

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

MATURAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS CANINOS: INFLUÊNCIA
DA SUPLEMENTAÇÃO HORMONAL SERIADA SOBRE A
ULTRAESTRUTURA OOCITÁRIA.

Tathiana Ferguson Motheo

Médica Veterinária

2013

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

**MATURAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS CANINOS: INFLUÊNCIA
DA SUPLEMENTAÇÃO HORMONAL SERIADA SOBRE A
ULTRAESTRUTURA OOCITÁRIA.**

Tathiana Ferguson Motheo

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliandra Antônia Pires-Buttler

Co-orientadora: Profa. Dra. Maricy Apparício Ferreira

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tathiana Ferguson Motheo – nascida no dia 21 de Outubro de 1980, na cidade de Rio Claro, São Paulo, filha de Artur de Jesus Motheo e Angela Maria Ferguson Cavichioli Motheo. Graduiu-se em Janeiro de 2005 pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” *campus* de Jaboticabal. Fez parte do programa de aprimoramento (residência) na área de Reprodução e Obstetrícia Veterinária também pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *campus* de Jaboticabal no período compreendido entre março de 2005 e fevereiro de 2007. Fez mestrado pelo programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária, entre março de 2007 a fevereiro de 2009, na mesma instituição, sob orientação do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente e obteve bolsa junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Ingressou no doutorado também sob orientação do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente em março de 2009 pelo programa de pós-graduação em Medicina Veterinária na área de Reprodução Animal e obteve bolsa junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Por fim, realizou estágio e desenvolveu pesquisas com metabolismo oocitário canino entre agosto de 2011 e janeiro de 2012, no Department of Reproductive Sciences, Center for Species Survival, Smithsonian Conservation Biology Institute, Front Royal, Virginia, EUA sob supervisão da pesquisadora Professora Dra. Nucharin Songsas

Dedico

À minha querida família
pelo incentivo, apoio e carinho sempre.

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado a vida, minha família, meus amigos e por me dar forças para nunca desistir e sempre seguir em frente.

Aos meus pais Angela e Artur pelo amor, carinho e incentivo sempre. Vocês são a base de tudo o que sou hoje. Vocês são o meu porto seguro. Amo muito vocês.

Aos meus “gordos” (Arthur e Stéphanie) e ao meu irmão Daniel. Particularmente os meus gordinhos, vocês sabem que vocês são como filhos para mim e sabem que podem contar comigo para o que der e vier. Tenho muito orgulho de vocês pelo adultos que vocês estão se tornando.

Ao Alexandre, meu marido. É difícil expressar o quanto você significa para mim. Muito obrigada pelo amor, carinho, dedicação, paciência e pelas estatísticas. Temos agora uma nova etapa em nossas vidas, não vai ser fácil, mas o que me conforta é você está ao meu lado. Te amo muito!

Ao meu orientador Wilter Ricardo Russiano Vicente, pelos 9 anos de Obstetrícia. Obrigada pela oportunidade de chegar onde estou e pelo voto de confiança, carinho e amizade sempre. Muito obrigada.

À Profa. Laura Satiko Okada Nakaghi, por toda ajuda, apoio e amizade.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa Prof. Idécio Luiz Sinhorini, Profa. Laura Satiko Okada Nakaghi, Profa. Vera Fernanda M. H. de Lima, Profa. Ana Paula Coelho Ribeiro, Dra. Naiara Zoccal Saraiva e Dra. Aracélle Elisane Alves por atenderem ao convite para composição das bancas e pela imensa contribuição para a redação final da tese.

Á minha querida co-orientadora e amiga Maricy Apparício Ferreira pela amizade e pelos conhecimentos em maturação in vitro.

À minha outra queridíssima co-orientadora Eliandra Antônia Pires-Buttler (Eli), sem você este trabalho não existiria. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão por tudo o que você fez por mim, Obrigado Eli pela pessoa e amiga maravilhosa que você é !

Á Dra. Nucharin Songsasen e toda a equipe do Smithsonian Conservation and Biology Institute por terem me proporcionado a oportunidade de fazer parte de sua equipe. Obrigada pela amizade, acolhida e pela enorme experiência de vida.

Às “Claudinhas”, (antigas e recentes) técnicas do Laboratório da MEV e MET da UNESP/Jaboticabal, com as quais dividi não somente as minhas angústias no processamento e na avaliação das minhas amostras, mas também a felicidade de superação de um obstáculo. Obrigada por tudo.

Á Teresa, técnica do Laboratório de Microscopia da Faculdade de Medicina da USP/Ribeirão Preto, muito obrigada pela ajuda na finalização deste trabalho.

Às minhas três queridas amigas Aracélle Elisane Alves, Paula Andressa Pennacchi Savi e Luciana Cristina Padilha Nakagi sem o apoio e auxílio de vocês este projeto não seria possível. Vocês são a prova viva de que verdadeiras amizades existem. Obrigada por tudo!

Aos meus grandes e “antigos” amigos da República Aêêê Mariana C. H. Rondelli (Mari), Sofia Borin Cirvellentti (Sof), Leandro Z. Crivellenti (Lê), Paula A. P. Savi (Paulinha) e Negão e às minhas novas companheiras de república

Fabília (Fabícia) e Isa, vocês são a minha família Jaboticabalense, sentirei muito a falta de vocês, obrigado por todos os momentos de descontração e amizade, assim como os momentos de consolo em. Vocês moram no meu coração!

Aos amigos da Obstetrícia por toda ajuda e momentos de descontração. Muito obrigada a todos, por toda ajuda durante a durante todos estes anos de convivência. Aracélle Elisane Alves (Ara), Eliandra Antônia Pires-Buttler (Eli), Paula P. Savi (Paulinha), Luciana C.P. Nakagi (Lu), Maricy A. Ferreira (Má), Giuliano Q. Mostachio (Giu), Diogo J, Cardilli (Di), Maria Emília (ME), Fabiana A. Voorwald (Fabi), Caio Tiosso, Valeska Rodrigues, Riacrdo, Juliana, Raquel, Beatrice, Pedro Paulo, Felipe Leandro, Marcos (Psico), Alanna, Marina, Ana Paula, Dona Izilda, Arnildo e Anésia. Obrigada por tudo!

A todos os funcionários e colegas do Departamento de Reprodução Animal em especial Roberta, Ivo, Isabel (Bel) e Edson, obrigada por tudo!

À todos os proprietários que compreenderam e aceitaram em ceder seus bichinhos para o desenvolvimento deste trabalho. E a todas as cadelinhas que participaram do nosso projeto, certamente sem vocês nada disso seria possível.

Um agradecimento especial à **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, que através da concessão da bolsa de estudo e da reserva técnica, proporcionou o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 – Particularidades da fisiologia reprodutiva da cadela	4
2.2 – Desenvolvimento e maturação oocitária <i>in vivo</i> da cadela	6
2.3 – Aspectos morfológicos do complex <i>cumulus</i> -oócito canino	7
2.4 – Configuração da cromatina de oócitos caninos	9
2.5 – Aspectos gerais da maturação <i>in vitro</i> de oócitos caninos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 – Animais e locais de processamento e análise de amostras	17
3.2 – Determinação da fase do ciclo estral	17
3.3 – Obtenção e classificação morfológica de oócitos caninos	19
3.4 – Maturação <i>in vitro</i>	20
3.5 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	21

3.6 – Análise das amostras submetidas a MEV	22
3.7 – Microscopia electronica de transmissão (MET)	25
3.8 – Análise das amostras da MET	26
3.9 – Análise estatística	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 – Valores de progesterona sérica	28
4.2 – Microscopia eletrônica de varredura	29
4.3 – Microscopia eletrônica de transmissão	33
4.3.1 – Avaliação ultraestrutural de COC's não maturados (avaliação 0 hora)	34
4.3.2 – Avaliação ultraestrutural de oócitos após o processo de MIV	38
5. CONCLUSÃO	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICE.....	62

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Adaptação de Viaris De Leseño et al.(2008b) utilizado para classificar a VG de oócitos recém-colhidos e imaturos (A) e oócitos que permaneceram em VG após o processo de maturação <i>in vitro</i> (B). A: Antes da maturação <i>in vitro</i> a VG_c revela núcleo central arredondado com grande nucléolo reticulado e VG_p apresenta núcleo ligeiramente achatado disposto na periferia do oócito e nucléolo em vários estádios de condensação da cromatina. B: Após a maturação <i>in vitro</i> a VG pode ser classificada em três diferentes padrões: VG₁ com grande núcleo arredondado e central. VG₂ núcleo periférico, ligeiramente achatado e nucléolo não se apresenta envolto por cromatina condensada. VG₃ núcleo periférico, achatado e nucléolo envolto por cromatina condensada.....	11
Figura 2. Fotomicrografia de avaliação colpocitológica das diferentes fases do ciclo estral da cadela sob microscopia de luz. (aumento 40x) (A) Anestro. Células parabasais (P) e <i>debris</i> celulares. (B) Final de proestro. Células superficiais queratinizadas com núcleo picnótico (S) e hemácias (h). (C) Estro. Células superficiais queratinizadas (S). (D) Diestro. Células parabasais (P), intermediárias (I) e neutrófilos (N). Jaboticabal, 2013.....	18
Figura 3. Fotomicrografia dos complexos <i>cumulus</i>-oócito (COCs) caninos em estereomicroscópio em aumento de 4X. COCs classificados como grau I (I) e II (II). Jaboticabal, 2013.....	19
Figura 4. Sequência de processamento das amostras para realização da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A. Desidratação dos oócitos em cápsulas de micropore. B. Secador de ponto crítico. C. Aparelho de metalização Denton Vacuum. D. Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 5410. Jaboticabal, 2013.....	22
Figura 5. Eletromicrografia de complexo <i>cumulus</i>-oócito de fêmea canina A. Células do <i>cumulus</i> organizadas de forma regular ao redor do oócito. B. Células do <i>cumulus</i> arranjadas irregularmente ao redor do oócito. C. Comunicação entre as células do <i>cumulus</i> do tipo curto (seta). D. Comunicação entre as células do <i>cumulus</i> do tipo longo (seta). Jaboticabal, 2013.....	23

- Figura 6.** Eletromicrografia do complexo *cumulus*-oócito de fêmeas caninas demonstrando os parâmetros utilizados para se estabelecer a escala de intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*. **A e B.** Ausência e pouco processos emitidos entre as células do *cumulus*. **C.** Quantidade moderada de processos emitidos entre as células do *cumulus*. **D e E.** Quantidade intensa de processos emitidos entre as células do *cumulus*. Adaptação de PIRES-BUTTLER (2010)..... 24
- Figura 7.** Arranjo das células do *cumulus* ao redor de oócitos de cadelas em fase folicular à avaliação 0 hora, e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios 1, 2, 3, 4 e 5..... 30
- Figura 8.** Arranjo das células do *cumulus* ao redor de oócitos de cadelas em fase não folicular à avaliação 0 hora e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios 1, 2, 3, 4 e 5..... 30
- Figura 9.** Tipo de comunicação (curta/longa) entre as células do *cumulus* de cadelas da fase folicular à avaliação 0 hora, e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios 1, 2, 3, 4 e 5 32
- Figura 10.** Tipo de comunicação (curta/longa) entre as células do *cumulus* de cadelas da fase não folicular à avaliação 0 hora, e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios 1, 2, 3, 4 e 5..... 32
- Figura 11.** Eletromicrografia de COC's não maturados (avaliação 0h) provenientes de cadelas em fase não folicular (FN). **(A)** Núcleo (N) arredondado com nucléolo (NL) denso e condensado na periferia do oócito. Ao redor deste presença de pequenos *clusters* mitocondriais (M). (aumento 8.000x). **(B)** Infiltração das células do *cumulus* através da zona pelúcida (ZP), gerando comunicação entre estas células e o ooplasma (CO). Microvilosidade (MV), grânulos corticais (GC) e mitocôndrias (M) na periferia do ooplasma (aumento 14.000x). **(C)** Complexos de Golgi (CG) na periferia do ooplasma (aumento 20.000x). **(D)** Camada de células do *cumulus* (CC) ao redor da zona pelúcida (ZP). Gotas lipídicas e *clusters* mitocondriais (aumento de 2.700x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.. 35

- Figura 12.** Eletromicrografia de COC's não maturado (avaliação 0h) proveniente de cadela em fase folicular (FF). **(A)** Núcleo (N) e nucléolo (NL) periféricos. Presença de *clusters* mitocondriais (M) ao redor do núcleo e gotas de lipídeos (L) distribuídas de forma uniforme (aumento 5.000x). Núcleo (N) com nucléolo (NL) reticulado com a presença de pequenos vacúolos. pelo ooplasma e mitocôndrias (M) ao seu redor (aumento 10.000x). **(C)** Presença de microvilosidades (MV) bem desenvolvidas e complexo de Golgi (CG) e mitocôndrias (M) na periferia do ooplasma e próximos a gotas de lipídeos (L) (aumento 20.000x). **(D)** Comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma (CO), zona pelúcida (ZP), microvilosidades (MV), grânulos corticais (GC), lipídeos (L) e mitocôndrias (M) (aumento 20.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão..... 36
- Figura 13.** Eletromicrografia de COC's provenientes de cadelas em fase folicular do ciclo estral após 96 horas de maturação *in vitro* em meio I. **(A)** Núcleo periférico (N), próximo a zona pelúcida (ZP) com nucléolo denso e condensado (NL) (aumento 4.000x). **(B)** Grandes *clusters* mitocondriais dispersos homogeneamente pelo ooplasma entremeando gotas lipídicas (L) (aumento 8.000x). **(C)** Células do *cumulus* com sinais de degeneração (CC) e poucas comunicações entre esta células e o ooplasma (CO) (aumento 5.000x). **(D)** Presença de complexo de Golgi (CG) próximos a junções entre as células do *cumulus* e o ooplasma (CO) (aumento 20.000x). Microscópio eletrônico de transmissão..... 39
- Figura 14.** Eletromicrografia de COC's oriundos de fêmeas em fase não folicular. **(A)** Zona pelúcida (ZP) e inúmeras gotas lipídicas (L) e mitocôndrias (M) dispostas na periferia do ooplasma (aumento de 2700x). **(B)** Grânulos corticais (GC), complexo de Golgi (CG) e mitocôndrias (M) na periferia do ooplasma. Comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma (CO)(aumento de 10.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão..... 40
- Figura 15.** Eletromicrografia de COC's após 96 horas de maturação *in vitro* em meio II provenientes de cadelas em fase folicular **(A)** Presença de retículo endoplasmático liso (REL) na periferia do ooplasma e comunicação entre as células do *cumulus* (CC) e o ooplasma (CO) entremeando a zona pelúcida (ZP) (aumento 10.000x). **(B)** Presença de grânulos corticais (GC) e mitocôndrias (M) na periferia do ooplasma (aumento 20.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão..... 41

- Figura 16.** Eletromicrografia de COC's após 96 horas de maturação *in vitro* em meio II provenientes de cadela em fase não folicular. **(A)** Presença de inúmeras mitocôndrias (M), assim como grânulos corticais (GC) na periferia do oócito (aumento 20.000x). **(B)** Presença de complexo de Golgi (CG), e grânulos corticais (GC) na periferia do ooplasma (aumento 40.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão..... 42
- Figura 17.** Eletromicrografia de COC's após 96 horas de maturação *in vitro* em meio III provenientes de cadelas em fase folicular. **(A)** Presença de pequenos *clusters* mitocondriais (M) e grande aglomerados de complexos de Golgi (CG) na periferia do ooplasma próximo as terminações das comunicações entre células do *cumulus* e ooplasma (CO) que entremeiam a zona pelúcida (ZP) (aumento 5.000x). **(B)** Presença de retículo endoplasmático liso (REL), *clusters* mitocondriais (M) e gota de lipídeos na periferia do ooplasma (aumento 27.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão..... 43
- Figura 18.** Eletromicrografia de COC's após 96 horas de maturação *in vitro* em meio III provenientes de cadelas em fase não folicular. **(A)** Núcleo (N) arredondado periférico circundado por mitocôndrias (M) (aumento 40.000x). **(B)** *Cloud* mitocondrial (CM) (aumento 40.000x). **(C)** Presença de pequenos *clusters* mitocondriais (M), pequena quantidade de grânulos corticais na periferia do ooplasma. Presença de complexo de Golgi em região cortical próximo a gota lipídica (L) (aumento 2.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão..... 44
- Figura 19.** **(A)** Eletromicrografia de COC proveniente de cadela fase não folicular após 96 horas de maturação *in vitro* em meio IV. Destacamento do ooplasma da zona pelúcida (ZP). Mitocôndrias (M) concentradas na periferia do ooplasma. (aumento 5.000x). **(B)** COC proveniente de cadela em fase folicular após 96 horas de maturação *in vitro* em meio IV. Retículo endoplasmático liso (REL) em COC oriundos de cadelas em fase folicular (aumento 40.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão..... 45

Figura 20. Eletromicrografia de COC proveniente de cadela em fase folicular após 96 horas de maturação *in vitro* em meio V. **(A)** Núcleo periférico (N) e nucléolo (NL), aglomerado de mitocôndrias (M) e microvilosidades bem desenvolvidas e grânulos corticais (GC) na periferia do ooplasma (GC) (aumento 8.000x). **(B)** Comunicação (CO) entre as células do *cumulus* e o ooplasma (O) (aumento 40.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.....

47

Figura 21. Eletromicrografia de COC proveniente de cadela em fase não folicular após 96 horas de maturação *in vitro* em meio V. **(A)** Núcleo periférico (N) e nucléolo parcialmente condensado em com reticulações (NL), e ao seu redor presença de aglomerados de mitocôndrias (M) (aumento 5.000x). **(B)** Retículo endoplasmático liso (REL) envolto por gotas lipídicas (L) (aumento 14.000x).Microscópio Eletrônico de Transmissão...

47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Escala de valores de intensidade de comunicação entre as células do <i>cumulus</i> do oócito canino segundo Pires-Buttler (2010). Jaboticabal, 2013.....	25
Tabela 2. Média $\pm$ erro padrão da média dos valores de progesterona (P_4) sérica de fêmeas caninas incluídas no grupo de animais em fase folicular (FF) e fase não folicular (FN). Jaboticabal, 2013.....	28
Tabela 3. Número de complexos <i>cumulus</i> -oócitos recuperados para avaliação por microscopia eletrônica de varredura, de acordo com a fase do ciclo estral da fêmea canina (FF - fase folicular e FN - fase não folicular) e tipo de avaliação realizada: avaliação 0 hora e após 96 horas de maturação <i>in vitro</i> nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.....	29
Tabela 4. Mediana (máximo e mínimo) relativo ao escore de intensidade de comunicação entre as células dos <i>cumulus</i> entre os meios estudados nas fases folicular e não folicular Jaboticabal, 2013.....	33
Tabela 5. Número de complexos <i>cumulus</i> -oócitos (COC) recuperados para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão, de acordo com a fase do ciclo estral da fêmea canina (Fase Folicular –FF e Fase Não Folicular –FN) e tipo de avaliação realizada: avaliação 0 hora e após 96 horas de maturação <i>in vitro</i> nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.....	33
Tabela 6. Características do núcleo de complexos <i>cumulus</i> -oócitos (COC) caninos provenientes de fêmeas em fase não folicular (FN) quanto a sua posição no ooplasma, formato, presença de invaginações no envelope nuclear e condensação da cromatina do nucléolo após avaliação por meio de microscopia eletrônica de transmissão realizada a 0 hora e após 96 horas de maturação <i>in vitro</i> nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.....	48
Tabela 7. Características do núcleo de complexos <i>cumulus</i> -oócitos (COC) caninos provenientes de fêmeas em fase folicular (FF) quanto a sua posição no ooplasma, formato, presença de invaginações no envelope nuclear e condensação da cromatina do nucléolo após avaliação por meio de microscopia eletrônica de transmissão realizada a 0 hora e após 96 horas de maturação <i>in vitro</i> nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.....	48

Tabela 8. Características da organização citoplasmática de <i>cumulus</i> -oócitos (COC) caninos provenientes de fêmeas em fase não folicular (FN) quanto a distribuição pelo ooplasma de mitocôndrias (Mit), grânulos corticais (GC), complexos de Golgi (CG), retículo endoplasmático liso (REL); intensidade de comunicação entre as células do <i>cumulus</i> , desenvolvimento de microvilosidades e distribuição de gotas lipídicas após avaliação por meio de o microscopia eletrônica de transmissão realizada a 0 hora e após 96 horas de maturação <i>in vitro</i> nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.....	49
Tabela 9. Características da organização citoplasmática de <i>cumulus</i> -oócitos (COC) caninos provenientes de fêmeas em fase folicular (FF) quanto a distribuição pelo ooplasma de mitocôndrias (Mit), grânulos corticais (GC), complexos de Golgi (CG), retículo endoplasmático liso (REL); intensidade de comunicação entre as células do <i>cumulus</i> , desenvolvimento de microvilosidades e distribuição de gotas lipídicas após avaliação por meio de o microscopia eletrônica de transmissão realizada a 0 hora e após 96 horas de maturação <i>in vitro</i> nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

Albumina Sérica Bovina	BSA
Células do <i>cumulus</i>	CC
Complexo cumulus-oócito	COC
Cultivo in vitro	CIV
Dióxido de Carbono	CO ₂
Estradiol	E ₂
Fecundação in vitro	FIV
Gonadotrofina Coriônica humana	hCG
Graus Celsius	°C
Hormônio Folículo Estimulante	FSH
Hormônio luteinizante	LH
Internacional Union for Conservation of Nature	IUCN
Maturação <i>in vitro</i>	MIV
Meio Base	MB
Metáfase I	MI
Metáfase II	MII
Micrograma	µm
Microscopia Eletrônica de Transmissão	MET
Microscopia Eletrônica de Varredura	MEV
Mililitro	mL
Molar	M
Nanograma	nm
Nanometro	nn
Núcleo Circundado	NC
Núcleo Não Circundado	NNC
Ovariohisterectomia	OH
Phosphate Buffer Saline	PBS
Progesterona	P4
Quebra de Vesícula Germinativa	QVG
Soro Fetal Bovina	SFB

Synthetic Oviduct Fluid	SOF
Tissue Culture Medium	TCM
Unidade internacional	UI
Vesícula Germinativa	VG
Vesícula Germinativa central	VG _c
Vesícula Germinativa periférica	VG _p

MATURAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS CANINOS: INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO HORMONAL SERIADA SOBRE A ULTRAESTRUTURA OOCITÁRIA.

RESUMO - Relativamente ao uso de técnicas de reprodução assistida em canídeos, a maturação e a fertilização *in vitro* (MIV) e (FIV), tem como principal objetivo a preservação do genoma dos canídeos ameaçados de extinção. Entretanto, os meios de cultivo empregados para maturação são adaptações de metodologias adotadas para outras espécies. Inúmeros estudos avaliaram a suplementação dos meios com gonadotrofinas, estrógeno, progesterona, antioxidantes, proteínas e entre outros, porém, nenhum deles releva a ação seriada de hormônios sobre a maturação de oócitos caninos. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar os efeitos da suplementação seriada do meio de maturação com gonadotrofina coriônica humana (hCG) e progesterona (P_4), em diferentes momentos do processo de MIV de oócitos caninos. Vinte e três cadelas, com idades entre 1 a 7 foram selecionadas por meio de citologia vaginal, dosagem de progesterona e agrupadas em dois grupos: Fase Folicular (n=12) e Fase Não FolicularDiestro (n=11). Os ovários foram obtidos durante o procedimento de ovariectomia (OH) e somente complexos *cumulus*-oócito (COCs) grau 1 e diâmetro superior a 120 μ m foram selecionados. A avaliação foi feita por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), antes e após o período de cultivo *in vitro* por 96h em 5 meios: I (hCG + P_4 durante 96 h), II (hCG nas primeiras 48 h de MIV), III (hCG nas primeiras 48h e P_4 após 48h), IV (P_4 após 48h de MIV) e V (sem suplementação durante 96h de MIV). Os resultados revelaram que a morfologia, assim como a ultraestrutura oocitárias não são afetadas pela fase do ciclo estral. Entretanto, oócitos da fase folicular quando submetidos ao processo de MIV em meios suplementados com hormônios são mais sensíveis e responsivos a sua ação, quando comparados a oócitos oriundos da fase não folicular. Ainda, a utilização do hCG e progesterona de forma associada ou seriada favoreceram de forma semelhante a comunicação entre as células do *cumulus* durante o processo de MIV e a maturação citoplasmática, no entanto, não beneficiaram o oócitos quanto a retomada da meiose e a maturação nuclear.

Palavras-chave: ultraestrutura, oócito canino, maturação *in vitro*, microscopia eletrônica, suplementação hormonal.

***In vitro* MATURATION OF CANINE OOCYTES: INFLUENCE OF HORMONAL BI-PHASIC SYSTEM ON OOCYTE ULTRASTRUCTURE**

ABSTRACT - On the use of assisted reproduction techniques in dogs, *in vitro*, maturation (IVM) and fertilization (IVF) has the main goal to preserve the genome of endangered canids. However, the culture media used for maturation are adapted from those used in other species. Numerous studies evaluated the supplementation with gonadotropins, estrogens, progesterone, antioxidants and proteins on the IVM media, however none of them assessed the effects of a bi-phasic human chorionic gonadotropin (hCG) and progesterone (P₄) supplementation on *in vitro* maturation media of canine oocytes. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of a bi-phasic system using human chorionic gonadotrophin (hCG) and progesterone (P₄) on IVM media of canine oocytes. Twenty-three female dogs, including 12 from follicular phase (FF) and 11 from non-follicular phase (FN) aged 1-7 years underwent ovariohysterectomy (OH). After the procedure, the ovaries were sliced and *cumulus*-oocyte complexes (COCs) released. Only COCs grade 1, with diameter greater than 120 µm were selected. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission (TEM) were carried out before and after 96h of *in vitro* maturation (IVM) in 5 different culture media: I (TCM-199 + hCG + P₄ for 96 h), II (TCM -199 + hCG within 48h of IVM), III (TCM-199 + hCG in the first 48h and after 48h P₄), IV (TCM-199 + P₄ after 48h of IVM) and V (no hormone supplementation during 96h of IVM). The results revealed that the oocyte morphology and ultrastructure are not affected by the phase of the estrous cycle. However, follicular phase oocytes undergoing IVM are more sensitive and responsive to hormonal supplementation of the IVM media when compared to oocytes from the non-follicular phase. The association of the bi-phasic human chorionic gonadotropin (hCG) and progesterone (P₄) supplementation on *in vitro* maturation media positively affected the *cumulus* cells communication during IVM and the cytoplasmic maturation, but did not exert significant effects on resumption of meiosis and nuclear maturation.

Keywords: ultrastructure, canine oocyte, *in vitro* maturation, electron microscopy, hormonal supplementation.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a “Internacional Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List”(2011/12) há 36 espécies que compõem a família *Canidae*, sendo que nove estão ameaçadas de extinção. Neste contexto, duas espécies pertencem à fauna selvagem brasileira, como é o caso do cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) e o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). Dessa forma, o uso de técnicas de reprodução assistida, tais como a maturação e a fecundação *in vitro* tornaram-se alvo de pesquisas científicas com o intuito de maximizar o potencial de preservação do genoma destas espécies.

Ainda, nos últimos anos, os animais de estimação, principalmente os cães, conquistaram lugar na sociedade, passando de animal doméstico a membro da família. Esta transformação na relação homem-animal representou mudança brusca no mercado “pet”, despertando crescente interesse por produtos direcionados a cães e gatos e, conseqüentemente, gerando faturamento anual próximo dos U\$ 2 bilhões (Yabiku, 2009, Apparício et al., 2011). Neste segmento, a comercialização de animais tornou-se sinônimo de lucro (Souza et al., 2001) e observou-se um aumento na procura por acompanhamento reprodutivo. Sendo assim, técnicas de reprodução assistida, tais como inseminação artificial e congelamento de sêmen canino, vêm sendo realizadas, permitindo intercâmbio mundial de material genético (Apparício et al., 2011).

Entretanto, para o emprego das técnicas de reprodução assistida é necessário o conhecimento dos padrões endócrinos e mecanismos de controle do ciclo estral da cadela, uma vez que os processos de maturação oocitária e fecundação nesta espécie possuem características peculiares (OTOI et al., 2000).

O primeiro estudo desenvolvido com maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos caninos foi realizado há mais de 30 anos por Mahi e Yanagimachi (1976). Neste estudo, de 99% dos oócitos recuperados de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, 25% foram capazes de retomar a meiose e atingir o estágio de metáfase I (MI) ou metáfase II (MII) após 72 horas de cultivo *in vitro*.

A partir deste estudo pouco progresso foi feito e atualmente as taxas de maturação *in vitro* em canídeos atingem valores que variam de 0 a 58% de maturação nuclear. Inúmeros autores atribuem a baixa eficiência deste processo ao conhecimento restrito sobre os eventos reprodutivos e particularidades da cadela como: ambiente hormonal, morfologia e metabolismo celular do oócito e seu papel no processo de maturação nuclear e citoplasmática, ausência de meio de cultivo específico para esta espécie e o papel do oviduto sobre a maturação oocitária (MAHI e YANAGIMACHI, 1976; HEWITT e ENGLAND, 1998; OTOI et al., 1999; FARSTAD, 2000; GOODROWE et al., 2000; BOGLIOLO et al., 2002; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003; SONGSASEN et al., 2002; WILLINGHAN-ROCKY et al., 2003; HAENISCH-WOEHL et al., 2003; LUVONI et al., 2005; SONGSASEN e WILDT, 2007; APPARÍCIO et al., 2011).

A maturação *in vitro* é uma etapa crucial na reprodução assistida, uma vez que antecede alguns processos como a fecundação e o cultivo *in vitro* (FIV e CIV) e produção e desenvolvimento *in vitro* de embriões. A maioria dos protocolos de MIV utilizados para oócitos caninos são adaptações dos meios empregados em bovinos, uma vez que ainda não há meios completamente pré-estabelecidos para esta espécie (MARTINS, 2005; APPARÍCIO et al., 2011).

Recentemente, estudos têm avaliado os efeitos da suplementação hormonal nos meios de cultura para melhoria do desenvolvimento oocitário (SRSEN et al., 1998; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003). Rodrigues e Rodrigues (2003) relataram que a suplementação do meio TCM 199 ("Tissue Culture Media" - 199) com 20µg de estradiol não aumentou as taxas de maturação *in vitro* de oócitos canino. Em contrapartida, De Los Reys et al. (2005) constatou que a adição de 10UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) resultou em aumento das taxas de metáfase II (31,7%). Sendo assim, um estudo detalhado sobre a suplementação hormonal utilizando diferentes tipos de hormônios, assim como a adição destes em diferentes períodos do processo de maturação *in vitro*, pode ser um grande avanço para o desenvolvimento de um meio de cultivo específico para espécie canina, assim como para espécies de canídeos selvagens ameaçados de extinção.

Ainda, alguns autores destacam a importância do estudo morfológico do

oócito canino com intuito de elucidar os motivos que culminam na baixa eficiência do processo de maturação *in vitro* (HAENISCH-WOEL et al., 2003; LUVONI et al.; 2005; PIRES-BUTTLER, 2010). Uma vez que o oócito canino é ovulado ainda imaturo no oviduto e as células do *cumulus* permanecem aderidas ao oócito durante todo período de maturação, o desenvolvimento de pesquisas objetivando o estudo da relação entre estas estruturas são de extrema importância para o esclarecimento de questionamentos sobre o processo de maturação na espécie canina (LUVONI et al., 2005; PIRES-BUTTLER, 2010).

2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Particularidades da fisiologia reprodutiva da cadela

Os canídeos são espécies monoéstricas não estacionais, ou seja, apresentam um ou dois ciclos estrais por ano, seguidos por um longo período de quiescência reprodutiva (WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003, APPARÍCIO et al., 2011).

O ciclo estral da fêmea canina apresenta quatro fases: proestro, estro, diestro e anestro. Tais fases caracterizam-se por alterações hormonais que resultam em transformações morfológicas, clínicas e citológicas no aparelho reprodutor feminino (ANDERSEN, 1973; JONHSTON et al., 2001).

O proestro apresenta duração média de 9 dias, podendo variar de 3 à 21 dias. A fêmea apresenta sinais clínicos de secreção vaginal serosanginolenta e edema vulvar. Ainda, observa-se atração do macho pela fêmea, no entanto esta não aceita a monta. À citologia vaginal pode-se constatar a presença de leucócitos (raros), eritrócitos, células parabasais, intermediárias e superficiais. Nesta fase observa-se aumento na secreção de FSH (Hormônio Folículo Estimulante), o qual promove o crescimento folicular, e aumento da concentração de estradiol (E_2) produzido pelas células da teca interna (CONCANNON e DIGREGORIO, 1986), sendo que este último atinge pico máximo 24 à 48 horas antes do início do estro (ROTA et al., 2007).

A transição do proestro para o estro é caracterizada pelo comportamento de aceitação de monta pela fêmea e colpocitologia caracterizada pela presença de mais de 80% de células superficiais (queratinizadas). Outrossim, constata-se uma inversão hormonal, representada pelo declínio e aumento das concentrações séricas de estradiol e progesterona (P_4), respectivamente (CONCANNON et al., 1989; REYNAUD et al., 2005). O aumento da concentração sérica de P_4 ocorre pela aquisição prematura de receptores de LH (hormônio luteinizante) na camada de células da granulosa do folículo ovariano canino, que por sua vez, resulta na luteinização (metaplasia das células da granulosa em células luteais) pré- ovulatória

destas células, a qual ocorre no início do estro, 36 a 50 horas antes da ovulação. Dessa forma, no momento do pico de LH a concentração sérica de progesterona apresenta valores de 2 ng/mL, atingindo valores de 6 ng/mL durante a ovulação (JONHSTON et al., 2001).

Na cadela, a ovulação é espontânea e tem início aproximadamente 48 horas após o pico de LH. Os oócitos são liberados do folículo ainda imaturos (prófase I) para o oviduto e atingem o estágio de metáfase II (MII) aproximadamente de 54 à 72 horas após a ovulação (VIARIS DE LESEGNO et al., 2008; REYNAUD et al., 2009). Estes mantêm-se aptos para serem fecundados por até 7 dias, sendo que a partir do 9^o dia após a ovulação a taxa de fecundação é nula (TSUTSUI e SHIMIZU, 1975). Ainda, a presença de oócitos degenerados pode ser constatada a partir de 92 à 127 horas após a ovulação (REYNAUD et al., 2005).

No período subsequente ao estro, a fêmea entra em uma fase lútea (diestro) que apresenta duração aproximada de 45 dias (fêmeas não prenhes) e 60 dias (fêmeas prenhes). À avaliação citológica constata-se a presença de muco e leucócitos e observa-se declínio no número de células superficiais (queratinizadas) e aumento no número de células parabasais e intermediárias. Ainda, as concentrações séricas de progesterona encontram-se elevadas (15 a 90 ng/mL) e apresentam valores semelhantes em fêmeas prenhes ou não (JEFFCOATE, 1998; JONHSTON et al., 2001), principalmente nos 40 dias posteriores ao pico de LH (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003).

Após esta fase inicia-se um longo período de quiescência ovariana, denominado anestro (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003). A duração média do período de anestro é de quatro meses, no entanto pode variar de acordo com a raça e a idade da fêmea, assim como por fatores ambientais e genéticos (FELDMAN e NELSON, 1996). Nesta fase a progesterona sérica encontra-se em concentrações basais que variam de 1 à 2 ng/mL. Já os valores de estradiol variam ao longo deste período e apresentam um aumento considerável um mês antes do pico de LH. O final do anestro é marcado pela retomada da atividade ovariana, que por sua vez é sinalizada pelo aumento da secreção de LH (VAN HAAFFTEN et al., 1994).

2.2 – Desenvolvimento e maturação oocitária *in vivo* da cadela

Durante o período embrionário, as células germinativas iniciam a divisão mitótica enquanto migram do saco vitelínico embrionário para o local de desenvolvimento gonadal (ovário primitivo), onde são denominadas oogônias (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Ao término do processo de mitose estas estruturas passam a ser chamadas de oócitos, os quais iniciam o processo de meiose (DEW, 2001), antes do nascimento (humanos, equinos e ruminantes), logo após o nascimento (suínos e felinos) e nas primeiras semanas subsequentes, como é o caso dos canídeos (ANDERSEN, 1970).

A divisão celular, tanto mitótica quanto meiótica, é composta de quatro fases distintas: prófase, metáfase, anáfase e telófase (BAKER, 1982). A meiose ocorre em duas etapas, denominadas meiose I e II, sendo que a prófase da primeira divisão meiótica pode ser subdividida em cinco estádios: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese (estádio de vesícula germinativa – VG) (BAKER, 1982).

Na maioria dos mamíferos, o desenvolvimento oocitário sofre dois momentos de estagnação, o primeiro na prófase I e o segundo na metáfase II (MII), onde os oócitos são ovulados e ativados após fecundação (DULCIBELLA, 1998). Nestes animais, a maturação ocorre no interior do folículo ovariano, e a ovulação ocorre quando estes atingem o estágio de MII (oócito secundário). Sendo assim, estas estruturas já se encontram prontas para a fecundação no interior do oviduto (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Em contrapartida, os canídeos liberam os oócitos ainda imaturos em estágio de vesícula germinativa (VG) na fase de diplóteno da prófase I para o interior do oviduto. Sendo assim, são necessárias 54 à 72 horas para que estes atinjam o estágio de MII e adquiram a capacidade de serem fecundados (VIARIS DE LESEGNO et al., 2008a; REYNAUD et al., 2009).

Destarte, o crescimento oocitário intra-folicular é constituído por um conjunto de modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (SCRIBAN, 1999). O processo de maturação é caracterizado pela ocorrência de dois eventos celulares: o término da divisão meiótica com a transição do estágio de vesícula germinativa para o estágio de metáfase II (maturação nuclear) e a maturação citoplasmática, onde

alterações moleculares e estruturais conferem ao oócito a capacidade de ser fecundado e a fase inicial do desenvolvimento embrionário (BEYERS et al., 1997; SCRIBAN,1999).

O processo de maturação citoplasmática do oócito é caracterizado pela redistribuição de organelas celulares, visto que há um rearranjo contínuo no interior do citoplasma durante a progressão da meiose. No momento da quebra de vesícula germinativa (QVG), gotas de lipídios dentro do citoplasma aumentam em número e tamanho, enquanto o complexo de Golgi diminui (HYTTEL et al., 1997). Com a progressão da meiose até o estágio de MII, as gotas de lipídios continuam a aumentar, o complexo de Golgi a regredir e as mitocôndrias associam-se às gotas de lipídios dentro do citoplasma e migram da periferia para regiões mais centrais (STOJKOVIC et al., 2001). Além disso, os microtúbulos se reorganizam e os grânulos corticais são redistribuídos e se tornam mais espaçados e periféricos (HYTTEL et al., 1997; STOJKOVIC et al., 2001; MARTINS, 2008).

2.3. Aspectos morfológicos do complexo *cumulus*-oócito canino

No início do seu desenvolvimento o oócito canino apesar de apresentar mudanças ultra-estruturais que o assemelhem aos demais mamíferos, este apresenta particularidades que o distingue da demais espécies (TESORIERO et al., 1982). Dentre elas estão: aquisição da competência meiótica, que ocorre tanto em ambiente intra quanto extra- folicular (ovidutal), e a grande quantidade de material lipídico, o que lhe confere uma coloração escura e homogênea.

O crescimento intra-folicular pode ser caracterizado por alta atividade transcricional e durante este período, a íntima associação entre o oócito e as células do *cumulus* (CC) é primordial para o crescimento folicular normal e a aquisição da competência meiótica (EPPIG,1996; MATZUK et al., 2002). Estas células são um subtipo das células da granulosa e possuem papel fundamental no processo de maturação oocitária, uma vez que mantém o estado meiótico das células germinativas, induzem o reinício da meiose e fornecem suporte para a maturação

citoplasmática (WARRIACH e CHOCHAN, 2004).

O oócito e as CCs estão conectados funcional e fisicamente por meio de uma rede de comunicação bidirecional mediada por junções do tipo GAP, nas quais ocorre transferência de nutrientes, íons e pequenas moléculas como o cálcio e AMPc para os compartimentos internos (GANDOLFI et al., 2005). Ainda, esta rede tem sido reconhecida como item fundamental para o início da maturação oocitária em resposta a tratamentos com gonadotrofinas, tanto em animais domésticos quanto de laboratório (VOZZI et al., 2001; MARTINS, 2008).

Há evidências de que a ligação entre as células do *cumulus* e o oócito seja influenciada pelo estágio do ciclo estral. Em estudo realizado com complexo *cumulus*-oócito (COC) de fêmeas caninas pré-puberes, as células do *cumulus* apresentavam-se frouxamente arranjadas ao redor do oócito e emitindo poucos prolongamentos para a zona pelúcida (HAENISCH-WOEHL et al., 2003). Ainda, em outro estudo avaliando junções GAP foi constatado que 89% destas junções apresentavam-se abertas em COC's de cadelas em proestro e 67% permaneceram abertas após 24 horas de MIV. Em contrapartida, em cadelas na fase de anestro não foi detectado permeabilidade oocitária por meio destas junções (LUVONI et al., 2000).

Viaris De Lesegno et al. (2008b) constataram que momentos antes da ovulação, oócitos e CCs mostram sinais evidentes de comunicação entre si, entretanto, após três dias da ovulação a comunicação se desfaz. Desta forma, tem sido proposto que a diminuição das junções GAP é um fato cronologicamente relacionado à maturação oocitária, assim, essas junções teriam importante papel na coordenação entre a maturação nuclear e citoplasmática (RODRIGUEZ e FARIN, 2004).

A morfologia oocitária é tida como pré-requisito para a produção e desenvolvimento de embriões (EBNER et al., 2006). Assim, a integridade do fenótipo do complexo *cumulus*-oócito é considerada não apenas um indicador da sua viabilidade mas também um potencial marcador da capacidade de transcrição de genes envolvidos na maturação e desenvolvimento embrionário inicial (RODRIGUES

et al., 2009). Por este fato e de forma a obter oócitos de alta qualidade e viabilidade, na espécie canina preconiza-se a seleção de oócitos para o cultivo *in vitro* baseando-se em critérios morfológicos. Uma das características morfológicas avaliadas é a espessura da camada de CCs, visto que, somente oócitos com duas ou mais camadas de CCs continuam a se desenvolver *in vitro* (NICKSON et al., 1993). Já a expansão das CCs *in vitro* tem sido interpretada como indicador de maturação oocitária, entretanto, há divergências quanto esta afirmação (TRUMPAN, 2001). Para Rodrigues e Rodrigues (2009), a expansão das CCs após a maturação *in vitro* talvez seja apenas um artefato imposto por um ambiente artificial, não estando correlacionado com a maturidade nuclear.

2.4. Configuração da cromatina de oócitos caninos

Na maioria dos mamíferos, o oócito encontra-se estagnado em prófase I no estágio de diplóteno (VG) ao longo de todo o desenvolvimento fetal até a puberdade, quando a onda de LH estimula a retomada da meiose, com o oócito sendo ovulado em metáfase II (TAN et al., 2009). Já nos canídeos, os oócitos são ovulados ainda imaturos (VG) e por este motivo, estes só atingem o estágio de metáfase II após um período de maturação de 54 à 72 horas no oviduto (VIARIS DE LESEGNO et al., 2008a; REYNAUD et al., 2009). Embora o oócito canino possa retomar espontaneamente a meiose *in vitro* quando submetido a adaptações das técnicas utilizadas em outras espécies, os índices de maturação são extremamente baixos e a porcentagem de oócitos que permanecem em VG independente das condições de cultivo é elevada (LEE et al., 2008).

Durante o desenvolvimento oocitário, a VG sofre modificações e remodelamentos na cromatina que por sua vez, se manifestam por meio de alterações na configuração e posicionamento desta, fato considerado imperativo para o desenvolvimento de competência meiótica do oócito (TAN et al., 2009). Em canídeos há cinco tipos distintos de configurações de vesícula germinativa, sendo duas identificadas em oócitos obtidos *in vivo* (VG_c – vesícula germinativa central e VG_p - vesícula germinativa periférica) e as outras três após o cultivo *in vitro* (VG₁,

VG₂ e VG₃). A VG_c é caracterizada por possuir grande núcleo arredondado central, nucléolo reticular esférico e excêntrico e poucos sinais de condensação da cromatina. Na VG_p o núcleo periférico pode apresentar-se arredondado ou achatado com nucléolo esférico contendo pequenos vacúolos e cromatina em diferentes estádios de condensação. A VG₁ apresenta características semelhantes à VG_c, com núcleo redondo e central, nucléolo reticulado esférico e poucos sinais de condensação da cromatina. A VG₂ possui núcleo redondo ou ligeiramente achatado, envelope nuclear com pequenas invaginações próximas a zona pelúcida, nucléolo reticulado, mas não circundado por cromatina condensada. A VG₃ apresenta núcleo achatado com longas invaginações no envelope nuclear próxima a membrana plasmática, o nucléolo demonstra sinais de inativação e a condensação da cromatina é mais evidente em VG₃ do que nos demais grupos supracitados (VIARIS DE LESEGNO et al., 2008b) (Figura 1).

O padrão VG_c e VG_p descritos em canídeos apresentam características semelhantes, entretanto o primeiro apresenta configuração de nucléolo não circundado por cromatina (NNC) já o segundo apresenta esta estrutura circundada por cromatina (NC), como descrito em camundongos e humanos (REYNAUD et al., 2009). Nestas espécies, a configuração NNC, caracteriza oócitos transcricionalmente ativos, já NC representa oócitos inativos, sendo que a transição de NNC para NC está associada a um aumento no potencial de desenvolvimento, que por sua vez coincide com o final do crescimento oocitário (DEBEY et al., 1993). O uso de oócitos transcricionalmente ativos na maturação *in vitro* pode fazer com que a retomada da meiose ocorra precocemente, antes que o estoque de RNA_m seja suficiente para sustentar o desenvolvimento embrionário. Tal fato sugere as baixas taxas de maturação *in vitro* na espécie canina possam ser ocasionadas pelo uso de oócitos em VG_c (GILCHRIST e THOMPSON, 2007).

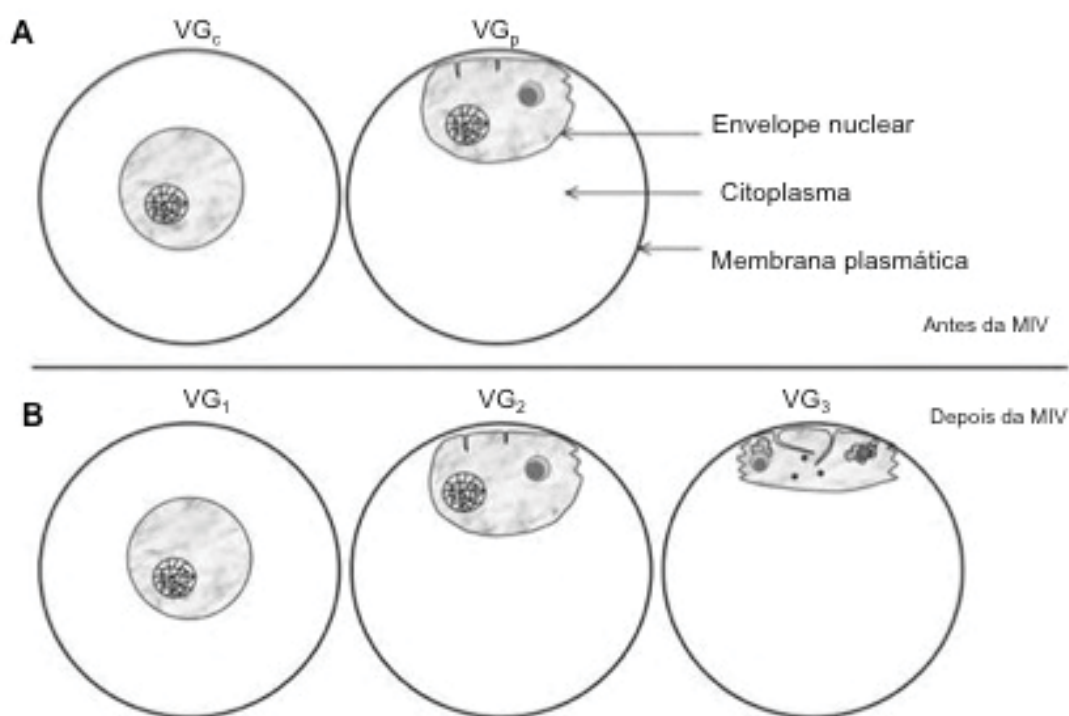


Figura 1. Adaptação de Viaris De Leseqno et al.(2008b) utilizado para classificar a VG de oócitos recém-colhidos e imaturos (A) e oócitos que permaneceram em VG após o processo de maturação *in vitro* (B). A: Antes da maturação *in vitro* a VG_c revela núcleo central arredondado com grande nucléolo reticulado e VG_p apresenta núcleo ligeiramente achatado disposto na periferia do oócito e nucléolo em vários estágios de condensação da cromatina. B: Após a maturação *in vitro* a VG pode ser classificada em três diferentes padrões: VG₁ com grande núcleo arredondado e central. VG₂ núcleo periférico, ligeiramente achatado e nucléolo não se apresenta envolto por cromatina condensada. VG₃ núcleo periférico, achatado e nucléolo envolto por cromatina condensada.

Viaris De Leseqno et al. (2008b) avaliando a ultraestrutura de oócitos caninos maturados *in vitro* observaram que oócitos que exibem padrão VG₁ e VG₂ são menos avançados em termos de maturação nuclear e citoplasmática quando comparados a VG_p (antes do cultivo *in vitro*). Sendo assim, sugerem que tanto VG₁ quanto VG₂ sejam originários de oócitos em VG_c enquanto os oócitos com padrão VG₃, metáfase I, metáfase II e degenerados sejam provenientes de oócitos em VG_p.

2.5 – Aspectos gerais da maturação *in vitro* de oócitos caninos

A maturação oocitária *in vitro* é um processo complexo onde se busca mimetizar as mudanças dinâmicas que ocorrem no folículo ovariano pré-ovulatório. Um sistema de maturação bem-sucedido suporta todos os componentes do *complexo cumulus-oócito*, incluindo células do *cumulus*, material nuclear e citoplasmático (LUVONI, 2000; APPARÍCIO et al., 2011).

Embora seja uma técnica utilizada rotineiramente em muitas espécies (bovinos, suínos, camundongos e felinos), em canídeos, o processo de maturação *in vitro* é considerado ineficiente. Esse fato é comprovado pelas baixas taxas de metáfase II, elevadas taxas de oócitos degenerados e baixíssimas taxas de prenhez obtidas por meio de fecundação *in vitro* (LUVONI et al., 2006). A ineficiência do processo deve-se às peculiaridades da fisiologia reprodutiva da cadela, as quais têm dificultado a adaptação da técnica de MIV, uma vez que esta espécie além de se distinguir em muitos aspectos dos demais mamíferos, apresenta pontos relevantes que necessitam de maiores esclarecimentos, dentre eles: os fatores envolvidos no reinício e a progressão da meiose, a morfologia oocitária e o seu papel no processo de maturação, a importância da interação entre as células do *cumulus* e oócito (CCs) após a ovulação e o real efeito da fase do ciclo estral sobre a competência meiótica (MAHI e YANAGIMACHI, 1976; HEWITT e ENGLAND, 1998; OTOI et al., 1999; FARSTAD, 2000; GOODROWE et al., 2000; BOGLIOLO et al., 2002; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003; SONGSASEN et al., 2002; WILLINGHAM-ROCHY et al., 2003; HAENISCH-WOEHL et al., 2003; LUVONI et al., 2005).

Os oócitos caninos podem retomar espontaneamente a meiose *in vitro* quando submetidos a adaptações das técnicas de maturação utilizadas para bovinos e suínos, embora com taxas bastante inferiores às referidas para as espécies supracitadas (FARSTAD, 2000). A habilidade do oócito para iniciar a meiose em condições artificiais é definida como competência meiótica, e parece ser dependente do grau de crescimento atingido pelo oócito antes de ser liberado pelo folículo (HEWITT et al., 1998). Essa competência é atingida pela coordenação de vários processos que envolvem mudanças morfológicas, ultra-estruturais e transcricionais nos compartimentos citoplasmático e nuclear (LUVONI et al., 2005).

Dentro de um folículo em crescimento, o oócito aumenta o seu diâmetro de 20µm para aproximadamente 120µm, o que o torna progressivamente competente e capaz de evoluir à MII (DURRANT et al., 1998). Segundo Otoi (2001), as melhores taxas de maturação *in vitro* são obtidas de oócitos colhidos durante o proestro e estro, em consequência do maior diâmetro oocitário encontrado nessas fases do ciclo reprodutivo. Entretanto, Ribeiro (2007) cita que o diâmetro oocitário independe do estágio do ciclo estral, e que nestas fases há uma proporção significativamente maior de oócitos com diâmetro igual ou superior a 120 µm.

Hewitt e England (1998) relatam que quanto maior o oócito, maior a habilidade deste para transpor a fase de quebra da vesícula germinativa e atingir as fases de metáfase I, anáfase I e metáfase II. Ainda, oócitos com diâmetro superior a 120 µm apresentam maior competência meiótica para os estágios finais de maturação, semelhantemente ao observado em outras espécies domésticas (MOTLIK, 1989; DURENZI et al., 1995; GILCHRIST et al., 1995; THEISS, 1997).

De acordo com Ebner (2006) a morfologia do oócito é vista como pré-requisito para o desenvolvimento de embriões. Assim, a integridade do fenótipo do complexo *cumulus*-oócito é considerada não apenas um indicador da sua viabilidade como também um potencial marcador da capacidade de transcrição de genes envolvidos na maturação e desenvolvimento embrionário inicial (RODRIGUES et al., 2009). Neste contexto, Nickson et al. (1993) constatou que somente oócitos com duas ou mais camadas de CCs são capazes de progredir no processo de maturação *in vitro*.

A expansão das células do *cumulus* tem sido interpretada como indicador de maturação oocitária. Reynaud et al. (2009), estudando COCs durante o período periovulatório, observaram que a expansão ocorre dentro do folículo após o pico de LH. Entretanto, a capacidade de resposta à onda pré-ovulatória de LH somente é adquirida quando folículos atingem 50 a 60% do diâmetro ovulatório. Ainda, o oócito canino, apresenta comportamento semelhante ao oócito de camundongos, no qual a expansão das CCs está correlacionada com a aquisição de competência meiótica, sugerindo que nesta espécie, a competência provavelmente é adquirida somente por oócitos provenientes de folículos maiores que 4 mm de diâmetro.

No que concerne à influência do ciclo estral sobre a taxa de recuperação e frequência de maturação nuclear de oócitos encontram-se resultados muito controversos, de forma que essa questão continua a ser alvo de pesquisas. Para Rodrigues e Rodrigues (2003), a maturação nuclear *in vitro* não é influenciada pela fase do ciclo estral, sendo a qualidade do oócito, o indicador mais confiável para definir o potencial de competência meiótica. Da mesma forma, Hewitt e England (1997) citam que não há diferenças na taxa de maturação oocitária entre oócitos coletados de cadelas no período de anestro e diestro, no entanto, afirmam que a obtenção de oócitos no final do proestro e início de estro é mais adequada, pois, as concentrações de progesterona e estrógeno durante este período possuem efeito positivo sobre a maturação. Contrariamente, Nickson (1993) e Yamada (1993), afirmam que o número de oócitos coletados e a taxa de maturação *in vitro* são influenciados pela fase do ciclo estral.

Outro aspecto relevante é a idade das fêmeas doadoras. De acordo com Dolezel (2004), os ovários de fêmeas caninas pré-púberes apresentam menor proporção de folículos em estágios avançados de desenvolvimento e maior taxa de folículos atrésicos, fato este, que pode justificar o aumento do processo de atresia durante os primeiros meses após o nascimento. Segundo Hewitt e England (1998), a habilidade de maturar *in vitro* fica comprometida em fêmeas com idade superior a sete anos, quando comparadas com animais mais jovens.

Sobre o período de cultivo, pesquisas estabeleceram 72 horas como o período de maturação para cães (OTOI et al., 2000; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003; APPARÍCIO, 2006, PIRES-BUTTLER, 2010), uma vez que há um equilíbrio entre a progressão da meiose até o estágio de metáfase II e a degeneração celular (NICKSON et al., 1993).

Sobre o meio de cultivo, vale ressaltar que as características bioquímicas dos oócitos das cadelas são distintas das observadas em outras espécies e tais diferenças determinam adaptações nas condições de cultivo *in vitro*. Em virtude disto, vários estudos têm sido realizados na tentativa de mimetizar as condições encontradas *in vivo*, com o intuito de melhorar as taxas de maturação nesta espécie. Normalmente, são utilizadas adaptações dos meios empregados em bovinos, visto

que, ainda não há um meio pré-estabelecido para esta espécie (MARTINS, 2005).

Os meios mais comumente utilizados são o SOF ("Synthetic Oviduct Fluid") (HEWITT e ENGLAND, 1999; BOLAMBA et al., 2002) e, principalmente, o TCM 199 (NICKSON et al., 1993; HEWITT et al., 1998; FUJI et al., 2000; OTOI et al., 2001; SONGSASEN et al., 2002; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003), acrescidos de proteínas, hormônios, antioxidantes e fatores de crescimento, com o intuito de melhorar as taxas de maturação e reduzir a degeneração.

O meio SOF foi desenvolvido por Tervit et al. (1972) visando mimetizar as características fisiológicas do fluido do oviduto de ovelhas e bovinos. Desde então, este meio tem sido utilizado com bastante sucesso na maturação *in vitro* de oócitos de bovinos. No entanto, Hewitt e England (1999) obtiveram resultados limitados em cultivo de oócitos de cadelas utilizando este meio, especialmente com relação à maturação nuclear, o que talvez decorra da constituição do fluido oviductal variar entre espécies e os diferentes estádios reprodutivos.

O TCM 199, além de modificado pode ser suplementado com hormônios e substâncias favoráveis ao desenvolvimento, como fontes protéicas tais como o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA - "Bovine Serum Albumin") (NICKSON et al., 1993; HEWITT e ENGLAND, 1997; HEWITT et al., 1998). Para Cinone (1992), entre os meios complexos, o TCM 199 é o que fornece as melhores condições para o oócito canino completar a sua maturação até os estádios de metáfase II.

Hewitt et al. (1998) compararam as taxas de maturação de oócitos caninos em protocolos com diferentes concentrações de BSA e SFB em TCM 199, concluindo que 0,3% de BSA favoreceu a maturação às 48 horas de cultivo e 20% de SFB às 96 horas.

A suplementação com hormônios sexuais nos meios de cultivo é baseada no fato de que os oócitos caninos em fase de vesícula germinativa estão sujeitos, *in vivo*, a níveis decrescentes de estrógeno e crescentes de progesterona no folículo pré- ovulatório (HEWITT e ENGLAND, 1997; NICKSON et al., 1993). Entretanto, Kim

(2005), afirmam que a suplementação com progesterona e estradiol pode aumentar ou diminuir as taxas de maturação nuclear dos oócitos caninos, dependendo da sua concentração.

Já os hormônios gonadotróficos, desempenham papel fundamental no desenvolvimento dos folículos ovarianos e, indiretamente, no oócito em crescimento. Neste contexto, o FSH apresenta grande importância na expansão dos *complexos cumulus-oócito*, mediada, provavelmente devido a ação do AMPc (SALUSTRI et al., 1993). Já a onda pré-ovulatória de LH induz a quebra da vesícula germinativa *in vivo*, pois reduz a comunicação existente entre as células do *cumulus* e o oócito, evitando o transporte de substâncias inibitórias da competência meiótica. Não obstante, De Los Reyes (2005) avaliando o efeito luteotrófico do hCG descreve maiores taxas de MII em oócitos caninos maturados em meio de cultivo suplementado com 10 UI/mL de hCG nas primeiras 48 horas durante um período de cultivo de 96 horas.

Com base no exposto foram levantadas as seguintes hipóteses:

- As alterações hormonais observadas no decorrer do ciclo estral da cadela afetam a morfologia, assim como a ultraestrutura oocitária.
- A suplementação do meio de maturação com hCG e P₄, de forma associada ou seriada, promove efeitos positivos na maturação nuclear e citoplasmática.

Dessa forma foram propostos os seguintes objetivos:

- Correlacionar a fase do ciclo estral com a morfologia do complexo *cumulus-oócito* (COC).
- Avaliar a influência da suplementação hormonal com hCG e progesterona (P₄) nos diferentes meios de maturação *in vitro* sobre a ultraestrutura oocitária canina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais e locais de processamento e análise de amostras

No presente estudo foram utilizadas 23 fêmeas caninas (12 animais em fase folicular – FF e 11 animais em fase não folicular) de raças variadas, com idades entre um e sete anos e com peso médio de 12 kg. Os animais apresentavam-se hígidos mediante ao exame físico e clínico e foram submetidos à ovariectomia eletiva (OH), junto ao Setor de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da UNESP *campus* de Jaboticabal, SP.

No que concerne ao processo de maturação *in vitro* este foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da UNESP *campus* de Jaboticabal, SP. Os oócitos foram avaliados quanto a sua morfologia por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). O processamento e avaliação das amostras destinadas à MEV foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP *campus* de Jaboticabal, SP. Já as amostras destinadas a MET desde o seu processamento até a sua observação e análise foram realizadas no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioreagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo *campus* Ribeirão Preto, SP (BIOCEL – FMRP -USP).

3.2 - Determinação da fase do ciclo estral

As cadelas foram agrupadas nos seguintes grupos de acordo com o seu “status” reprodutivo: fase folicular (FF – fêmeas caninas em proestro e estro) e fase não folicular (FN – fêmeas caninas em diestro e anestro). A determinação da fase do ciclo estral foi realizada por meio do histórico e exame clínico dos animais, avaliação colpocitológica segundo os critérios descritos por Nelson e Feldman (2004) e dosagem sérica de progesterona (Figura 2)

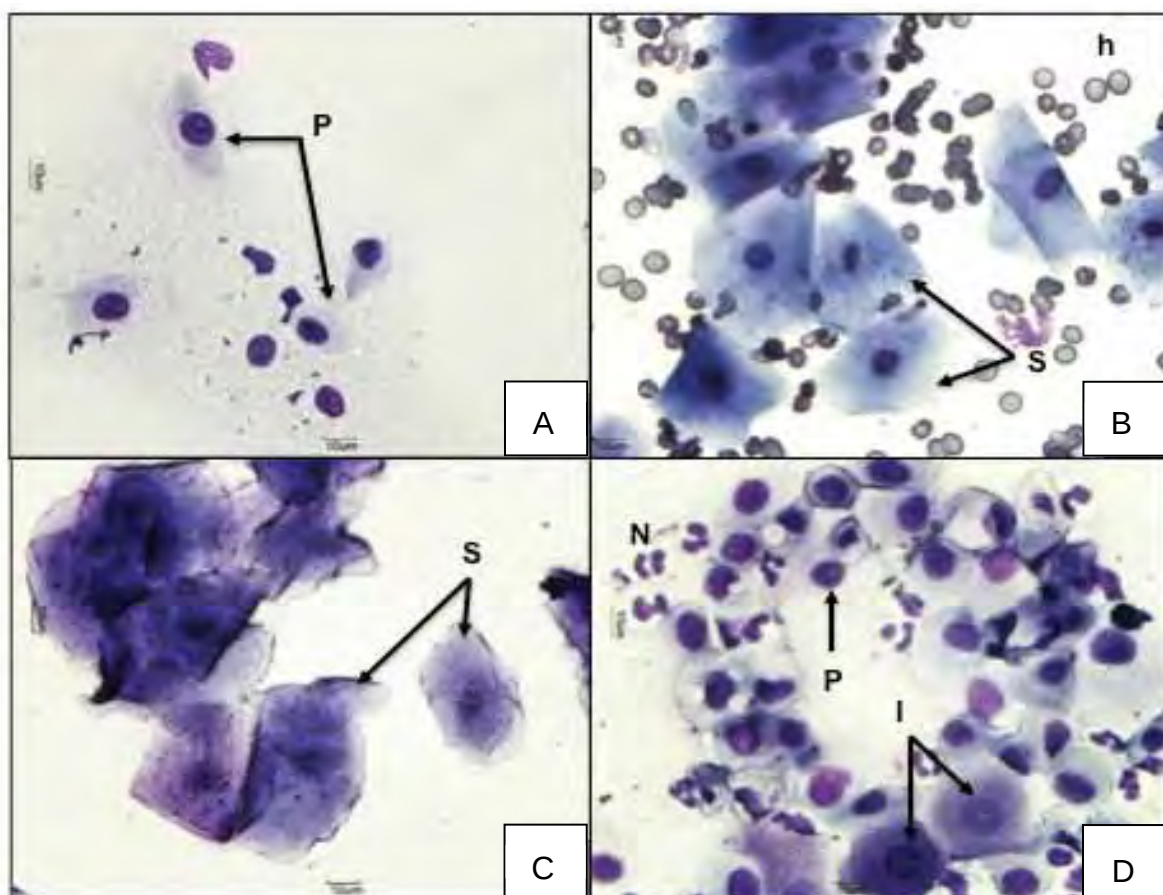


Figura 2. Fotomicrografia de avaliação colpocitológica das diferentes fases do ciclo estral da cadela sob microscopia de luz. (aumento 40x) **(A)** Anestro. Células parabasais (P) e *debris* celulares. **(B)** Final de proestro. Células superficiais queratinizadas com núcleo picnótico (S) e hemácias (h). **(C)** Estro. Células superficiais queratinizadas (S). **(D)** Diestro. Células parabasais (P), intermediárias (I) e neutrófilos (N). Jaboticabal, 2013.

Para determinação das concentrações séricas de progesterona, uma única amostra de sangue foi coletada de cada animal. As amostras foram centrifugadas a 800G durante 5 minutos e subsequentemente dessoradas e acondicionadas em microtubos de 1,5 mL. Ato contínuo, estas foram armazenadas a temperatura de -20°C até o momento das análises. A dosagem de progesterona foi realizada pelo método de quimioluminescência no Centro de Análises e Pesquisas Clínicas Álvaro, na cidade de Cascavel/Paraná.

3.3 – Obtenção e classificação morfológica de oócitos caninos

Após o procedimento de OH, os ovários foram colhidos assepticamente e imersos em “Phosphate Buffer Saline” (PBS)¹ acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB)² a temperatura ambiente (Solução de Transporte). Ato contínuo, os ovários foram transportados ao Laboratório de Reprodução da UNESP *campus* de Jaboticabal, SP onde foram processados pela técnica de fatiamento sobre placa aquecida em solução transporte. Os COCs liberados foram classificados morfológicamente de acordo com o critério adotado para oócitos caninos por Hewitt e England (1998) (Apêndice I) (Figura 3). A mensuração do diâmetro dos oócitos foi realizada por meio de retículo milimetrado de medição para objetiva ocular de 10x do estereomicroscópio em aumento 4x. Sendo que, o valor de cada milímetro da régua correspondia a 27,5 μm e somente oócitos com diâmetro igual ou superior a 120 μm foram selecionados (PIRES-BUTTLER, 2010).

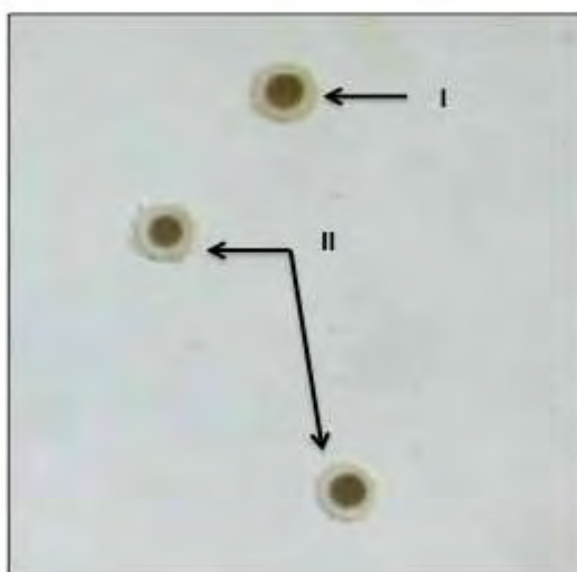


Figura 3. Fotomicrografia dos complexos *cumulus*-oócito (COCs) caninos em estereomicroscópio em aumento de 4X. COCs classificados como grau I (I) e II (II). Jaboticabal, 2013.

¹ Sigma Chemical Co, St Louis, EUA

² Cripion Biotecnologia Ltda, Andradina, Brasil

3.4 - Maturação *in vitro*

Após a obtenção e seleção de COCs grau I, parte dos oócitos foi separada e imediatamente fixada em glutaraldeído 2% em 0,1M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por 90 minutos a 38°C e estocada em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M/sucrose 0,2M a 4°C para posterior processamento para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (avaliação 0 horas).

Os demais COCs foram divididos em 5 grupos de até 25 oócitos cada, os quais foram submetidos ao processo de maturação *in vitro* em cinco meios de maturação distintos, porém com a mesma base de constituição. Os constituintes do meio base (MB) encontram-se elucidados no Apêndice II.

Destarte, os meios utilizados no presente estudo foram:

- **Meio I** – Meio base (MB) suplementado com 10 UI/mL de hCG + 2ng/mL de P₄ durante 96 horas de MIV.
- **Meio II** – MB suplementado com 10 UI/mL de hCG nas primeiras 48 horas e sem suplementação hormonal nas 48 horas subsequentes do processo de MIV.
- **Meio III** – MB suplementado com 10UI/mL hCG nas primeiras 48 horas e 2ng/mL de P₄ nas 48 horas subsequentes do processo de MIV.
- **Meio IV** - MB sem suplementação hormonal nas primeiras 48 horas e 2ng/mL de P₄ nas 48 horas subsequentes do processo de MIV.
- **Meio V** – MB durante 96 horas do processo de MIV.

Os COCs foram transferidos para placas de quatro poços (NUNC) e em cada poço foram colocados 500µL de meio de maturação específico para cada tratamento. Posteriormente as placas foram acondicionadas em estufa a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ por período de 48 horas. Após este período os oócitos foram removidos do meio de maturação e colocados em outras placas do tipo NUNC contendo igualmente 500µL de meio de maturação específico para cada

tratamento por mais 48 horas.

Após 96 horas de cultivo, os oócitos foram removidos e fixados em glutaraldeído 2% em 0,1M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por 90 minutos a 38°C e estocados em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M/sucrose 0,2M a 4°C até o processamento das amostras para MEV e MET.

3.5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O processamento das amostras para avaliação por meio de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas de acordo com o descrito por Pires-Buttler (2010).

Para a realização da análise ultraestrutural as amostras armazenadas em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M/sucrose 0,2M a 4°C foram lavadas três vezes em solução salina 0,9% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 4 horas. Após esta etapa as amostras foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) , desidratadas em uma série graduada de acetona³ (30- 100%) e secas em secador de ponto crítico. Ato contínuo estas foram montadas em “stubs”, e posteriormente metalizadas com ouro, para avaliação em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 5410 do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV/UNESP *campus* Jaboticabal (Figura 4).

³ Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha

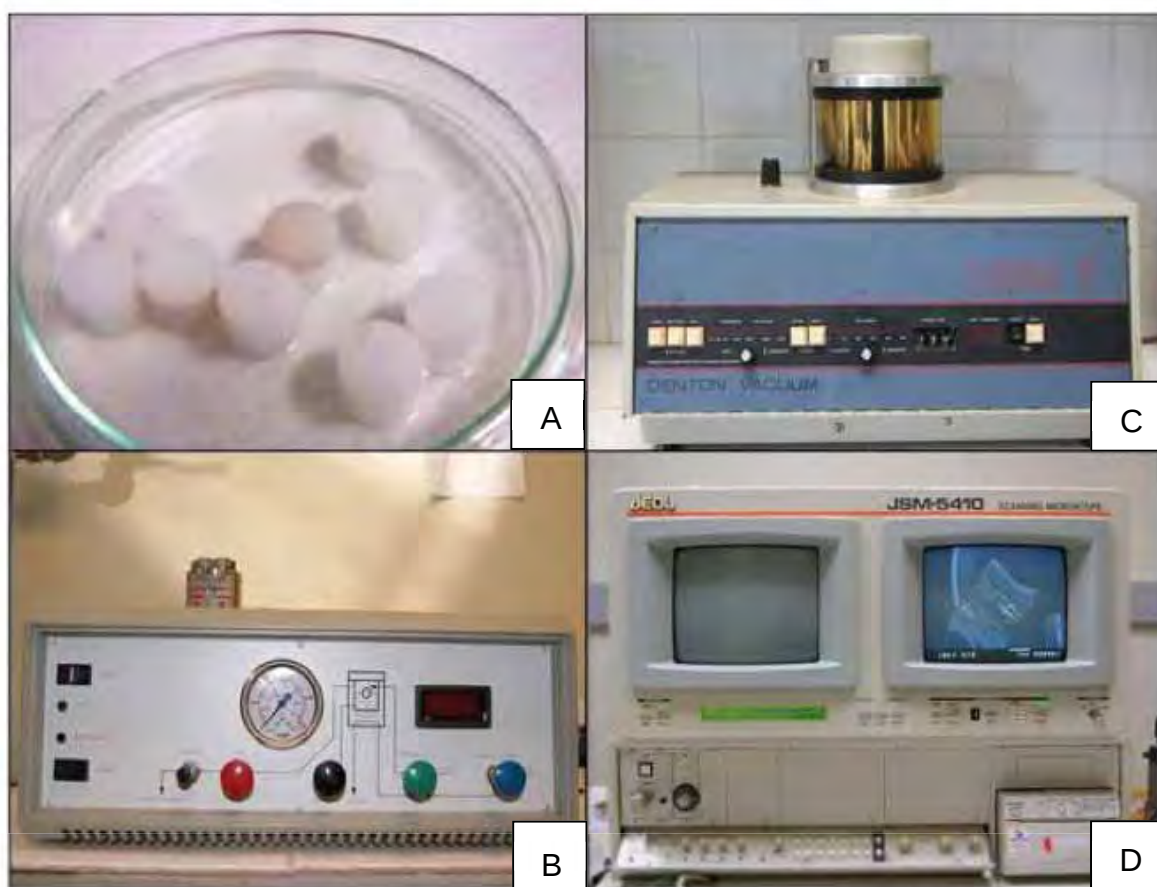


Figura 4. Sequência de processamento das amostras para realização da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A.** Desidratação dos oócitos em cápsulas de micropore. **B.** Secador de ponto crítico. **C.** Aparelho de metalização Denton Vacuum. **D.** Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 5410. Jaboticabal, 2013.

3.6 – Análise das amostras submetidas a MEV

No presente estudo, os oócitos caninos foram avaliados quanto aos parâmetros descritos por Haenisch-Woehl et al. (2003) e Pires-Buttler (2010):

- a. Arranjo (Figura 5A e 5B)
- b. Processos emitidos entre as células do *cumulus* e entre estas células e a zona pelúcida (ZP). Dentro deste item dividiu-se os processos em curtos e longos (Figura 5C e 5D).
- c. Intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* (Figura 6).

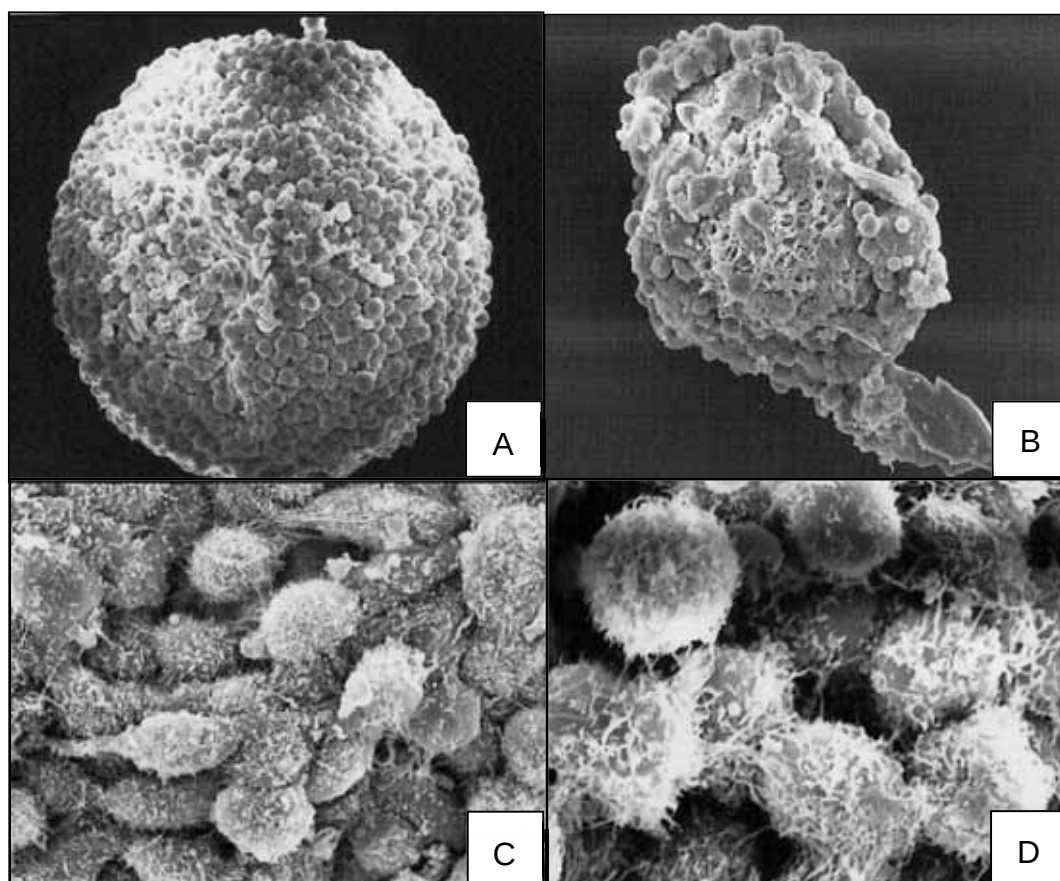


Figura 5. Eletromicrografia de complexo *cumulus*-oócito de fêmea canina
A. Células do *cumulus* organizadas de forma regular ao redor do oócito. **B.** Células do *cumulus* arranjadas irregularmente ao redor do oócito. **C.** Comunicação entre as células do *cumulus* do tipo curto (seta). **D.** Comunicação entre as células do *cumulus* do tipo longo (seta). Jaboticabal, 2013.

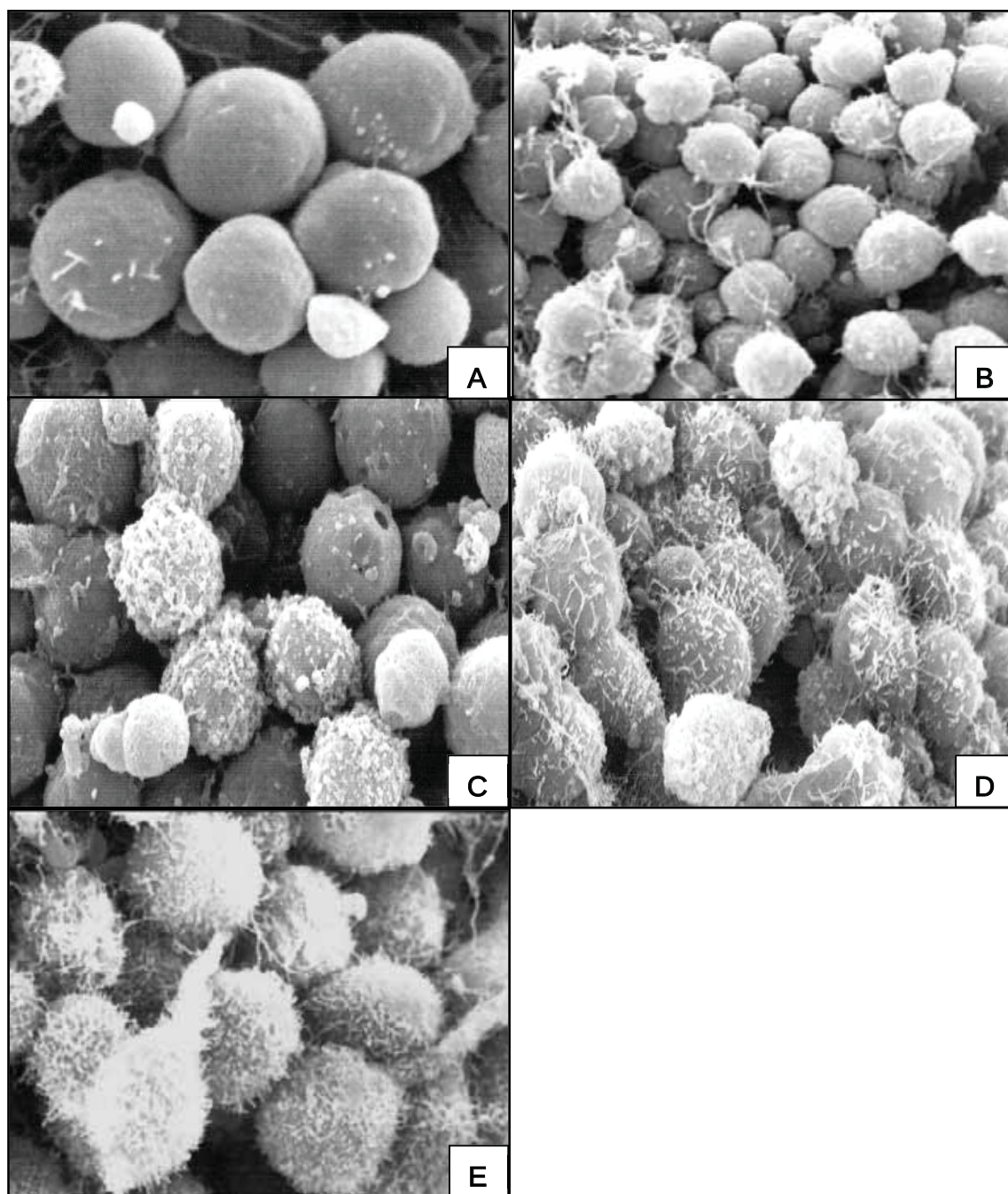


Figura 6. Eletromicrografia do complexo *cumulus*-oócito de fêmeas caninas demonstrando os parâmetros utilizados para se estabelecer a escala de intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*. **A e B.** Ausência e pouco processos emitidos entre as células do *cumulus*. **C.** Quantidade moderada de processos emitidos entre as células do *cumulus*. **D e E.** Quantidade intensa de processos emitidos entre as células do *cumulus*. Adaptação de PIRES-BUTTLER (2010).

Dessa forma, foram realizadas tanto análises qualitativas como quantitativas e para tal determinou-se uma escala para estabelecer a intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*. Ainda, tais dados foram transformados em números absolutos, que por sua vez foram utilizados para análise estatística do presente estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Escala de valores de intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* do oócito canino segundo Pires-Buttler (2010). Jaboticabal, 2013.

Intensidade do processos emitidos entre as células do <i>cumulus</i>	Escala	Número absoluto
Ausente	-	0
Pouco	+	1
Moderado	++	2
Intenso	+++	3
Muito intenso	++++	4

3.7 – Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O processamento das amostras para avaliação por meio de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas de acordo com o descrito por Pires-Buttler (2010) com algumas modificações.

Para a realização da análise ultra-estrutural as amostras foram armazenadas em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M/sucrose 0,2M a 4°C foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M/sucrose 0,2M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 24 horas. Ato

contínuo, estas foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M/sucrose 0,2M coradas *overnight* em acetato de uranila 0,5%. Ao término desta etapa as amostras foram desidratadas em série graduada de acetona⁴ (30 -100% e incluídas em Araldite 502. Após a inclusão, o material colocado em estufa 60°C onde permaneceu por 72 horas para polimerização da resina.

Os blocos foram removidos da forma de inclusão e trimados para a retirada do excesso de resina. Posteriormente foram realizados os cortes semi-finos e ultra-finos no ultramicrotomo. Os cortes semi-finos foram realizados com navalha de vidro a uma espessura de 500 nm. A cada 5mm lâminas eram confeccionadas e coradas com azul de toluidina a 0,25% em solução aquosa de borato de sódio a 1% para verificar a região do corte. Uma vez que a região do *cumulus* era identificada eram realizados cortes de 200nm e a cada 2µm (eram confeccionadas lâminas, que posteriormente eram coradas para identificação da região do núcleo. Quando esta era identificada, trocava-se navalha de vidro pela de diamante e eram realizados cortes ultra-finos (50 a 70nm), os quais eram colocados em grades de cobre oval 2 x 1, revestidas com parlódio e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo antes de serem analisadas no microscópio eletrônico de transmissão da marca JEOL modelo JEOL 100 CXII do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioreagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo *campus* Ribeirão Preto, SP (BIOCEL – FMRP -USP).

3.8 – Análise das amostras da MET

Por meio desta técnica, os oócitos, aleatoriamente escolhidos, foram avaliados quanto à maturação nuclear e citoplasmática sob os seguintes aspectos:

- Distribuição dos grânulos corticais e mitocôndrias,
- Presença de junções do tipo GAP entre as células do *cumulus* e oócito
- Distribuição do complexo de Golgi e retículo endoplasmático
- Presença de microvilosidades e gotas lipídicas

⁴ Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha

- Avaliação da posição nuclear no interior do citoplasma do oócito canino e condensação e organização da cromatina.

3.9 – Análise estatística

Para as amostras processadas e avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura foi utilizado o teste de correlação qui-quadrado para se averiguar o percentual de oócitos com arranjo regular e irregular e de comunicação do tipo curta ou longa entre as células do *cumulus* nas diferentes fases entre os grupos estudados. Adotou-se nível de significância de $p < 0,05$.

A análise de variância de Friedman foi realizada para avaliar os dados relativos ao escore de intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* e entre estas e a zona pelúcida entre os meios estudados nas fases folicular e não folicular. Em todas as análises foi adotado nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Valores de progesterona sérica

Sobre a seleção dos animais para inclusão nos grupos fase folicular (FF), e não folicular (FN) a avaliação do histórico e sinais clínicos do animal e colpocitologia foram realizadas de acordo com o descrito por Nelson e Feldman (2004). Entretanto, por se tratarem de análises subjetivas, optamos pela dosagem de progesterona sérica para confirmar o estágio do ciclo estral de cada animal (Tabela 2). A dosagem de progesterona sérica foi realizada pelo método de quimioluminescência por ser um teste sensível, rápido e de baixo custo. Com base nos resultados apresentados pode-se inferir que a maior parte dos animais que compunham a fase folicular provavelmente já haviam tido o pico de LH, uma vez que a dosagem de progesterona no momento da onda de LH corresponderia de 2 a 4 ng/mL. Ainda, os baixos valores de progesterona nos animais classificados na fase não folicular sugere que a maior parte dos animais selecionados para este grupo encontravam-se no final do diestro, uma vez que associando-se estes valores aos achados clínicos e colpocitológicos estes animais apresentavam características de final de diestro e início de anestro.

Tabela 2. Média $\pm$ erro padrão da média dos valores de progesterona (P_4) sérica de fêmeas caninas incluídas no grupo de animais em fase folicular (FF) e fase não folicular (FN). Jaboticabal, 2013.

Grupo	Número de animais/ grupo	Valor de P_4 sérica (ng/mL)
FF	12	6,56 $\pm$ 3,10
FN	11	5,94 $\pm$ 3,54

4.2 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram avaliados 306 oócitos por meio de MEV. O número de amostras correspondentes a cada fase e a cada meio de tratamento encontram-se descritos na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3. Número de complexos *cumulus*-oócitos recuperados para avaliação por microscopia eletrônica de varredura, de acordo com a fase do ciclo estral da fêmea canina (FF - fase folicular e FN - fase não folicular) e tipo de avaliação realizada: avaliação 0 hora e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.

Tipo de avaliação	Fase do ciclo estral	
	FF	FN
0 hora	45	31
Meio I	42	29
Meio II	20	20
Meio III	20	24
Meio IV	15	22
Meio V	19	19
Total	161	145

Por meio desta técnica, os oócitos foram avaliados de acordo com o arranjo das células do *cumulus* ao seu redor. O arranjo foi classificado como regular ou irregular. Os dados referentes ao arranjo das células do *cumulus* nas fases folicular (FF) e não folicular (FN) após 96 horas de MIV em diferentes meios maturação estão representados nas Figuras 7 e 8.

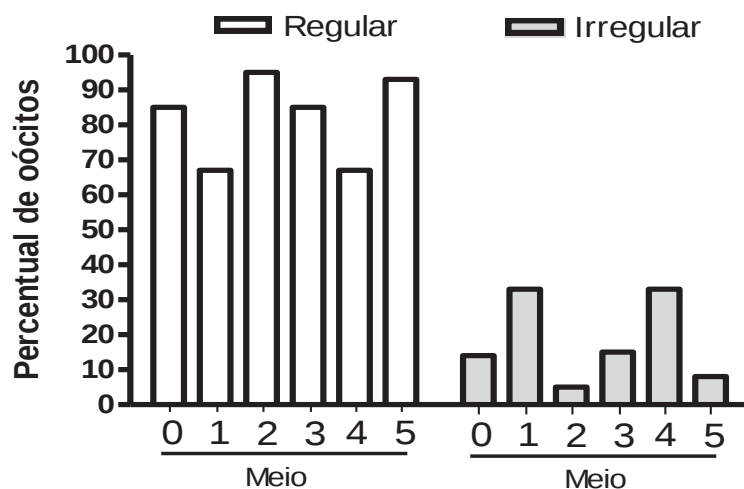


Figura 7. Arranjo das células do *cumulus* ao redor de oócitos de cadelas em fase folicular à avaliação 0 hora, e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios 1, 2, 3, 4 e 5.

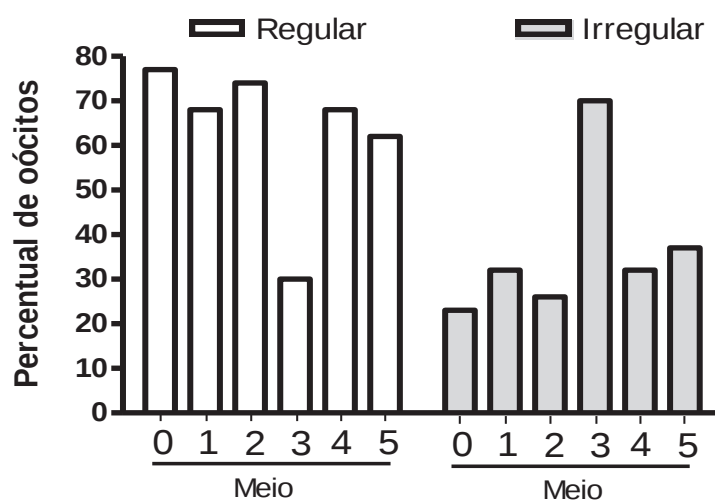


Figura 8. Arranjo das células do *cumulus* ao redor de oócitos de cadelas em fase não folicular à avaliação 0 hora e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios 1, 2, 3, 4 e 5.

Nas amostras referentes à avaliação zero hora (FF-0) e submetidas ao processo de maturação *in vitro* nos meios II (FF-2) e V (FF-5) da fase folicular (FF) pôde-se constatar um número significativamente maior de oócitos com arranjo regular quando comparados aos demais tratamentos ($p = 0,03$).

Já na fase não folicular, exceto pelos oócitos do meio III que apresentaram um número de oócitos com arranjo irregular significativamente maior do que com arranjo regular ($p < 0,001$) após o processo de MIV, não foi observada diferença significativa entre os percentuais de oócitos com arranjo regular e irregular na avaliação zero hora e nos diferentes meios de MIV.

Dessa forma podemos inferir que nos oócitos provenientes tanto da fase folicular como da não folicular, há um predomínio de COC's com arranjo regular semelhantemente ao descrito por Pires-Buttler (2010) em cadelas em fase folicular e anestro e Haenisch-Woehl et al. (2003) em cadelas pré-púberes. No entanto acredita-se que a ocorrência de maior número de oócitos com arranjo irregular no meio III possa ser exclusivamente devido ao processamento das amostras deste grupo.

Semelhantemente ao descrito por Pires-Buttler (2010), nossos resultados revelaram que, em oócitos recém-colhidos, a forma de comunicação entre as células do *cumulus* independe da condição reprodutiva da cadela e esta é estabelecida por meio de processos curtos (Figuras 9 e 10). Entretanto, no que se refere aos oócitos submetidos ao processo de MIV independentemente da fase avaliada, este mesmo autor descreve a ocorrência de processos longos em oócitos cultivados em meios não suplementados, fato este não constatado no presente estudo.

Já quanto a intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*, alguns autores afirmam que a ausência e a escassez destas sugerem uma capacidade reduzida de maturação por parte dos oócitos (HAENISCH-WOEHL et al., 2003). Desse modo, pode-se afirmar que, no presente estudo, os oócitos avaliados a zero hora oriundos de fêmeas em fase folicular e não folicular apresentam a mesma capacidade para retomar o processo de meiose, uma vez que ambos apresentam intensidade moderada de comunicação (Tabela 4).

Ainda, tanto os oócitos obtidos nas fases folicular e não folicular mostraram leve redução, porém não significativa, nas comunicações entre as células do *cumulus* quando submetidas aos diversos meios de tratamento ($p=0,053$). Apesar da ausência de significância, acredita-se que esta redução seja devida ao processo de maturação, uma vez que a perda de comunicação entre as células do *cumulus* são sinais de maturidade oocitária; ou até mesmo decorrente de um processo degenerativo natural.

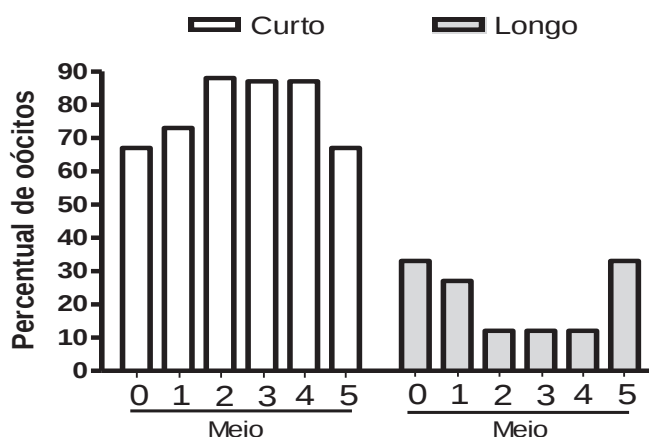


Figura 9. Tipo de comunicação (curta/longa) entre as células do *cumulus* de cadelas da fase folicular à avaliação 0 hora, e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios 1, 2, 3, 4 e 5.

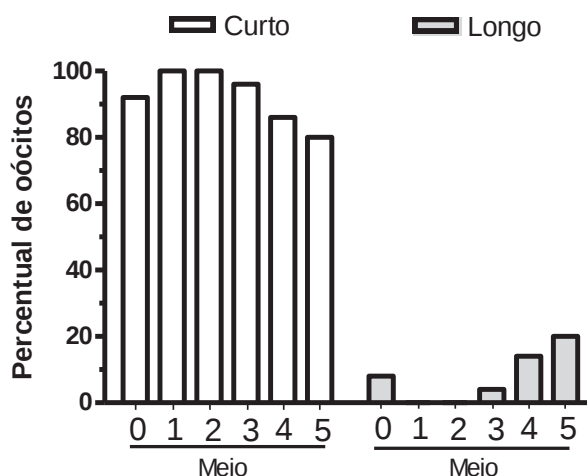


Figura 10. Tipo de comunicação (curta/longa) entre as células do *cumulus* de cadelas da fase não folicular à avaliação 0 hora, e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 4. Mediana (máximo e mínimo) relativo ao escore de intensidade de comunicação entre as células dos *cumulus* entre os meios estudados nas fases folicular e não folicular Jaboticabal, 2013.

Meios	Fase Folicular	Fase Não Folicular
Zero hora	2,0 (0,0 – 3,0)	1,0 (0,0 – 2,0)
I	1,5 (0,0 – 4,0)	1,0 (1,0 – 2,0)
II	1,5 (0,0 – 3,0)	1,0 (0,0 – 2,0)
III	1,5 (0,0 – 3,0)	1,0 (1,0 – 3,0)
IV	1,0 (1,0 – 3,0)	1,0 (0,0 – 3,0)
V	1,0 (0,0 – 2,0)	1,0 (0,0 – 2,0)

*Teste de Friedman (p=0,053)

4.3 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Vinte e nove amostras foram avaliadas por meio de MET. O número de amostras correspondente a cada fase e a cada meio de tratamento encontra-se descrito na Tabela 5 abaixo:

Tabela 5. Número de complexos *cumulus*-oócitos (COC) recuperados para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão, de acordo com a fase do ciclo estral da fêmea canina (Fase Folicular –FF e Fase Não Folicular –FN) e tipo de avaliação realizada: avaliação 0 hora e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.

Tipo de avaliação	Fase do ciclo estral	
	FF	FN
0 hora	3	3
Meio I	4	1
Meio II	2	1
Meio III	2	3
Meio IV	2	1
Meio V	3	4
Total	16	13

4.3.1 – Avaliação ultraestrutural de COC's não maturados (avaliação 0 hora)

As características ultraestruturais de COC's não maturados (avaliação 0 hora) provenientes de cadelas nas fases folicular (FF) e não folicular (FN) encontram-se detalhadas nas figuras 11 e 12 e sumarizadas tabelas 6, 7, 8 e 9.

- **COC's não maturados (avaliação zero hora) provenientes de cadelas em fase não folicular**

Os COC's desta fase foram caracterizados pela presença de núcleo periférico com formato arredondado, ausência de invaginações no envelope nuclear e nucléolo denso e condensado. Ao redor do núcleo pôde-se constatar pequenos *clusters* mitocondriais, os quais também encontravam-se distribuídos na periferia do ooplasma. As microvilosidades apresentavam-se bem desenvolvidas e próximo a elas pôde-se constatar comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma. Os grânulos corticais encontravam-se concentrados na periferia do oócito, entretanto podiam ser visualizados em menor número em outras regiões do ooplasma. Ainda, inúmeros complexos de Golgi foram constatados próximos ao núcleo e na periferia do ooplasma. Inúmeras gotas lipídicas apresentavam-se distribuídas uniformemente pelo ooplasma (Figura 11).

- **COC's não maturados (avaliação zero hora) provenientes de cadelas na fase folicular.**

Nos oócitos oriundos da fase folicular, pôde-se constatar a presença de núcleo periférico com presença de ondulações na membrana nuclear e nucléolo parcialmente reticulado composto com certo grau de condensação de cromatina. Ao redor do núcleo, assim como na periferia do ooplasma, pôde-se observar a presença de pequenos *clusters* mitocondriais. Semelhantemente aos oócitos da fase não folicular as microvilosidades apresentavam-se bem desenvolvidas e próximo a elas também pôde-se constatar comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma. Os complexos de Golgi foram observados em região periférica juntamente a com os grânulos corticais. Quanto as gotas lipídicas estas foram observadas dispersas de

forma homogênea em todo o citoplasma do oócito (Figura 11).

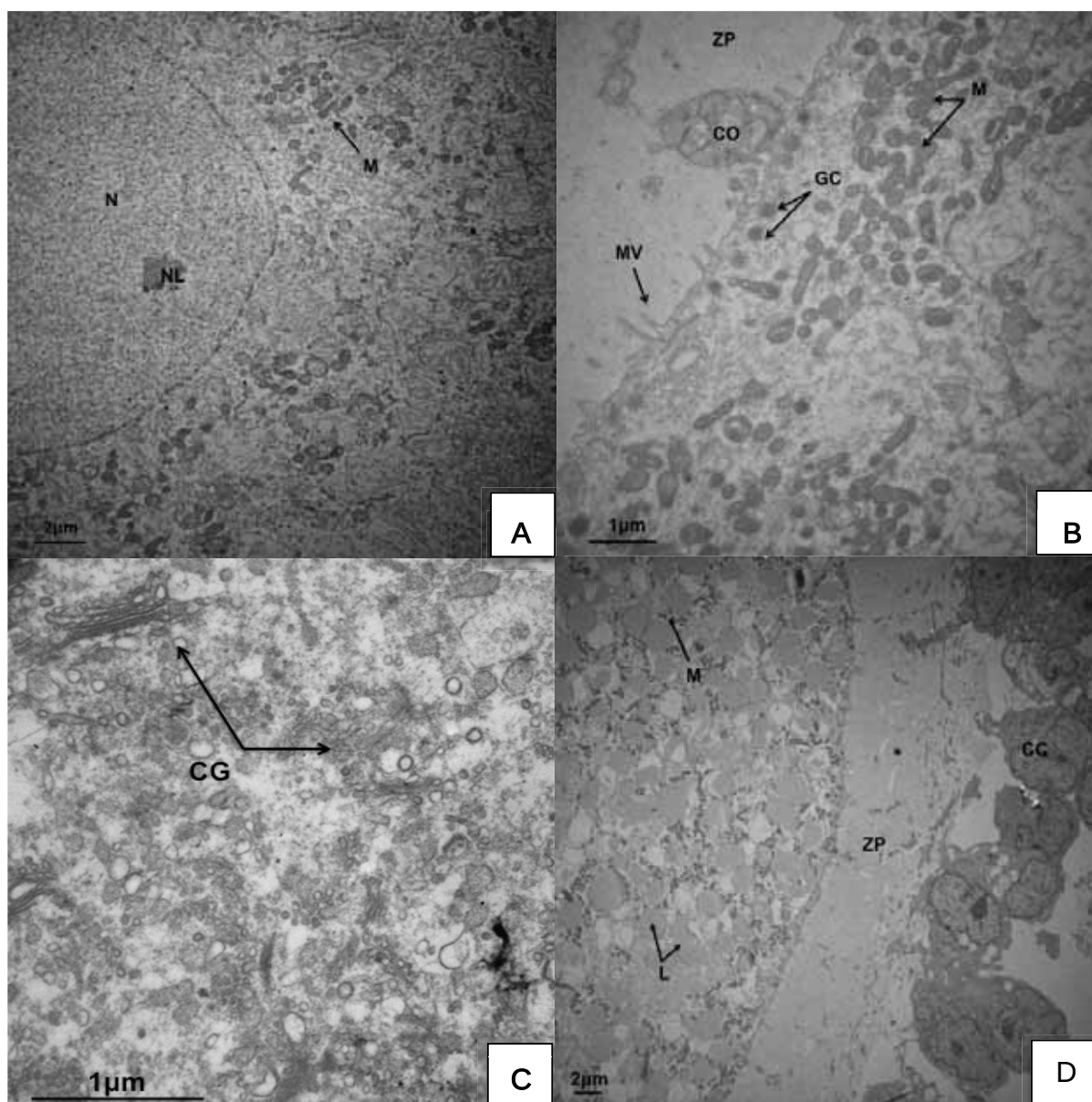


Figura 11. Eletromicrografia de COC's não maturados (avaliação 0h) provenientes de cadelas em fase não folicular (FN). **(A)** Núcleo (N) arredondado com nucléolo (NL) denso e condensado na periferia do oócito. Ao redor deste presença de pequenos *clusters* mitocondriais (M). (aumento 8.000x). **(B)** Infiltração das células do *cumulus* através da zona pelúcida (ZP), gerando comunicação entre estas células e o ooplasma (CO). Microvilosidade (MV), grânulos corticais (GC) e mitocôndrias (M) na periferia do ooplasma (aumento 14.000x). **(C)** Complexos de Golgi (CG) na periferia do ooplasma (aumento 20.000x). **(D)** Camada de células do *cumulus* (CC) ao redor da zona pelúcida (ZP). Gotas lipídicas e *clusters* mitocondriais (aumento de 2.700x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

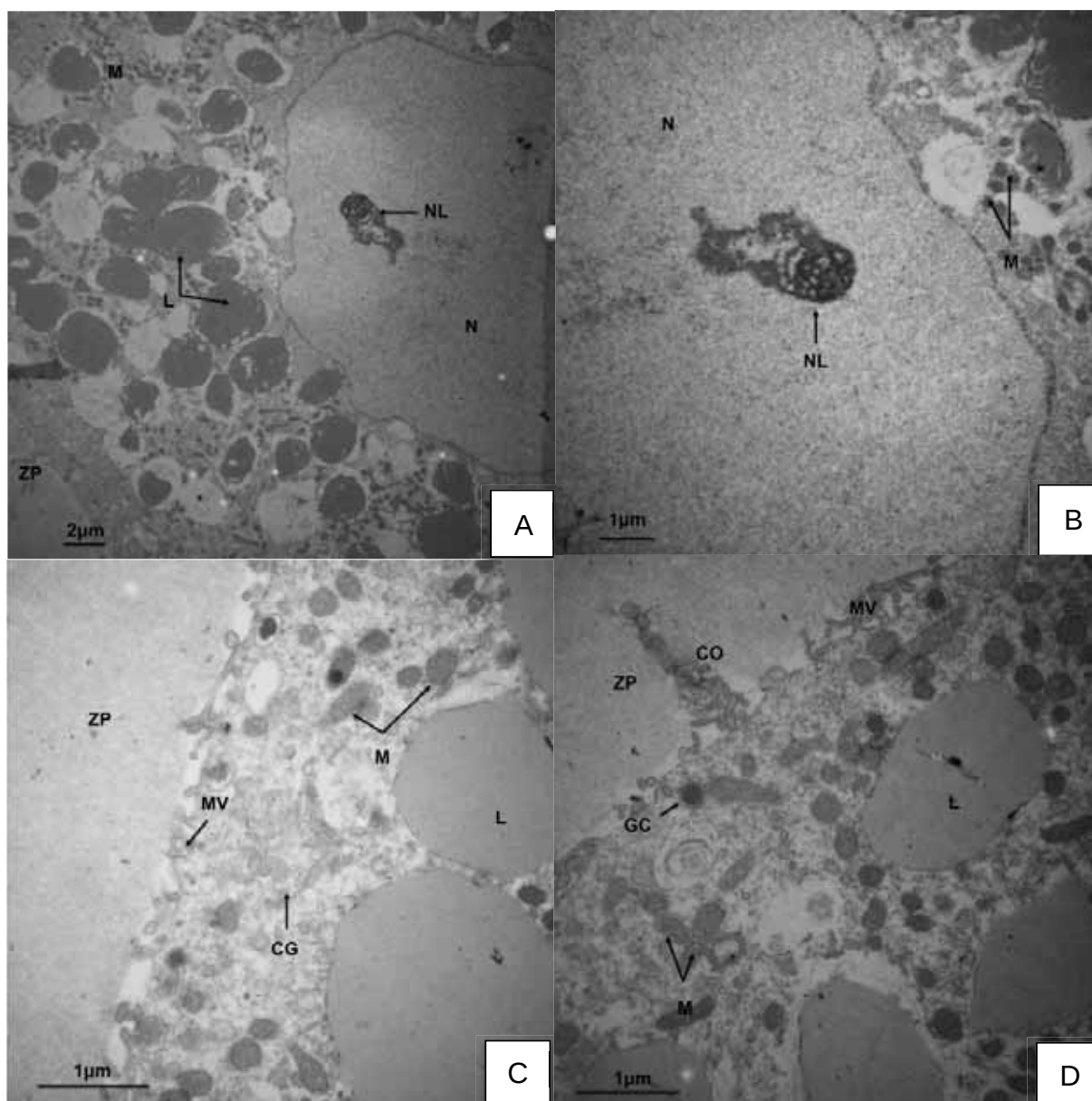


Figura 12. Eletromicrografia de COC's não maturado (avaliação 0h) proveniente de cadela em fase folicular (FF). **(A)** Núcleo (N) e nucléolo (NL) periféricos. Presença de *clusters* mitocondriais (M) ao redor do núcleo e gotas de lipídeos (L) distribuídas de forma uniforme (aumento 5.000x). Núcleo (N) com nucléolo (NL) reticulado com a presença de pequenos vacúolos. pelo ooplasma e mitocôndrias (M) ao seu redor (aumento 10.000x). **(C)** Presença de microvilosidades (MV) bem desenvolvidas e complexo de Golgi (CG) e mitocôndrias (M) na periferia do ooplasma e próximos a gotas de lipídeos (L) (aumento 20.000x). **(D)** Comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma (CO), zona pelúcida (ZP), microvilosidades (MV), grânulos corticais (GC), lipídeos (L) e mitocôndrias (M) (aumento 20.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Com base nas descrições e nas figuras supracitadas pôde-se constatar presença de oócitos VG_p em ambas as fases avaliadas de oócitos recém colhidos. Entretanto, apesar da localização periférica do núcleo e nucléolo com condensação da cromatina, os oócitos provenientes destas fases, os oócitos apresentaram tanto sinais de maturidade citoplasmática, como grande quantidade de grânulos corticais distribuídos na periferia do ooplasma, quanto sinais de imaturidade, como a presença de pequenos *clusters* mitocondriais distribuídos de forma heterogênea pelo citoplasma e presença de complexos de Golgi próximos à comunicação entre células do *cumulus* e ooplasma. Sendo assim, tais resultados comprovam que oócitos com características VG_p apresentam características de maturidade semelhantemente ao descrito por Viaris De Lesegno et al. (2008a).

Ainda, os mesmos autores afirmam que a presença de ondulações no envelope nuclear é um evento que antecede a onda de LH e que associado ao deslocamento do núcleo em direção a periferia representam o primeiro sinal que induz a maturação. Sendo assim, os oócitos da fase folicular e da fase não folicular classificados em VG_p, provavelmente foram provenientes de animais que já haviam sofrido a primeira sinalização, o que justifica os sinais de maturidade citoplasmática, o deslocamento do núcleo para a periferia e as ondulações no envelope nuclear.

Sobre a ausência de oócitos VG_c nas fases folicular e não folicular não podemos afirmar que cadelas nestas fases não possuam oócitos imaturos e transcritionalmente ativos (GV_c). Acredita-se que a ausência deste tipo oocitário seja exclusivamente devida ao número reduzido de amostras avaliadas em nosso estudo (FN-3 amostras e FF-3 amostras), uma vez foi constatado este padrão oocitário em estudos realizados por Viaris De Lesegno et al. (2008) e Pires-Buttler (2010) onde foram avaliadas 78 e 15 amostras, respectivamente.

4.3.2 – Avaliação ultraestrutural de oócitos após o processo de MIV

As características dos oócitos provenientes de cadelas em fase não folicular e fase folicular nos diferentes meios de tratamento após 96 horas de maturação *in vitro* encontram-se detalhadas nas figuras 13 a 21 e sumarizadas nas tabelas 6, 7, 8 e 9.

- **COC's após 96 horas de maturação *in vitro* no meio I**

Os COC's oriundos de cadelas em fase folicular foram caracterizados pela presença de núcleo periférico com invaginações no envelope nuclear e nucléolo denso e condensado. Ainda, dispersos de forma homogênea pelo citoplasma, porém com maior concentração nas proximidades do núcleo pôde-se constatar a presença de grandes *clusters* mitocondriais. As microvilosidades apresentavam-se bem desenvolvidas e próximo a elas pôde-se observar comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma, porém em menor número quando compradas a avaliação 0 hora. Na junção entre as células do *cumulus* com o ooplasma e na proximidade do núcleo pode-se constatar aglomerados de complexos de Golgi, assim como grandes retículos endoplasmático lisos organizados concentricamente. Inúmeros grânulos corticais apresentavam-se enfileirados na periferia do ooplasma e as gotas lipídicas apresentam-se dispersa uniformemente no citoplasma do oócito. (Figura 13).

Já em COC's provenientes de fêmeas em fase não folicular não foi possível a visualização do núcleo nos cortes realizados. Os grânulos corticais, assim como inúmeras mitocôndrias encontravam-se na periferia do ooplasma. As microvilosidades apresentavam-se bem desenvolvidas e próximo a elas pôde-se observar comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma com a presença de complexos de Golgi em suas terminações. Grande quantidade de gotas lipídicas apresentavam-se dispersas no citoplasma. (Figura 14).

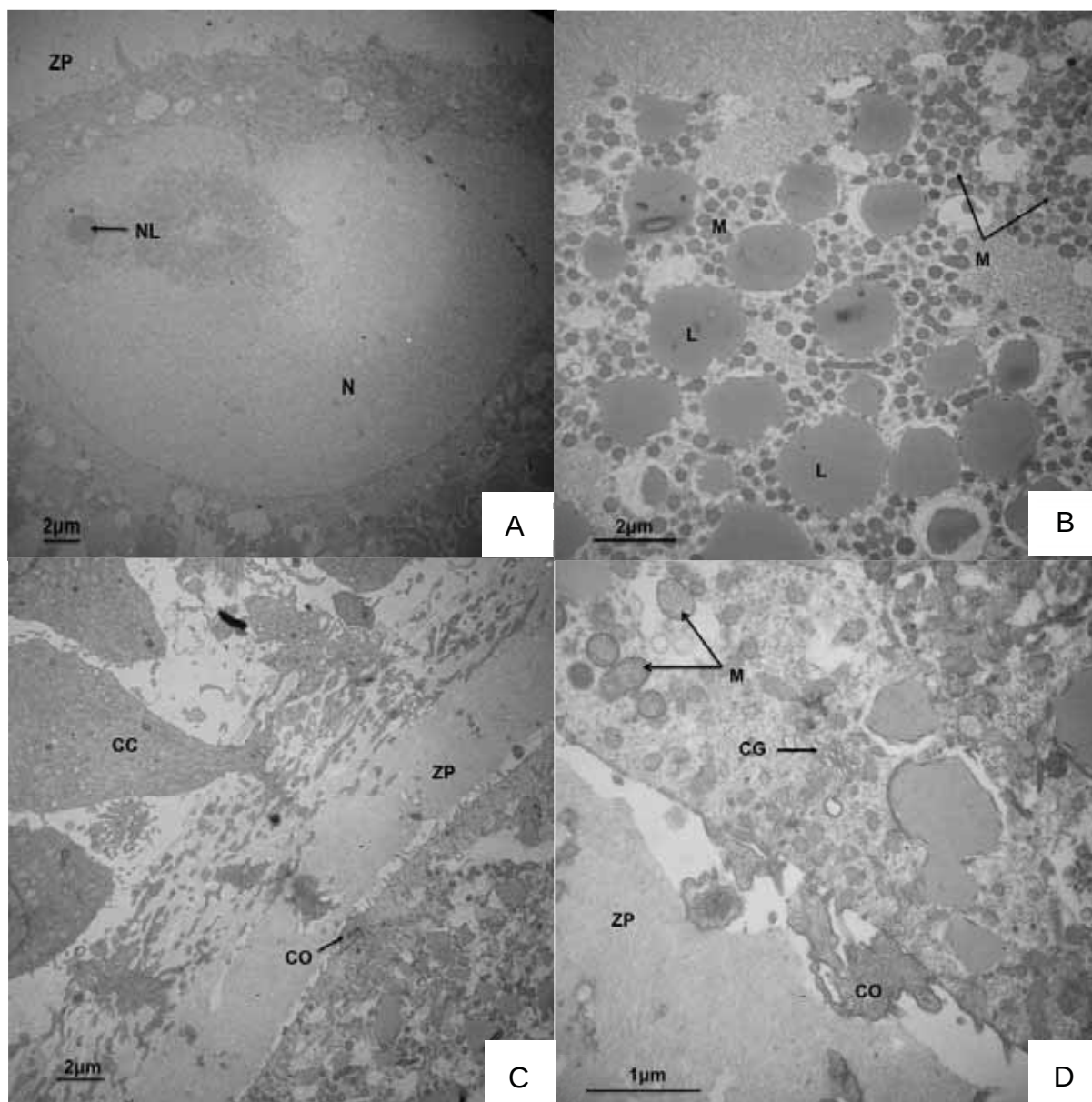


Figura 13. Eletromicrografia de COC's provenientes de cadelas em fase folicular do ciclo estral após 96 horas de maturação *in vitro* em meio I. **(A)** Núcleo periférico (N), próximo a zona pelúcida (ZP) com nucléolo denso e condensado (NL) (aumento 4.000x). **(B)** Grandes *clusters* mitocondriais dispersos homogeneamente pelo ooplasma entremeando gotas lipídicas (L) (aumento 8.000x). **(C)** Células do *cumulus* com sinais de degeneração (CC) e poucas comunicações entre esta células e o ooplasma (CO) (aumento 5.000x). **(D)** Presença de complexo de Golgi (CG) próximos a junções entre as células do *cumulus* e o ooplasma (CO) (aumento 20.000x). Microscópio eletrônico de transmissão.

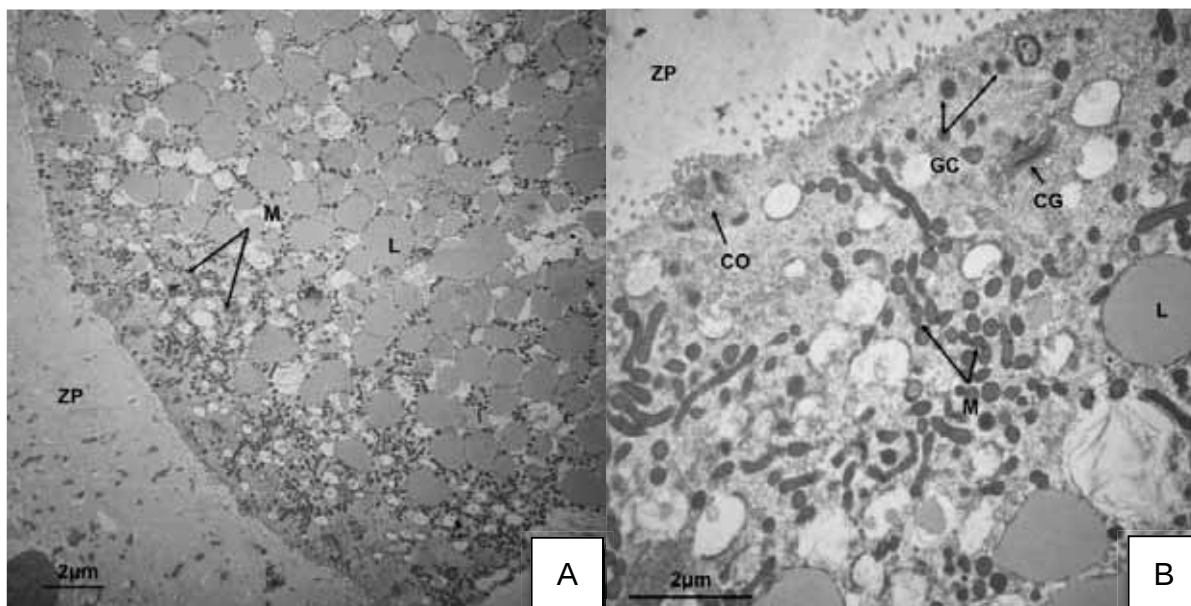


Figura 14. Eletromicrografia de COC's oriundos de fêmeas em fase não folicular. **(A)** Zona pelúcida (ZP) e inúmeras gotas lipídicas (L) e mitocôndrias (M) dispostas na periferia do ooplasma (aumento de 2700x). **(B)** Grânulos corticais (GC), complexo de Golgi (CG) e mitocôndrias (M) na periferia do ooplasma. Comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma (CO)(aumento de 10.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

- **COC's após 96 horas de maturação *in vitro* no meio II**

Tanto no grupo de COC's obtidos de fêmeas nas fase folicular como em não folicular não foi possível visualizar o núcleo dos oócitos nas amostras avaliadas.

Nos COC's provenientes de cadelas em fase folicular pôde-se constatar a presença de pequenos *clusters* distribuídos de forma heterogênea pelo citoplasma. As microvilosidades apresentavam-se bem desenvolvidas e próximo a elas também pôde-se constatar comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma. Os grânulos corticais foram observados principalmente na região periférica do citoplasma juntamente com complexos de Golgi e retículo endoplasmático liso que localizavam-se próximos as terminações das comunicações entre as células do *cumulus* e o ooplasma. Inúmeras gotas lipídicas foram observadas dispersas de forma homogênea em todo o citoplasma do oócito (Figura 15).

Já os COC's provenientes de cadelas em fase não folicular apresentaram mitocôndrias e grânulos corticais concentrados preferencialmente na periferia do ooplasma, entretanto, estes podiam ser observados em menor concentração dispersos em outras regiões do citoplasma. Ainda, foi constatado menor quantidade de complexos de Golgi próximos à comunicação entre CC e ooplasma e as microvilosidades apresentavam-se menos desenvolvidas (Figura 16).

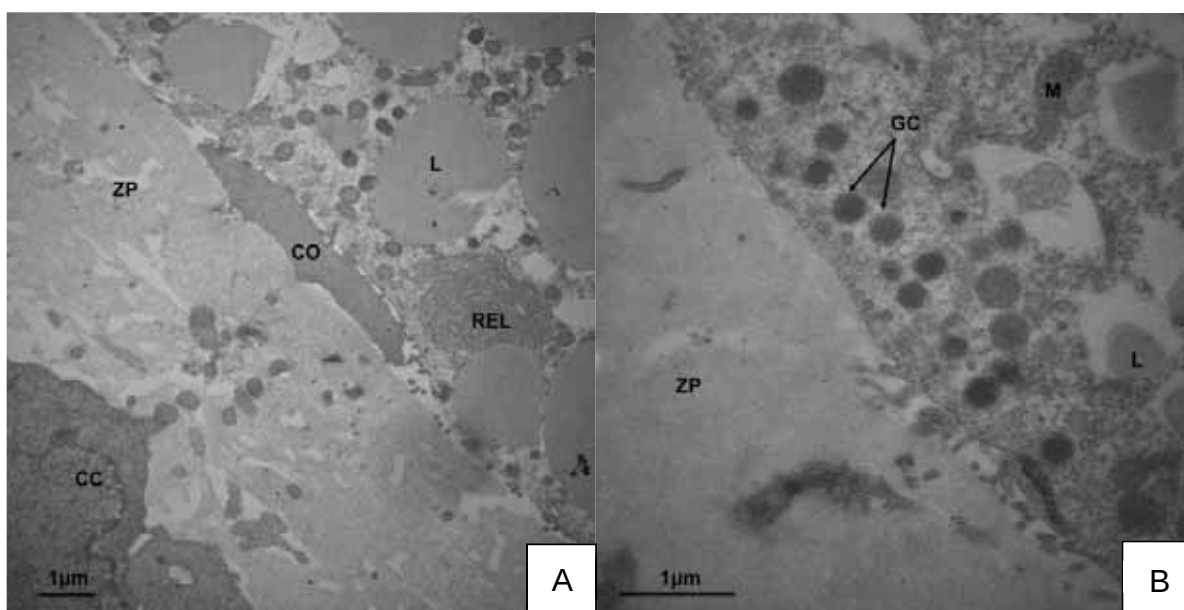


Figura 15. Eletromicrografia de COC's após 96 horas de maturação *in vitro* em meio II provenientes de cadelas em fase folicular **(A)** Presença de retículo endoplasmático liso (REL) na periferia do ooplasma e comunicação entre as células do *cumulus* (CC) e o ooplasma (CO) entremeando a zona pelúcida (ZP) (aumento 10.000x). **(B)** Presença de grânulos corticais (GC) e mitocôndrias (M) na periferia do ooplasma (aumento 20.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

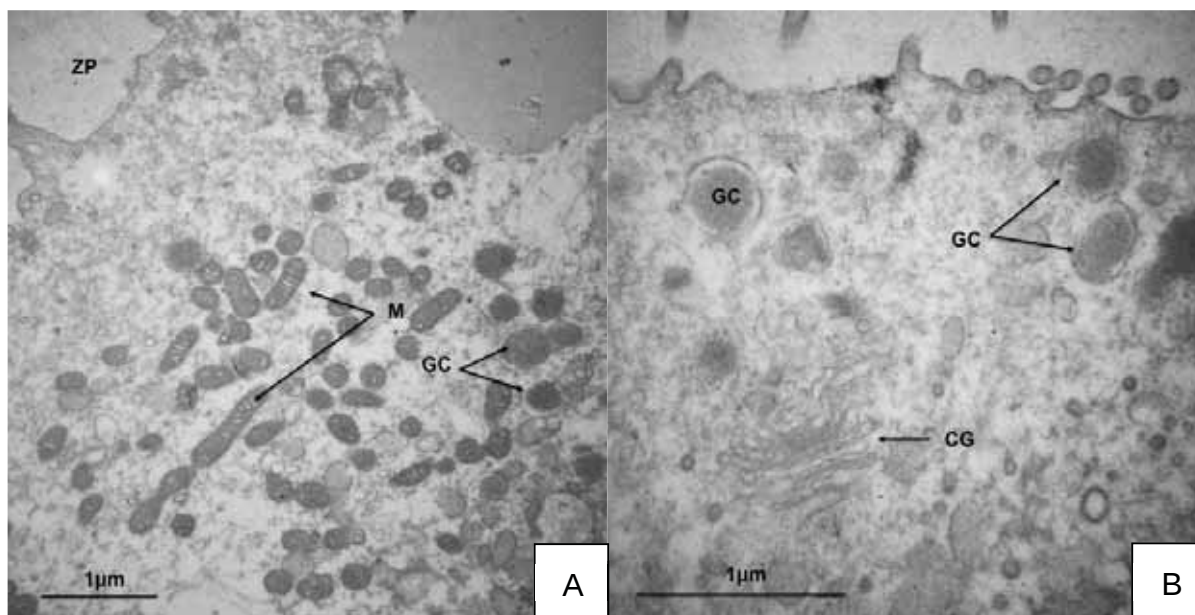


Figura 16. Eletromicrografia de COC's após 96 horas de maturação *in vitro* em meio II provenientes de cadela em fase não folicular **(A)** Presença de inúmeras mitocôndrias (M), assim como grânulos corticais (GC) na periferia do oócito (aumento 20.000x). **(B)** Presença de complexo de Golgi (CG), e grânulos corticais (GC) na periferia do ooplasma (aumento 40.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

- **COC's após 96 horas de maturação *in vitro* no meio III**

Das duas amostras provenientes de cadelas em fase folicular, uma delas apresentou sinais de degeneração, os quais não se sabe se foram decorrentes ao processo de MIV ou ao processamento da amostra. Já na amostra remanescente, não foi possível a identificação da posição do núcleo, assim como a morfologia do nucléolo. No entanto, pôde-se constatar a presença de pequenos *clusters* mitocondriais, assim como pequeno número de grânulos corticais principalmente na periferia do oócito, mas também dispersos nas demais regiões do ooplasma. Foi constatado a presença de retículo endoplasmático liso e um grande aglomerado de complexos de Golgi em região periférica próximo a terminações de comunicação entre células do *cumulus* e ooplasma (Figura 17).

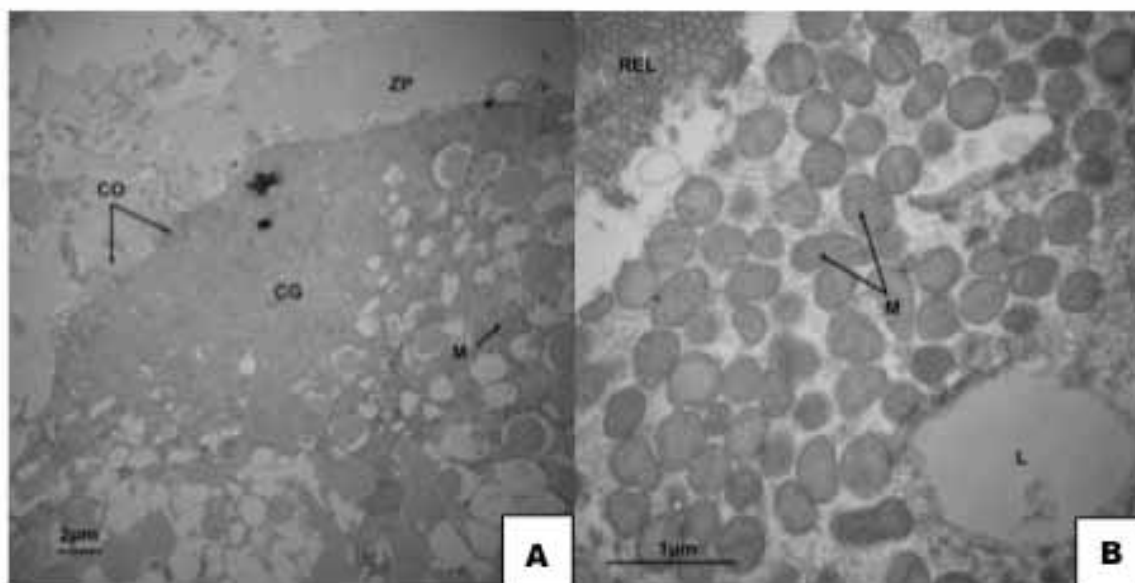


Figura 17. Eletromicrografia de COC's após 96 horas de maturação *in vitro* em meio III provenientes de cadelas em fase folicular. **(A)** Presença de pequenos *clusters* mitocondriais (M) e grande aglomerados de complexos de Golgi (CG) na periferia do ooplasma próximo as terminações das comunicações entre células do *cumulus* e ooplasma (CO) que entremeiam a zona pelúcida (ZP) (aumento 5.000x). **(B)** Presença de retículo endoplasmático liso (REL), *clusters* mitocondriais (M) e gota de lipídeos na periferia do ooplasma (aumento 27.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Os COC's obtidos de fêmeas na fase não folicular apresentaram núcleo periférico circundado por mitocôndrias, que por sua vez também encontravam-se dispersas no ooplasma e formando "clouds" mitocondriais. Estas estruturas caracterizam-se por uma gota de lipídeo circundada por mitocôndrias e indicam imaturidade oocitária. Ainda, pôde-se observar pequena quantidade de grânulos corticais na periferia, assim como dispersos na demais regiões do citoplasma. Ainda, constatou-se se a presença de inúmeras microvilosidades bem desenvolvidas e comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma. Próximo as terminações destas estruturas pôde-se observar inúmeros complexos de Golgi (Figura 18). Uma única amostra de COC's submetida a MIV com meio 3 apresentou alterações em sua morfologia, assim como em suas organelas. Dessa forma, não foi possível identificar se estas foram decorrentes a degeneração oocitária após o processo de MIV ou se houve algum problema no processamento desta amostra.

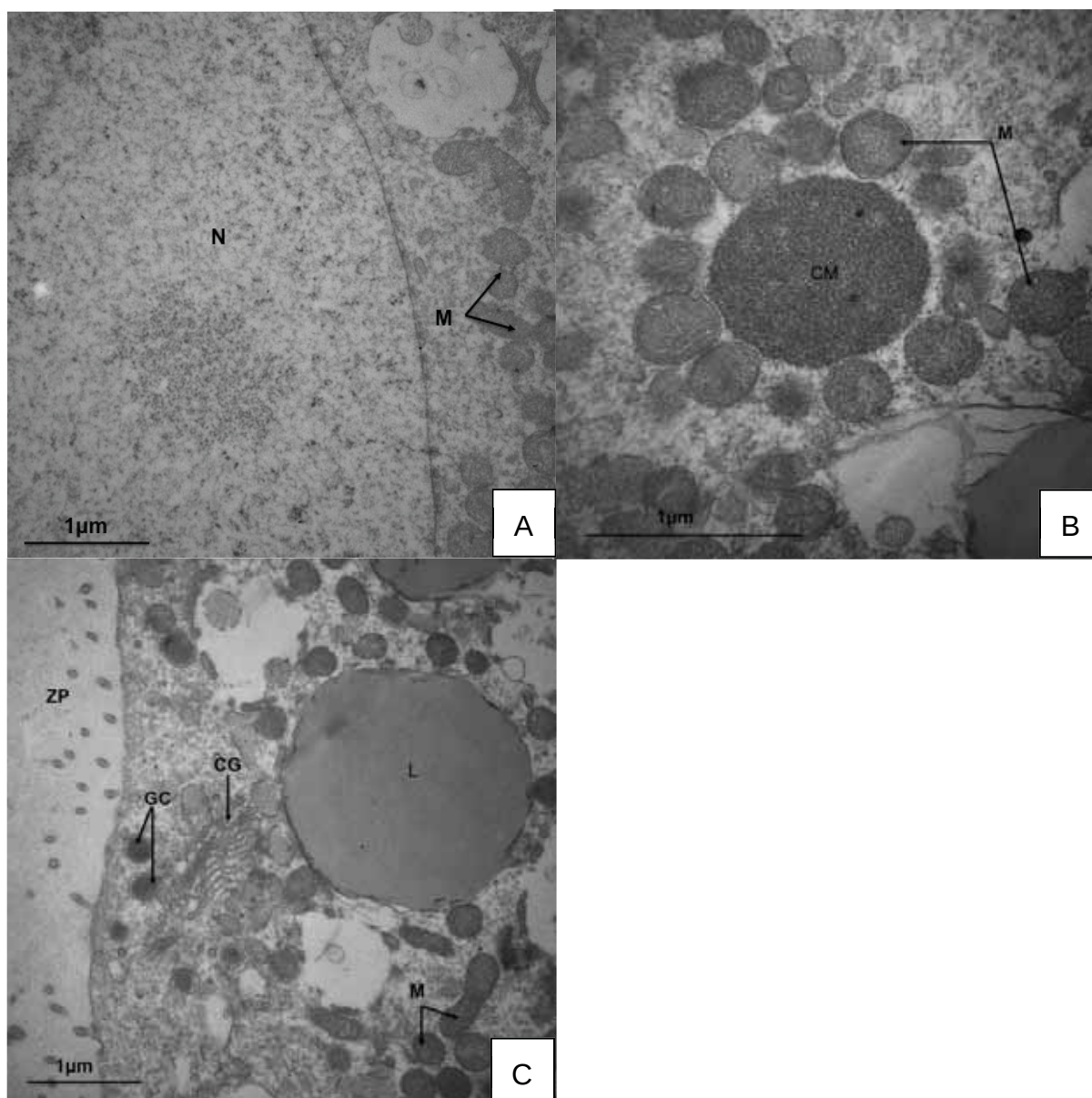


Figura 18. Eletromicrografia de COC's após 96 horas de maturação *in vitro* em meio III provenientes de cadelas em fase não folicular **(A)** Núcleo (N) arredondado periférico circundado por mitocôndrias (M) (aumento 40.000x). **(B)** *Cloud* mitocondrial (CM) (aumento 40.000x). **(C)** Presença de pequenos *clusters* mitocondriais (M), pequena quantidade de grânulos corticais na periferia do ooplasma. Presença de complexo de Golgi em região cortical próximo a gota lipídica (L) (aumento 2.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

- **COC após 96 horas de maturação *in vitro* no meio IV**

O COC proveniente da fase não folicular apresentou características degenerativas, das quais não pode-se afirmar se foram decorrentes ao processamento da amostra ou de um processo degenerativo após o processo de MIV. Dessa forma, este caracterizou-se pela ausência de comunicação entre as células do *cumulus* e o ooplasma e em algumas regiões destacamento da zona pelúcida do ooplasma. As mitocôndrias encontravam-se morfologicamente disformes e aglomeradas na periferia do COC. Não foi possível definir e delimitar as demais estruturas avaliadas (Figura 19A).

Já os COC's da fase folicular, pode-se constatar presença de grânulos corticais juntamente com inúmeros complexos de Golgi na periferia do oócito. As mitocôndrias apresentavam-se dispersas no ooplasma e em região mais central pôde-se observar a presença de retículo endoplasmático liso. As microvilosidades apresentava-se pouco desenvolvidas e foi contatado menor número de comunicações entre CC e o ooplasma (Figura 19B).

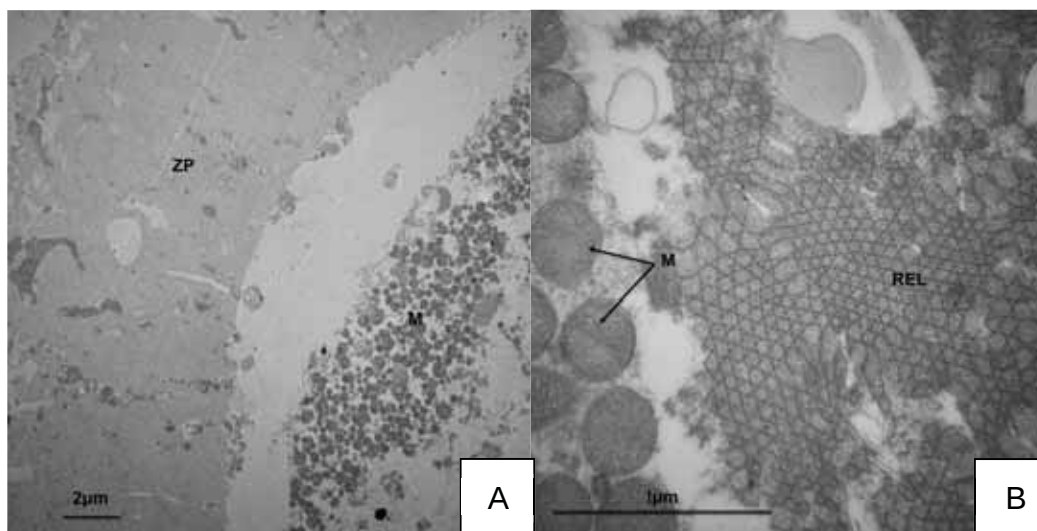


Figura 19. (A) Eletromicrografia de COC proveniente de cadela fase não folicular após 96 horas de maturação *in vitro* em meio IV. Destacamento do ooplasma da zona pelúcida (ZP). Mitocôndrias (M) concentradas na periferia do ooplasma. (aumento 5.000x). **(B)** COC proveniente de cadela em fase folicular após 96 horas de maturação *in vitro* em meio IV. Retículo endoplasmático liso (REL) em COC oriundos de cadelas em fase folicular (aumento 40.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

- **COC's após 96 horas de maturação *in vitro* no meio V**

Nas amostras obtidas em fase folicular pôde-se observar degeneração oocitária em uma das amostras. Nas demais pôde-se constatar núcleo periférico com pequenas ondulações e invaginações e presença de nucléolo denso e condensado. Inúmeras mitocôndrias apresentavam-se agrupadas ao redor deste, assim como aglomeradas em grandes *clusters* em outras regiões do ooplasma. Pôde-se observar a presença de inúmeras microvilosidades e comunicação moderada entre as células do *cumulus* e o ooplasma. Ainda pôde-se constatar a presença de grânulos corticais e complexos de Golgi na periferia do ooplasma (Figura 20).

Os COCs de cadelas em fase não folicular apresentaram núcleo com ondulação em região periférica e nucléolo parcialmente condensado e com presença e pequenas reticulações. Ainda, as mitocôndrias encontravam-se agrupadas ao redor deste e dispersas pelo ooplasma. Já os grânulos corticais encontravam-se alinhados na periferia assim como retículos endoplasmáticos liso. As microvilosidades apresentavam-se moderadamente desenvolvidas, assim como e a comunicação entre CC e o ooplasma (Figura 21). Uma única amostra apresentou sinais de degeneração, entretanto conforme mencionado anteriormente não se pode inferir se tais alterações foram decorrentes ao processo de degeneração ou ao processamento da amostra. Sendo assim, não foi possível definir, assim como localizar o núcleo e as organelas no ooplasma deste oócito.

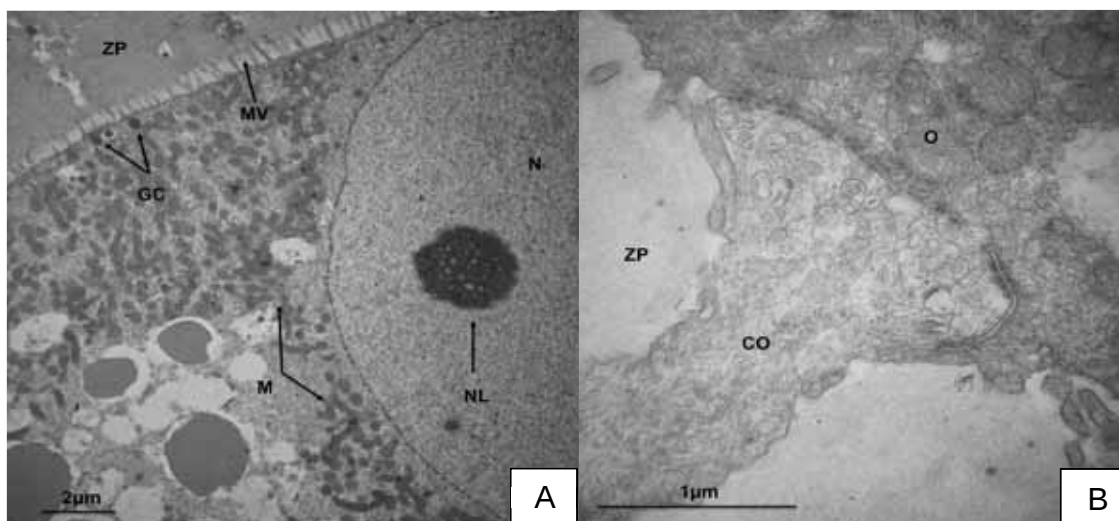


Figura 20. Eletromicrografia de COC proveniente de cadela em fase folicular após 96 horas de maturação *in vitro* em meio V. **(A)** Núcleo periférico (N) e nucléolo (NL), aglomerado de mitocôndrias (M) e microvilosidades bem desenvolvidas e grânulos corticais (GC) na periferia do ooplasma (GC) (aumento 8.000x). **(B)** Comunicação (CO) entre as células do *cumulus* e o ooplasma (O) (aumento 40.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

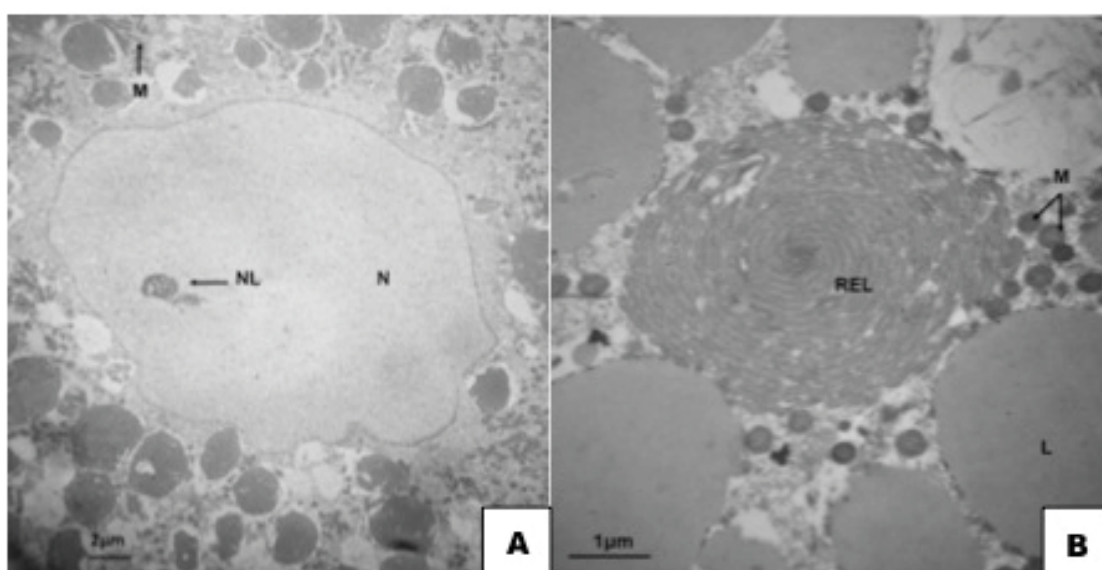


Figura 21. Eletromicrografia de COC proveniente de cadela em fase não folicular após 96 horas de maturação *in vitro* em meio V. **(A)** Núcleo periférico (N) e nucléolo parcialmente condensado em com reticulações (NL), e ao seu redor presença de aglomerados de mitocôndrias (M) (aumento 5.000x). **(B)** Retículo endoplasmático liso (REL) envolto por gotas lipídicas (L) (aumento 14.000x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Tabela 6. Características do núcleo de complexos *cumulus*-oócitos (COC) caninos provenientes de fêmeas em fase não folicular (FN) quanto a sua posição no ooplasma, formato, presença de invaginações no envelope nuclear e condensação da cromatina do nucléolo após avaliação por meio de microscopia eletrônica de transmissão realizada a 0 hora e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.

Tipo de avaliação	Posição	Formato	Invaginações	Nucléolo
0 hora (3)	Periférico	Arredondado	Presente	Denso e Condensado
Meio I (4)	-	-	-	-
Meio II (2)	-	-	-	-
Meio III (2)*	-	-	-	-
Meio IV (2)	-	-	-	-
Meio V (3)	Periférico	Arredondado	Presente	Parcialmente condensado

* Presença de 1 COC degenerado

Tabela 7. Características do núcleo de complexos *cumulus*-oócitos (COC) caninos provenientes de fêmeas em fase folicular (FF) quanto a sua posição no ooplasma, formato, presença de invaginações no envelope nuclear e condensação da cromatina do nucléolo após avaliação por meio de microscopia eletrônica de transmissão realizada a 0 hora e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.

	Posição	Formato	Invaginações	N
0 hora (3)	Periférico	Arredondado	Presente	Parcialmente condensado
Meio I (4)	Periférico	Arredondado	Presente	Denso e Condensado
Meio II (2)	-	-	-	-
Meio III (2)*	Periférico	Arredondado	Ausente	-
Meio IV (2)	-	-	-	-
Meio V (3)	Periférico	Arredondado	Presente	Denso e Condensado

*Presença de 1 COC degenerado

Tabela 8. Características da organização citoplasmática de *cumulus*-oócitos (COC) caninos provenientes de fêmeas em fase não folicular (FN) quanto a distribuição pelo ooplasma de mitocôndrias (Mit), grânulos corticais (GC), complexos de Golgi (CG), retículo endoplasmático liso (REL); intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*, desenvolvimento de microvilosidades e distribuição de gotas lipídicas após avaliação por meio de o microscopia eletrônica de transmissão realizada a 0 hora e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.

	Mit	GC	CG	CO	MV	REL	Lipídeos
0 hora (3)	Periférico e citoplasma	Periférico	Periférico	intensa	Bem desenvolvidas	-	Homogênea
Meio I (1)	Periférico	Periférico	Periférico	Moderada	Bem desenvolvidas	-	Homogênea
Meio II (1)	Periférico e citoplasma	Periférico e citoplasma	Periférico	Moderada	Pouco desenvolvidas	Periférico	Homogênea
Meio III (3)*	Periférico e "Clouds"	Periférico e Citoplasma	Periférico	Moderada	Bem desenvolvidas	Periférico	Homogênea
Meio IV (1)*	-	-	-	-	-	-	-
Meio V (4)*	Citoplasma e Núcleo	Periférico	Periférico	-	-	-	Homogênea

* Presença de 1 COC degenerado

Tabela 9. Características da organização citoplasmática de *cumulus*-oócitos (COC) caninos provenientes de fêmeas em fase folicular (FF) quanto a distribuição pelo ooplasma de mitocôndrias (Mit), grânulos corticais (GC), complexos de Golgi (CG), retículo endoplasmático liso (REL); intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*, desenvolvimento de microvilosidades e distribuição de gotas lipídicas após avaliação por meio de o microscopia eletrônica de transmissão realizada a 0 hora e após 96 horas de maturação *in vitro* nos meios I, II, III, IV e V. Jaboticabal, 2013.

	Mit	GC	CG	CO	MV	REL	Lipídeos
0 hora (3)	Periférico e Citoplasma	Periférico e Citoplasma	Periférico e Núcleo	intensa	Bem desenvolvidas	-	Homogênea
Meio I (1)	Periférico	Periférico	Núcleo e Periférico	Moderada	Bem desenvolvidas	Núcleo e periférico	Homogênea
Meio II (1)	Citoplasma	Periférico e Citoplasma	Periférico	Moderada	Bem desenvolvidas	Periférico	Homogênea
Meio III (3)*	Periférico e Citoplasma"	Periférico e Citoplasma	Periférico	Moderada	Bem desenvolvidas	Periférico	Homogênea
Meio IV (1)	Citoplasma	Periférico	Periférico	Moderada	Pouco desenvolvidas	Central	Homogênea
Meio V (3)*	Citoplasma e Núcleo	Periférico	Periférico	Moderada	Bem desenvolvidas	-	Homogênea

*Presença de 1 COC degenerado

Viari De Leseño et al. (2008b), descrevem que após o processo de MIV, a vesícula germinativa (VG) apresenta três padrões de maturidade citoplasmática e nuclear distintos: VG_1 , VG_2 , VG_3 . Em termos de maturidade oocitária, os oócitos em VG_1 e VG_2 apresentam padrões citoplasmáticos e nucleares menos avançados quando comparados a VG_p (antes do processo de maturação), o que sugere que VG_1 e VG_2 sejam derivados de oócitos em VG_c . Já oócitos em VG_3 QVG (quebra de vesícula germinativa) , metáfase I e II e degenerados sejam provenientes de oócitos VG_p .

Nos diferentes grupos avaliados não foi constatada a presença de oócitos em GVBD, MI e MII. Entretanto, nas amostras nas quais tivemos acesso a localização e

a conformação do núcleo e nucléolo, foi constatado a presença de oócitos em estádios mais avançados no processo de maturação nuclear (GV₃), assim como em processo degenerativo. Dessa forma acredita-se que, a ausência de oócitos em GVBD, MI e MII seja devida ao número reduzido de amostras e à ineficiência do processo de MIV.

Considerando os resultados obtidos em nosso estudo por meio de análises de oócitos caninos maturados *in vitro* nos meios I, II, III, IV e V por microscopia eletrônica de transmissão pôde-se constatar que em ambas as fases os oócitos apresentaram níveis variáveis de maturidade citoplasmática, entretanto na fase folicular foi constatado menor número de oócitos degenerados.

Dessa forma, os resultados obtidos pela análise por meio da MEV sobre o arranjo celular e intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* ratificam as observações encontradas por meio de MET para avaliação da maturação citoplasmática. Semelhantemente ao descrito por Pires-Buttler (2010), os oócitos provenientes da fase folicular, quando submetidos a suplementação hormonal, são mais sensíveis e responsivos ao efeito de hormônios no meio e quando privados destas substâncias entram em processo de degeneração ou evoluem para estádios menos avançados de desenvolvimento. Não obstante, a utilização do hCG e progesterona de forma associada ou seriada favoreceram a comunicação entre as células do *cumulus* durante o processo de MIV e a maturação citoplasmática, no entanto, não beneficiaram o oócito quanto a retomada da meiose e a maturação nuclear.

5 – CONCLUSÃO

Podemos concluir que as alterações hormonais observadas no ciclo estral da cadela não afetam a morfologia e ultraestrutura oocitária. Ainda, a suplementação do meio de MIV com hCG e P_4 de forma associada e seriada promovem efeitos positivos porém semelhantes, principalmente no que se refere a morfologia e a maturação citoplasmática oocitária.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABDEL-GHANI, M. A. et al. *In vitro* maturation of canine oocytes co-cultured with bovine and canine granulosa cell monolayers. **Theriogenology**, v. 77, p. 347-355, 2012.

ANDERSEN, A.C.. Reproductive system. B/Female. In: _ANDERSEN A.C., GOOD L.S. **The Beagle as an experimental dog**. 1 ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1970. p. 321-326.

ANDERSEN, A.C., SIMPSON, M.E. Reproduction in the beagle: the estrous cycle. In: _ ANDERSEN A.C., SIMPSON M.E. **The Ovary and Reproductive Cycle of the Dog (Beagle)**. 1 ed. Los Altos, CA: Geron-X, 1973. p. 4–14.

APPARICIO-FERREIRA, M. Efeito da suplementação de hCG, progesterone e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos de cadelas (*Canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingohisterectomia. 61f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2006.

APPARÍCIO, M. et al. Maturação *in vitro* de oócitos caninos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.1, p.16-25, 2011.

BAKER, T.G. Germs cells and fertilization. In: _AUSTIN C.R., SHORT R.V. **Reproduction in mammals**. 2 ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1982. p 17-45.

BEYERS, M.M., et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.1322, 1997.

* ABNT – NR 6023:2002

BOGLIOLO, L. et al. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells in *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.42, n.3, p.265-273, 2002.

BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K.D.; DURRANT, B.S. *In vitro* maturation of the bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential, **Theriogenology**, v.58, n.1, p.1689-1703, 2002.

CHEBROUT, M., et al. Nuclear and cytoplasmic maturation of canine oocytes related to *in vitro* denudation. *Reproduction Domestic Animal*, v.44, suppl. 2, p.243-246, 2009.

CINONE, M., et al. Collection and maturation of oocytes in the bitch. In: International Congress Animal Reproduction 12., 1992, The Hague. Proceedings. The Hague, 1992, v.4, p.1767-1769.

CONCANNON, P.W.; DIGREGORIO, G.B. Canine vaginal cytology. In: BURKE, T.J. **Small Animal Reproduction and Infertility**. 1 ed. Philadelphia, USA: Lea Febiger, 1986. p.96-111.

CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, n.39, p.3-25, 1989.

DEBEY, P., et al. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. **Molecular Reproduction and Development**, v.36, p.59-74, 1993.

DE LOS REYES, M. et. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods in *in vitro* maturation of canine. **Theriogenology**, v.64, p.1-11, 2005.

DEW, E.V. **In vitro maturation of the canine oocyte**. 56f. Tese (Mestrado) – University of Georgia, Athens, GA, 2001.

DOLEZEL, R., et al. Follicular population and oestrogen receptor alpha in ovary of the bitch. **Acta Veterinary BRNO**, n.73, p.37-43, 2004.

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

DURENZI, K.L., et al. The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocytes. **Fertility and Sterility**, v.63, p.404-406, 1995.

DURRANT, B.S. et al. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.917-932, 1998.

EBNER, T. et al. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? **Reproductive Biomedicine Online**, v.12, 507-512, 2006.

EPPIG, J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reproduction and Fertility and Development**, v.8, p.485-489, 1996.

FARSTAD, W. et al. Periovarian endocrinology and oocyte maturation unmated, mature blue fox vixens (*Alopex lagopus*). **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.30, p.313-319, 1989.

FARSTAD, W. Assisted reproductive biotechnology in canine and feline reproduction. **Theriogenology**, v.52, p.175-186, 2000.

FELDMAN, E.; NELSON, R. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: _ FELDMAN, E.; NELSON, R. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004. p.752-776.

FUJI, M., et al. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, p.305-307, 2000.

GANDOLFI, F. et al. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for animal reproductive efficiency. **Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.**, v.24, p.413-423, 2005.

GILCHRIST, R.B., et al. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte somatic cell associations. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1234-1243, 1995.

GILCHRIST, R. B; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.

GOODROWE, K.L. et al. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.389-403, 2000.

HAENISCH-WOEHL, A. et al. Morphology of canine cumulus-oocyte complexes in pre-puberal bitches. **Anatomy, Histology and Embriology**, v.32, p.373-377, 2003.

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 Supplement**, 51:83-91, 1997.

HEWITT, D. A. et al. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.1083-1128, 1998.

HEWITT, D.A., ENGLAND, G.C.W. Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. **Veterinary Records**, v.144, n.9, p.237- 239, 1999.

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

HYTTEL, P., et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCE. IUCN Red list of Threatened Species, 2011/ 2012. <http://www.redlist.org>.

JEFFCOATE, I. Physiology and endocrinology of the bitch. In: SIMPSON G.M. ENGLAND G.C.W. HARVEY M. **BSVA Manual of small animal reproduction and neonatology**. Cheltenham, UK: British Small Animal Veterinary Association. 1998. p.1-9.

JOHNSTON, D.S. et al. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia, PA: Saunders. 2001. p.337-355.

KIM, M.K., et al. Effects of estradiol-17 β and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1342-1353. 2005.

LEE, H. S., et al. Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.336-347, 2008.

LOPEZ, et al. Ultrastructural characterization of canine diestrous grade-I cumulus-oocyte complexes. In: **Proceedings of the 5th Biannual Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR)**. 2006. p. 306.

LUVONI, G.C. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. **Reproduction Nutrition Development**, v. 40, p. 505-512, 2000.

LUVONI, G.C., et al. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, n. 63, p. 41- 59, 2005.

LUVONI, G.C., et al. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. **Reproduction Domestic Animal**, v. 41, p.286-290, 2006.

MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. Maturation and sperm penetration canine ovarian oocytes in vitro. **Journal of Experimental Zoology**, v.196, n.2, p.189-196, 1976.

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

Paulista, 2005.

MARTINS, L.R. **Influência da sazonalidade e da condição ovariana sobre a produção embrionária *in vitro* de gato doméstico (*Felis catus*, Linnaeus 1758).** 107f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2008.

MATZUK, M.M; et al. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, p.2178-2180, 2002.

MOTLIK J. Cytoplasmatic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, n.25, p.3817-3825, 1989.

NICKSON, D.A. et al. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, n.47, p.231-240, 1993.

OTOI, T. et al. Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, v.11, n. 2, p. 387-390, 1999.

OTOI, T. et al. Canine oocytes diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v. 54, p. 535- 542, 2000.

PIRES-BUTTLER, E. A. **Efeito do estágio do ciclo estral e adição de hormônios ao meio de cultivo in vitro sobre a morfologia do complexo cumulus-oócito canino.** 2010. 201f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2010.

REYNAUD, K. et al. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, v.130, p.193-201, 2005.

REYNAUD, K. et al. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. **Theriogenology**, v.72, p.1120-1131, 2009.

RIBEIRO, A.P.C. **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**. 129f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2007.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Meiotic response of *in vitro* mature canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 58-62, 2003.

RODRIGUES, B.A. et al. Cumulus cells features and nuclear chromatin configuration of in vitro matured canine COCs and the influence of the in vitro serum progesterone concentrations of ovary donors. **Zygote**, v.17, p.79-91, 2009.

RODRIGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, n.10, p.55-67, 2004.

ROTA, A. et al. Estradiol 17- β , progesterone and testosterone plasma concentrations during estrus in the bitch. **Veterinary Research Communications**, v.31, supl.1, p.197-199, 2007.

SALUSTRI, A. et al. Oocyte granulosa cell interactions. In: _ADASHI, E.Y.; LEUNG, P.C. **The ovary**. New York: Raven Press, 1993. 687p.

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

SONGSASEN, N.; YU, I.; LEIBO, S.P. Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. **Molecular Reproduction Device**, v. 62, p. 407-415, 2002.

SONGSASEN, N.; WILDT, D.E. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 1-2, p. 2-22, 2007.

SOUZA, L.C et al. Associação homem-animal: reflexos na economia. **Revista Educação Continuada**, v.4, p. 62-65, 2001.

SRSEN, V. et al. Effects of follicle stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes in vitro. **Zygote**, v. 6, p. 299-309, 1998.

STOJKOVIC et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n.3, p. 904-909, 2001.

TAN, J.H., et al. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.1, p.1-9, 2009.

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

TESORIERO, J.V. A morphologic, cytochemical, and chromatographic analysis of lipid yolk formation in the oocytes of the dog. *Gamete Research*. n.6, p.267-279, 1982.

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

TRUMPAN, M. **Experimentelle untersuchungen zur in vitro maturation von kumulus- oozyten-komplexen von *sus scrofa* f.d. in modifizierten Whitten's medium**. 155f., Tese. Tierärztlichen Hochschule Hannover, Germany, 2001.

TSUTSUI, T. Studies on the reproduction in the dog on cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v.21, p.70-75, 1975.

TSUTSUI, T. et al. An experimental trial on embryo transfer in the dog. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.51, p.797-800, 1989.

VAN HAAFTEN, B., et al. Increasing sensitivity of the pituitary to GNRH from early to late anoestrous in the beagle bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p. 221- 225, 1994.

VIARIS DE LESEGNO. C.V., et al. Ultrastructure of canine oocytes during in vivo maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.115-125, 2008a.

VIARIS DE LESEGNO. C.V., et al. Ultrastructural evaluation of in vitro-matured canine oocytes. **Reproduction, fertility and Development**, v.20, p.626-639, 2008b.

VOZZI, C. et al. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p. 619 -628, 2001.

WARRIACH, H.M.; CHOCHAN, K.R. Thickness of cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.3, p. 247 -251, 2004.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: _ KNOBIL, E., NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York, NY: Raven Press 1994. p.79-122.

WILLINGHAN-ROCKY, L.A. et al. Effects of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.501-508, 2003.

Yabiku, R. M. Animais de estimação: lucros estimados. Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br>> Acessado em: jan 2013.

YAMADA, S., et al. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p.227-229.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Classificação do complexo *cumulus* -oócitos (COC) segundo Hewitt e England (1998).

COC grau I: complexo cumulus/oócito com ooplasma homogêneo, escuro e rodeado completamente por uma ou mais camadas de células do *cumulus*.

COC grau II: ooplasma levemente pigmentado com presença de camadas de células do *cumulus* incompletas.

COC grau III: ooplasma pálido e ausência de células do *cumulus*.

Apêndice 2: Meio Base (MB) –Meio de maturação *in vitro* base

Meio de maturação	5mL
Solução TCM-199*	5 mL
BSA	0,015g
Piruvato	10 μ L
Amicacina	25 μ L

* Sigma –Aldrich M4530

A solução final deve ser filtrada em filtro estéril de 0,22 μ m e estabilizada em estufa de CO₂ durante 1 hora.