, no sentido de proporcionarem menores taxas de VG. Nossos dados, portanto, corroboram com as afirmações de WILLINGHAM-ROCKY et al. (2003), que ao pesquisar o efeito da suplementação de P_4 ao meio de cultivo, não evidenciaram efeito benéfico da mesma sobre as taxas de MIV, mesmo trabalhando com diversas concentrações desse hormônio (0, 20, 200 e 2000ng/mL). Ainda, ao analisarmos as taxas de MII em nosso estudo, verificamos que no grupo das cadelas em estro induzido (único que apresentou diferenças significativas nas taxas de MII de acordo com o meio utilizado), o M1 (sem suplementação alguma) mostrou índices de MII (8,05%) significativamente superiores ao M2 (com suplementação de progesterona). Esse fato nos faz inferir sobre algum efeito prejudicial da adição de progesterona e reforça a conclusão de que neste experimento a adição desse hormônio não foi benéfica para a MIV.

Segundo LUVONI et al. (2005), é bem conhecido que o soro sanguíneo exerce efeito positivo sobre a maturação oocitária. Ele contém, além de componentes protéicos, vários hormônios, como gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento e por essa razão é difícil atribuir à um componente específico, sua ação benéfica sobre a MIV.

Sobre o efeito de diferentes fontes protéicas, RODRIGUES & RODRIGUES (2003), compararam soro de cadela em estro (SCE), SVE e BSA e, observaram que as maiores taxas de MI (20%) foram obtidas no meio com BSA. Os oócitos submetidos à MIV em meio contendo 10% de SCE não progrediram à MII (10,4% MI e 0% MII), mas os índices de MI nesse grupo foram superiores aos apresentados pelo grupo de oócitos em meio com SVE.

Os resultados de MARTINS (2005) demonstram taxas de 9,79% de MI em fêmeas em anestro e 25% de MI em fêmeas em estro, quando submetidos à maturação em TCM 199 com SCE.

OTOI et al. (1999) avaliaram a influência de várias concentrações (5, 10 e 20%) de soro de cadela em anestro, estro e diestro na MIV canina. Os autores concluíram que o soro de cadela em estro, na concentração de 10%, é o tratamento ideal pois proporcionou a mais elevada taxa de oócitos em MI e MII (26% e 17%, respectivamente). Os autores ainda justificaram esses índices afirmando que este tratamento mimetiza os eventos pré-ovulatórios *in vivo*.

Os dados do presente estudo permitiram sugerir sobre possível efeito positivo do uso do soro de cadela em estro, especificamente quando observamos as taxas de VG, dentro do grupo estro induzido. Neste grupo os meios 3 e 4 apresentaram menores taxas de VG, o que mostrou que nesses meios, esse grupo de oócitos apresentou maior capacidade de retomada da meiose. Mas quanto aos valores de MI e MII, pode-se afirmar que nas condições deste estudo não foi verificado efeito positivo da adição do soro. Esses dados podem ser confirmados pois, dentro do grupo estro induzido, que foi o único a apresentar diferença significativa entre os meios, encontrou-se que os meios 3 e 4 não foram significativamente diferentes do meio 1 (sem suplementação). Pode-se perceber então que neste grupo, os oócitos apresentaram maior capacidade de retomada da meiose (demonstrada pelas baixas taxas de VG), mas essa retomada não foi traduzida em maturação à MI ou MII.

Em relação à influência da fase estral sobre as taxas de MIV, as pesquisas atuais também trazem resultados controversos. Dentre os pesquisadores que compartilham da idéia de que a fase do ciclo estral influencia as taxas de MIV, estão YAMADA et al. (1993), OTOI et al. (2001), OTOI et al. (2001) e MARTINS (2005). OTOI et al. (2001) referem índice de 41% de MII em óocitos provenientes de fêmeas em estro natural. Da mesma forma, MARTINS (2005) encontrou taxa de 25% de MI em oócitos de fêmeas em estro contra 9,79% de MI em oócito de fêmeas em anestro. YAMADA et al. (1992) relataram taxa de MII de 32% em oócitos pré ovulatórios. Estes autores

realizaram indução de estro com eCG, hCG e estradiol objetivando a estimulação folicular e conseqüente obtenção de oócitos mais competentes.

Segundo GRAZUL-BILSKA et al. (1997), a aquisição de competência meiótica e competência citoplasmática são controladas por comunicações intercelulares, entre as células do *cumulus* e o oócito, pelas quais ocorre a passagem de nutrientes, íons e pequenas moléculas, como o Ca^{2+} e AMPc. Essas comunicações, denominadas “gap junctions” foram estudadas por LUVONI et al. (2001), que concluíram que essas junções estão fechadas durante a fase do anestro e abertas no estro. Esse achado suporta a idéia de influência da fase estral sobre as taxas de MIV, porém nenhuma conclusão adicional pode ainda ser feita.

Em nosso estudo, observou-se diferença significativa entre as fases quando utilizamos o M4. Nessas condições, verificou-se superioridade da fase estro induzido em relação ao anestro, traduzida por baixas taxas de VG (2,6%). Neste caso pode-se até inferir sobre o efeito negativo da ausência de junções “gap” abertas, na fase do anestro, porém esperava-se dentro desse contexto que também o grupo estro fosse significativamente superior ao anestro, o que não ocorreu. Quando avaliadas as taxas de MI, também foram observadas diferenças entre as fases, especificamente quando se utilizou o M2. Nessas condições anestro e estro mostraram resultados semelhantes e ambos foram significativamente superiores ao grupo estro induzido, que apresentou 9,3% de MI.

Sobre a relação entre as porcentagens de oócitos maturados e a fase do ciclo estral das doadoras, RODRIGUES & RODRIGUES (2003), APPARÍCIO (2006) e HEWITT & ENGLAND (1997), não encontraram correspondência entre esses fatores. RODRIGUES & RODRIGUES (2003), encontraram porcentagens de MII de 5,4% no grupo estro, 4,2% no diestro e 4,4% no anestro, sendo que esses valores não diferiram entre si. Em consonância, APPARÍCIO (2006) relatou taxa de 10% de MII na fase folicular, 6,6% na lútea e 5% no anestro e embora as taxas na fase folicular sejam maiores, esses números não diferiram estatisticamente entre si, mas o referido autor, avaliando a maturação citoplasmática encontrou evidências de correlação positiva entre as fases lútea e folicular e o estágio de classificação nuclear.

Nossos dados corroboram com os estudos acima pois na análise das taxas de MII, que é o índice de maturação desejado, não observamos diferença significativa entre as diferentes fases, nos diferentes meios.

Em relação à porcentagem de degenerados ou não passíveis de identificação, encontramos que quando utilizado o M2, houve diferença entre as fases, com estro e estro induzido apresentando taxas altas, semelhantes entre si e significativamente diferentes do anestro. Quando utilizado o M3, o estro induzido apresentou taxas mais elevadas de degenerados. Esses resultados podem nos conduzir à uma suspeita de certo efeito negativo da suplementação de progesterona para os animais em estro e ainda, as altas taxas de degenerados no grupo estro induzido estão correlacionadas às baixas perdas durante o processo de coloração, como já mencionado.

Assim, nas condições do presente estudo pode-se concluir que:

1. A indução do estro favorece a obtenção de oócitos Grau I e com diâmetro superior a 110 μ m;
2. A perda oocitária durante o processo de coloração é menor quando se realiza indução do estro;
3. A suplementação de progesterona não apresentou efeito positivo na retomada e progressão da meiose;
4. É interessante o uso do soro de cadela em estro para a retomada da meiose de oócitos caninos;
5. Em meio suplementado com progesterona e soro de cadela em estro, os estádios reprodutivos anestro e estro proporcionam maiores índices de MI e as taxas de degeneração oocitária são maiores em animais em estro induzido.

REFERÊNCIAS

APPARÍCIO, M.F. **Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática in vitro de oócitos de cadelas (Canis familiares) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia**. 61f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2006.

DEW, E.V. **In vitro maturation of the canine oocyte**. 56f. Thesys (Master of Sciences) – University of Georgia, 2001.

DULCIBELLA, T. Biochemical and cellular insight into the temporal window of normal fertilization. **Theriogenology**, v.49, p.53-65, 1998.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Repeatability of events during spontaneous and gonadotrophin-induced oestrus in bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, n.2, p.443-448, 1991.

ENGLAND, G.C.W.; HEWITT, D.A. Follicular growth and ovulation in dogs. In: **EVSSAR Annual Symposium**, Lyon, 1999, p.51.

FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v.52, p. 175-186, 2000

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. The ovarian cycle & vaginal cytology in the bitch. In: DI BRYDEN (Ed) Internal Medicine. **Proceedings** 284, The Post-Graduate Foundation in Veterinary Science of the University of Sydney, 1997, p. 273-288.

FUJII, M.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; TANAKA, M.; UNE, S.; SUZUKI, T. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, n.3, p.305-307, 2000.

FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. Effects of the duration of exposure to hormone supplementa on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 179-185, 1993.

GRAZUL- BILSKA, A.T. Effects of second messengers on gap junctional intercellular communication of ovine luteal cells throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.57, p. 947-957, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p.83-91, supplement, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.957-966, 1998.

HOLST, P.A.; PHEMISTER R.D. The prenatal development of dog, preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v.5, p. 771-779, 1971.

JHONSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Sexual differentiation and normal anatomy of the bitch. In:___**Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. 1v, p. 1-14.

KIM, M.K.; FIBIRANTO, Y.H.; GOO JANG, H.J.O.; KIM, H.J.; LEE,K.S.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. Effects of estradiol-17 β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1342-1353, 2005.

KOOISTRA, H.S. Concurrents pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of estrous cycle and anestrus in beagle bitches. **Biology of Reproduction**, v. 60, n.1, p.65-71, 1999.

LEAVIT, W.W.; BOSLEY, C.G.; BLAHA, G.C. Source of ovarion preovulatory progesterone. **Nature New Biology**, v.234, n.52, p. 283-284, 1971.

LUVONI, G.C.; COLOMBO, C. Effect of L-cysteine on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. In: ENNE, G.; GREPPI, G.F.; LAURI, A. (Eds), **Reproduction and Animal Breeding** : Advances and Strategy. Paris: Elsevier, p.403-404, 1995.

LUVONI, G.C.; LUCIANO, A.M.; MODINA, S.; GANDOLF, F.; Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.57,suppl 30, p.141-146, 2001.

LUVONI, G.C; CHIGIONI,S.; ALLIEVI, E.; MACIS,D. Factors involved in vivo and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.41-59, 2005.

MACHADO, M. A. **Efeito do fator de crescimento IGF-I sobre a maturação *in vitro* de oócitos caninos (*Canis familiaris*): Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática**. 78f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2007.

MARTINS, L.R. **Maturação nuclear de ovócitos de cadelas em estro e anestro submetidos à maturação *in vitro*** . 74f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2005.

MIALOT, J.P. **Patologia da Reprodução dos Carnívoros Domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1988, p.34-40.

NICKSON, D.A.; BOYD, J.S.; ECKERSALL, P.D.; FERGUSON, J.M.; HARVEY, M.J.; RENTON, J.P. Molecular biology methods of monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl v.47, p.231-240, 1993.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.;OOKA, A.; SUZUKI,T. Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, n. 7-8, p. 387-390, 1999.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.;OOKA, A.; SUZUKI,T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v. 54, p. 535-542, 2000.

OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI,M.; KARJA, N.W.K.; SUZUKI, T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrus cycle. **Journal and Fertility Development**, v. 13, p. 151-155, 2001.

PIRES, E. A. **Efeito da Suplementação de cistéina e cisteamina sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (Canis familiares) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia durante a fase pré-ovulatória do estro**. 66p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dog. **Theriogenology**, v. 60, p. 59-66, 2003.

ROTA, A.; CAMBIANCA, G. In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrus bitches in simple media. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 44(2), p.105-109, 2004.

SCRIBAN, R. Les biotechnologies de la reproduction animal. cap 6. In: **Biotechnologie**, 5 ed. Paris: TEC et DOC, 1999.

SONGSASSEN, N.; SPINDLER, R.; WILDT, D.E. Follicular size, but not stage of reproduction or season, influences meiotic maturation of domestic dog oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, n.2, p. 282-283, 2004.

THEISS, T. **Investigations on the collection, in vitro maturation and fertilization of dog oocytes**. 97f. Tese. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilian Universität Munich, 1997.

VANNUCCHI, C.I. **Estudo da maturação in vitro de oócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina.**, 2003, 77p., Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

WILLINGHAM-ROCKY, L.A.; HINRICHS, K.; WESTHUSIN, M.E.; KRAEMER, D.C. Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.501-508, 2003.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Maturation, fertilization and development of dog oocyte in vitro. **Biology of Reproduction**, v.46, n.5, p. 853-858, 1992.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl 47, p. 227-229, 1993.

YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G.; FAYRER-HOSKEN R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. **Gamete Research**, v.23, p.189-201, 1989.

CAPÍTULO 3 - INCIDÊNCIA DA MATURAÇÃO NUCLEAR INTRAOVARIANA DE OÓCITOS DE FÊMEAS CANINAS EM ANESTRO, ESTRO NATURAL E ESTRO INDUZIDO

RESUMO – O principal objetivo das pesquisas com MIV canina tem sido o desenvolvimento e implementação adequados da fecundação *in vitro* (FIV) e do cultivo embrionário *in vitro* (CIV) para a obtenção de embriões das espécies de canídeos em extinção. Concomitantemente à publicação de dados sobre índices de MIV em cadelas, surgiram alguns relatos sobre taxas de maturação completa e indícios de retomada da meiose em oócitos provenientes de folículos pré-ovulatórios. Assim, o presente estudo objetivou investigar a incidência de maturação oocitária intraovariana de cadelas em anestro, estro natural e estro induzido. Os oócitos foram colhidos após fatiamento ovariano e imediatamente corados com bisbenzimida para avaliação dos diferentes graus de configuração cromossômica. Em conclusão podemos afirmar que há retomada e progressão da meiose em oócitos, no ambiente intrafolicular; não há diferença estatística ($P < 0,05$) nas porcentagens das diferentes configurações cromossômicas de acordo com os estádios reprodutivos avaliados neste estudo (anestro/estro e estro induzido).

Palavras-chave – oócito, ovário, maturação nuclear, cadela, estro, anestro

CHAPTER 3 – CANINE FEMALE OOCYTES INTRAOVARIAN NUCLEAR MATURATION INCIDENCE IN ANESTRUS NATURAL ESTRUS AND ESTRUS-INDUCED

ABSTRACT – The main canine MIV research goal has been adequate *in vitro* fecundation develop and implementation (FIV) and the *in vitro* embryo cultivation (CIV) to obtain in extinction canid species embryos. Concomitantly to data publication about bitch MIV indexes appeared some relates about complete maturation rates and indications of meiosis retaken in oocytes from pre-ovulatory follicles. This way, the present study aimed investigate the anestrus bitches ovariovarian oocytary maturation incidence, natural estrus and estrus-induced. The oocytes were collected after the ovary slicing and immediately colored with bisbenzimidazole to evaluate the different chromosomic configuration degrees. As a conclusion, can be affirmed there is meiosis progression and resumption in oocytes, in the intra follicular environment. There were no statistical difference ($P < 0.05$) between the different chromosomic configurations percentages according to the reproductive stages evaluated in this study (anestrus/estrus and estrus-induced).

Keywords – oocytes, ovary, nuclear maturation, bitch, estrus, anestrus

Introdução

O processo de maturação *in vitro* de oócitos de fêmeas caninas tem sido objeto de exaustivos estudos, pois o domínio do mesmo constitui-se o fator primordial para o desenvolvimento e implementação adequados da fecundação *in vitro* (FIV) e do cultivo embrionário *in vitro* (CIV), fato que permitiria portanto, a obtenção de embriões das espécies de canídeos em extinção (PIRES, 2006).

As características da fisiologia reprodutiva canina são peculiares e ainda não totalmente esclarecidas, fato que pode ser responsável pelas baixas taxas de MIV dos oócitos nesta espécie.

O ciclo estral das cadelas compreende um período de inatividade sexual, conhecido como anestro, que é seguido por outro de atividade reprodutiva, cuja manifestação principal é definida como estro. Esta forma de apresentação cíclica e os espaçamentos interestro de 5 a 12 meses fazem com que a fêmea canina seja referenciada na literatura como uma espécie monoéstrica não estacional (CONCANNON et al., 1989). Ainda, o ciclo reprodutivo apresenta fases distintas estabelecidas por alterações hormonais que induzem a transformações de ordem morfológica e clínica, sendo as fases, o proestro, estro, metaestro/diestro e anestro (JÖCHLE & ANDERSEN, 1977).

A fase folicular (proestro e estro inicial) é o tempo no qual os folículos ovarianos estão se desenvolvendo e aumentando de tamanho com a aproximação da ovulação (HOSZEL, 1975). Depois da ovulação há a formação do corpo lúteo, que é seguido por um período de duração variável, o anestro. Um aumento na secreção do LH sinaliza o final do anestro e o retorno à atividade ovariana (CONCANNON, 1993; VAN HAFTEN et al., 1994).

Os oócitos são células haplóides que iniciam processo de mitose quando migram do saco vitelínico embrionário para o local de desenvolvimento gonadal, onde são denominados oogônias (WASSARMAN & ALBERTINI, 1994). Quando a mitose é cessada, inicia-se a meiose que ocorre em momentos distintos de acordo com a espécie animal, sendo que em canídeos o processo de meiose inicia-se algumas

semanas após o nascimento (ANDERSEN, 1970). A meiose ocorre em duas etapas, meiose I e meiose II e cada etapa é compreendida por quatro fases: prófase (com cinco estágios : leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e vesícula germinativa), metáfase, anáfase e telófase (BAKER, 1982). Ainda, segundo DULCIBELLA (1998), na maioria dos mamíferos, o processo de desenvolvimento oocitário sofre dois momentos de estagnação, em PI e em MII. A primeira estagnação é interrompida com o processo de crescimento folicular, quando, caracterizando o processo de maturação oocitária, há transição do estágio de vesícula germinativa (VG) ao estágio de metáfase II e a segunda estagnação é quebrada com a fecundação (DEW, 2001).

Em bovinos, o processo de maturação *in vivo* à MII tem início concomitantemente com o pico de LH e *in vitro*, com a retirada do oócito do ambiente folicular. Para completar esse processo de maturação nuclear de oócitos bovinos, é requerido um período de 18-24 horas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (SIRARD, 2001).

Porém, como citado por LUVONI et al. (2005), oócitos caninos são ovulados imaturos, em estágio de vesícula germinativa, enquanto as outras espécies ovulam oócitos MII. Assim, nos canídeos, o oviduto sustenta por longo período oócitos imaturos e é o sítio da evolução à MII, bem como da fecundação e desenvolvimento à blastocisto (HOLST & PHEMISTER, 1971). Segundo OTOI et al., (2000) os oócitos caninos necessitam de dois a cinco dias para completarem a maturação meiótica no oviduto.

A despeito dessas informações, HEWITT & ENGLAND (1998) estudaram a incidência de maturação nuclear intrafolicular de cadelas e encontraram como achado interessante, oócitos em estágio de quebra de vesícula germinativa e metáfase I, provenientes de ovários de cadelas em diferentes fases do ciclo estral. Os autores relatam que tais achados não haviam sido descritos anteriormente.

Assim, esse estudo objetivou investigar a incidência de maturação oocitária intraovariana de cadelas em anestro, estro natural e estro induzido.

Material e Métodos

Animais

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Reprodução Animal, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal. Para este estudo foram utilizados ovários de 30 fêmeas caninas, em anestro, estro natural e estro induzido. A população oocitária dos ovários dessas cadelas foi subdividida entre esse estudo e experimentos de maturação *in vitro*, de forma que para a presente análise foram destinados 162 oócitos.

Determinação da fase do ciclo estral

Durante a realização de cadastro dos animais para a introdução dos mesmos no experimento, eram obtidas informações sobre o último ciclo reprodutivo e a partir desse dado, os mesmos eram direcionados para constituírem os grupos dos animais em anestro, estro ou estro induzido.

Os animais destinados a compor o grupo ANESTRO eram submetidos à citologia vaginal e dosagem sérica de progesterona para a confirmação da fase. Eram destinados à fornecer oócitos para esse grupo, os animais que apresentavam na citologia vaginal, baixa celularidade com predomínio de células basais e parabasais e dosagem sérica de progesterona inferior a 1ng/mL. A citologia vaginal era realizada segundo MIALOT (1988). Após a confirmação dessa fase do ciclo estral, as fêmeas eram submetidas à OSH para colheita dos ovários. Todas as dosagens de progesterona, neste experimento, foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas - Endomed, na cidade de Jaboticabal- SP, pelo do método de quimioluminescência.

As cadelas destinadas a compor o grupo ESTRO eram, após os primeiros sinais de proestro, imediatamente submetidas à citologia vaginal em dias alternados para acompanhamento da progressão da fase folicular. Esse exame era realizado até a determinação do início do estro, quando na citologia vaginal denotava-se presença de cerca de 90% de células superficiais e superficiais anucleadas. Doze horas após,

amostra de sangue era colhida e encaminhada para dosagem sérica de progesterona a fim de se prever o momento da ovulação, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Relação entre dosagem sérica de progesterona e estimativa do momento da ovulação em fêmeas caninas.

[P4] ng/ml	Momento estimado da ovulação
1.0-1.9	Em até 48 horas
2.0-3.9	Em até 24 horas
4.0-10.0	Houve ovulação ou está ovulando

JHONSTON et al. (2001)

Com base nos resultados de dosagem de progesterona realizávamos a OSH para coleta dos ovários, em tempo médio de 12 horas antes da ovulação estimada.

Os animais que formaram o grupo ESTRO INDUZIDO foram submetidos à uma triagem, de modo que somente foram selecionados animais em anestro comprovado por citologia vaginal e dosagem sérica de progesterona. Isto posto, iniciávamos o protocolo de indução que compreendia o seguinte esquema:

eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	hCG		OSH
d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11

d0 a d1 : dia 0 ao dia 11

eCG (gonadotrofina coriônica eqüina): 30UI/kg, IM, uma vez ao dia

hCG (gonadotrofina coriônica humana): 500UI/ animal, IM, em aplicação única

O protocolo de indução utilizado foi adaptado de ENGLAND & ALLEN (1991) e no 12º dia de tratamento (d11), realizou-se a OSH para colheita dos ovários.

Obtenção e classificação dos oócitos

Após a OSH, os ovários foram colhidos assepticamente, imersos em solução fisiológica 0,9% a 37°C (Figura 2A) e imediatamente encaminhados ao Laboratório de Reprodução Animal desta Universidade. Em placa aquecida, os mesmos foram fatiados em solução de PBS com 10% de SFB, a 37°C, e assim os complexos oócito-*cumulus* (COCs), liberados (Figura 2B)

Os oócitos foram rastreados sob lupa estereomicroscópica, avaliados com relação à homogeneidade do citoplasma, número de camadas de células do *cumulus*, conforme os critérios morfológicos adotados por HEWITT & ENGLAND (1997). Os oócitos também foram selecionados pela mensuração de seu diâmetro sendo que somente foram destinados à esse estudo, oócitos com diâmetro superior a 110µm em COCs Grau I.

Os COCs selecionados foram passados três vezes em meio de lavagem (Apêndice G) antes de submetidos aos processos de coloração para determinação do grau de maturação nuclear.

Avaliação do estágio de maturação nuclear

Imediatamente após a lavagem, os oócitos foram colocados em placas de Petri contendo 200 µL de solução de hialuronidase a 0,2% e aspirados repetidas vezes com pipeta de 100 µL para remoção completa das células do *cumulus*. Na sequência, foram passados três vezes em meio de lavagem para inativação da enzima. Ato contínuo, foram transferidos para solução de paraformaldeído a 4%, onde permaneceram por 5 minutos para fixação. Após foram novamente passados em meio de lavagem por três vezes e transferidos para solução de Triton 100x (1%) em PBS por 10 minutos. Ao término deste processo, os oócitos foram colocados em lâmina de microscopia contendo uma gota de bisbenzimide (Hoechst 33342) em glicerol (0,001%) e a seguir foram cobertos por lamínula.

Uma lista composta pelas especificações sobre reagentes e hormônios utilizados neste experimento, encontra-se sob título de Apêndice J.

Classificação dos estágios de maturação

A classificação do estágio de maturação nuclear foi realizada segundo os critérios adotados por HEWITT & ENGLAND (1997), baseado na morfologia do DNA, por graus variados de condensação cromossômica (Figura 1). A avaliação foi realizada em microscópio invertido equipado com luz ultravioleta e filtro de 365-420 de excitação/emissão. Assim, os graus avaliados foram:

1. Vesícula Germinativa (VG - prófase I) – presença de núcleo vesicular com cromossomos pouco condensados.
2. Quebra de Vesícula Germinativa (QVG) – cromossomos apresentam algum grau de condensação com dispersa distribuição, porém ainda com núcleo de aspecto vesicular.
3. Metáfase I (MI) – cromossomos atingem grau mais elevado de condensação não sendo possível a visualização individual dos mesmos.
4. Metáfase II (MII) – apresentam grupo denso de cromossomos formando o primeiro corpúsculo polar e outro grupo, mais afastado, caracterizado pela placa metafisária.
5. D/NI : degenerados ou não passíveis de identificação.

Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS (Statistical Analysis System) para Windows (2000). Utilizou-se testes não paramétricos, sendo o efeito dos estágios do ciclo estral verificado pelo teste Qui-quadrado.

O nível de significância para rejeitar a hipótese de nulidade (a distribuição dos diferentes graus de maturação independe do estágio estral) foi de 5%, isto é, para $p < 0,05$, considerou-se que ocorreram diferenças significativas entre as variáveis (*status* reprodutivo) para um determinado estágio de maturação (VG, QVG, MI, MII, D/NI).

Resultados e Discussão

Existem várias diferenças entre a fisiologia reprodutiva canina e a da maioria dos outros mamíferos. Tem sido reportado que cadelas ovulam oócitos primários que passarão por processo de maturação dentro do oviduto (HOLST & PHEMISTER, 1971). Em contraste, a maioria das outras espécies de mamíferos tem maturação oocitária dentro do folículo pré ovulatório. Essa peculiaridade da reprodução da fêmea canina, bem como outros aspectos relacionados à endocrinologia de cada fase do ciclo estral e especificamente da ovulação, tem tornado o processo de maturação *in vitro* dos oócitos caninos, um campo de pesquisa extremamente desafiador.

O principal objetivo das pesquisas com MIV canina tem sido o desenvolvimento e implementação adequados da FIV e do CIV para a obtenção de embriões das espécies de canídeos em extinção (PIRES, 2006). Esse aspecto deve-se ao fato de a fêmea canina constituir-se modelo experimental para esses canídeos, dentre eles o cachorro-do-mato vinagre (*Spheothos venaticus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), que são espécies da fauna brasileira.

Concomitantemente à publicação de dados sobre índices de MIV em cadelas, surgiram alguns relatos sobre taxas de maturação completa e indícios de retomada da meiose em oócitos provenientes de folículos pré ovulatórios, ou seja, certo grau de maturação intraovariana tem sido relatado. Esse aspecto merece certa atenção, considerando a urgência da preservação de alguns canídeos, já que mediante a obtenção de oócitos já maduros, mesmo que em quantidades mínimas, poderia-se proceder a FIV e CIV.

MAHI & YANAGIMACHI (1976) relataram que há fecundação em oócitos imaturos ou supostamente imaturos. Considerando que nesses oócitos houve capacidade de bloqueio à poliespermia, pode-se inferir que provavelmente há maturação citoplasmática, embora esse não seja o único evento responsável pelo bloqueio. Como é sabido que a maturação citoplasmática é um conjunto de alterações estruturais no ooplasma, que acompanham a maturação nuclear e preparam o oócito para a fertilização e desenvolvimento embrionário (AVELINO, 2004). Segundo

APPARÍCIO (2006), em estudo sobre a maturação citoplasmática de oócitos caninos, cerca de 60% dos oócitos em MI apresentavam grânulos corticais em estágios de transição, do centro para a periferia do ooplasma, e todos os oócitos em MII apresentavam grânulos totalmente na periferia, comprovando que há correspondência entre a progressão da meiose e a maturação citoplasmática em caninos. Assim pode-se inferir que oócitos caninos supostamente imaturos, fecundados por espermatozóides podem não estar completamente imaturos, se considerarmos que certo grau de maturação citoplasmática esteve presente, fato evidenciado pelo bloqueio à polispermia.

Em acréscimo, OTOI et al. (2004), demonstraram considerável porcentagem de clivagem em embriões caninos oriundos de oócitos maturados *in vitro* por apenas 48 horas, sendo que já se evidenciou que o tempo de 72 horas é o ideal para se atingir a maturação completa.

Dentre deste contexto a presente pesquisa buscou relatar os diferentes graus de configuração nuclear encontrados em oócitos não submetidos à MIV e colhidos de fêmeas caninas em distintas condições reprodutivas (Tabela 2).

Tabela 2. Números absolutos e relativos de oócitos em diferentes graus de maturação nuclear intrafolicular, obtidos de ovários de fêmeas em três condições reprodutivas (anestro, estro e estro induzido). – Jaboticabal - SP, 2007.

Configuração cromossômica	Estádio reprodutivo		
	ANESTRO	ESTRO	ESTRO INDUZIDO
PI-VG	21/56 (37,5)	30/52 (57,69)	30/54 (55,55)
RM-QVG	15/56 (26,78)	10/52 (19,23)	10/54 (18,50)
MI	5/56 (8,93)	2/52 (3,85)	2/54 (3,70)
A-T I	0/56 (0)	2/52 (3,85)	0/54(0)
MI	0/56 (0)	0/52 (0)	1/54 (1,85)
DEG.	15/56 (26,79)	8/52 (15,38)	11/54 (20,37)

PI-VG: prófase I-vesícula germinativa; RM-QVG: retomada da meiose-quebra de vesícula germinativa; MI: metáfase I; A-T I: anáfase-telófase I; MII: metáfase II; DEG: degenerados ou não passíveis de identificação.

Nossos resultados comprovam a existência de retomada da meiose em oócitos imediatamente após a colheita. Em todas as condições reprodutivas analisadas observamos presença de oócitos em QVG, sendo 26,78% nas fêmeas em anestro, 19,23% nas em estro e 18,50% nas em estro induzido. Também evidenciou-se progressão da meiose para MI em todas as fases, sendo 8,93% no anestro, 3,85% no estro e 3,7% no estro induzido. Observamos ainda dois oócitos em A-T, no grupo estro e um oócito em MII, no estro induzido.. Assim foi confirmada a presença de maturação nuclear intraovariana em cadelas, mesmo que em grau limitado.

De acordo com BOLAMBA et al. (2002), as altas taxas de QVG (19,4%) encontradas em oócitos, imediatamente após a colheita, deve-se ao fato de que provavelmente os mesmos eram advindos de folículos pré-antrais avançados. Em concordância, MAHI & YANAGIMACHI (1976) e HEWITT et al.(1998) relataram 1,1 e 5,1 % respectivamente de QVG em oócitos não submetidos à MIV.

Em análise da influência da fase do ciclo estral sobre os diversos graus de maturação nuclear, evidenciou-se na presente pesquisa, que não houve diferença significativa quando avaliada a mesma configuração cromossômica nas diferentes fases. Assim, embora BOLAMBA (2002) tenha afirmado que os oócitos em QVG provavelmente eram advindos de folículos pré-antrais, essa afirmação não se aplica ao nosso estudo, pois não houve diferença nas porcentagens de QVG nas diferentes condições reprodutivas e como sabido, animais em anestro não apresentam ou apresentam menor número de folículos pré-antrais.

Em concordância, MARTINS (2005) analisando oócitos não submetidos à MIV, relatou taxas QVG de 20,71% e 43,56% respectivamente em fêmeas em anestro e estro, sendo que esse último grupo ainda apresentou 15,34% de oócitos em MI. Esse autor constatou influência positiva da fase do estro em detrimento do anestro na maturação nuclear de oócitos não submetidos à MIV, fato não confirmado em nosso estudo.

HEWITT & ENGLAND (1998) observaram oócitos imediatamente após a colheita e relataram taxas de QVG de até 8% nas fêmeas em metaestro tardio e proestro e 7,5% em fêmeas em estro, além de 2% de MI em oócitos de cadelas em proestro. As fêmeas

em anestro apresentaram oócitos com 100% de VG. Também YAMADA et al. (1993), analisando oócitos após colheita, encontraram 100% deles em VG, tanto nas fêmeas em anestro, quanto naquelas submetidas à protocolo de superovulação. Novamente os dados deste estudo discordam das observações desses autores pois encontramos também oócitos em QVG e MI nas fêmeas em anestro.

Em conclusão e nas condições da presente pesquisa pode-se afirmar que:

1. Há retomada e progressão da meiose em oócitos, no ambiente intrafolicular;
2. Os estádios reprodutivos não influenciam nas taxas das diferentes configurações cromossômicas dos oócitos caninos.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, A.C. Reproductive System. B/Female. In: ANDERSEN,A.C.; GOOD, L.S. (Eds): **The beagle as an experimental dog**. Iowa: Iowa State University Press, 1970, p.321-326.

APPARÍCIO, M.F. **Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática in vitro de oócitos de cadelas (Canis familiares) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia**. 61f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2006.

AVELINO, K.B. **Efeito da estimulação e inibição da síntese de glutatona durante a maturação in vitro de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária**. 2004. 82f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias , Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

BAKER, T.G. Germes cells and fertilization. 2 ed. In: **Reproduction in mammals**. Cambridge, England, Cambridge University Press, p.17-45, 1982.

BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K.D.; DURRANT, B.S. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicle in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essencial. **Theriogenology**, v.58, p.1689-1703, 2002.

CONCANNON, P.W.; MC CANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and Endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39 , suppl, p.3-25, 1989.

CONCANNON, P.W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, suppl, p. 3-27, 1993.

DEW, E.V. **In vitro maturation of the canine oocyte**. 56f. Thesys (Master of Sciences) – University of Georgia, 2001.

DULCIBELLA, T. Biochemical and cellular insight into the temporal window of normal fertilization. **Theriogenology**, v.49, p.53-65, 1998.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Repeatability of events during spontaneous and gonadotrophin-induced oestrus in bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, n.2, p.443-448, 1991.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.957-966, 1998.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p.83-91, supplement, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Incidence of oocyte nuclear maturation within the ovarian follicle of the bitch. **Veterinary Record**, v. 143, p.590-591, 1998.

HEWITT D.A.; WATSON, P.F.; ENGLAND, G.C.W. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.1083-1128, 1998a.

HOLST, P.A.; PHEMISTER R.D. The prenatal development of dog, preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v.5, p. 771-779, 1971.

HOSZEL, J.F. Genital Cytology of the bitch. **Veterinary Scope**, v. 11, p. 2-15, 1975.

JHONSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Sexual differentiation and normal anatomy of the bitch. In: ____ **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. 1v, p. 1-14.

JOCHLE, W.; ANDERSEN, A.C. The estrous cycle in the dog: a review. **Theriogenology**, v.07, n.03, p. 113-140, 1977.

LUVONI, G.C; CHIGIONI,S.; ALLIEVI, E.; MACIS,D. Factors involved in vivo and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.41-59, 2005.

MAHI, C.A.; YANAGIMACI, R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. **Journal of Experimental Zoology**, v.196, p.189-196, 1976.

MARTINS, L.R. **Maturação nuclear de ovócitos de cadelas em estro e anestro submetidos à maturação *in vitro*** . 74f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2005.

MIALOT, J.P. **Patologia da Reprodução dos Carnívoros Domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1988, p.34-40.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.;OOKA, A.; SUZUKI,T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v. 54, p. 535-542, 2000.

OTOI, T.; SHIN, T.; KRAEMER, D.C.; WESTHUSIN, M.E. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. **Reproduction Nutrition and Development**, v.44(6), p.631-637, 2004.

PIRES, E. A. **Efeito da Suplementação de cistéina e cisteamina sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (Canis familiares) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia durante a fase pré-ovulatória do estro**. 66p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p. 1241-1254, 2001.

VAN HAFTEN, B. Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, n.1, p. 221-225, 1994.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: **The Physiology of Reproduction**, 2 ed. Edited by E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press, ITD, New York, 1994, p.79-122.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl 47, p. 227-229, 1993.

CAPÍTULO 4 - ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO OOCITÁRIO DE ACORDO COM O ESTÁDIO REPRODUTIVO DE FÊMEAS CANINAS

RESUMO – Pesquisas atuais tem buscado relacionar diâmetro oocitário e estágio do ciclo estral à competência meiótica de oócitos caninos, objetivando estabelecer maiores critérios para a seleção dos mesmos. Há relatos de que o oócito adquire habilidade para sofrer a meiose reducional (competência meiótica) durante o processo de crescimento oocitário, que se dá coordenadamente ao processo de crescimento folicular. Assim, o presente estudo teve como escopo descrever a distribuição de diâmetro oocitário em fêmeas caninas em anestro, estro natural e estro induzido. Após a ovariossalpingohisterectomia, os ovários foram colhidos assepticamente, imersos em solução fisiológica 0,9% a 37°C (solução de transporte). Após, foram fatiados em solução de PBS com SFB a 37°C, rastreados, classificados e submetidos à mensuração dos seus diâmetros por meio de um retículo milimetrado de medição (10mm/100partes). Assim, os oócitos foram divididos em oócitos com diâmetro superior ou inferior a 110µm. Concluiu-se que a proporção de oócitos com diâmetros superior a 110µm ou inferior a 110µm não é influenciada pelos estádios reprodutivos avaliados (anestro, estro e estro induzido) e encontra-se significativamente mais oócitos com diâmetro superior ou igual a 110µm nos ovários de cadelas, independentemente do estágio reprodutivo em que se encontram.

Palavras-chave – oócito, diâmetro oocitário, cadela, ciclo estral

CHAPTER 4 – OOCYTARY DIAMETER DISTRIBUTION ANALYSIS ACCORDING CANINE FEMALE REPRODUCTIVE STAGE

ABSTRACT – Actual researches are trying accounting oocytary diameter and estrus cycle stage to oocytes canine meiotic competence, focusing establish higher criteria to their selections. There are some accounts given which the oocytes acquire ability to get the reductional meiosis (meiotic competence) during the oocytary growth, which happens coordinately to the follicular growth. This way, the present study had as its target describe the oocytary diameter distribution in canine female in anestrus, natural estrus and induced-estrus. After the hemiovarysalpingohysterectomy the ovaries were collected aseptically immersed in a 0.9% physiologic solution at 37°C (transport solution). Later, they were sliced in PBS solution with SFB at 37°C, tracked, classified, and submitted to their diameter measure through a millimetered reticulum used to measure (10mm/100 parts). After that the oocytes were divided in oocytes with diameter superior or inferior to 110 µm. It was concluded the oocytes with diameter superior/equal or inferior to 110 µm proportion is not influenced by the evaluated reproductive stages (anestrus, estrus and induced-estrus). There are significantly more oocytes with diameter superior to 110µm when compared with oocytes with diameter inferior to 110µm in bitch ovaries. This fact does not depend to the animal reproductive stage.

Keywords – oocytes, oocytary diameter, bitch, estrous cycle

Introdução

A aplicação de biotécnicas aplicadas a reprodução animal tem sido fundamental para assegurar ganho genético desejável nas espécies domésticas inseridas na escala de produção de alimentos, sendo que a inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) são os exemplos mais significativos da importância que os estudos *in vitro* possuem, para maior controle dos processos fisiológicos que ocorrem *in vivo*.

Durante muito tempo, as pesquisas na área de biotecnologia da reprodução se restringiram à estudos com animais de produção e somente a partir da década de 90, com o interesse da comunidade científica pela preservação da biodiversidade é que a espécie canina mereceu atenção. Esse aspecto deveu-se ao fato de a fêmea canina constituir-se modelo experimental para canídeos ameaçados de extinção, dentre eles o cachorro-do-mato vinagre (*Spheothos venaticus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), que são espécies da fauna brasileira (PIRES, 2006).

O processo de maturação oocitária e fecundação nos canídeos é único, já que os oócitos são ovulados em estágio de vesícula germinativa e necessitam de dois a cinco dias para completarem a maturação meiótica, no oviduto (OTOI et al., 2000). Essa fisiologia é particular pois enquanto a fêmea canina ovula oócito primário, na maioria dos mamíferos, a maturação acontece dentro do folículo ovariano, o oócito secundário é ovulado, estando pronto para a fecundação (TSUITSUI, 1989). Esse fato pode explicar o sucesso limitado nas taxas de maturação oocitária *in vitro* em caninos, que é de cerca de 20%, enquanto em bovinos, 90% (FARSTAD, 2000).

Segundo WASSARMAN & ALBERTINI (1994), o oócito e as células foliculares que o rodeiam crescem coordenadamente, progredindo através de uma série de estágios morfológicos definidos. Em ratos sexualmente maduros, os oócitos completam seu crescimento antes da formação do antro folicular; conseqüentemente a maior parte do crescimento folicular ocorre após o fim do crescimento do oócito. O crescimento folicular termina com a ovulação de um oócito maturo ou atresia de oócito e seu folículo. No processo de crescimento, os oócitos crescem de um diâmetro de cerca de 12µm

para um diâmetro final de 80µm. Portanto, durante essa fase de crescimento, enquanto ainda está em estágio de vesícula germinativa, o oócito de ratos aumenta consideravelmente seu volume tornando-se a maior célula do corpo.

O oócito em estágio dictioto ou VG adquire habilidade para sofrer a meiose reducional (competência meiótica) durante o processo de crescimento oocitário. Essa aquisição de competência meiótica aparentemente ocorre em dois passos: oócitos em crescimento primeiro adquirem capacidade de passar pela QVG com progressão para MI, seguido pela aquisição de capacidade de progredir da MI para a MII. Esses autores citam ainda que, oócitos de ratos somente maturam *in vitro*, se tiverem diâmetro superior a 60µm.

Neste contexto, YAMADA et al. (1992), no intuito de se obter maior número de oócitos com maior diâmetro, submeteram fêmeas caninas à protocolo de indução de estro, obtendo taxa de maturação à MII de 32% e em (1993), encontraram que, uma alta proporção de oócitos de folículos pré-ovulatórios de cadelas estimuladas com gonadotrofinas atingiram MII comparados com oócitos de folículos obtidos de fêmeas não estimuladas.

THEISS (1997), foi quem primeiramente demonstrou evidências de que a habilidade do oócito canino em recomeçar a meiose *in vitro* é maior quando seu diâmetro é superior a 110µm.

DURRANT et al. (1998) também citaram que dentro de um folículo em crescimento, o oócito canino se desenvolve e aumenta de tamanho. Assim durante essa fase de crescimento, o oócito aumenta seu diâmetro de 20µm para aproximadamente 120µm, o que o torna, segundo esses autores, progressivamente competente e capaz de evoluir à MII.

O processo de crescimento intra folicular do oócito é constituído por um conjunto de modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (SCRIBAN, 1999). Ainda segundo esse mesmo autor, pode-se distinguir três tipos de maturação, a nuclear, que corresponde ao início da meiose e expulsão do primeiro corpúsculo polar pelo núcleo do oócito; a citoplasmática, caracterizada pela capacidade do citoplasma descondensar o núcleo do espermatozóide e transformá-lo em pró-núcleo masculino e a maturação de

membrana, que permite à zona pelúcida do oócito reconhecer os espermatozóides de sua espécie. Com base nessas afirmações há que se considerar a influência positiva do tempo que o oócito passa dentro do folículo em crescimento, sobre as taxas de MIV.

Neste contexto, o presente estudo teve como escopo descrever a distribuição de diâmetro oocitário em fêmeas caninas em anestro, estro natural e estro induzido.

Material e Métodos

Animais

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Reprodução Animal, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal. Para este estudo foram utilizados 1765 oócitos, provenientes de ovários de fêmeas caninas, em anestro, estro natural e estro induzido. Os animais eram de raças variadas, apresentavam-se hígidos e tinham idade entre um e sete anos.

Determinação da fase do ciclo estral

Durante a realização de cadastro dos animais para a introdução dos mesmos no experimento, eram obtidas informações sobre o último ciclo reprodutivo e a partir desse dado, os mesmos eram direcionados para constituírem os grupos dos animais em anestro, estro ou estro induzido.

Os animais destinados a compor o grupo ANESTRO eram submetidos à citologia vaginal e dosagem sérica de progesterona para a confirmação da fase. Eram destinados a fornecer oócitos para esse grupo, os animais que apresentavam na citologia vaginal, baixa celularidade com predomínio de células basais e parabasais e dosagem sérica de progesterona inferior a 1ng/mL. A citologia vaginal era realizada segundo MIALOT (1988). Após a confirmação dessa fase do ciclo estral, as fêmeas eram submetidas à OSH para coleta dos ovários. Todas as dosagens de progesterona,

neste experimento, foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Endomed, na cidade de Jaboticabal- SP, através do método de quimioluminescência.

As cadelas destinadas a compor o grupo ESTRO eram, imediatamente após os primeiros sinais de proestro, submetidas à citologia vaginal em dias alternados para acompanhamento da progressão da fase folicular. Esse exame era realizado até a determinação do início do estro, quando a citologia vaginal denotava presença de cerca de 90% de células superficiais e superficiais anucleadas. Doze horas após, amostra de sangue era coletada e encaminhada para dosagem sérica de progesterona a fim de se prever o momento da ovulação, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Relação entre dosagem sérica de progesterona e estimativa do momento da ovulação em fêmeas caninas.

[P4] ng/ml	Momento estimado da ovulação
1.0-1.9	Em até 48 horas
2.0-3.9	Em até 24 horas
4.0-10.0	Houve ovulação ou está ovulando

JHONSTON et al. (2001)

Com base nos resultados de dosagem de progesterona realizávamos a OSH para coleta dos ovários, em tempo médio de 12 horas antes da ovulação estimada.

Os animais que formaram o grupo ESTRO INDUZIDO foram submetidos à uma triagem, de modo que somente foram selecionados animais em anestro comprovado por citologia vaginal e dosagem sérica de progesterona. Isto posto, iniciávamos a protocolo de indução que compreendia o seguinte esquema:

eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	hCG		OSH
d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	

d0 a d1 : dia 0 ao dia 11

eCG (gonadotrofina coriônica eqüina): 30UI/kg, IM, uma vez ao dia

hCG (gonadotrofina coriônica humana): 500UI/ animal, IM, em aplicação única

O protocolo de indução utilizado foi adaptado de ENGLAND & ALLEN (1991) e no 12º dia de tratamento (d11), realizou-se a OSH para colheita dos ovários.

Obtenção e classificação dos oócitos

Após a OSH, os ovários foram coletados assepticamente, imersos em solução fisiológica 0,9% a 37°C (Figura 2A) e imediatamente encaminhados ao Laboratório de Reprodução Animal desta Universidade.

Em placa aquecida, os mesmos foram fatiados em solução de PBS com 10% de SFB a 37°C e assim os COCs, liberados (Figura 2B)

Os oócitos foram rastreados sob lupa estereomicroscópica, avaliados com relação à homogeneidade do citoplasma, número de camadas de células do cumulus, e selecionados conforme os critérios morfológicos adotados por HEWITT & ENGLAND (1997) (Figuras 2C e 2D). Os COCs selecionados foram então passados três vezes em meio de lavagem (Apêndice G). Após, mantidos em gota do mesmo meio em placa aquecida enquanto progressivamente eram submetidos à mensuração dos seus diâmetros.

Uma lista composta pelas especificações sobre reagentes e hormônios utilizados neste experimento, encontra-se sob título de Apêndice J.

Mensuração do diâmetro oocitário

A mensuração dos diâmetros foi realizada por meio de um retículo milimetrado de medição (10mm/100partes) para ocular de 10x , acoplado em microscópio estereoscópio. De acordo com a calibração, em zoom 4,0 o valor de cada milímetro da régua correspondia a 27,5µm. Assim, os oócitos foram divididos em oócitos com diâmetro igual ou superior a 110µm e inferior a 110µm (Figura 2E).

Análise estatística

Para se evidenciar diferença nas proporções de oócitos com diâmetros maiores ou menores que 110µm, dentro de cada fase e entre fases, utilizou-se Teste-T de amostras independentes (com transformação $\arcsen\sqrt{p/100}$), através do Programa SAS (Statistical Analysis System) para Windows (2000).

Resultados e Discussão

As pesquisas com maturação oocitária canina tem se tornado frequentes, mas as taxas de maturação à MII ainda são consideradas muito baixas (< 25%). Alguns estudos relatam que a idade da doadora (NICKSON et al. 1993), o diâmetro oocitário (THEISS, 1997; OTOI et al.,2000) e a qualidade morfológica dos oócitos (NICKSON et al, 1993) influenciam na frequência de maturação. A influência da fase do ciclo estral canino nas taxas de MIV permanece uma questão ainda muito controversa e embora LIEBFRIED & FIRST (1979) tenham afirmado que em oócitos bovinos não existe relação entre o estágio do ciclo estral da doadora e a frequência de maturação dos oócitos, em caninos, não há consenso entre os pesquisadores. Dentro deste contexto, o aspecto da fase do ciclo estral parece estar relacionado à aquisição de oócitos com maiores diâmetros, os quais apresentariam maior competência meiótica.

FAIR (1997) relatou uma correlação positiva entre o diâmetro dos oócitos bovinos e a dimensão do folículo e que os oócitos maiores apresentavam alta habilidade de retomada da meiose. Em contraste, experimentos evidenciando a correlação entre diâmetro e competência meiótica em caninos, são escassos.

WASSARMAN & ALBERTINI (1994) afirmaram que o oócito em estágio de vesícula germinativa (VG) adquire habilidade para sofrer a meiose reducional (competência meiótica) durante o processo de crescimento oocitário, que se dá coordenadamente ao processo de crescimento folicular. DURRANT et al. (1998) citaram que pequenos oócitos (com cerca de 25µm de diâmetro) com uma única camada de células do *cumulus* são encontrados em folículos primordiais; oócitos pálidos (com

cerca de 78µm de diâmetro) caracterizados por camadas incompletas de células do *cumulus* estão contidos em folículos pré-antrais; e em folículos pré-antrais avançados (com cerca de 212µm de diâmetro) são encontrados oócitos (com cerca de 115µm de diâmetro) que apresentam um citoplasma lipídico denso, múltiplas camadas de células do *cumulus*, caracterizando um oócito pré-ovulatório.

A punção individual dos folículos ovarianos na cadela, é um processo laborioso e que não resulta na recuperação de muitos oócitos, isso porque quase todos os folículos permanecem abaixo da superfície ovariana, tornando-se aparentes apenas poucos dias antes da ovulação. Portanto, vários laboratórios tem usado a técnica de fatiamento em cortes seriados do ovário a fim de se aumentar o número de oócitos recuperados (NICKSON et al., 1993; FUJII et al., 2000). Assim, pode-se afirmar que o fatiamento ovariano, que é o método mais comum de aquisição dos oócitos caninos, gera a obtenção de uma população heterogênea de oócitos, tanto em relação às características morfológicas, como à capacidade intrínseca de retomada da meiose. Pode-se então inferir que esse aspecto relaciona-se, ao menos em parte, aos baixos índices de maturação *in vitro* nessa espécie.

Em virtude disso, alguns pesquisadores tem buscado relacionar diâmetro oocitário e estágio do ciclo estral à competência meótica de oócitos caninos, objetivando estabelecer maiores critérios para a seleção dos mesmos.

HEWITT & ENGLAND (1998) citaram que quanto maior o tamanho do oócito, maior sua habilidade em transpor a fase de quebra da vesícula germinativa para atingir as fases de MI, anáfase I (ANA I) e MII e que aqueles com diâmetro superior a 120 µm apresentam maior competência meiótica para os estádios finais de maturação. Também, HAY et al. (1997) recomendaram para o uso na MIV, somente oócitos com diâmetro superior a 100µm, desde que sejam obviamente de Grau I.

YAMADA et al. (1992), no intuito de obter maior número de oócitos com maior diâmetro, submeteram fêmeas caninas ao protocolo de indução de estro, obtendo taxa de maturação à MII de 32% e em (1993) os mesmos autores encontraram que, uma alta proporção de oócitos de folículos pré-ovulatórios de cadelas estimuladas com

gonadotrofinas atingiram MII comparados com oócitos de folículos obtidos de fêmeas não estimuladas.

Assim, orientados pelas afirmações de THEISS (1997) e HAY et al. (1997) que recomendam, respectivamente, para o uso em MIV somente oócitos com diâmetros maiores que 110µm ou 100µm, o presente estudo buscou caracterizar e comparar, a proporção de oócitos maiores que 110µm ou menores que 110µm, encontrados em ovários de fêmeas caninas em três condições reprodutivas diferentes, anestro, estro natural e estro induzido (Tabela 2).

Os resultados demonstram que as porcentagens de oócitos com diâmetro inferior a 110µm foram 31,57%, 26,34% e 31,53%, respectivamente para anestro, estro e estro induzido. Para os oócitos com diâmetro superior a 110µm, as porcentagens foram 68,42%, 73,65% e 68,46%, respectivamente para anestro, estro e estro induzido. A análise dos dados revelou não haver diferença significativa entre as diferentes condições reprodutivas quando se compara classe de oócitos de mesmo diâmetro. Quando se analisa, porém, as proporções de oócitos com diâmetros menores e maiores que 110µm dentro da mesma condição reprodutiva verificou-se diferença significativa ($p < 0,01$).

Tabela 2. Porcentagem dos oócitos com diâmetro inferior e superior a 110µm, obtidos de ovários de fêmeas caninas em fase de anestro, estro e estro induzido - Jaboticabal, 2007.

Diâmetro	Status Reprodutivo					
	anestro		estro		estro induzido	
	% real	$\arcsen\sqrt{p/100}$	% real	$\arcsen\sqrt{p/100}$	% real	$\arcsen\sqrt{p/100}$
<110 um	31,57 a	0,589	26,34 a	0,532	31,53 a	0,588
>110 um	68,42 b	0,981	73,65 b	1,038	68,46 b	0,982

$R^2 = 0.044610$ CV = 24.24473 (menor) / $R^2 = 0.044610$ CV = 13.56949 (maior). Letras diferentes na mesma coluna de % real, diferem entre si ($P < 0,05$).

Os dados do presente estudo, portanto não corroboram com os dados de OTOI et al. (2001), o qual afirmou que, com respeito à distribuição de diâmetros, a porcentagem de oócitos menores que 110µm colhidos de ovários em fase folicular (17,8%) foi significativamente menor que aqueles obtidos de ovários em anestro ou

diestro (69,7% e 58,3% respectivamente), e ainda, a porcentagem de oócitos com diâmetro superior a 120 μ m em ovários em fase folicular (50,8%) foi significativamente maior que aquelas encontradas em ovários em fase anestro (5,5%) ou diestro (13,3%). No mesmo estudo, depois de 72 horas de cultivo, os autores encontraram alta frequência de maturação à MII em oócitos maiores que 120 μ m na fase folicular, mas não encontraram diferença na frequência de MII em oócitos maiores que 120 μ m entre os três estágios do ciclo estral avaliados. No grupo de pequenos oócitos (< 120 μ m), não existiu diferença entre os estágios do ciclo estral com respeito à proporção de oócitos que atingiram cada estágio da meiose. Assim, os autores afirmaram que, como a aquisição de competência meiótica foi maior quanto maior o diâmetro oocitário, a alta frequência de MII dos oócitos advindos de ovários em fase folicular pode resultar da alta proporção de grandes oócitos encontrados nesses ovários e concluíram que o efeito do ciclo estral sobre as taxas de MIV resulta das diferenças quantitativas de oócitos grandes nestas distintas fases. Porém, esses dados não permitem inferir sobre competência meiótica dos oócitos avaliados neste estudo.

Nas condições do presente estudo podemos afirmar que:

1. O diâmetro do oócito não é influenciado pelo anestro, estro e estro induzido;
2. Encontra-se significativamente mais oócitos com diâmetro superior ou igual a 110 μ m nos ovários de cadelas, independentemente do estágio reprodutivo em que se encontram.

REFERÊNCIAS

DURRANT, B.S.; PRATT, N.C.; RUSS, K.D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, p.917-932, 1998.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Repeatibility of events during spontaneous and gonadotrophin-induced oestrus in bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, n.2, p.443-448, 1991.

FAIR, T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embriology**. v. 195, p. 327-336, 1997.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60, n.1, p.375-387,2000.

FUJII, M.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; TANAKA, M.; UNE, S.; SUZUKI, T. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, n.3, p.305-307, 2000.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Canine spermatozoa – cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v.28, n.8, p.1329-1342, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p.83-91, suppl, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.957-966, 1998.

JHONSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Sexual differentiation and normal anatomy of the bitch. In:___**Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. 1v, p. 1-14.

LIEBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro* . **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 76-86, 1979.

MIALOT, J.P. **Patologia da Reprodução dos Carnívoros Domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1988, p.34-40.

NICKSON, D.A.; BOYD, J.S.; ECKERSALL, P.D.; FERGUSON, J.M.; HARVEY, M.J.; RENTON, J.P. Molecular biology methods of monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl v.47, p.231-240, 1993.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.;OOKA, A.; SUZUKI,T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v. 54, p. 535-542, 2000.

OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI, M.; KURNIANI KARJA, N.W.; SUZUKI, T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of oestrous cycle. **Reproduction Fertility and Development**, v.13, p. 151-155, 2001.

PIRES, E. A. **Efeito da suplementação de cisteína e cisteamina sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*Canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia durante a fase pré-ovulatória do estro.** 66p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SCRIBAN, R. Les biotechnologies de la reproduction animal. cap 6. In: **Biotechnologie**, 5 ed. Paris: TEC et DOC, 1999.

THEISS, T. **Investigations on the collection, in vitro maturation and fertilization of dog oocytes.** 97f. Tese. Tierarztliche Facultat der Ludwig-Maximilian Universitat Munich, 1997.

TSUITSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, suppl, p.269-275, 1989.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: **The Physiology of Reproduction**, 2 ed. Edited by E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press, ITD, New York, 1994, p.79-122.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Maturation, fertilization and development of dog oocyte in vitro. **Biology of Reproduction**, v.46, n.5, p. 853-858, 1992.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl 47, p. 227-229, 1993.

CAPÍTULO 5 - AVALIAÇÃO DA CITOLOGIA VAGINAL, DOSAGEM SÉRICA DE PROGESTERONA E MACROSCOPIA OVARIANA E UTERINA, DE FÊMEAS CANINAS SUBMETIDAS À INDUÇÃO DO ESTRO COM GONADOTROFINAS

RESUMO – O presente estudo objetivou realizar a indução de estro em cadelas com o uso de gonadotrofinas e avaliar a efetividade desse protocolo através da análise das alterações de citologia vaginal, dosagem sérica de progesterona e análise macroscópica dos ovários. Para tanto, utilizou-se nove fêmeas caninas, de diferentes raças e com idade entre 1 e 4 anos. O protocolo de indução compreendeu aplicações diárias de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) na dosagem de 30 UI/kg, via intra-muscular, uma vez ao dia, por 9 dias, seguido de aplicação de gonadotrofina coriônica humana (hCG) na dosagem de 500 UI/ por animal, via intra-muscular, em aplicação única no décimo dia. No décimo segundo dia após início deste protocolo, realizou-se a ovariossalpingohisterectomia para colheita dos ovários. A citologia foi realizada em dias alternados e a dosagem de progesterona foi realizada no 12º dia. Os resultados demonstraram que o protocolo foi efetivo na promoção de alterações citológicas indicativas de proestro seguido de estro. As dosagens séricas de progesterona revelaram valores acima do esperado, demonstrando uma luteinização pré-ovulatória exacerbada. Os ovários apresentaram altas taxas de folículos crescidos, bem como rompidos, demonstrando a efetividade do protocolo na indução da ovulação. Em conclusão, o protocolo utilizado foi efetivo na indução de estro em cadelas e as baixas taxas de fertilidade mencionadas até então, podem ser advindas de alterações físicas do fluido folicular que no presente estudo apresentou-se viscoso em íntima aderência aos oócitos.

Palavras-chave – gonadotrofina, cadela, estro, progesterona, citologia vaginal, ovário

CHAPTER 5 – VAGINAL CYTOLOGY EVALUATION, SERIC PROGESTERONE DOSAGE AND OVARIAN AND UTERINE MACROSCOPY OF CANINE FEMALE SUBMITTED TO ESTRUS INDUCTION WITH GONADOTROPHIN

ABSTRACT – The present study aimed performs the estrus induction in bitches using gonadotrophines and evaluate the effectiveness of this protocol through vaginal cytology alteration analysis, seric progesterone dosage and ovarian macroscopic analysis. To this, nine canine females of different races and ages from one to four-year-old were used. In the induction protocol, equine chorionic gonadotrophin (eCG) were applied daily in the dose of 30 UI/kg via intramuscle, once a day, during nine days, followed by one application in the tenth day of human chorionic gonadotrophin (hCG), 500 UI/per animal dose. Twelve days after beginning this protocol, the ovarysalpingohysterectomy were done to collect the ovarians. The cytology was done in alternated days and the progesterone dosage was done in the twelfth day. The results demonstrated the protocol was effective to promote the proestrus indicative cytological alterations followed by estrus. The seric progesterone dosages presented values higher than expected, demonstrating an exacerbate preovulatory luteinization. The ovaries presented high indexes of grown follicles, as well broken, demonstrating the protocol effectiveness to ovulation induction. In conclusion, the used protocol seems have been effective to induce estrus in bitches with low fertility rates since now. It can come from follicular fluid physic alterations that in this present presented viscous, in intimate adherence to the oocytes.

Keywords – gonadotrophin, bitch, estrum, progesterone, vaginal cytology, ovary

Introdução

A indução do estro em cadelas vem sendo realizada com diferentes objetivos, entre eles, a busca de acasalamento em tempo determinado pelo criador, o término de um anestro prolongado por causas não determinadas ou falhas para iniciar o período de puberdade (ZÖLDAG et al., 2001). Mais recentemente, pesquisadores tem usado a indução de estro na tentativa de obtenção de oócitos supostamente mais competentes destinados à maturação *in vitro*.

O ciclo reprodutivo da cadela apresenta quatro fases bem distintas, estabelecidas por alterações hormonais que induzem transformações de ordem morfológicas, clínicas e citológicas no trato genital. Essas fases são conhecidas como proestro, estro, metaestro/diestro e anestro, sendo que o período de atividade reprodutiva é denominado estro (JÖCHLE & ANDERSEN, 1977).

O proestro nesta espécie é caracterizado por duração média de 7-10 dias (CONCANNON et al., 1989), edema de lábios vulvares e secreção sanguinolenta que pode ser observada na rima vulvar (JÖCHLE & ANDERSEN, 1977). O caráter sanguinolento dessa secreção é resultado de diapedese de hemácias proveniente da ruptura de vasos subepiteliais endometriais (FELDMAN & NELSON, 1997) em conjunto à secreção das glândulas endometriais (HOFFMANN et al, 1996). Ao proestro segue-se o estro, com duração média de 5-9 dias. A turgidez vulvar observada no proestro dá lugar à maciez e flacidez, que se fazem acompanhar de supressão e modificação da secreção vaginal de sanguinolenta para serosanguinolenta e permissão à cópula (FELDMAN & NELSON, 1997). As alterações endócrinas relacionadas ao mecanismo de interrupção do anestro na cadela não se encontram totalmente esclarecidas (KOOISTRA, 1999).

Nos esfregaços vaginais a proporção relativa de diferentes tipos de células pode ser usada como identificadora do ambiente endócrino e portanto da fase do ciclo estral (ARTHUR, 1996). O número de células basais e parabasais sediadas nas camadas mais profundas do epitélio, reduz-se à medida que o ciclo avança para o estro e dá lugar ao aparecimento de células intermediárias superficiais e células superficiais, que

compõem o estrato espinhoso e superficial, de modo que nos quatro ou cinco dias precedentes ao pico de LH, o índice de células parabasais torna-se inferior à 5% (CONCANNON & DIGREGORIO, 1986). Isso ocorre porque sob a influência da elevação progressiva de estrógeno ocorre a estratificação epitelial e proliferação celular. As células mais distantes do estrato basal, sofrendo com a redução de aporte nutricional e de oxigênio, perdem a sua capacidade de exocitose e acabam degenerando-se (FELDMAN & NELSON, 1997; VERSTEGEN, 1999). Por isso, o predomínio de células superficiais no esfregaço é indicativo de progressão do ciclo e está associado ao efeito estrogênico máximo alcançado assinalando a expressão hormonal deste momento (FELDMAN & NELSON, 1997).

Segundo MIALOT (1988), o esfregaço vaginal do anestro é caracterizado quase que exclusivamente por células parabasais e também algumas intermediárias; o diestro por células intermediárias e parabasais isoladas; o proestro tem predominância de células intermediárias e superficiais nucleadas, além de numerosos glóbulos vermelhos e o estro caracteriza-se por células superficiais anucleadas ou com núcleo picnótico e poucos glóbulos vermelhos.

O estradiol 17- β atinge seu ápice 24 a 48 horas antes do estabelecimento da elevação sérica máxima pré-ovulatória do LH, isto é, antes do pico de LH, o qual marca o início do estro (VALTONEN & JALKANEN, 1993). Os níveis iniciais de estradiol de 90 pg/mL reduzem-se para 10-20 pg/mL ao final do proestro (HOFFMANN et al., 1996; VERSTEGEN, 1999). Esse declínio que ocorre concomitante à elevação plasmática de progesterona, reflete a maturação folicular vários dias antes da ovulação (FELDMAN & NELSON, 1997). LEAVIT et al. (1971) concluíram que o aumento da progesterona tem origem nos folículos pré-ovulatórios e nas células intersticiais ovarianas, conceito defendido também por FELDMAN & NELSON (1997).

Contrariamente à liberação de FSH, a de LH é determinante pois sua elevação pré-ovulatória determina, na cadela, o fim da fase folicular e o ingresso na fase luteal (SHILLE & STABENFELDT, 1980). O pico de LH é o momento marcante do ciclo estral dessa espécie pois todos os eventos da ovulação à parição lhe são retroativos. Ao pico

de LH, que persiste por 12 a 24 horas, segue-se a ovulação (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002).

A concentração hormonal de progesterona eleva-se acima do nível basal antes do estabelecimento do pico de LH, devido à capacidade de síntese e secreção mediada pelas células foliculares ovarianas, que se tornam funcionais mesmo antes do desenvolvimento do corpo lúteo (FELDMAN & NELSON, 1997). Os níveis de progesterona que no início do proestro se encontravam abaixo de 1ng/mL, aumentam de forma que, valores de 2 a 3 ng/mL, registrados no momento do pico de LH, sobem para $4,9 \pm 1,0$ ng/mL no instante da ovulação (BOUCHARD, 1991), embora estudos recentes tenham revelado índices médios de 2,3ng/mL no dia da ovulação (HASE, 2000).

Segundo JHONSTON et al. (2001), uma concentração plasmática de progesterona entre 1,0-1,9ng/mL indica ovulação em até 48 horas, entre 2,0-3,9 ng/mL indica ovulação em até 24 horas e 4,0-10,0 ng/mL indica que o animal já ovulou ou está ovulando.

Foi demonstrado que em cadelas, o processo ovulatório mantém relação estreita com o aumento de progesterona. A falha na sua elevação faz com que a proporção na concentração sérica progesterona/estradiol não se modifique, o que impede o desencadeamento do pico de LH e a ovulação (VERSTEGEN, 1999).

Quanto às características morfológicas ovarianas, estas também se modificam na dependência da fase do ciclo estral. Quando a hipófise inicia a liberação de FSH e LH em grandes quantidades no início do período de maturidade sexual, os folículos iniciam seu crescimento e cerca de 48 horas após a onda pré-ovulatória de LH, eles rompem-se liberando o oócito, no processo denominado ovulação. Imediatamente após, os folículos rompidos iniciam a rápida produção de uma massa celular, denominada corpo lúteo, o qual irá produzir progesterona, que terá papel de manutenção da gestação. Um folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e em estágios mais avançados, células tecais). De acordo com o grau de evolução, pode-se dividir a população folicular de um ovário em folículos não cavitários ou pré-antrais (folículos

primordiais, primários e secundários) e folículos cavitários ou antrais (folículos terciários e folículos de Graaf). São os folículos pré antrais, os responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais no ovário (DAVOL, 2007).

HEWITT & ENGLAND (1998) analisando macroscopicamente o ovário de cadelas descreveram que durante o anestro ocorre predominância de folículos primários, no proestro predominam os antrais, no estro, os chamados pré ovulatórios e no diestro não há folículos aparentes. Encontraram ainda, tecido luteal pronunciado no diestro e remanescente no anestro. HEWITT et al. (1998) e OTOI et al. (2000) relataram que os folículos ovarianos da cadela apresentam localização cortical nos ovários, permanecendo abaixo da superfície ovariana e somente se tornando aparentes pouco antes da ovulação.

Segundo CONCANNON et al.(1989), os resultados insatisfatórios dos protocolos de indução de estro, utilizando gonadotrofinas com ou sem estimulação prévia com estrógeno, resultam da falta de conhecimento dos eventos hormonais e foliculares responsáveis pelo término do anestro nas cadelas e afirmou que a eficiência diminuída desses protocolos pode ser devido à uma hiperestimulação ovariana, falhas nos processos de ovulação, luteólise prematura ou formação de anticorpos.

Diversos protocolos de indução são usuais. Atualmente a prolactina é conhecida como principal luteotrofina em caninos (VERSTEGEN, 1997). Assim, tem sido verificado que o uso de agonistas da dopamina ocasionam supressão na secreção de prolactina, diminuindo o intervalo interestro. Dentre os agonistas mais utilizados estão, a bromocriptina (KOOISTRA et al., 1999); a cabergolina (ONCLIN et al., 1993).

Estudos prévios tentaram induzir um estro fértil em cadelas usando gonadotrofinas e componentes estrogênicos, sem grandes sucessos nas taxas de prenhez. O uso desses compostos não resultou em dados reais e com repetibilidade (ZÖLDAG et al. 2001).

SHILLE et al. (1989) citaram que o uso das gonadotrofinas visa mimetizar a interação hipófise-ovário para o desenvolvimento folicular, maturação oocitária e ovulação, mas concluíram em seu estudo que esses compostos não corresponderam na indução de estro fértil. Os principais protocolos de indução usando gonadotrofinas e

compostos estrogênicos incluem eCG : 20 UI/kg por 5 a 10 dias consecutivos, seguido de aplicação única de hCG (500-1000 UI por animal) (ENGLAND & ALLEN, 1991); DES (diethiletilbestrol): 5 mg/kg até início do proestro, seguido de 5mg/kg no quinto dia do proestro e FSH: 5mg/kg, via intra-muscular, nos dias 9 e 11 do proestro (MOSES et al., 1988); e ainda o uso de GnRH em administração pulsátil (CONCANNON et al., 1997).

A despeito desses dados, protocolos de indução de estro utilizando gonadotrofinas têm sido utilizados para provocar crescimento folicular e proporcionar, assim, a colheita de oócitos pré-ovulatórios para a MIV, já que é defendido que a competência meiótica de oócitos de outras espécies é influenciada pelo tamanho de ambos, folículo (LONERGAN et al., 1994; MARTINO et al., 1994; MOTLIK & FULKA, 1986) e oócito (FAIR, 1997; OTOI et al., 1997).

YAMADA et al. (1992) e YAMADA et al. (1993) realizaram MIV e FIV de oócitos caninos pré-ovulatórios. Seu protocolo de indução compreendia estrone (100-400 µg/dia) até o aparecimento de secreção vaginal sanguinolenta. Três dias depois, eCG (400 UI) e hCG (1000 UI), via subcutânea, seguidas de duas aplicações de estradiol, uma três e outra quatro dias após a aplicação de eCG e hCG. O primeiro dia do estro foi determinado pela citologia vaginal e nesse dia os animais receberam aplicação de hCG (1000UI). Esses autores realizaram punção folicular para colheita dos oócitos, e consideraram os folículos repletos de fluido claro e protrusos sobre a superfície ovariana (com mais de 3mm de diâmetro), como sendo grandes folículos e os folículos colapsados, hemorrágicos e com ponto de ruptura, foram considerados folículos ovulados. Ainda, concluíram por essas características morfológicas que a ovulação nas cadelas ocorreu 72 horas após a aplicação do hCG, sendo que os ovários colhidos 96 horas após a aplicação de hCG possuíam apenas folículos colapsados.

Assim, o presente estudo realizou a indução do estro em cadelas objetivando descrever a evolução da citologia vaginal, mensurar a dosagem de progesterona e analisar a morfologia macroscópica ovariana no momento pré-ovulatório.

Material e Métodos

Local e animais

O estudo foi conduzido nas dependências do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, Setor de Reprodução e Obstetrícia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal. Foram utilizadas nove fêmeas caninas, com idade entre um e quatro anos, de diferentes raças. As fêmeas pertenciam a proprietários que manifestavam interesse em requisitar a realização da cirurgia de OSH para seus animais.

Seleção do Animais

Todos os animais passaram por exame clínico prévio antes de serem incluídos no experimento. O exame clínico, como de rotina englobou anamnese, exame físico e exames complementares. A anamnese foi realizada com ênfase para o sistema reprodutivo, a fim de que não fossem incluídas no experimento fêmeas que apresentassem histórico de abortamento, piometra, vaginite recorrente, sub ou infertilidade ou que tivessem recebido, eventualmente ou regularmente, hormonioterapia anticoncepcional. O exame físico completo foi executado objetivando o diagnóstico de qualquer patologia, reprodutiva ou não.

Por fim, todos os animais, foram submetidos à triagem, buscando-se selecionar animais em anestro comprovado por citologia vaginal de baixa celularidade, com predomínio de células basais e parabasais, associada à dosagem sérica de progesterona inferior a 1ng/mL.

Protocolo de indução do estro

Os animais incluídos no experimento foram submetidos ao seguinte protocolo de indução:

eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	eCG	hCG		OSH
d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11

d0 a d1 : dia 0 a dia 11

eCG (gonadotrofina coriônica eqüina): 30UI/kg, IM, uma vez ao dia

hCG (gonadotrofina coriônica humana): 500UI/ animal, IM, em aplicação única

O protocolo de indução utilizado foi adaptado de ENGLAND & ALLEN (1991) e no 12° dia de tratamento (d11), realizou-se a OSH para colheita de ovários e útero.

Uma lista composta pelas especificações sobre reagentes e hormônios utilizados neste experimento, encontra-se sob título de Apêndice J.

Citologia vaginal

O exame citológico vaginal foi realizado a cada 48 horas após início do protocolo de indução, objetivando analisar a progressão da fase folicular.

O início do proestro era detectado pelos sinais clínicos característicos dessa fase, que são: edema de vulva, atração de machos e secreção vaginal sanguinolenta. A colheita de material para a citologia vaginal foi realizada com o uso de *swab*. Após introdução do mesmo até a porção cranial da vagina, foram efetuados movimentos de rotação em toda a circunferência vaginal, sempre mantendo-o em contato com a mucosa. O *swab* foi então rolado sobre lâminas de vidro devidamente identificadas, as quais depois de secas, foram coradas pelo método de Romanowsky (Apêndice I). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico de luz, em aumento de 40x, verificando-se a morfologia das células do epitélio vaginal e a progressão da

cornificação celular, a fim de se determinar a porcentagem de células epiteliais superficiais.

O início do estro foi determinado quando a citologia vaginal evidenciava presença de mais de 80% de células superficiais com ausência de núcleo ou núcleo picnótico em associação ao comportamento de estro.

Dosagem sérica de Progesterona

No dia da realização da OSH, ou seja, 12 dias após início do protocolo de indução, os animais foram submetidos à punção da veia jugular para colheita de amostras de sangue destinadas à dosagem sérica de progesterona.

A dosagem foi realizada através do método de quimioluminescência, no Laboratório de Análises Clínicas Endomed, na cidade de Jaboticabal, São Paulo, e objetivou evidenciar o grau de luteinização dos folículos pré ovulatórios.

Macroscopia Ovariana

Imediatamente após a OSH, ovários e úteros foram submetidos à avaliação macroscópica que compreendia o registro dos seguintes dados:

1. Nos ovários: coloração, textura de superfície, presença de folículos túrgidos, folículos com ponto de ruptura, corpo hemorrágico, corpo lúteo e cistos foliculares.
2. No útero: presença de hiperplasia cística do endométrio, presença de secreção intra luminal.

Resultados e Discussão

O desenvolvimento de um protocolo efetivo de indução do estro em cadelas parece ser vantajoso, especialmente em estabelecimentos de criação de cães onde se faz necessário um contínuo suprimento de filhotes. Porém, os resultados obtidos com o uso desses protocolos difere entre os diferentes trabalhos publicados mesmo quando metodologias semelhantes são utilizadas. Esse fato pode ser uma consequência de

alguns aspectos e entre eles deve-se considerar, o pequeno número de animais utilizados em alguns trabalhos, a utilização de animais em anestro determinado apenas através de citologia vaginal e comportamento, a não distinção da fase do anestro (inicial ou tardio) em que os animais se encontram antes de serem submetidos à indução e ainda, a utilização de animais em estado de anestro prolongado. Todos esses aspectos contribuem para as divergências nos relatos de sucesso, isto é, nas taxas de ovulação, prenhez e nascimentos (ENGLAND & ALLEN, 1991).

Segundo JOHNSTON et al. (2001), a avaliação da citologia vaginal associada à dosagens hormonais, podem ajudar o profissional veterinário a determinar o momento mais apropriado para a realização da monta natural ou inseminação artificial, pois esses parâmetros refletem as diferentes fases do ciclo estral. Considera-se que o proestro tem duração média de 9 dias, terminando com o pico de LH, que marca o início do estro, fase também marcada inicialmente pela presença de células superficiais em porcentagem superior a 90% .

Dentro deste contexto, o presente estudo objetivou descrever as alterações de citologia vaginal e morfologia ovariana e uterina , bem como a determinação da dosagem sérica de progesterona em animais submetidos à indução de estro. Considerando que estes parâmetros já se encontram muito bem determinados em animais em estro natural, buscou-se avaliar como eles se comportam no estro artificial.

Na Tabela 1, pode-se verificar como ocorreu a evolução do proestro e início de estro mediante aspectos de citologia vaginal. A Tabela 2 demonstra a concentração sérica de progesterona no 12º dia de indução de estro e a Tabela 3 revela as características ovarianas observadas por ocasião da OSH.

Tabela 1. Valores percentuais referentes aos tipos celulares observados nas análises de citologia vaginal (CV), realizadas em seis momentos (dia 2 ao dia 12) após início da aplicação do protocolo de indução do estro em fêmeas caninas. Jaboticabal-SP, 2007.

Tipos celulares	Animal 1						Animal 2						Animal 3					
	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12
B	60	-	-	-	-	-	B	70	25	-	-	-	B	10	-	-	-	-
PB	40	90	30	5	5	5	PB	10	50	-	-	-	PB	90	95	70	50	-
I	-	10	70	90	80	80	I	20	20	50	10	-	I	-	5	30	50	20
SN	-	-	-	5	15	15	SN	-	5	50	50	20	SN	-	-	-	-	80
SA	-	-	-	-	-	-	SA	-	-	-	40	80	SA	-	-	-	-	10
	Animal 4						Animal 5						Animal 6					
	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12
B	5	-	-	-	-	-	B	10	-	-	-	-	B	50	50	5	-	-
PB	65	60	-	-	-	-	PB	90	10	-	-	-	PB	50	50	25	25	10
I	30	40	80	-	-	-	I	-	70	-	-	-	I	-	-	70	50	30
SN	-	-	20	60	50	20	SN	-	10	20	10	-	SN	-	-	-	20	50
SA	-	-	-	40	50	80	SA	-	10	80	90	100	SA	-	-	-	5	10
	Animal 7						Animal 8						Animal 9					
	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12
B	90	90	-	-	-	-	B	10	-	-	-	-	B	20	20	10	-	-
PB	10	10	10	-	-	-	PB	80	-	-	-	-	PB	80	80	90	-	-
I	-	-	20	10	-	-	I	-	30	-	-	-	I	-	-	-	90	-
SN	-	-	20	30	30	20	SN	-	70	50	30	5	SN	-	-	-	5	60
SA	-	-	50	60	70	80	SA	-	-	50	70	95	SA	-	-	-	5	30

Tipos celulares: B = células basais, PB= parabasais, I= intermediárias, SN= superficiais nucleadas, SA= superficiais anucleadas ou com núcleo picnótico).

Com referência aos dados de citologia vaginal, verificou-se que, de maneira geral, os animais apresentaram características semelhantes, com uma progressão de proestro à estro marcada pelo aumento progressivo na porcentagem de células superficiais. No segundo dia de aplicação de eCG, houve predomínio de células basais e parabasais, porém células intermediárias foram encontradas nos animais 2 (20%) e 4 (30%), fato que demonstrou uma evolução inicial acelerada do proestro. No quarto dia, com exceção dos animais 4, 9 e 7, pode-se notar uma evolução do proestro, com aumento na porcentagem de células intermediárias, e até mesmo presença de células

superficiais, nos animais 2 e 5. No sexto dia, destacaram-se os animais 5, 7 e 8, com presença precoce e considerável de células superficiais anucleadas no esfregaço, 80%, 50% e 50%, respectivamente. Em relação ao dia 8, pode-se destacar os animais 1, 3 e 6 que no momento citado ainda apresentavam células parabasais, demonstrando uma evolução mais lenta do proestro. No dia 10, todos os animais já apresentavam células superficiais, com destaque para o animal 5 com 100% de células superficiais anucleadas no esfregaço. Por fim, no dia 12, com exceção do animal 1, todos apresentavam 100% de células superficiais, porém o grau de superficiais anucleadas ou com núcleo picnótico variou entre os animais. De fato, JOHNSTON et al. (2001) citaram que a porcentagem máxima de cornificação celular, que reflete a máxima estimulação estrogênica, está entre 80 e 90% na maioria dos animais. Ainda segundo esses autores, o tipo e a intensidade da coloração podem contribuir para que as células superficiais tenham aparência anuclear.

Avaliando, portanto, as características de citologia vaginal influenciadas pela indução hormonal exógena, pode-se observar que houve indução de proestro em todos os animais, porém com intensidades de progressão diferenciadas. Considerando que o início do estro coincide com a máxima cornificação celular, pode-se afirmar que até o dia 12, o animal 1 ainda não havia entrado em estro citológico.

Realizando indução de estro em protocolo semelhante ao utilizado no presente estudo, ENGLAND & ALLEN (1991) avaliaram comparativamente a repetibilidade de alguns eventos em um grupo de cadelas submetidas à indução do estro com 20 UI/kg de eCG (uma vez ao dia por 5 dias) e 500 UI de hCG/animal (no quinto dia) e em grupo de animais em estro espontâneo. Os autores descreveram as alterações de citologia vaginal e encontraram que o pico de cornificação celular, se deu mais precocemente nos animais submetidos à indução do estro, comparativamente aos animais em estro natural. Nossos dados corroboram em parte com o aspecto citado, pois apesar de os animais 2, 4, 5, 7 e 8, já apresentarem presença de células superficiais anucleadas por volta do dia 6 após início da aplicação do protocolo, o pico de cornificação não se deu precocemente. Assim podemos afirmar que os animais do presente estudo não

desenvolveram hiperestrogenismo, condição que rotineiramente exige cautela quando do uso de aplicações repetidas de eCG.

A cadela é a única fêmea doméstica que apresenta elevação na concentração sérica de progesterona 2-3 dias antes da ovulação. A concentração de progesterona permanece menor que 1 ng/mL durante o anestro e maior parte do proestro. Os valores aumentam rapidamente acima de 1 ng/mL antes e durante o pico pré- ovulatório de LH (CONCANNON et al., 1989). No presente estudo, a aplicação de hCG, foi realizada no 10º dia de indução, mimetizando o pico pré ovulatório de LH e 48 horas depois realizou-se a dosagem sérica de progesterona, que revelou os valores descritos na Tabela 2.

Os animais 1, 3 e 4 apresentaram valores dentro do esperado, pois segundo JOHNSTON et al. (2001), valores séricos de progesterona entre 4 a 10 ng/mL, indicam que a ovulação está ocorrendo, fato que se aplica ao momento de dosagem em nossos animais, 48 horas após aplicação de hCG. Os outros seis animais apresentaram níveis séricos de progesterona acima do esperado, pois como descrito por CONCANNON et al. (1989), picos de 15 a 90 ng/mL ocorrem apenas por volta de 15 a 30 dias após o pico de LH, e no presente estudo a aplicação de hCG havia sido realizada há apenas 48 horas. Esse fato demonstra um processo de luteinização pré ovulatória exacerbado. Essa observação destoa das descrições de ENGLAND & ALLEN (1991), que afirmaram que a concentração sérica de progesterona foi sempre menor nos animais em estro induzido, comparando-se aos animais em estro natural e que essa pode ser uma das causas das baixas taxas de prenhez. Embora tenhamos encontrado níveis elevados de progesterona, cabe ressaltar que não foi avaliado o tempo de persistência desses valores e portanto não podemos inferir sobre nenhum efeito positivo em taxas de prenhez, mas podemos afirmar que os valores séricos de progesterona encontrados nos animais 2,5,6,7,8 e 9 não estão em consonância com os achados de citologia vaginal desses animais.

Tabela 2. Valores de progesterona sérica (P_4), referente ao 12º dia após início da aplicação de protocolo de indução de estro, em fêmeas caninas. Jaboticabal – SP, 2007.

	Animais								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
P_4 (ng/mL)	5,2	15,4	9,4	7,5	26,5	17,8	19,8	14,5	17,9

O crescimento e desenvolvimento folicular tem sido avaliado em vários estudos através de ultra-sonografia. No tempo da ovulação os ovários apresentam estruturas anecóicas (císticas), que são os folículos em crescimento. Após a ruptura dos folículos, essas estruturas se luteinizam rapidamente tornando-se sítios organizados capazes de sustentar a produção de progesterona por longos períodos. Essas estruturas, não mais císticas, são denominadas corpos lúteos e são reconhecidas facilmente na superfície ovariana por sua coloração salmão. Durante esse período, ainda, o útero pode tornar-se espesso em preparação para a implantação, o sangramento microvascular pode parar ou diminuir e pode haver desenvolvimento glandular visível (WALLACE et al., 1992)

Os ovários, macroscopicamente observados por ocasião da OSH (realizada no 12º dia após início do protocolo de indução), evidenciaram uniformidade de coloração hemorrágica e superfície irregular para todos os animais. O número de folículos, corpos hemorrágicos e corpos lúteos encontram-se na Tabela 3 e caracterizam a efetividade na indução do crescimento folicular e ovulação. Com exceção do animal 1, que apresentou a menor taxa de progesterona, todos os animais apresentaram folículos rompidos, ou seja, ocorrência de ovulação e presença de corpo hemorrágico, na maioria (Figuras 3A e B). Nesse contexto pode-se afirmar que houve correspondência entre os valores de progesterona encontrados e os achados de macroscopia ovariana.

Quanto às alterações uterinas, apenas o animal 6 apresentou secreção intra-uterina, o que nos permitiu concluir que o protocolo utilizado não causou efeitos negativos relacionados à hiperestimulação glandular uterina, o que poderia relacionar-se ao complexo hiperplasia endometrial cística-piometra.

Tabela 3. Número de estruturas macroscópicas ovarianas, observadas por ocasião da ovariosalpingo-histerectomia, realizada no 12º dia após início da aplicação de protocolo de indução de estro, em nove fêmeas caninas. Jaboticabal – SP, 2007.

Estruturas ovarianas	Animais								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Folículos túrgidos	07	05	04	02	11	05	12	11	15
Folículos rompidos	0	01	01	02	04	17	13	07	09
Corpos hemorrágicos	0	0	01	0	01	06	08	12	06
Corpos lúteos	0	0	0	0	0	0	0	03	0

Um achado interessante do presente estudo foi a característica do fluido folicular encontrado. Apesar do grande número de folículos rompidos, havia considerável número de folículos ainda túrgidos (não rompidos). Ao realizarmos fatiamento ovariano para a liberação de complexos *cumulus*-oócitos, que foram destinados à outro experimento, notamos que o fluido folicular apresentava um aspecto nunca antes observado em outros ovários, nas diversas fases do ciclo estral (Figuras 3C e D). Todos os folículos ovarianos das fêmeas do presente experimento apresentavam fluido folicular extremamente denso, viscoso, assemelhando-se à um gel aderente. Esse fluido envolvia os oócitos de tal forma que se tornou impossível a separação entre os mesmos. Esse aspecto nos permitiu inferir que essa característica de fluido folicular pode estar intrinsicamente relacionada às baixas taxas de fertilidade descritas na literatura, quando se induz o estro em cadelas, com o uso de gonadotrofinas. O fato de termos encontrado boa evolução na citologia vaginal, consideráveis níveis séricos de progesterona e ainda, altas taxas de crescimento folicular e ovulação, claramente evidenciadas na análise macroscópica ovariana, reforçam a hipótese que levantamos, de que as baixas taxas de fertilização podem também estar relacionadas à alterações físicas e até bioquímicas do fluido folicular de fêmeas caninas submetidas à indução de estro com gonadotrofinas.

Em conclusão, podemos afirmar que, nas condições do presente estudo, o estro induzido por gonadotrofinas foi caracterizado por:

1. Citologia vaginal característica de proestro com progressão para estro em graus variados;
2. Valores séricos de progesterona acima dos níveis observados em animais em estro natural, indicando processo de luteinização acelerado;
3. Efetividade na promoção de crescimento folicular e ovulação;
4. Ausência de indução de alterações uterinas consideráveis;
5. Presença de fluido folicular de característica densa e viscosa, o qual muito possivelmente compromete as taxas de fertilidade.

REFERÊNCIAS

ARTHUR, G.H. Infertility in bitch and queen. In: **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. 7. Ed. London: WB Saunder, 1996, p.536.

BOUCHARD, G. Seasonality and variability of the interoestrus interval in the bitch. **Theriogenology**, v.36, n.1, p. 41-50, 1991.

CONCANNON, P.W.; DIGREGÓRIO, G.B. Canine vaginal cytology. In: T.J. BURKE (ed). **Small Animal Reproduction and Fertility**. Ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986, p. 96-111.

CONCANNON, P.W.; MC CANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and Endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39 , suppl, p.3-25, 1989.

CONCANNON, P.W.; LASLEY, B.; VANDERLIP, S. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrus dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, suppl, p.41-54, 1997.

DAVOL, P.A. Canine Reproduction. Disponível em <<http://www.labbies.com>. Acesso em: 22 maio 2007.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Repeatability of events during spontaneous and gonadotrophin-induced oestrus in bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, n.2, p.443-448, 1991.

FAIR, T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embriology**, v. 195, p. 327-336, 1997.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. The ovarian cycle & vaginal cytology in the bitch. In: DI BRYDEN (Ed) Internal Medicine. **Proceedings** 284, The Post-Graduate Foundation in Veterinary Science of the University of Sydney, 1997, p. 273-288.

HASE, M. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dog. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.62, n.3, p.243-248, 2000.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Incidence of oocyte nuclear maturation within the ovarian follicle of the bitch. **Veterinary Record**, v. 143, p.590-591, 1998.

HEWITT D.A.; WATSON, P.F.; ENGLAND, G.C.W. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.1083-1128, 1998.

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.2, p. 275-288, 1996.

JHONSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Sexual differentiation and normal anatomy of the bitch. In:___**Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. 1v, p. 1-14.

JOCHLE, W.; ANDERSEN, A.C. The estrous cycle in the dog: a review. **Theriogenology**, v.07, n.03, p. 113-140, 1977.

KOOISTRA, H.S. Concurrents pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of estrous cycle and anestrus in beagle bitches. **Biology of Reproduction**, v. 60, n.1, p.65-71, 1999.

LEAVIT, W.W.; BOSLEY, C.G.; BLAHA, G.C. Source of ovarion preovulatory progesterone. **Nature New Biology**, v.234, n.52, p. 283-284, 1971.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOZ, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, D. Effects of follicle size on bovine oocytes quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48-53, 1994.

MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M.J.; PARAMIO, M.T. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes . **Theriogenology**, v. 41, p. 969-980, 1994.

MIALOT, J.P. **Patologia da Reprodução dos Carnívoros Domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1988, p.34-40.

MOSES D.L.; SHILLE, V.M. Induction of estrus in greyhound bitches with prolonged idiopathic anestrus or with suppression of estrus after testosterone administration. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 192 (11), p. 1541-1545, 1988.

MOTLIK, J.; FULKA, J. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. **Journal Exp. Zoology**, v. 198, p. 155-162, 1986.

ONCLIN, K. Patterns of circulating prolactin LH and FSH during dopamine-agonist induced termination of anestrus in beagle dog. . **Biology of Reproduction**, v.52, suppl, p.314, 1993.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v. 48, p. 769-774, 1997.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v. 54, p. 535-542, 2000.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Endocrinologia Reprodutiva na cadela. **Clínica Veterinária**, n.40, set/out, p. 50-58, 2002.

SHILLE, V.M.; STABENFELDT, G.H. Current concepts on reproduction of the dog and cat. **Advances in Veterinary Science and Cooperative Medicine**, v.24, p.211-243, 1980.

SHILLE, V.M.; TATCHER, M.J.; LLOYD, M.L. Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch. **Journal Reproduction and Fertility**, v.39, suppl, p.103-113, 1989.

VERSTEGEN, J. Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in the dogs by administration of purified pig LH. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.111, n.1, p. 35-40, 1997.

VERSTEGEN, J. Hormonal cycle and vaginal cytology in the bitch. In: Reproduction Hos Hund. **Proceedings**. Frederiksberg Dansk Veterinær forening for Husdyrreproduction. Escandinávia, 1999, p. 7-21.

VALTONEN, M.; JALKANEN, L. Species-specific features of oestrus development and blastogenesis in domestic canine species. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, suppl, p.133-137, 1993.

ZOLDAG, L.; FEKETE, S.; CSAKY, I.; BERSENYI, A. Ferile estrus induced in bitch by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. **Theriogenology**, v.55, p. 1657-1666, 2001.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Maturation, fertilization and development of dog oocyte in vitro. **Biology of Reproduction**, v.46, n.5, p. 853-858, 1992.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl 47, p. 227-229, 1993.

WALLACE, S.S.; MAHAFFEY, M.B.; MILLER, D.M.; THOMPSON, F.N.; CHAKRABORT, P.K. Ultrasonic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, n.2, p. 209-215, 1992.

CONCLUSÕES GERAIS

A presente pesquisa permitiu concluir que:

- A indução do estro favorece a obtenção de oócitos Grau I e com diâmetro superior a 110 μ m;
- A perda oocitária durante o processo de coloração é menor quando se realiza indução do estro;
- A suplementação de progesterona não apresentou efeito positivo na retomada e progressão da meiose;
- É interessante o uso do soro de cadela em estro para a retomada da meiose de oócitos caninos;
- Em meio suplementado com progesterona e soro de cadela em estro, os estádios reprodutivos anestro e estro proporcionam maiores índices de MI e as taxas de degeneração oocitária são maiores em animais em estro induzido;
- Há retomada e progressão da meiose em oócitos, no ambiente intrafolicular;
- Os estádios reprodutivos não influenciaram nas taxas das diferentes configurações cromossômicas intraovarianas;
- O diâmetro do oócito não é influenciado pelo anestro, estro e estro induzido;
- Encontra-se significativamente mais oócitos com diâmetro superior ou igual a 110 μ m nos ovários de cadelas, independentemente do estágio reprodutivo em que se encontram;
- Cadelas submetidas à indução do estro com gonadotrofinas apresentam citologia vaginal característica de proestro com progressão para estro em graus variados; valores séricos de progesterona acima dos níveis observados em animais em estro natural, indicando processo de luteinização acelerado; efetivo crescimento folicular e ovulação; ausência de alterações uterinas consideráveis e presença de fluido folicular de característica densa e viscosa, o qual muito possivelmente compromete as taxas de fertilidade.

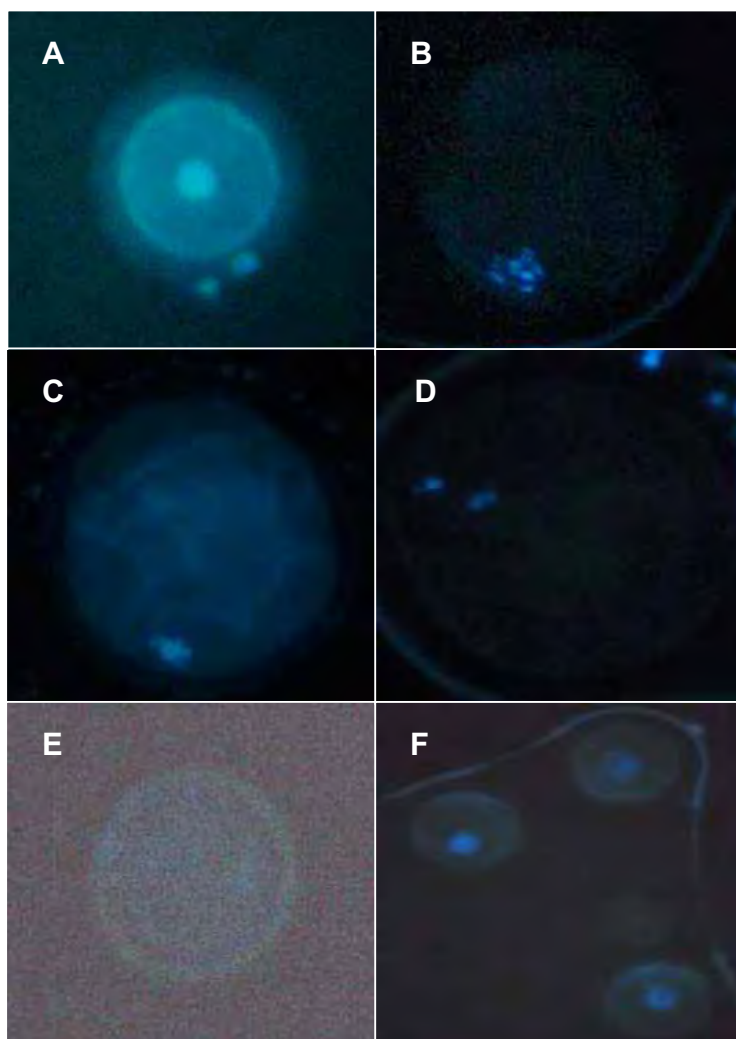


FIGURA 1. Fotomicrografia de oócitos caninos em diferentes estágios de maturação nuclear. **A a E** (foram submetidos à MIV), **F** (não submetido à MIV). **A:** vesícula germinativa (VG); **B:** quebra de vesícula germinativa (QVG); **C:** metáfase I (MI); **D:** metáfase II; **E:** degenerado ou não passível de identificação; **F:** oócitos em VG imediatamente após a coleta. Coloração: Hoechst 33342.

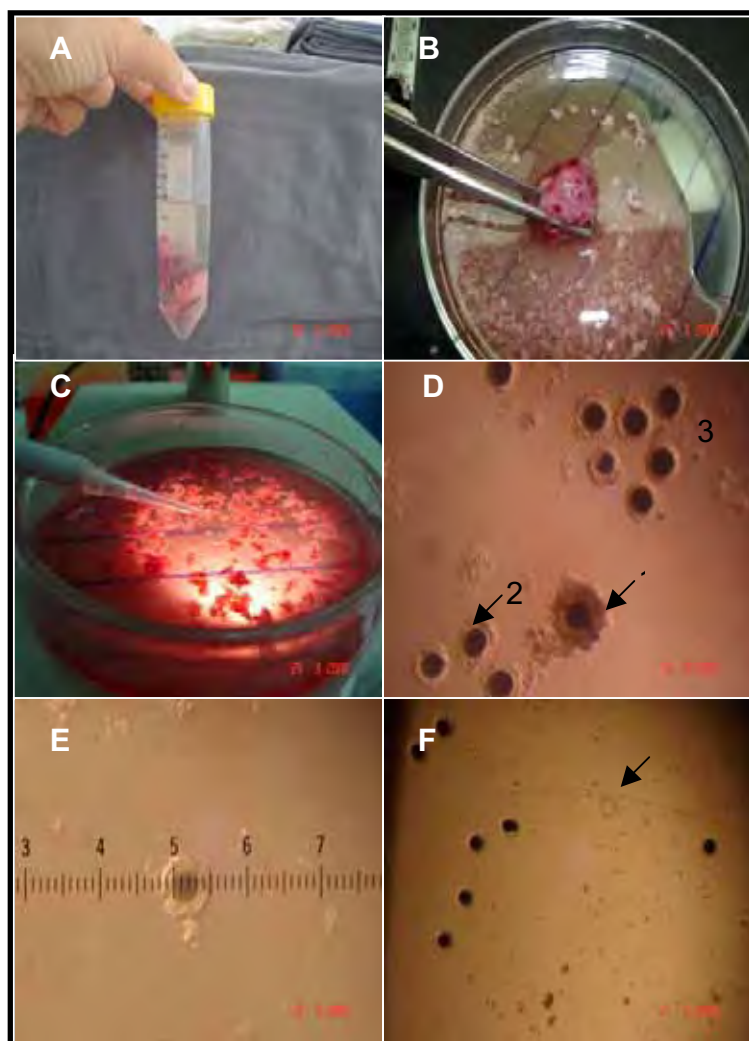


FIGURA 2. Fotografias digitalizadas **A.** Ovários em solução de transporte (SF 0,9%) imediatamente após a OSH; **B.** Ovário em placa de Petri, sendo submetido a fatiamento para recuperação dos oócitos. **C.** Processo de seleção dos oócitos em placa aquecida após fatiamento. **D.** COCs de diferentes graus. Seta 1 : COC grau 1 (selecionado para maturação), seta 2 e 3 : COCs graus 2 e 3 respectivamente (não selecionados para maturação). **E.** Mensuração oocitária através de retículo milimetrado de medição (10mm/100partes) para ocular de 10x de Microscópio Estereoscópio/ 1 mm = 27,5 μ m (em zoom 4.0). **F.** Oócitos desnudos após passagem pela solução de hialuronidase, a seta aponta oócito degenerado após esse processo.

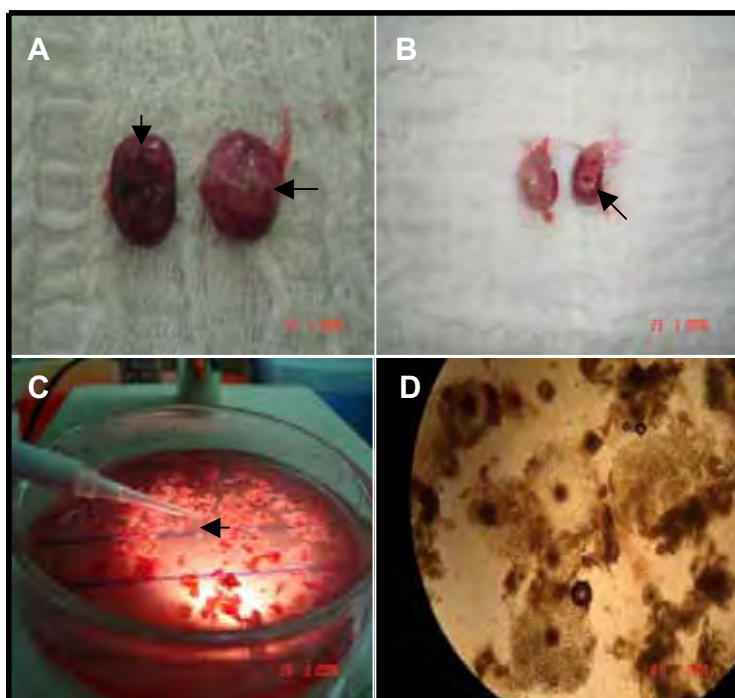


FIGURA 3. Fotografias digitalizadas. **A.** Ovários estimulados com gonadotrofinas exógenas. Ovário da direita com folículos protrusos (setas) e ovário da esquerda com corpo hemorrágico (seta). **B.** Ovários estimulados com gonadotrofinas exógenas. Ovário da direita com folículos rompidos (seta). **C.** Processo de seleção de oócitos provenientes de ovários estimulados com gonadotrofinas exógenas (observar na ponta da seta substância viscosa que envolvia os oócitos). **D.** Oócitos observados em microscópio estereoscópio e envoltos por fluido viscoso.

APÊNDICES

Apêndice A. Número absoluto e relativo de oócitos, recuperados de fêmeas em anestro, em diferentes graus de maturação nuclear (VG: vesícula germinativa; QVG: quebra de vesícula germinativa; MI: metáfase I; A-T I: anáfase-telófase I; MII: metáfase II; DEG: degenerados ou não passíveis de identificação), após 72 horas de cultivo em diferentes meios (1: meio MIV; 2: meio MIV + progesterona; 3: meio MIV + soro de cadela em estro; 4: meio MIV + progesterona + soro de cadela em estro) - Jaboticabal-SP, 2007.

Configuração Cromossômica	Meios			
	1	2	3	4
VG	4/33 (12,12)	11/39 (28,20)	5/41 (12,19)	7/40 (17,5)
QVG	11/33 (33,33)	11/39 (28,20)	9/41 (21,95)	9/40 (22,5)
MI	4/33 (12,12)	10/39 (25,64)	10/41 (24,39)	7/40 (17,5)
A-T I	2/33 (6,06)	0/39 (0)	0/41 (0)	0/40 (0)
MI	1/33 (3,03)	0/39 (0)	1/41 (2,43)	4/40 (10,0)
DEG.	11/33 (33,33)	7/39 (17,94)	16/41 (39,02)	13/40 (32,5)

Apêndice B. Número absoluto e relativo de oócitos recuperados de fêmeas em estro, em diferentes graus de maturação nuclear (VG: vesícula germinativa; QVG: quebra de vesícula germinativa; MI: metáfase I; A-T I: anáfase-telófase I; MII: metáfase II; DEG: degenerados ou não passíveis de identificação), após 72 horas de cultivo em diferentes meios (1: meio MIV; 2: meio MIV + progesterona; 3: meio MIV + soro de cadela em estro; 4: meio MIV + progesterona + soro de cadela em estro) - Jaboticabal-SP, 2007.

Configuração Cromossômica	Meios			
	1	2	3	4
VG	7/62 (11,30)	7/49 (14,28)	3/55 (5,45)	2/49 (4,08)
QVG	13/62 (20,97)	6/49 (12,24)	18/55(32,73)	10/49(20,40)
MI	12/62(19,35)	11/49(22,45)	10/55(18,18)	11/49(22,44)
A-T I	3/62 (4,84)	3/49(6,12)	3/55(5,45)	2/49(4,08)
MI	5/62 (8,06)	2/49 (4,08)	6/55(10,91)	4/49 (8,16)
DEG.	22/62 (35,48)	20/49(40,81)	15/55(27,27)	20/49(40,81)

Apêndice C. Número absoluto e relativo de oócitos, recuperados de fêmeas em estro induzido, em diferentes graus de maturação nuclear (VG: vesícula germinativa; QVG: quebra de vesícula germinativa; MI: metáfase I; A-T I: anáfase-telófase I; MII: metáfase II; DEG: degenerados ou não passíveis de identificação), após 72 horas de cultivo em diferentes meios (1: meio MIV; 2: meio MIV + progesterona; 3: meio MIV + soro de cadela em estro; 4: meio MIV + progesterona + soro de cadela em estro) - Jaboticabal- SP, 2007.

Configuração Cromossômica	Meios			
	1	2	3	4
VG	15/87 (17,24)	21/86 (24,42)	8/80 (10,0)	2/77 (2,6)
QVG	25/87 (28,73)	20/86 (23,26)	21/80(26,25)	19/77(24,68)
MI	7/87(8,04)	8/86(9,30)	8/80 (10,00)	11/77(14,29)
A-T I	2/87 (2,30)	0/86(0)	0/80(0)	1/77(1,29)
MI	7/87 (8,04)	0/86 (0)	3/80(3,75)	2/77 (2,6)
DEG.	31/87 (35,63)	37/86(43,02)	40/80(50,0)	42/77(54,54)

Apêndice D. Número absoluto de oócitos grau I e números absolutos e relativos dos oócitos com diâmetro inferior e superior ou igual a 110 µm, obtidos de ovários de fêmeas caninas em fase de anestro – Jaboticabal- SP, 2007.

Animal	nº total de oócitos Grau I	nº oócitos diâm <110 um	nº oócitos diâm >110 um
1	45	12 (26,6)	33 (73,3)
2	32	04 (12,5)	28 (87,5)
3	11	03 (27,3)	08 (72,7)
4	40	08 (20,0)	32 (80,0)
5	37	20 (54,0)	17 (46,0)
6	11	02 (18,18)	09 (81,81)
7	30	12 (40,0)	18 (60,0)
8	91	43 (47,25)	48 (52,7)
9	24	06 (25,0)	18 (75,0)
10	18	06 (33,33)	12 (66,6)
11	58	25 (43,10)	33 (56,8)

Apêndice E. Número absoluto de oócitos grau I, oócitos com diâmetro inferior 110 µm e oócitos com diâmetro superior ou igual a 110 µm, obtidos de ovários em fase pré-ovulatória, de fêmeas caninas em **estro natural** - Jaboticabal- SP, 2007.

Animal	nº total de oócitos Grau I	nº oócitos diâm <110 µm	nº oócitos diâm >110 µm
1	113	49 (43,36)	64 (56,63)
2	22	05 (22,72)	17 (77,27)
3	22	06 (27,27)	16 (72,72)
4	56	07 (12,5)	49 (87,5)
5	56	12 (21,42)	44 (78,57)
6	111	34 (30,63)	77 (69,36)
7	58	11 (18,96)	47 (81,03)
8	31	07 (22,58)	24 (77,41)
9	42	07 (16,66)	35 (83,33)
10	184	38 (20,65)	146 (79,34)
11	48	25 (52,08)	23 (47,91)
12	75	18 (24,0)	57 (76,0)
13	113	43 (38,05)	70 (61,94)
14	30	4 (13,33)	26 (86,66)
15	20	7 (35,0)	13 (65,0)
16	45	10 (22,22)	35 (77,77)

Apêndice F. Número absoluto de oócitos grau I, oócitos com diâmetro inferior a 110 µm e oócitos com diâmetro superior ou igual a 110 µm, obtidos de ovários de fêmeas em **estro induzido** - Jaboticabal- SP, 2007.

Animal	nº total de oócitos Grau I	nº oócitos diâm <110 µm	nº oócitos diâm >110 µm
1	92	34 (36,96)	58 (63,04)
2	62	08 (12,90)	54 (87,10)
3	16	03 (18,75)	13 (81,25)
4	53	31 (58,49)	22 (41,51)
5	72	29 (40,28)	43 (59,72)
6	47	17 (36,17)	30 (63,83)
7	73	17 (23,29)	56 (76,71)
8	53	12 (22,64)	41 (77,36)
9	99	34 (34,34)	65 (65,66)

Apêndice G. Protocolo de composição de solução de lavagem padrão TCM199, utilizado para MIV em cães. Jaboticabal – SP, 2007.

Solução Mãe TCM 199 - Hepes	5ML
Água proveniente do sistema Milli-Q	5 ML
TCM 199	0,0475 g
Bicarbonato de sódio	0,0021 g
Hepes sódico (10mM)	0,013 g
Hepes ácido (10mM)	0,012 g
Meio de Lavagem	5ML
Solução Mãe TCM 199 - Hepes	5 mL
BSA	0,015 g
Piruvato (100mM)	10 uL
Amicacina (16,67 µg/µL)	25 uL

Apêndice H. Protocolo de composição de meio de maturação padrão TCM199, utilizado para MIV em cães. Jaboticabal – SP, 2007.

Solução Mãe TCM 199 bicarbonato	5mL
Água proveniente do sistema Milli-Q	5 mL
TCM 199	0,0475 g
Bicarbonato de sódio (26mM)	0,011 g
Meio de Maturação (MIV)	5mL
Solução Mãe TCM 199 bicarbonato	5,0 mL
BSA	0,015 g
Piruvato sódico (100mM)	10 µL
Amicacina (16,67 µg/µL)	25 µL
FSH (1 µg/µL)	25 µL
LH (5 µg/µL)	10 µL
ITS (16 µg/µL)	5 µL
Estradiol 17B (1 µg/µL)	10 µL

Apêndice I. Método de Romanowsky utilizado para coloração de esfregaços vaginais. Jaboticabal–SP, 2007.

Ordem de passagem	Reagente	Tempo
1	Sol. de triarilmetano 0,1%	Imersão por 5 segundos
2	Sol. de xantenos 0,1%	Imersão por 5 segundos
3	Sol. de tiazinas 0,1%	Imersão por 5 segundos

Após a passagem 3 lavar as lâminas em água corrente e secar a temperatura ambiente

Apêndice J. Lista de reagentes e hormônios utilizados. Jaboticabal – SP, 2007

Produto	Código/ nome comercial	Fornecedor
Amicacina	-	Biochimico
Bicarbonato de sódio	7412	Sigma
BSA	A6003	Sigma
eCG	Novormon	Syntex
Estradiol	E2758	Sigma
FSH	Pluset	Calier
hCG	Vetecor	Calier
Hepes ácido	4018-01	Sigma
Hepes sódico	H3784	Sigma
Hialuronidase	H3884	Sigma
Hoescht	B2261	Sigma
ITS	I1884	Sigma
LH	Profasi	Calier
Paraformaldeído	P6148	Sigma
Piruvato	P4562	Sigma
Progesterona	P7556	Sigma
TCM199	31.100-027	Gibco
Triton	X100	Sigma