

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CISTEÍNA E CISTEAMINA  
SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITOS DE FÊMEAS  
CANINAS (*Canis familiaris*) OBTIDOS POR  
OVARIOSALPINGO-HISTERECTOMIA DURANTE A FASE  
PRÉ-OVULATÓRIA DO ESTRO**

**Eliandra Antônia Pires  
Médica Veterinária**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
JULHO DE 2006**

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CISTEÍNA E CISTEAMINA  
SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITOS DE FÊMEAS  
CANINAS (*Canis familiaris*) OBTIDOS POR  
OVARIOSALPINGO-HISTERECTOMIA DURANTE A FASE  
PRÉ-OVULATÓRIA DO ESTRO**

**Eliandra Antônia Pires  
Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Campus* de  
Jaboticabal, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Cirurgia  
Veterinária.**

**Jaboticabal - SP  
Julho – 2006**

Pires, Eliandra Antônia  
P667e Efeito da suplementação de cisteína e cisteamina sobre a  
maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*Canis familiaris*)  
obtidos por ovariosalpingo-histerectomia durante a fase pré-ovulatória  
do estro / Eliandra Antônia Pires. -- Jaboticabal, 2006  
vi, 53 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006  
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente  
Banca examinadora: Maria Denise Lopes, Camila Infantsi  
Vannucchi  
Bibliografia

1. Cisteína. 2. Cisteamina. 3. Maturação *in vitro*. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.622:636.7

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

Dedico aos meus pais Maria José e Olivardo,  
por todo carinho, amor e compreensão.

Vocês são à base da minha vida!

## **AGRADECIMENTOS**

Aprendi que na vida, o importante é saber agradecer a todo gesto de carinho, pois não somos e nem fazemos nada sozinho. Por isso, deixo registrado, o meu sincero agradecimento a todos que não somente durante este trabalho, mas em toda minha vida estiveram presentes.

Agradeço primeiramente a Deus, por minha vida, minha família e amigos e pela minha vocação de médica veterinária.

Aos meus pais Maria José e Olivardo, com quem aprendi a respeitar e amar os animais. Vocês são o meu maior exemplo de vida, luta e dedicação. É através de vocês que retorno as minhas raízes e ganho forças para continuar o meu caminho. Amo muito vocês!

Aos meus sogros Maria Amália e Félix, por terem me dado à oportunidade de conhecer o grande amor da minha vida. Muito obrigada por tudo.

Ao Alexandre, grande amor da minha vida. Agradeço seu amor, amizade, cumplicidade, carinho e principalmente por todo incentivo, mesmo quando estava prestes a desistir. Muito obrigada por sua presença marcante em minha vida. Te amo muito!

A minha irmã Elisângela e ao meu cunhado Fábio, por toda amizade e carinho e em especial, por terem dado a minha maior riqueza, a Maria Luísa (Maluzinha). Muito obrigada.

Ao meu orientador e amigo Wilter Ricardo Russiano Vicente, por todo gesto de carinho desde o início da minha caminhada na Unesp, quando ainda era estagiária. Agradeço pela confiança em mim e em meu trabalho.

A amiga Aline Costa de Lúcio (Dirce), pessoa marcante em minha vida, com quem desde o primeiro dia pressenti que seríamos mais que amigas. Agradeço a sua amizade, ajuda e carinho, e pelos ótimos momentos de convivência que passamos juntas. Muito obrigada por tudo minha querida irmã!

A amiga Ana Paula Coelho Ribeiro (Aninha), o maior exemplo de serenidade e amizade. Com você aprendi durante a residência ser médica veterinária e no mestrado ser pesquisadora. Aninha muito obrigada pelos ótimos momentos que compartilhamos durante a realização do nosso trabalho, mesmo quando nos deparávamos com as dificuldades. Você com certeza tornou o meu trabalho bem mais leve e simples, apesar de ser tão complexo e até então desconhecido. Aninha você faz e fará muita falta. Com certeza a sala de cultivo não será a mesma sem você ao meu lado, minha grande companheira.

A amiga Maricy Apparício (Má), a grande maluquinha que deu o pontapé inicial nesta árdua jornada da biotecnologia. Pessoa por quem tenho grande admiração e respeito. Muito obrigada pela grande amizade minha querida R2.

A todos os amigos da obstetrícia, pessoas que fazem deste setor um verdadeiro lar, onde passamos momentos muito felizes e de descontração. Muito obrigada a todos, por toda ajuda não somente durante a realização do meu trabalho, mas durante todos estes anos de convivência. Ana Paula Coelho Ribeiro (Aninha), Maricy Apparício (Má), Aracelle E. Alves (Ara), Carla R. F. Gadelha (Carlinha), Diogo José Cardilli (Zé),

Giuliano Q. Mostachio (Giu), Gabriela J. Covizzi (Gaby), Danilo G. Martins (Puff), Guilherme Nascimento (Gui), Tathiana F. Motheo (Tathy), Michele G. Medeiros (Mi), Fabiana A. Voorwald (Fabi), Izilda (Dona Izildinha) e Anésia. Amo vocês!

À professora Camila Infantsi Vannucchi da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da USP por toda sua atenção disponibilizando o seu tempo para sanar as minhas dúvidas. Muito obrigada!

Aos professores Vera F. M. H. Lima e Francisco Guilherme Leite por terem participado da minha qualificação contribuindo para a finalização deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do laboratório de reprodução animal, em especial a funcionária Isabel A. P. Natarelli (Bel), por sua pronta disponibilidade em ajudar sempre, e as amigas Mabel, Juliana, Giovana, Eliana, Naiara, Kellen, Tatiana, Ana Paula e Max.

A Capes pela concessão da bolsa.

A todos os proprietários que compreendendo a importância do nosso trabalho, carinhosamente abriram as portas de suas casas para nos ajudar. Mas agradeço principalmente a todas as cadelinhas (Nupita, Paloma, Rajada, Laika, Wendy, Piniquinha, Susi, Meg, Doli, Judy, Pandora, Lessie, Vida, Vidinha e Miúxa), a quem dedico todo o meu trabalho, pois sem vocês certamente nada disso seria possível. Muito obrigada!

## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | ii     |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | iii    |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....   | iv     |
| <b>RESUMO</b> .....  | v      |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | vi     |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 1      |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 4      |
| 2.1. Aspectos da fisiologia reprodutiva da cadela ( <i>Canis familiaris</i> )..... | 4      |
| 2.2. Maturação oocitária <i>in vivo</i> .....                                      | 5      |
| 2.3. Obtenção de oócitos caninos.....  | 6      |
| 2.4. Aspectos da maturação oocitária canina <i>in vitro</i> .....                  | 6      |
| 2.5. Estresse oxidativo e bioquímica da glutathiona.....                           | 10     |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 14     |
| 3.1. Animais.....  | 14     |
| 3.2. Determinação da fase pré-ovulatória do estro.....                             | 14     |
| 3.2.1. Histórico reprodutivo.....  | 14     |
| 3.2.2. Acompanhamento citológico.....  | 14     |
| 3.2.3. Dosagem sérica de progesterona.....   | 15     |
| 3.3. Obtenção e classificação dos oócitos.....                                     | 17     |
| 3.4. Maturação <i>in vitro</i> .....   | 19     |
| 3.5. Avaliação do estágio de maturação nuclear.....                                | 19     |
| 3.6. Análise estatística.....  | 22     |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....   | 23     |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....  | 27     |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....  | 33     |
| <b>7. REFERÊNCIAS</b> .....  | 34     |
| <b>APÊNDICES</b> .....   | 48     |

## LISTA DE TABELAS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Tabela 1:</b> Correlação entre a dosagem sérica de progesterona e o momento da ovulação.....  | 16     |
| <b>Tabela 2:</b> Resultados das dosagens séricas de progesterona dos animais incluídos no experimento .....  | 16     |
| <b>Tabela 3:</b> Dados da frequência absoluta e relativa de COCs recuperados de sete fêmeas em fase pré-ovulatória do estro .....  | 23     |
| <b>Tabela 4:</b> Números absoluto e relativo (%) de oócitos caninos perdidos durante a maturação nuclear .....   | 23     |
| <b>Tabela 5:</b> Dados absolutos e relativos (%) dos COCs grau I avaliados, após 72 horas de cultivo, de cadelas em fase pré-ovulatória imediata, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI), metáfase II (MII), retomada da meiose (QVG-MII) e degenerados em cada meio de maturação, sendo controle (A), cisteína (B), cisteamina (C) e associação de cisteína com cisteamina (D)..... | 24     |
| <b>Tabela 6:</b> Verificação da influência dos meios de cultivo sobre os estágios de maturação (Teste de Wilcoxon) .....   | 26     |

## LISTA DE FIGURAS

|                  |  | Página |
|------------------|--|--------|
| <b>Figura 1:</b> | Fotomicrografia de células do epitélio vaginal, demonstrando evolução da fase folicular onde A: Proestro inicial; B: Proestro intermediário e C: Estro.....  | 15     |
| <b>Figura 2:</b> | Realização do método de “slicing” para obtenção dos COCs para maturação <i>in vitro</i> .....  | 17     |
| <b>Figura 3:</b> | Seleção dos oócitos através da lupa estereomicroscópica .....  | 18     |
| <b>Figura 4:</b> | Fotomicrografia de COCs grau I (letra A), grau II (letra B) e grau III (letra C).....  | 18     |
| <b>Figura 5:</b> | Passagem dos COCs selecionados para o meio de lavagem .....  | 18     |
| <b>Figura 6:</b> | Placa NUNC contendo gotas do meio de maturação, onde os oócitos ficavam incubados por período de 72 horas .....  | 19     |
| <b>Figura 7:</b> | Fotomicrografia de oócitos caninos corados pela técnica de fluorescência (Hoechst 33342) onde: Vesícula germinativa (A), Quebra de vesícula germinativa (B), Metáfase I (C), Metáfase II (D) e Degenerado (E)..... | 21     |

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

|                 |  |
|-----------------|--|
| AI              | Anáfase I  |
| BSA             | “Bovine serum albumine” (Albumina sérica bovina) |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                               |
| COC             | Complexo oócito- <i>cumulus</i>                  |
| FIV             | Fertilização <i>in vitro</i>                     |
| GSH             | Glutathiona                                      |
| H               | Horas  |
| µg              | Micrograma                                       |
| mg              | Miligrama  |
| µL              | Microlitro                                       |
| µm              | Micrômetro                                       |
| µM              | Micromol   |
| mM              | Milimol  |
| MI              | Metáfase I                                       |
| MII             | Metáfase II                                      |
| MIV             | Maturação <i>in vitro</i>                        |
| O <sub>2</sub>  | Oxigênio   |
| OSH             | Ovariosalpingo-histerectomia                     |
| P <sub>4</sub>  | Progesterona                                     |
| PBS             | “Phosphate buffered saline”                      |
| PI              | Prófase I  |
| PIV             | Produção <i>in vitro</i>                         |
| QVB             | Quebra de Vesícula Germinativa                   |
| SFB             | Soro Fetal Bovino                                |
| TCM 199         | “Tissue Culture Médium 199”                      |
| TE              | Transferência de Embriões                        |
| VG              | Vesícula Germinativa                             |

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CISTEÍNA E CISTEAMINA SOBRE A  
MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITOS DE FÊMEAS CANINAS (*Canis familiaris*)  
OBTIDOS POR OVARIOSALPINGO-HISTERECTOMIA DURANTE A FASE PRÉ-  
OVULATÓRIA DO ESTRO**

**RESUMO** – O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da suplementação de cisteína e cisteamina no desenvolvimento meiótico de oócitos caninos durante o processo de maturação *in vitro*. Os oócitos foram coletados de sete cadelas híginas em fase pré-ovulatória imediata, submetidas à ovario-histerectomia. Os COC's selecionados foram cultivados por um período de 72 horas em quatro meios diferentes: A (controle) - TCM199 suplementado com BSA (3 mg/mL) + FSH (5 µg/mL) + LH (10 µg/mL) + progesterona (2 µg/mL) + estradiol (2 µg/mL); B – controle + 0,1mM de cisteína; C – controle + 100µM de cisteamina; D – controle + 0,1mM de cisteína + 100µM de cisteamina. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), ou seja, a suplementação de compostos antioxidantes no meio de maturação não favoreceu a competência meiótica. Além disso, neste estudo pode-se inferir que para cada fase do ciclo estral, talvez seja necessário um período de maturação diferenciado.

**Palavras-Chave:** cisteína, cisteamina, maturação *in vitro*, oócito canino

**EFFECT OF SUPPLEMENTATION OF CYSTEINE AND CYSTEAMINE ON THE NUCLEAR MATURATION OF CANINE FEMALES (*Canis familiaris*) OOCYTES OBTAINED BY OVARIHISTERECTOMY DURING ESTRUS PREEVULATORY STAGE.**

**ABSTRACT** - The aim of this research was to evaluate the effects of the cysteine and cysteamine supplementation on meiotic development of canine oocytes during the process of *in vitro* maturation. The oocytes were collected after ovariohysterectomy from seven healthy bitches in immediate preovulatory stage. The selected COC's were cultured by a period of 72 hours in four different media: A (control) - TCM199 supplemented with BSA (3 mg/mL) + FSH (5 µg/mL) + LH (10 µg/mL) + progesterone (2 µg/mL) + estradiol (2 µg/mL); B - control + 0,1mM of cysteine; C - control + 100µM of cysteamine; D - control + 0,1mM of cysteine + 100µM of cysteamine. The present study demonstrated that there was not significant difference among the treatments ( $p < 0,05$ ), in other words, the supplementation of antioxidant in the medium of maturation didn't favor the meiotic competence. Besides, in this study it can be inferred that for each stage of the oestrus cycle, perhaps it is necessary a different maturation period.

**Keywords:** cysteine, cysteamine, *in vitro* maturation, canine oocyte

## 1. INTRODUÇÃO

As biotécnicas da reprodução, tais como a inseminação artificial (IA), maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), produção de embriões *in vitro* (PIV), transferência de embriões (TE) e criopreservação de gametas são essenciais para o melhoramento reprodutivo e preservação da biodiversidade (GOBELLO, 2004).

Entretanto, durante muito tempo, as pesquisas nesta área restringiram-se aos animais de produção, espécies comercialmente importantes. Assim, o primeiro estudo de reprodução assistida em cães foi realizado apenas em 1976 por MAHI e YANAGIMACHI, os quais deram início aos questionamentos sobre maturação oocitária canina e outros eventos envolvidos com a reprodução canina. Todavia, foi a partir da década de 90, com o início do interesse da comunidade científica pela conservação da biodiversidade, que ocorreu um grande desenvolvimento nesta área (LUVONI, 2000). O crescimento desordenado da população e a conseqüente destruição do meio ambiente contribuíram de maneira significativa para o aumento de espécies ameaçadas de extinção, como é o caso do cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), pertencentes à fauna silvestre brasileira. Com isto, as técnicas de reprodução assistida como a maturação e a fecundação *in vitro* tornaram-se alvo de pesquisas, com o intuito de maximizar o potencial de preservação do genoma dos canídeos ameaçados de extinção. Para isto, tem-se utilizado o cão doméstico como modelo experimental no desenvolvimento destas técnicas, devido à similaridade da sua fisiologia reprodutiva e suas respostas a experimentos *in vitro* (DURRANT et al., 1998).

No entanto, deve-se ressaltar que, em canídeos a maturação *in vitro* tem alcançado índices limitados, com valores que giram em torno de 0 a 58% (FARSTAD, 2000b), enquanto que, em bovinos, cerca de 90% dos oócitos completam a maturação. Estes valores refletem o pouco conhecimento sobre os padrões endócrinos e os mecanismos de controle do ciclo estral nesta espécie, dificultando a adaptação das

técnicas de reprodução assistida empregadas com sucesso em outros mamíferos (VANNUCCHI, 2003).

A baixa competência meiótica dos oócitos caninos quando submetidos a condições artificiais de cultivo é considerada como o grande entrave para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas nesta espécie, como a fecundação *in vitro*, produção embrionária *in vitro* e criopreservação (FARSTAD, 2000a). Em consequência disto, tem sido levantada a importância do desenvolvimento de um meio de cultivo específico para canídeos, de tal forma que consiga preservar a viabilidade e a morfologia oocitária indispensáveis para aquisição da competência meiótica (LUVONI et al., 2005). Assim, as atuais pesquisas na área de reprodução assistida em canídeos estão concentrando seus esforços nos protocolos de maturação *in vitro* testando proteínas, hormônios, fatores de crescimento e antioxidantes.

O uso de compostos antioxidantes no meio de cultivo deve-se ao fato de que uma das principais preocupações durante o processo de maturação e fecundação *in vitro* são os danos causados pelos radicais livres (ROS) produzidos, normalmente, no metabolismo oxidativo (DEW, 2001). Pois, embora a maioria das células, apresente um eficiente sistema de defesa contra radicais livres, representado pela glutatona (GASPARRINI et al, 2005; LUBERDA, 2005); a manipulação do oócito durante o processo de maturação *in vitro*, retirando-o do ambiente intra-folicular, ou seja, do seu equilíbrio interno, e o expondo inevitavelmente a altas tensões de oxigênio, além de, no caso de oócitos caninos, a um meio quimicamente não definido, pode levar a um elevado estresse oxidativo, o qual provocará a mobilização de grande quantidade de glutatona, promovendo o acentuado declínio dos seus níveis. Como consequência, teremos redução da competência meiótica, devido à elevação dos índices de degeneração e morte celular provocada pelos radicais livres, presentes no meio de maturação.

Portanto, em virtude do importante papel da glutatona na proteção celular contra o estresse oxidativo, tem sido proposto à suplementação de compostos que atuem como substrato ou precursores da glutatona como a cisteína, cisteamina e o  $\beta$ -

mercaptoetanol, os quais estão sendo amplamente utilizados e, com êxito, em diferentes espécies como bovinos (DE MATOS et al., 1996), ovinos (DE MATOS et al., 2002), búfalos (GASPARRINI et al., 2005) e caprinos (RODRIGUES E GONZÁLES et al., 2003). Porém, em canídeos o uso destes compostos ainda é muito recente e os resultados não são satisfatórios.

Com base nas informações relatadas acima, o objetivo do nosso estudo foi analisar comparativamente a competência dos oócitos caninos maturados *in vitro* em meio suplementado com cisteína e cisteamina isoladas ou associadas e o meio controle (sem suplementação).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos da fisiologia reprodutiva da cadela (*Canis familiaris*)

Os canídeos são conhecidos por sua fisiologia reprodutiva peculiar. Estes animais são considerados monoéstricos, predominantemente não estacionais, apresentando um ou dois ciclos reprodutivos por ano com intervalos que podem atingir 11 meses (FARSTAD, 2000a; JOHNSTON et al., 2001).

O ciclo estral da cadela possui quatro fases: proestro, estro, diestro e o anestro. O proestro que pode persistir por uma a três semanas, está associado com a secreção do FSH (Hormônio Folículo Estimulante) que promove o crescimento folicular e aumento dos níveis de estrógeno produzido pelas células da granulosa (CONCANNON, 1986). A concentração do estradiol atinge o pico máximo (50 a 100 pg/mL) 24 a 48 horas antes do término do proestro (FELDMAN e NELSON, et al., 1996). Segundo Shille (1992) esta onda tem duração de um a dois dias e precede o pico sérico de LH pelo mesmo intervalo, retornando progressivamente aos valores basais (15 pg/mL) durante os próximos cinco a 20 dias.

Assim, a progressão do proestro para o estro é marcada por uma inversão na concentração hormonal, havendo um crescente aumento nos níveis de progesterona e decréscimo nas concentrações de estrógeno, promovendo um fenômeno característico desta espécie, denominado luteinização pré-ovulatória (CONCANNON et al., 1989; REYNAUD et al., 2005).

A ovulação, que é espontânea na cadela, ocorre 24 a 72 horas após a onda de LH, no início do estro (OLSON e NETT, 1986; TSUTSUI et al., 1989; FELDMAN e NELSON, et al., 1996). Após o estro, o animal entrará em uma fase, onde a concentração de progesterona apresenta níveis semelhantes entre animais gestantes ou não (JEFFCOATE, 1998). E ao final do ciclo reprodutivo, o animal passará por um longo período de quiescência ovariana, denominado anestro (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003).

## 2.2. Maturação oocitária *in vivo*

A maturação *in vivo* é o processo pelo qual o oócito adquire capacidade para ser fecundado, após complexa interação entre células somáticas e germinativas; caso ocorram falhas neste processo poderão surgir anormalidades na fecundação e no desenvolvimento embrionário (MATTIOLI, 1989). BAKER (1987) afirmou que a divisão celular, tanto mitótica quanto meiótica compreende quatro fases distintas: prófase, metáfase, anáfase e telófase. A maturação é iniciada na vida pré-antral, e, na maioria dos mamíferos, o processo sofre dois momentos de estagnação, na prófase I e metáfase II.

Os canídeos, devido algumas particularidades referentes ao ciclo estral, sofrem um processo de maturação diferenciado (OTOI et al., 2000). Enquanto que em outras espécies de mamíferos o oócito em fase de vesícula germinativa (prófase I) sofre reinício da meiose nas etapas finais da maturação folicular, sendo ovulado em metáfase II (já com a extrusão do primeiro corpúsculo polar), em canídeos os oócitos são liberados em estágio imaturo, no início da primeira divisão meiótica, ainda em fase de vesícula germinativa. Desta forma, os estágios subseqüentes da maturação meiótica, como quebra da vesícula germinativa, metáfase I, anáfase I, telófase I e completa meiose com extrusão do primeiro corpúsculo polar na metáfase II, assim como a fecundação, ocorrem no oviduto (HOLST e PHEMISTER, 1971; TSUTSUI, 1975; FARSTAD et al., 1989). Este fato justifica a importância do ambiente oviductal para a maturação oocitária canina, pois contrariamente ao que se observa em outras espécies, em canídeos o oviduto é responsável por sustentar durante um extenso período, a sobrevivência dos oócitos liberados ainda imaturos até completarem o seu desenvolvimento, serem fecundados e atingirem o estágio de blastocisto (LUVONI et al., 2005).

### **2.3. Obtenção de oócitos**

Em canídeos, os folículos ficam localizados na região cortical do tecido ovariano, tornando-se aparentes poucos dias antes do momento da ovulação. Isto dificulta o uso da técnica de aspiração folicular, método rotineiramente aplicado em outras espécies (HEWITT et al., 1998c; OTOI et al., 2000). Assim, a técnica empregada para a obtenção de oócitos caninos é o “slicing” ou fatiamento, que permite a liberação de maior número de oócitos quando comparada à aspiração folicular (NICKSON et al., 1993). Outra técnica que tem sido utilizada é o método de digestão ovariana, a qual vem sendo estudada com o intuito de aumentar a recuperação de folículos ovarianos *postmortem* (DURRANT et al., 1998). Por este método os ovários são colocados em solução enzimática, geralmente composta por colagenase e Dnase, por uma hora a 37°C. Embora ocasione danos às células da granulosa, o número de oócitos degenerados é reduzido (DURRANT et al., 1998; BOLAMBA et al., 2002).

### **2.4. Aspectos da maturação oocitária canina *in vitro***

A maturação oocitária canina *in vitro* tornou-se alvo de muitos estudos, principalmente nas últimas décadas, pois o sucesso no emprego desta técnica significa grande avanço científico no que tange a preservação de material genético das espécies ameaçadas de extinção (GOODROWE et al., 2000).

Embora oócitos caninos possam retomar espontaneamente a meiose *in vitro*, quando submetido a adaptações das técnicas utilizadas para bovinos e suínos (FARSTAD, 2000a), os índices de maturação são ainda muito baixos, variando de 0 a 58% para oócitos maturados até anáfase I e metáfase II (MAHI e YANAMACHI, 1976; YAMADA et al., 1993; NICKSON et al., 1993; HEWITT e ENGLAND, 1998a; METCALFE, 1999; LUVONI, 2000; VANNUCCHI, 2003; MARTINS, 2005; APPARÍCIO-FERREIRA, 2006). Segundo FARSTAD (2000b), estes índices podem ser atribuídos à baixa competência oocitária e as condições subótimas de cultivo.

Dessa forma, estudos estão sendo desenvolvidos tanto com o intuito de determinar o meio de cultivo específico para o oócito canino quanto definir parâmetros indicativos da competência meiótica (KIM et al. 2004). Assim, alguns fatores como a morfologia do complexo cumulus oócito (NICKSON et al., 1993; HEWITT e ENGLAND, 1997; LUVONI, 2001), o diâmetro oocitário (HEWITT e ENGLAND, 1998a) e a idade da fêmea doadora (NICKSON et al., 1993) tem demonstrado exercer influência sobre os índices de maturação *in vitro* em cadelas. Entretanto, a fase do ciclo estral da doadora (NICKSON et al., 1993; YAMADA et al. 1993; HEWITT e ENGLAND, 1997) e o período de cultivo (OTOI et al., 2000; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003) são fatores que ainda estão em estudos e até o momento apresentam dados contrapostos.

A importância da seleção oocitária baseada no critério morfológico foi demonstrada por NICKSON et al. (1993) quando verificaram a degeneração de oócitos com apenas uma camada de células do cumulus, enquanto parte dos oócitos com mais de duas camadas continuavam a se desenvolver em cultivo. Porém, para HEWITT e ENGLAND (1997) a seleção não deve basear-se unicamente no número de camadas das células do cumulus, mas também, no aspecto citoplasmático do oócito.

Sobre o diâmetro do oócito, HEWITT e ENGLAND (1998a) citaram que quanto maior o oócito, maior será a habilidade de se transpor à fase de quebra da vesícula germinativa para atingir as fases de metáfase I, anáfase I e metáfase II, sendo que o diâmetro superior a 120  $\mu\text{m}$  apresenta maior competência meiótica para os estágios finais de maturação, similar ao observado em outras espécies domésticas (THEISS, 1997; DURENZI, 1995; GILCHRIST, 1995; MOTLIK, 1989).

A idade da fêmea doadora também é um importante fator a ser considerado, pois pode influenciar no número total de oócitos recuperados (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003). De acordo com ANDERSEN et al. (1973) e DURRANT et al. (1998), os ovários de fêmeas caninas pré-púberes apresentam menor proporção de folículos em estágios avançados de desenvolvimento e maiores quantidades de folículos degenerados, fato este, que pode ilustrar a aceleração atrésica durante os primeiros meses após o nascimento. E fêmeas com idade superior a sete anos apresentam comprometimento

na habilidade para maturar quando comparadas a animais mais jovens (HEWITT e ENGLAND, 1998a).

Com relação à influência da fase do ciclo sobre a taxa de recuperação e frequência de maturação nuclear de oócitos ainda é controverso. HEWITT e ENGLAND (1997) observaram que não houve diferença na taxa de maturação oocitária entre oócitos coletados de cadelas no período de anestro e diestro, no entanto, relataram 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 podem possuir efeito positivo sobre a maturação.

Contrariamente, WILLINGHAM-ROCKY et al. (2003) afirmaram que o estágio do ciclo estral do doador é o fator chave no critério de seleção para oócitos caninos meioticamente competentes. Entretanto, mais recentemente, LUVONI e seus colaboradores (2005) reportaram que apesar de oócitos advindos de animais em anestro não apresentarem capacidade para atingir a metáfase II, nenhuma conclusão adicional pode ser tirada com relação à influência do ciclo estral sobre a competência meiótica. Contudo, o que se tem observado é a influência do ciclo estral sobre o funcionamento das junções GAP entre as células do cumulus e o oócito. Tem sido demonstrado que, enquanto os COCs advindos de cadelas em anestro apresentam as junções GAP fechadas, os COCs provenientes de cadelas no final do proestro possuem 89% destas comunicações abertas (LUVONI et al., 2001). Para BOGLIOLO et al (2002) este pode ser um dos fatores apontados para explicar as baixas taxas de maturação de oócitos obtidos durante o anestro, mesmo após um período de 72 ou 96 horas de cultivo.

Quanto ao período de cultivo para a maturação *in vitro* em canídeos, não há tempo pré-estabelecido. Alguns pesquisadores afirmam que a completa maturação meiótica ocorre após 24-48 horas de cultivo (NICKSON et al., 1993; SAINT-DIZIER et al., 2001). Em contrapartida, há estudos que relatam 72 a 96 horas como período necessário para alcançar maiores índices de maturação (FUJII et al., 2000; HEWITT et al., 1998c; OTOI et al., 2000; YAMADA et al., 1993). Entretanto, o que se procura é um

equilíbrio entre o meio utilizado e o tempo de cultivo, de forma a obter melhores índices de maturação e níveis reduzidos de degeneração (MARTINS, 2005).

Os protocolos para o meio de maturação ainda passam por fase de experimentação, na busca de um meio que consiga mimetizar as condições encontradas *in vivo*. Normalmente são utilizadas adaptações dos meios empregados em bovinos (GARDNER e LANE, 2000). Portanto, os mais utilizados são SOF (Synthetic Oviduct Fluid) (HEWITT e ENGLAND, 1997; HEWITT e ENGLAND 1998b; HEWITT e ENGLAND 1999; BOLAMBA et al., 2002; MARTINS, 2005) e, principalmente o TCM 199 (Tissue Culture Medium 199) (NICKSON et al., 1993; HEWITT et al., 1998c; FUJII et al., 2000; OTOI et al., 2001; SONGSASEN et al., 2001; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003), acrescidos de proteínas, hormônios e antioxidantes, objetivando melhorar os índices de maturação.

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.

Sobre o TCM 199, além de modificado pode ser suplementado com hormônios e substâncias favoráveis ao desenvolvimento, como o SFB e BSA (Nickson et al., 1993; HEWITT e ENGLAND, 1997; HEWITT et al., 1998c). Para CINONE et al. (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 estágios de metáfase II.

HEWITT et al. (1998c) compararam as taxas de maturação de oócitos 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 hormonal nos meios de cultivo é baseada no fato de que os oócitos caninos em fase de vesícula germinativa estão sujeitos, *in vivo*, a concentrações decrescentes de estrógeno e crescentes de progesterona no folículo pré-ovulatório (HEWITT e ENGLAND, 1997; NICKSON et al., 1993). Para KIM et al. (2005) a associação de hormônios esteróides (estrógeno e progesterona) na concentração de 2µg/mL apresenta melhor efeito sobre a maturação de oócitos caninos (16,6% de metáfase II) quando comparada com a mesma concentração isoladamente (E2 14,7% e P4 10,8%). Por outro lado, VANNUCCHI (2003) avaliando o efeito da suplementação de hormônios esteróides no meio de maturação, observou que às 72 horas, a associação de 20µg/mL de estrógeno e progesterona apresentaram maiores índices de metáfase II do que o meio sem suplementação hormonal (3,63% X 0%, respectivamente), porém às 96 horas, os resultados se inverteram, sendo que o meio sem suplementação hormonal apresentou as melhores taxas de maturação quando comparados ao meio suplementado com estrógeno e progesterona (6,45% meio X 0%). Dessa forma, pode-se inferir que a progesterona pode acelerar o processo de maturação nuclear dos oócitos de cadela, visto que, em meios de maturação sem hormônios, também foi possível verificar oócitos em estágios de metáfase II, mas, somente após um extenso período de cultivo (96 horas).

## **2.5. Estresse Oxidativo e Bioquímica da Glutathiona**

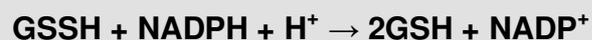
Uma das principais preocupações durante o processo de maturação e fecundação *in vitro* são os danos causados pelos radicais livres (ROS) produzidos, normalmente, no metabolismo oxidativo (DEW, 2001).

O estresse oxidativo está relacionado com presença de elevada concentração de moléculas com alto potencial de abstrair elétrons de biomoléculas. Os radicais livres são os mais importantes oxidantes biológicos, pois são potentes eletrófilos e agem em centros nucleofílicos, como as terminações -OH, -NH<sub>2</sub> e -SH, de pequenos componentes e macromoléculas celulares, como DNA, proteínas e polissacarídeos, com conseqüências irreversíveis, como a morte celular, via apoptose e necrose

(AVELINO, 2004). Entretanto, a maioria das células apresenta um eficiente sistema de defesa contra radicais livres, representado pela glutathiona, que possui como principal função a detoxicação e antioxidação de compostos endógenos e exógenos, mantendo a condição redox intracelular (GASPARRINI et al., 2005; LUBERDA, 2005).

A glutathiona (GSH) é o maior composto sulfidril não protéico de baixo peso molecular, amplamente distribuído pelo organismo, sendo encontrado não somente em células somáticas, mas também em gametas (LUBERDA, 2005). Apresenta-se sob duas formas principais: como grupo sulfidril (GSH) ou como dissulfeto (GSSH), sendo que a GSH reduzida é a forma predominante, encontrada em 99,5% de toda a GSH detectada na célula (ANDERSON, 1985).

A glutathiona pode agir diretamente nos radicais livres. Para neutralizá-los são necessárias duas moléculas de GSH que reagem pelo mecanismo de redução, via NADPH, com uma molécula de  $H_2O_2$  formando GSSH (metabólito não tóxico) e duas moléculas de  $H_2O$ . A conversão de GSH para GSSH é imediatamente catalisada pela enzima glutathiona redutase, utilizando NADH ou NADPH como doador de elétrons, atuando como maior redutor intracelular, mantendo o equilíbrio dentro da célula (MEISTER, 1983; AVELINO, 2004; LUBERDA, 2005). A equação abaixo mostra o mecanismo de ação da glutathiona frente ao peróxido de hidrogênio (LUBERDA, 2005):



Contudo, além de proteção celular contra radicais livres gerados normalmente pelo metabolismo oxidativo da célula, a GSH atua também no transporte de aminoácidos (principalmente cisteína), síntese de DNA e proteínas (LAFLEUR et al., 1994; DE MATOS et al., 1995; ABEYDEERA et al., 1998), manutenção da morfologia dos fusos meióticos do oócito e após a fertilização participa da descondensação nuclear do espermatozóide e subsequente formação do pró-núcleo masculino (CALVIN et al., 1986; PERREAULT et al., 1988; SAGARA et al., 1993; YOSHIDA et al., 1993).

A síntese da glutatona que ocorre no ciclo  $\gamma$ -glutamil é dependente da disponibilidade da presença da cisteína no meio extracelular (FURNUS e DE MATOS, 1999; GASPARRINI et al., 2005). Todavia, este aminoácido é estável por somente uma hora de cultivo, sendo rapidamente oxidado em cistina, promovendo redução na cisteína disponível no meio, prejudicando a síntese de glutatona intracelular (SAGARA et al., 1993). Mas, quando associada a uma molécula de tiol, como o  $\beta$ -mercaptoetanol ou cisteamina, a cistina produzida é reduzida a cisteína, mantendo assim a concentração de cisteína no meio de cultivo garantindo a produção da glutatona (ISHII et al., 1981).

No sistema reprodutivo, a GSH participa ativamente nos processos de maturação oocitária e parece estar relacionada a um controle hormonal, uma vez que sua concentração está aumentada no ovário no período pré-ovulatório, concomitante com a presença de LH, fazendo um estoque para proteger o oócito durante e após a fecundação (PERREAULT et al., 1988; AVELINO, 2004).

A produção de glutatona durante a maturação oocitária *in vitro* é citada em várias espécies como camundongo (CALVIN et al., 1986), hamster (PERREAULT et al., 1988), suínos (YOSHIDA et al., 1993) e bovinos (DE MATOS et al., 1995), ovinos (DE MATOS et al., 2002), caprinos (RODRIGUES-GONZALEZ et al., 2003) e búfalos (GASPARRINI et al., 2003).

Entretanto, apesar da glutatona poder ser sintetizada tanto no processo de maturação *in vitro* quanto *in vivo*, a sua concentração é mais elevada em oócitos maturados *in vivo*. Uma possível explicação é que a tensão de oxigênio no lúmen do trato reprodutivo feminino é um terço do que ocorre na maturação *in vitro*, desta forma, oócitos cultivados em condições artificiais, mobilizam maior quantidade de GSH para combater os radicais livres, provocados pelo estresse oxidativo, resultando no declínio dos seus níveis, o que pode justificar a baixa competência em oócitos maturados *in vitro* (BRAD et al., 2003).

Na maturação *in vitro*, a síntese de GSH pode ser estimulada por alguns substratos (cisteína e cistina) ou precursores (cisteamina e  $\beta$ -mercaptoetanol) (DE

MATOS et al., 1995; DE MATOS et al., 1996; DE MATOS et al., 2002; DE MATOS e FURNUS, 2000; GASPARRINI et al. 2003).

ABEYDEERA et al. (1998) citaram que, durante a maturação *in vitro* de oócitos suínos, a suplementação do meio de cultivo com 25 $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol promoveu elevação na concentração da GSH e o subsequente desenvolvimento embrionário. Em canídeos, foram observados índices de maturação de 20% e 12,9% de metáfase II em meios suplementados respectivamente com 50 e 100 $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol (KIM et al., 2004). Na espécie ovina, o uso de  $\beta$ -mercaptoetanol (50 $\mu$ M) ou cisteamina (200 $\mu$ M) aumentou a síntese de GSH, mas apenas o grupo tratado com cisteamina obteve resultado favorável quanto ao desenvolvimento de blastocisto (DE MATOS et al., 2002). Fato semelhante foi observado na MIV de bovinos ao suplementar o meio de maturação com 100 $\mu$ M de cisteamina ou 0,6 mM de cisteína ou 100 $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol (DE MATOS et al., 1995). Em felinos também foi registrado melhores índices de maturação e fertilização *in vitro* quando o meio foi suplementado com 0,1 mg/mL de cisteína (POPE et al., 1995; LUVONI e COLOMBO, 1995). Entretanto, DEW (2001) ao suplementar o meio de maturação de oócitos de cadelas em anestro com diferentes concentrações de cisteína (0,1mM e 1,0mM), observou que a concentração de 0,1mM apresentou melhores resultados, porém não significativos. Segundo este autor a reduzida taxa de maturação pode ser atribuída a baixa competência de oócitos obtidos de cadelas em anestro.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp - *Campus* de Jaboticabal. Para este estudo foram utilizadas sete fêmeas da espécie canina, sem raça definida, com idade entre um e sete anos, peso médio de 15 kg e consideradas híginas mediante exames clínicos como, auscultação cardio-respiratória, palpação transabdominal, avaliação do trato reprodutivo (citologia vaginal) e temperatura corpórea.

Os animais utilizados para este estudo apresentavam-se na fase pré-ovulatória imediata no momento da realização da ovario-histerectomia.

#### **3.2. Determinação da fase pré-ovulatória do estro**

##### **3.2.1. Histórico Reprodutivo**

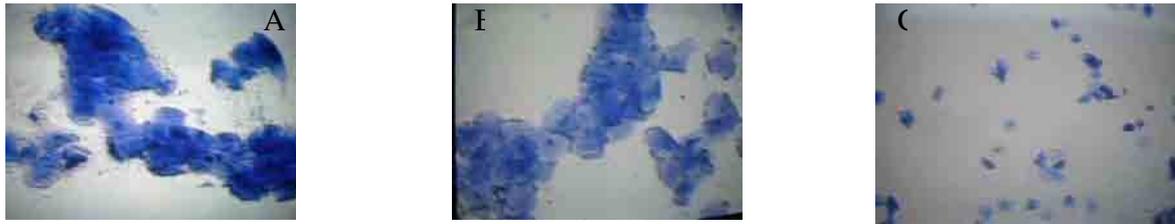
Durante o cadastro dos animais realizava-se anamnese, na qual eram obtidas informações sobre último ciclo reprodutivo. A partir deste dado, estimava-se o período do próximo ciclo estral e orientava o proprietário a respeito do reconhecimento da fase folicular.

##### **3.2.2. Acompanhamento colpocitológico**

Imediatamente após a detecção clínica do início da fase folicular como edema vulvar e secreção vaginal hemorrágica, iniciava-se o acompanhamento citológico diário para determinação do início do estro (80 a 90% de células superficiais e receptividade ao macho). O exame colpocitológico foi realizado introduzindo um “swab” pela comissura dorsal da vagina em ângulo de 45° em relação ao solo, o qual foi delicadamente rotacionado para que as células ficassem aderidas a ele. Ato contínuo foram transferidas sobre duas lâminas de microscopia, para que fossem coradas; uma

pelo método Panótico Rápido (Bio-cor 1,2 e 3<sup>®</sup>, Bioshop) e a outra, pelo método Harris-Shorr (apêndice 1).

A identificação dos tipos celulares, bem como a classificação da fase do ciclo estral baseou-se nos critérios adotados por JOHNSTON et al. (2001) (apêndice 2).



**Figura 1:** Fotomicrografia de células do epitélio vaginal, demonstrando evolução da fase folicular onde A: Proestro inicial; B: Proestro intermediário e C: Estro.

Após a determinação do início do estro esperava-se mais 12 horas para a coleta de sangue para a dosagem sérica de progesterona.

Deve-se ressaltar que a citologia vaginal constituiu-se em um exame complementar, pois o momento da ovulação foi determinado pelo resultado da concentração sérica de progesterona.

### 3.2.3 Dosagem sérica de progesterona

As amostras de sangue foram coletadas através de punção da veia jugular em tubos sem anticoagulante. Foram retirados 5 mL de sangue, o qual foi centrifugado por 10 minutos a 955 g para obtenção do soro.

O soro era enviado para o Laboratório Humano Endomed, na cidade de Jaboticabal, onde se realizava a dosagem de progesterona, pelo método de quimioluminescência adaptado para cães (ROOT-KUSTRITZ, 2001).

O resultado deste exame permitiu que estimássemos o momento da ovulação e determinássemos o dia para a realização da ovario-histerectomia para a obtenção dos ovários. Como se segue na tabela abaixo:

**Tabela 1. Correlação entre a dosagem sérica de progesterona e o momento da ovulação.**

| <b>P4 ng/mL</b> | <b>Momento estimado da ovulação</b> |
|-----------------|-------------------------------------|
| Menor que 1,0   | Anestro ou proestro                 |
| 1,0 – 1,9       | Em até 48h                          |
| 2,0 – 3,9       | Em até 24h                          |
| 4,0 – 10,0      | Já ovulou ou está ovulando          |

ROOT-KUSTRITZ , 2001

Dessa forma, seguindo os critérios adotados por ROOT-KUSTRITZ (2001) para estimar o momento da ovulação, utilizamos em nosso experimento somente animais que apresentavam dosagens séricas de progesterona entre 1,0 a 3,9 ng/mL, como mostra a tabela 2.

**Tabela 2. Resultados das dosagens séricas de progesterona dos animais incluídos no experimento**

| <b>Animal</b> | <b>Dosagem de P4 ng/mL</b> |
|---------------|----------------------------|
| 1             | 2,4                        |
| 2             | 3,8                        |
| 3             | 2,0                        |
| 4             | 3,5                        |
| 5             | 3,7                        |
| 6             | 2,8                        |
| 7             | 2,7                        |

### 3.3. Obtenção e classificação dos oócitos

Após o procedimento da ovario-histerectomia, os ovários foram coletados assepticamente, imersos em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% aquecida a 38° (Solução de Transporte) e, imediatamente levados ao Laboratório de Reprodução.

No Laboratório, os ovários foram colocados em placas de Petri (previamente aquecida em placa aquecedora) contendo meio de fatiamento (Solução de PBS adicionado de 10% de SFB a 39%), onde foi realizado o “slicing” (fatiamento) do órgão para a liberação dos complexos cumulus-oócitos (COC) (Fig.2).

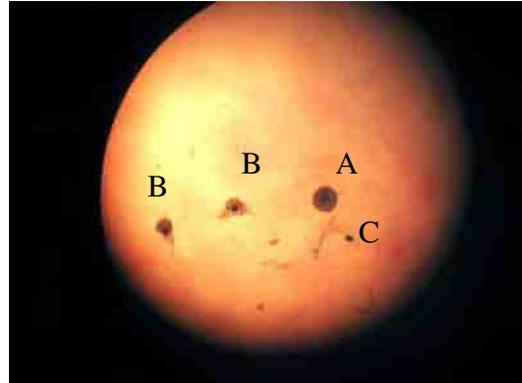


**Figura 2:** Realização do método de “slicing” para obtenção dos COCs para maturação *in vitro*.

Os oócitos foram rastreados sob lupa estereomicroscópica (Fig.3) e avaliados com relação à homogeneidade do citoplasma e número de camadas das células do cumulus (Fig.4), conforme os critérios morfológicos adotados por Hewitt e England, 1997 (Apêndice 3).

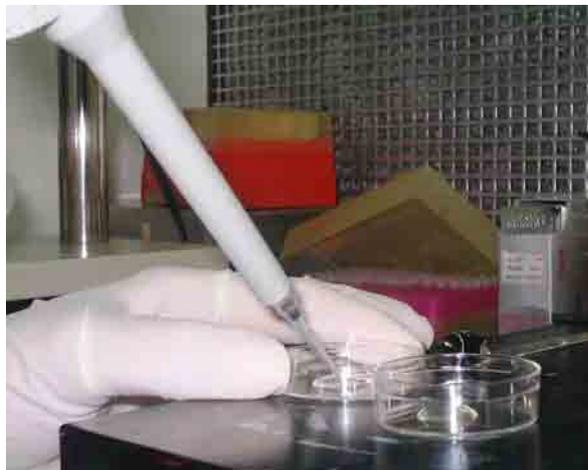


**Figura 3:** Seleção dos oócitos através da lupa estereomicroscópica



**Figura 4:** Fotomicrografia de COCs grau I (letra A), grau II (letra B) e grau III (letra C).

Para este trabalho foram selecionados apenas os COCs grau I, os quais foram lavados três vezes em meio de lavagem (Apêndice 4) antes do procedimento de maturação (Fig.5)



**Figura 5:** Passagem dos COCs selecionados para o meio de lavagem.

### 3.4. Maturação *in vitro*

Após a lavagem, grupos de até 20 oócitos foram transferidos para placa NUNC contendo quatro gotas de 500 $\mu$ L de meio de maturação específico para cada tratamento e mantidos a 38 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar durante 72 horas (Figura 6).



**Figura 6:** Placa NUNC contendo gotas do meio de maturação, onde os oócitos ficavam incubados por período de 72 horas.

Os oócitos foram submetidos a quatro tratamentos, sendo eles:

Tratamento controle (A): Meio padrão TCM 199 (apêndice 5)

Tratamento (B): Meio A suplementado com 0,1 mM de cisteína

Tratamento (C): Meio A suplementado com 100 $\mu$ M de cisteamina

Tratamento (D): Meio A suplementado com 0,1mM de cisteína + 100 $\mu$ M de cisteamina.

Assim como preconizado por NICKSON et al. (1993), após 48 horas de cultivo era realizado o “feeding”, ou seja, retirávamos 250 $\mu$ L do meio e o trocávamos pela mesma quantidade de um novo meio.

### 3.5. Avaliação do estágio de maturação nuclear

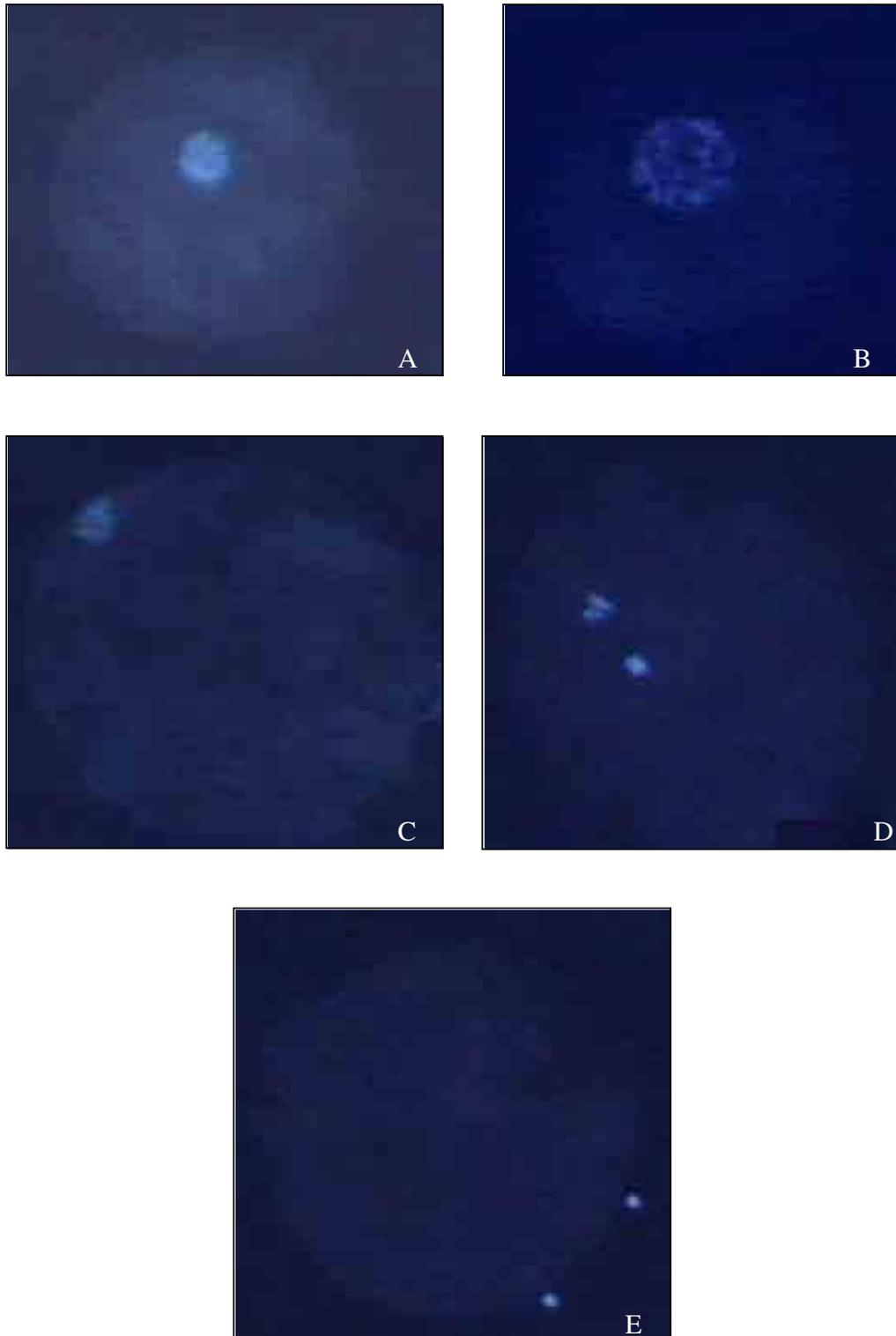
A abundante quantidade de material lipídico, característica do oócito canino dificulta a distinção dos componentes nucleares, desta forma se faz necessária

utilização da técnica de fluorescência para avaliação do estágio de maturação oocitária (BOLAMBA et al., 2002).

Após 72 horas de cultivo, os oócitos foram colocados em placas de Petri contendo 200 $\mu$ L de hialuronidase (apêndice 6) e aspirados repetidamente com pipetas de 100 $\mu$ L para remoção completa das células do cumulus. Na seqüência foram passados três vezes pelo meio de lavagem (apêndice 4) para inativação da enzima. Ato contínuo foram transferidos para solução de paraformaldeído (apêndice 7), onde permaneceram por 5 minutos. Os oócitos foram novamente submetidos ao meio de lavagem e transferidos para solução de Triton (apêndice 7) por 10 minutos. Ao término deste processo os oócitos foram colocados em lâmina de microscopia contendo uma gota de bisbenzomida em glicerol (Hoechst 33342) e recobertos por lamínula.

A classificação do estágio de maturação nuclear foi realizada segundo os critérios adotados por HEWITT e ENGLAND (1997), baseada na morfologia do DNA. E a avaliação nuclear feita em microscópio invertido equipado com luz ultravioleta e filtro de 365-420 de excitação/emissão (Figura 7).

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



**Figura 7:** Fotomicrografia de oócitos caninos corados pela técnica de fluorescência (Hoechst 33342) onde: Vesícula germinativa (A), Quebra de vesícula germinativa (B), Metáfase I (C), Metáfase II (D) e Degenerado (E).

### **3.6. Análise estatística**

Os dados foram analisados através de testes não-paramétricos, sendo o efeito dos meios de cultivo verificado por meio do teste Qui-quadrado e as comparações múltiplas com os diferentes meios de cultivo comparados dois a dois pelo teste de Wilcoxon.

O nível de significância utilizado para rejeitar H<sub>0</sub> (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para  $p < 0,05$  (nível de significância menor que 0,05), considerou-se que ocorreram diferenças significativas entre as variáveis (meios de cultivo) para um determinado estágio de maturação (VG, QVG, MI, MII, degenerados e a retomada de meiose).

#### 4. RESULTADOS

O número total de oócitos recuperados foi de 297. Sendo assim, cada fêmea forneceu uma média de 42,4 COCs grau I. As freqüências absolutas e relativas de COCs recuperados encontram-se na tabela 3.

**Tabela 3 – Dados da freqüência absoluta e relativa (%) de COCs recuperados de sete fêmeas em fase pré-ovulatória do estro – Jaboticabal, 2006.**

| Parâmetros | Freqüência |              |
|------------|------------|--------------|
|            | Absoluta   | Relativa (%) |
| COC grau I | 297        | 100          |
| Avaliados  | 219        | 73,7         |
| Perdas     | 78         | 26,3         |

**Tabela 4 – Números absoluto e relativo (%) de oócitos caninos perdidos durante o procedimento de coloração nuclear – Jaboticabal, 2006.**

| Nº oócitos recuperados | Freqüência absoluta e relativa (%) de oócitos perdidos |           |           |           |           |
|------------------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                        | A  | B         | C         | D         | Total     |
| 297                    | 27 (34,6)  | 20 (25,6) | 13 (16,7) | 18 (23,1) | 78 (26,3) |

Como pode ser observado na tabela 4, do total de 297 oócitos grau I recuperados, 78 (26,3%) foram perdidos durante o procedimento de coloração nuclear. As perdas ocorreram essencialmente durante a etapa da hialuronidase, enzima utilizada

para remoção das células do cumulus, sendo que o meio controle foi o tratamento que apresentou as maiores taxas de perda (34,5%) quando comparado aos demais tratamentos.

**Tabela 5 – Dados absolutos e relativos (%) dos COCs grau I avaliados, após 72 horas de cultivo, de cadelas em fase pré-ovulatória imediata, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI), metáfase II (MII), retomada da meiose (QVG-MII) e degenerados em cada meio de maturação, sendo controle (A), cisteína (B), cisteamina (C) e associação de cisteína com cisteamina (D) – Jaboticabal, 2006.**

| Parâmetros                      | Frequência absoluta e relativa (%) |          |          |          |
|---------------------------------|------------------------------------|----------|----------|----------|
|                                 | A                                  | B        | C        | D        |
| Avaliados                       | 50 (100)                           | 61 (100) | 56 (100) | 52 (100) |
| VG                              | 1 (2)                              | 4 (7)    | 1 (2)    | 5 (10)   |
| QVG                             | 13 (26)                            | 21 (34)  | 15 (27)  | 10 (19)  |
| MI                              | 5 (10)                             | 3 (5)    | 1 (2)    | 3 (6)    |
| MII                             | 5 (10)                             | 3 (5)    | 2 (4)    | 4 (8)    |
| Retomada da meiose<br>(QVG-MII) | 23 (46)                            | 27 (44)  | 18 (33)  | 17 (33)  |
| Degenerados                     | 26 (52)                            | 30 (49)  | 37 (65)  | 30 (57)  |

Analisando-se a tabela 5, podem ser visualizadas pequenas diferenças percentuais nos índices de maturação quando são considerados os distintos meios avaliados. Para avaliar o efeito dos meios de cultivo sobre os diferentes estágios de

maturação foi empregado o teste Qui-Quadrado. Para uma significância de 5%, o valor do  $\chi^2$  obtido foi igual a 14,26; portanto, menor que o  $\chi^2_{\text{crítico}} = \chi^2_{12\text{gl}} = 21,03$ . Com base nesse resultado, pode-se afirmar que não houve influência significativa dos meios de cultivo sobre os diferentes estágios de maturação (a hipótese H0 não pode ser rejeitada). Mas apesar disto, podemos fazer algumas observações:

Com relação ao estágio de VG, podemos observar que os meios B e D apresentaram os índices mais elevados (7% e 10%). Também podemos notar o predomínio de oócitos em fase de QVG no meio em que se suplementou cisteína isoladamente (meio B, 34%). Além disso, podemos observar elevadas taxas de oócitos degenerados em todos os tratamentos, porém os meios C e D foram os que obtiveram o maior número de degeneração (65% e 57%, respectivamente). Sobre a retomada da meiose, podemos afirmar que os valores foram apenas satisfatórios, pois o que contribuiu para o aumento deste índice foram as taxas de QVG e não a porcentagem de oócitos que atingiram a metáfase I e II, as quais ficaram abaixo do esperado em todos os tratamentos, sendo que o meio A foi o que obteve o maior número de oócitos nestes estágios de desenvolvimento.

Na tabela 6, são apresentados os resultados das comparações múltiplas (teste de Wilcoxon) com os meios de cultivo comparados dois a dois para cada estágio de maturação. O propósito é avaliar se ocorreram diferenças significativas quando do emprego dos meios suplementados sobre os índices de maturação oocitária.

**Tabela 6 – Verificação da influência dos meios de cultivo sobre os estágios de maturação (Teste de Wilcoxon)**

| Estágios                  | Comparação entre os diferentes meios |                 |                 |                 |                 |                 |
|---------------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                           | A x B                                | A x C           | A x D           | B x C           | B x D           | C x D           |
| <b>Degeneração</b>        | não                                  | não             | não             | não             | não             | não             |
| <b>Vesícula</b>           | não                                  | não             | não<br>(p=0,37) | não             | não             | não<br>(p=0,25) |
| <b>Quebra de vesícula</b> | não                                  | não             | não             | não<br>(p=0,19) | não<br>(p=0,20) | Não             |
| <b>Metáfase I</b>         | não<br>(p=0,31)                      | não<br>(p=0,12) | não             | não             | não             | não<br>(p=0,25) |
| <b>Metáfase II</b>        | não                                  | não<br>(p=0,12) | não             | não             | não<br>(p=0,31) | não<br>(p=0,13) |
| <b>Retomada de Meiose</b> | não                                  | não             | não             | não             | não             | não             |

\* Se  $p < 0,05$ , as diferenças podem ser consideradas significativas

Analisando-se a tabela 6, nota-se que não ocorreram diferenças significativas nos diferentes estágios de maturação para os meios avaliados (dois a dois), demonstrando similaridade entre os tratamentos.

## 5. DISCUSSÃO

As técnicas de reprodução assistida são extremamente importantes, pois permitem a melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos que ocorrem *in vivo*. Para canídeos, o sucesso alcançado com as biotécnicas reprodutivas, tais como, a maturação e fertilização *in vitro* e o desenvolvimento embrionário permitirá assegurar a preservação de material genético das espécies ameaçadas (DURRANT et al, 1998; OTOI et al., 2000; GOODROWE et al., 2000).

Contudo, apesar dos significativos esforços desde 1976, por MAHI e YANAGIMACHI, que deram início aos questionamentos sobre maturação oocitária e outros eventos envolvidos com a reprodução canina, pouco progresso se obteve até o momento. Fato demonstrado pelas baixas taxas de maturação oocitária (MAHI e YANAGIMACHI, 1976; YAMADA et al., 1993; NICKSON et al., 1993; HEWITT e ENGLAND, 1998a; METCALFE, 1999; LUVONI, 2000; FARSTAD, 2000a) e pela única prenhez obtida através da fertilização *in vitro* nesta espécie (ENGLAND et al., 2001).

Na tentativa de melhorar estes índices, vários protocolos de maturação têm sido testados, fazendo-se uso da suplementação com hormônios, proteínas, soros, fatores de crescimento e antioxidantes, visando o desenvolvimento de um sistema de cultivo específico para canídeos, pois o que se tem utilizado são adaptações inadequadas.

Em virtude disto, o presente trabalho consistiu em estudar o efeito da suplementação de compostos antioxidantes no meio de cultivo sobre os índices de maturação nuclear oocitária na espécie canina.

No presente estudo, utilizamos animais em fase pré-ovulatória do estro buscando a obtenção de oócitos supostamente com elevada competência meiótica.

Embora o efeito do estágio do ciclo estral seja um fator ainda em discussão, vários estudos têm demonstrado efeito positivo da fase reprodutiva sobre os índices de maturação (YAMADA et al., 1993; OTOI et al., 2001; OTOI et al., 2004; MARTINS, 2005). YAMADA et al. (1993) relataram que 32% dos oócitos pré-ovulatórios, coletados

de fêmeas superovuladas atingiram metáfase II após 72 horas de cultivo. Da mesma forma, índices elevados de maturação (41% de metáfase II) foram obtidos de oócitos provenientes de fêmeas em estro natural (OTOI et al., 2004).

Segundo LUVONI et al. (2001) as altas taxas de maturação obtidas durante a fase folicular podem ser explicadas pelo *status* funcional das junções GAP. O oócito e as células do cumulus se comunicam metabolicamente através das junções GAP, por meio da qual, se faz passagem de nutrientes, íons e moléculas importantes para a retomada da meiose (LUVONI et al., 2001; LUVONI et al. 2005). Contudo, esta comunicação é dependente da fase do ciclo estral, de tal forma, que se apresentam fechadas durante o anestro e abertas no estro. Além disso, na fase folicular se obtém maior número de oócitos com diâmetro igual ou superior a 120  $\mu\text{m}$ , os quais possuem elevada capacidade para atingir as etapas finais da maturação (OTOI et al., 2001).

Sobre os compostos antioxidantes, estes têm sido amplamente estudados em várias espécies, pois o estresse oxidativo, responsável pelos elevados índices de degeneração e morte celular, representa uma das grandes preocupações nos processos de maturação e fertilização *in vitro*. Entretanto, as células possuem um eficiente sistema de defesa contra os danos provocados pelos radicais livres, a glutatona (GASPARRINI et al., 2005).

A glutatona é um tripeptídeo, cuja síntese depende da presença de cisteína no meio extracelular (FURNUS e DE MATOS, 1999; GASPARRINI et al., 2005). Contudo, a instabilidade deste aminoácido tem dificultado o seu uso no cultivo *in vitro*, pois em poucas horas é oxidada em cistina tornando-se indisponível no meio (ISHII et al., 1981). Para contornar este problema, tem sido proposto associação da cisteína a um precursor de glutatona como a cisteamina ou o  $\beta$ -mercaptoetanol, pois quando associados à cistina produzida é convertida novamente em cisteína mantendo-a assim, disponível no meio para produção da glutatona (DE MATOS et al., 1995; DE MATOS et al., 1996; DE MATOS et al., 2002; DE MATOS e FURNUS, 2000; GASPARRINI et al. 2003).

DE MATOS et al. (1995) observaram que o desenvolvimento de blastocistos foi significativamente maior em oócitos maturados em meio contendo cisteamina. Em

felinos, a adição de cisteína ao meio de maturação promoveu aumento nos níveis de glutatona intracelular (LUVONI et al., 2001).

Com relação ao uso de compostos antioxidantes em canídeos, poucos estudos foram efetuados e os resultados não foram animadores. Apenas KIM et al. (2004), estudando a suplementação com 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol observaram melhora nos índices de maturação, encontrando 20% de metáfase II. Já SONGSASEN et al. (2002) em trabalho semelhante não compartilharam do mesmo êxito. DEW (2001) avaliando o efeito de cisteína no meio de maturação canina, utilizando diferentes concentrações (0,1mM e 1,0mM), observou que a concentração de 0,1mM apresentou melhor resultado (1,85% de metáfase II), porém não significativo. Da mesma forma, em nosso estudo, o esperado efeito protetor produzido pela adição de compostos antioxidantes no meio de maturação, o qual tornaria o ambiente mais favorável para aquisição da competência meiótica, não foi observado. Fato visualizado na tabela 6, a qual demonstra que os meios não diferiram estatisticamente entre si, sendo portanto, considerados semelhantes.

Entretanto podemos observar em todos os meios uma elevada taxa de QVG (A=26%; B=34%; C=27%; D=19%). Estes índices podem ser explicados pela própria fase do ciclo estral onde existe um estímulo provocado pela onda pré-ovulatória de LH, que reduz a comunicação existente entre as células do cumulus e o oócito, interrompendo o transporte de substâncias que inibem a competência meiótica, isto indiretamente promove a quebra da vesícula germinativa. Além disso, o LH estimula a síntese de um sinal indutor para o início da meiose, provavelmente representado pelo cálcio (EPPIG, 1993). O aumento intra-ocitário do cálcio reduz o AMPc e este mecanismo leva a quebra da vesícula germinativa (VANNUCCHI, 2003). Também não podemos deixar de considerar que, além dos nossos meios terem sido suplementados com progesterona (2 $\mu$ g/mL), os oócitos utilizados eram provenientes de animal em fase pré-ovulatória do estro, o que contribuiu, para o aumento da concentração da progesterona, a qual é responsável pela estimulação do fator promotor de meiose que

induz a quebra da vesícula germinativa (SALUSTRI et al., 1993; VANNUCCHI, 2003; MARTINS, 2005).

Ainda podemos notar um possível efeito positivo da fase pré-ovulatória sobre a retomada da meiose (A=46; B= 44; C= 33; D=33), embora os índices tenham sido considerados apenas satisfatórios, pois o que contribuiu para aumentar a taxa de retomada da meiose foram às altas porcentagens de QVG e não os índices de metáfase II. Durante o crescimento intra-folicular ocorre uma alta taxa de atividade transcripcional, que leva a síntese de DNA e proteínas, que sustentam e regulam a maturação citoplasmática (HYTTEL et al., 1999), por isso, quanto maior o tempo de permanência do oócito em ambiente intra-folicular, maior é a probabilidade de retomada da meiose (MARTINS, 2005). No entanto, estes índices poderiam ter sido melhores se a seleção dos complexos cumulus-oócito fosse baseada não somente nos critérios morfológicos, mas também no diâmetro oocitário, pois segundo OTOI et al. (2001), o efeito da fase do ciclo sobre a competência meiótica, deve em parte as diferenças entre a distribuição de tamanhos de oócitos em cada estágio reprodutivo.

Sobre as porcentagens de oócitos degenerados, podemos observar que foram elevadas em todos os tratamentos (A= 52; B=49; C= 65; D= 57). Entendemos que tal fato, talvez possa ser explicado pelo período de maturação de 72 horas, utilizado em nosso estudo. Embora recentes pesquisas estabeleçam 72 horas como período de cultivo para cães, este ainda é um parâmetro em discussão. FONTBONNE et al. (2004) observaram que *in vivo* a primeira metáfase II pode ser visualizada 50 horas após a ovulação. Da mesma forma, LUVONI et al. (2003), estudando o reinício da meiose de oócitos caninos cultivados em tecido oviductal em diferentes tempos de cultivo (0h, 24h, 30h e 48h), relataram que a retomada da meiose ocorreu dentro de 30 horas, e que a taxa de oócitos degenerados aumentou proporcionalmente com o período de cultivo. A mesma afirmação foi relatada recentemente por MARTINS (2005), a qual observou em seu estudo, que períodos de maturação superiores à 24 horas apresentaram elevados índices de degeneração. Levando-se em consideração que os oócitos utilizados em nosso estudo foram obtidos de fêmeas em fase pré-ovulatória do estro, talvez fosse

necessário um período de cultivo inferior a 72 horas para a obtenção de melhores taxas de maturação com menores índices de oócitos degenerados, uma vez que, estes oócitos apresentavam um crescimento intra-folicular superior e também haviam sido submetidos a uma prévia luteinização que antecede a ovulação (MARTINS, 2005). Todavia, não podemos afirmar que esta hipótese seja verdadeira já que não foram testados outros tempos de cultivo.

Com relação aos índices de oócitos que atingiram a fase de metáfase II em nosso experimento, os nossos dados ficaram aquém do esperado (A=10%; B=5%; C=4%; D=8%), considerando que buscamos em nosso estudo, mimetizar o microambiente ao qual o oócito está submetido durante o período de maturação *in vivo*. Para isso, adicionamos ao meio, hormônios esteróides (estrógeno e progesterona) e gonadotróficos (LH e FSH), fonte protéica (BSA) e compostos antioxidantes (cisteína e cisteamina) para minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo e fornecer condições favoráveis para o desenvolvimento oocitário, além de termos utilizado oócitos pré-ovulatórios. Entretanto, entendemos que as condições de cultivo possam ter dificultado a atuação dos compostos antioxidantes.

Ao utilizarmos fêmeas em fase pré-ovulatória imediata esperávamos obter oócitos meioticamente competentes e com elevado teor de glutathione intracelular, visto que de acordo com PERREAULT et al. (1988) o aumento nos níveis de glutathione ocorre concomitantemente com o pico de LH. Contudo, o estresse oxidativo induzido pela alta tensão de oxigênio, ao qual o oócito é inevitavelmente exposto durante o cultivo, assim como pela manipulação do oócito no processo de maturação, retirando-o do ambiente intra-folicular, leva a mobilização de grande quantidade de glutathione, promovendo o acentuado declínio dos seus níveis (BRAD et al., 2003), fato que pode justificar a baixa competência meiótica dos oócitos maturados em meio suplementado com antioxidantes, assim como, os elevados índices de degeneração observados em todos os tratamentos. A cisteína, utilizada como substrato para glutathione, é um aminoácido muito instável, sendo rapidamente oxidado a cistina, desta forma, a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  de cisteína adicionada ao meio independente se isolada ou

associada à cisteamina, pode não ter sido suficiente para manter a produção da glutathiona, em virtude do grande estresse sofrido durante o processo de maturação *in vitro*. Todavia, para tal afirmação, seria necessário termos realizado a dosagem da glutathiona intracelular, e assim, avaliarmos a habilidade da cisteína e cisteamina em aumentar a concentração da glutathiona, visto que o mecanismo de transporte destes compostos dentro do oócito canino ainda não está esclarecido.

Como pode ser observado, a maturação oocitária canina é um processo complexo, delicado, mas primordial, pois é o primeiro passo para outras biotecnologias como a fertilização *in vitro*, o cultivo e o desenvolvimento embrionário. Entretanto, necessita de mais estudos que visem não somente o estudo do meio de cultivo, mas também a própria morfologia oocitária, já que o sucesso desta técnica será importante para o desenvolvimento de programas de preservação de material genético das espécies ameaçadas de extinção.

## 6 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que:

- 1 - A suplementação com cisteína e cisteamina isoladas ou associadas não exerceu influência positiva sobre a maturação oocitária canina *in vitro*;
- 2 - Embora o objetivo do nosso estudo não tenha sido verificar o período de cultivo ideal para oócitos pré-ovulatórios, entendemos que devido ao maior desenvolvimento oocitário nesta fase, o período de 72 horas tenha sido superior ao necessário, ocasionando elevados índices de oócitos degenerados. Isto pode sugerir que o período de maturação possa ser variável dependendo do estágio de desenvolvimento oocitário alcançado em cada fase do ciclo estral.

## 7. REFERÊNCIAS

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Presence of  $\beta$ -mercaptoethanol can increase the glutathione content of oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, New York, v.50, p.747-756, 1998.

ANDERSEN, A.C.; SIMPSON, M.E. **The ovary and reproductive cycle of the dog (beagle)**. Los altos: Geron – X, Inc., 1973.

ANDERSON, M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzimology**, New York, v.113, p.548-555, 1985.

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.

AVELINO, K.B. **Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutathione durante a maturação in vitro de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária**. Tese de Doutorado para obtenção de título de doutor em Reprodução Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Unesp *Campus* Jaboticabal, 2004.

BAKER, T.G. Oogenesis and ovulation. In: germes cells and fertilization. 2 ed. **Germes cells and fertilization** Cambridge, England, Cambridge University Press, p. 17-45, 1987.

BOGLIOLO, L.; ZEDDA, M.T.; LEDDA, S.; LEONI, G.; NAITANA, S.; PAU, S. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *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 of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essencial. **Theriogenology**, v.581, p. 1689-1703, 2002.

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

CALVIN, H.I.; GROSSHANS, K.; BLAKE, E.J. Stimulation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. **Gamete Research**, New York, v.14, p.265-275, 1986.

CINONE, M.; GHNEIM, A.; CAIRA, M.; DELL'AQUILA, M.E.; MINOIA, P. 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.; WHALEY, S.; DONALD, L.; WISSELER, R. Canine gestation length: Variation related to time of mating and fertile life of sperm. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, p.1819-1821, 1983.

CONCANNON, P. W.; DIGREGORIO, G.B. **Canine vaginal cytology**. En: Burke, TJ (Ed). Small Animal Reproduction and Infertility. Ed. Lea Febiger, Philadelphia, USA. p.96-111, 1986.

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; 39:3-25, 1989.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and development capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.42, p.432-436, 1995.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.451-457, 1996.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v.53, p.761-771, 2000.

DE MATOS, D.G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v.57, p.1443-1451, 2002.

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

DURINZI, K.L.; SANIGA, E. M.; LANZENDORF, S.E. The relationship between size and maturation *in vitro* in the unstimulated human oocyte. **Fertility and Sterility**, 63:404-406, 1995.

DURRANT, B.S.; PRATT, N.C.; RUSS, K.D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, n.5, p. 917-932, 1998.

ENGLAND, G.C.W.; VERSTEGEN, J.P.; HEWITT, D.A. Pregnancy following *in vitro* fertilization of canine oocytes. **Veterinary Record**, v.148, n.1, p.20-22, 2001.

EPPIG, J.J. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: ADASHI, E.Y.; LEUNG, P.C. **The Ovary**. New York: Raven Press, p. 687, 1993.

FARSTAD, W.; MONDAIN-MONVAL, M.; HYTTEL, P.; SMITH, A.J.; MARKENG, D.; Perioovulatory endocrinology and oocyte maturation unmated, mature blue fox vixens (*Alopex lagopus*). **Acta veterinaria Scandinavica**, v.30, p.313-319, 1989.

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

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 375-387, 2000b.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Canine and feline endocrinology and reproduction. Ed. W.B. Saunders Company, Pennsylvania, USA, p.785, 1996.

FONTBONNE, A.; REYNAUD, K.; MARCELO, N.; DUMASY, M.; CHASTANT-MAILARD, S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. In: International Symposium on Canine and Feline Reproduction 5., 2004, São Paulo. **Abstract**. São Paulo, p.144-146, 2004.

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

FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G. The availability of cysteine in culture medium appears to be the limiting factor for glutathione synthesis in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.51, p.373, 1999.

GARDNER, D.K.; LANE, M. Embryo culture system. In: TROUSON, A.O.; GARDNER, D.K. **Handbook of *in vitro* fertilization**. 2ed. New York: CRC Press, cap. 11, p.205-264, 2000.

GASPARRINI, B.; SAYOUD, H.; NEGLIA, G.; DE MATOS, D.G.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. **Theriogenology**, v.60, p.943-952, 2003.

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

GILCHRIST, R. B.; NAYUDU, P. L.; NOWSHARI, M. A.; HODGES, J. K. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte somatic cell associations. **Biology of Reproduction**, 52:1234-1243, 1995.

GOBELLO, C. **Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos**. Ed. Intervet Argentina S.A., 1ª edición, Buenos Aires, Argentina. 2004, p.107-115.

GOODROWE, K.L.; WALKER, S.L.; RYCKMAN, D.P.; MASTROMONACO, G. F.; HAY, M. A.; BATEMAN, H.L.; WADDELL, W. T. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 389-403, 2000.

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

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent technique. **Animal Reproduction Science**, v.51, p.321-332, 1998b.

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

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

HYTTEL, P. GREVE, T. CALLESEN, H. Ultrastructure aspects of oocyte maturation and fertilization and cattle. **Journal Reproduction and Fertility Supplement**, n.38, p.35-47, 1999.

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

ISHII, T.; BANNAI, S.; SUGITA, Y. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol *in vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.10, p.12387-12392, 1981.

JEFFCOATE, I. A. Physiology and endocrinology of the bitch. In: SIMPSONS, G. M.; ENGLAND, G. C. W.; HARRY, M. **Manual of Small Animal Veterinary Association**, p.1-9, 1998.

JOHNSTON, D.S; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. The canine estrous cycle. In: JOHNSTON, D.S; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and Feline Theriogenology**, Ed. Saunders, 1<sup>st</sup> edn, Philadelphia, Pensilvania, p. 16-31, 2001.

KIM, M.K.; FIBIRANTO, Y.H; HYUN, J.O.; GOO JANG, H.J.O.; KIM, H.J.; LEE, K.S.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. **Journal Veterinary Science**, v.5, n.3, p.253-258, 2004.

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

LAFLEUR, M.V.M.; HOORWEG, J.J.; JOENJE, H.; WETMIJZE, E.J.; RETEL, J. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against single oxygen. **Free Radical Research**, London, v.21, p.9-17, 1994.

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

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

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

LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. **Reproduction Domestic Animal**, v.38, p.410-414, 2003.

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

MAHI, C. A.; YANAGIMACHI, R. Maturation and sperm penetration of 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 Zootécnica, Universidade Estadual Paulista, 2005.

MATTIOLI, M. The role of follicular cells in maturation, fertilizability and development competence of pig oocytes. In LAURIA, A. and GONDOLFI, F. **In Vitro approaches to mammalian gamete maturation and embryonic development**. Roma, Seronet, p. 19-28, 1989.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science**, Washington, v.220, p.472-477, 1983.

METCALFE, S.S. **Assisted Reproduction in the bitch**. 160f. Thesis (Master of Science) – Monash University, Victoria, Australia, 1999.

MOTLIK, J. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility** supplement; p.3817-25, 1989.

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

OLSON, P.N.; NETT, T. M. Reproductive endocrinology and physiology of the bitch. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology**. 2<sup>a</sup> Edição. Philadelphia: W. B. Saunders, p.453-457, 1986.

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

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

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

PERREAULT, S.D.; BARBEE, R.R.; SLOTT, V.I. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. **Development Biology**, v.125, p.181-186, 1988.

POPE, C.E.; SCHMID, R.; DRESSER, B.L. *In vitro* development of cat embryos produced by *in vitro* fertilization is enhanced by addition of cysteine to the maturation medium and a reduced O<sub>2</sub> atmosphere. **Theriogenology**, v.51, p.291, 1995.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHASTANT-MAILLARD, S. *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, n.130, p.193-201, 2005.

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

RODRIGUEZ-GONZÁLES, E.; LÓPEZ-BEJAR, M.; MERTENS, M.J.; PARAMIO, M.T.; Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.65, p.446-453, 2003.

ROOT-KUSTRITZ, M.V. Use of Commercial Luteinizing Hormone and Progesterone Assay Kits in Canine Breeding Management. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. (Eds) **Recent advances in small animal reproduction**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: <[www.ivis.org](http://www.ivis.org)>. Acesso 15 set. 2005.

SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAY, S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary cultura and in suspension. **Journal of Neurochemistry**, v.61, p.1667-1671, 1993.

SAINT-DIZIER, M.; SALOMON, J.F.; PETIT, C.; RENARD, J.P.; CHASTANT-MAILLARD, S. *In vitro* maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.147-150, 2001, supplement 57.

SALUSTRI, A.; HASCALL, V.C.; CAMAIONI, A.; YANAGISHITA, M. Oocyte granulosa cell interactions. In: ADASHI, E.Y.; LEUNG, P.C. **The Ovary**. New York: Raven Press, p. 687, 1993.

SHILLE, V. M. Fisiologia reprodutiva e endocrinologia da fêmea e do macho. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3ª Edição. São Paulo: Manole, v.4, p.1857-1869, 1992

SONGSASEN, N.; YU, I.; LEIBO, S.P. Effects of maturation media and oxygen concentration on nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.494, 2001.

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

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

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.

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

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.; KAWAKAMI, E.; ORIMA, H. Effects of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -analogue administration on luteal function, implantation of embryos and maintenance of pregnancy in bitches. JPN. **Journal Veterinary Science**, v.51, n.3, p.496-504, 1989.

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

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

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

YOSHIDA, M.; ISHIGALI, K.; PURSEL, V.G. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. **Biology of Reproduction**, v.49, p.89-94, 1993.

## APÊNDICES

**APÊNDICE 1 – MÉTODO DE COLORAÇÃO HARRIS-SHORR**

|                               |                    |
|-------------------------------|--------------------|
| 1. Solução álcool/éter 1:2    | 5 minutos          |
| 2. Álcool 70%                 | Mergulhar 10 vezes |
| 3. Álcool 50%                 | Mergulhar 10 vezes |
| 4. Água destilada             | Mergulhar 10 vezes |
| 5. Hematoxilina de Harris     | 2 minutos          |
| 6. Água destilada             | Mergulhar 2 vezes  |
| 7. Álcool Amoniacal           | 1 minuto           |
| 8. Água destilada             | Mergulhar 1 vezes  |
| 9. Álcool 70%                 | Passagem           |
| 10. Álcool 95%                | Passagem           |
| 11. Corante Shorr             | 2 minutos          |
| 12. Álcool 95%                | Passagem           |
| 13. Álcool Absoluto ou Etanol | Passagem           |

**APÊNDICE 2: CLASSIFICAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL SEGUNDO JOHNSTON et al. (2001)**

Proestro

No início do proestro podem ser encontradas células parabasais e intermediárias, as quais vão diminuindo à medida que o estro se aproxima, sendo substituídas por células superficiais.

Estro

Esta fase é caracterizada pelo predomínio de células superficiais nucleadas e anucleadas (90%).

**APÊNDICE 3: CLASSIFICAÇÃO DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO (COC) SEGUNDO HEWITT E ENGLAND (1997)**

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

**Grau II:** COC com o ooplasma levemente pigmentado com camadas de células do cumulus incompletas.

**Grau III:** COC com o ooplasma pálido, frequentemente disformes e sem células do cumulus.

**APÊNDICE 4 – MEIO DE LAVAGEM (5 ml)**

| <b>Solução Mãe TCM 199 - Hepes</b> | <b>5 mL</b> |
|------------------------------------|-------------|
| Água Milli-Q                       | 5 mL        |
| TCM 199                            | 0,0475g     |
| Bicarbonato de sódio               | 0,0021g     |
| Hepes sódico (10mM)                | 0,013g      |
| Hepes ácido (10mM)                 | 0,012g      |

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem e a água Milli-Q por último. Filtrar em membrana 0,22 $\mu$ m e armazenar em geladeira por até 7 dias.

| <b>Meio de Lavagem</b> | <b>5 mL</b> |
|------------------------|-------------|
| Solução Mãe TCM 199    | 5mL         |
| BSA                    | 0,015g      |
| Piruvato               | 10 $\mu$ L  |
| Amicacina              | 25 $\mu$ L  |

Filtrar em membrana 0,22 $\mu$ m e armazenar em geladeira por até 24h

**APÊNDICE 5: MEIO DE MATURAÇÃO PADRÃO TCM 199**

| <b>Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato</b> | <b>5 mL</b> |
|--|-------------|
| Água Milli-Q                           | 5 mL        |
| TCM 199                                | 0,0475g     |
| Bicarbonato de sódio (26mM)            | 0,011g      |

Esta solução deve ser mantida por 1 hora na estufa para estabilizar

| <b>Meio de Maturação</b>        | <b>5 mL</b>                |
|---------------------------------|----------------------------|
| Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato | 5 mL                       |
| BSA                             | 0,015g                     |
| Piruvato                        | 10 $\mu$ L                 |
| Amicacina                       | 25 $\mu$ L                 |
| FSH                             | 25 $\mu$ L (5 $\mu$ g/mL)  |
| LH                              | 10 $\mu$ L (10 $\mu$ g/mL) |

Filtrar em membrana 0,22  $\mu$ m e acrescentar o estradiol e a progesterona

Estradiol 17 $\beta$  10 $\mu$ L (2 $\mu$ g/mL)

Progesterona 10 $\mu$ L

**APÊNDICE 6: SOLUÇÃO DE HIALURONIDASE**

| <b>Hialuronidase a 0,2%</b> |       |
|-----------------------------|-------|
| PBS CA <sup>++</sup> free   | 10 mL |
| Álcool polivinílico (0,1%)  | 0,01g |
| Hialuronidase               | 0,02g |

**APÊNDICE 7: SOLUÇÃO DE FIXAÇÃO**

| <b>Paraformaldeído 4%</b> |        |
|---------------------------|--------|
| Paraformaldeído           | 400 µL |
| PBS                       | 10 ML  |

| <b>Solução de Triton</b> |       |
|--------------------------|-------|
| Triton                   | 10 µL |
| PBS                      | 1 mL  |