

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

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO IGF-I SOBRE A
MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS (*Canis
familiaris*): AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR E
CITOPLASMÁTICA**

Marco Antonio Machado

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP -
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Reprodução Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARCO ANTONIO MACHADO - natural de Londrina, Estado do Paraná, nascido em 28 de junho de 1963, é Médico Veterinário graduado pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no Rio Grande do Sul em 15 de julho de 1988. Entre 1989 e 1991 realizou Curso de Pós-Graduação em Sanidade Animal, em nível de Especialização, junto à Universidade Estadual de Londrina (UEL). Em 1991 foi contratado como Professor Universitário pela Universidade de Marília para lecionar as disciplinas de Patologias e Clínicas Médicas dos Monogástricos e dos Ruminantes. Durante o ano de 1992 atuou como docente temporário, através de concurso público, junto ao Departamento de Clínicas Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da UEL (CCA-UEL), ministrando as disciplinas de Obstetrícia Animal e Cirurgia I. Realizou o Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal, em nível de Mestrado junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) durante o período de 1993 a 1997. Desde março de 1993 é docente da Área de Obstetrícia Animal, atual Teriogenologia de Animais de Companhia, aprovado em concurso público, do Departamento de Clínicas Veterinárias do CCA-UEL. Em 2003 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal, em nível de Doutorado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal.

O INFINITO

**O infinito
É tão bonito
Para quem quer ver
E observar**

**A partir do Sol
Aí vem a lua
E as estrelas
Para enfeitar**

**Os homens da Terra
Com sua ciência
Querem com isto
Me tapear**

**Mas eu acredito
É no meu Jesus
É quem tem a luz
Para nos salvar**

**Ninguém aqui
Vai conseguir mudar
O que ele falou
Pode esperar**

**Pode ser em dois mil
Não sei quando é
Sei que vai pegar
Como pegou
No tempo de Noé**

**Todos estão avisados
Para não errar
Mas só acreditam
No que está errado**

Pad. Valdete

Ao Prof. Dr. **Gilson Hélio Toniollo** pela amizade, orientação e exemplo profissional.

Aos meus pais **Alcides** e **Leolfina** (*in memoriam*).

Aos meus irmãos e irmãs **Pedro, Leonice, Eunice, Elza, Maria Eugênia, Alice, Neiva, Cleonice, Francisco** e **José Luiz**. Especialmente ao Alcides "**Cidinho**" Aparecido Machado Filho pelo apoio constante na vida e nos estudos, fundamentais para a conclusão desta etapa acadêmica.

À **Rafaela** e **André**, pela benção de tê-los como meus filhos.

A estas pessoas *especiais* **DEDICO** este trabalho!

Deus é quem determina e é em *Deus* que eu tenho fé...

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa (Processo Fapesp nº 2005/51349-7).

Ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade.

Ao Setor de Reprodução e Obstetrícia Veterinária do Hospital Veterinário, em especial aos Residentes Médicos Veterinários que realizaram as cirurgias nas doadoras de ovários.

Ao Laboratório de Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da UNESP FCAV-Jaboticabal local de realização do experimento, especialmente à **Roberta** Vantini.

A todos docentes da área de Reprodução Animal do Departamento pela convivência amistosa e ensinamentos partilhados e à secretária Isabel Penariol pela atenção dispensada.

Aos colegas de pós-graduação pela convivência, amizade e companheirismo.

À doutoranda **Kellen** Souza (“irmãzinha”) cuja dedicação foi imprescindível para a conclusão dos trabalhos de laboratório.

Aos Professores Drs. **Gilson** H. Toniollo, **César** R. Esper, **Paulo** H. Franceschini, **Francisco** G. Leite e **Joaquim** M. Garcia membros da banca do exame de qualificação pelas valiosas contribuições na “pré-lavagem” desta tese.

À Universidade Estadual de Londrina pela liberação das atividades acadêmicas e aos colegas de Departamento de Clínicas Veterinárias que me estimularam a finalizar esta importante etapa da carreira docente.

Aos Professores Doutores. **Amauri** A. Alfieri, **Ana Paula** F.R.L. Bracarense, Ernst E. **Müller**, **Odilon** Vidoto e **Vanerli** Beloti, pelas disciplinas ministradas no Curso de Ciência Animal da UEL, importantes para a integralização dos créditos junto à UNESP.

À Professora. Dra. **Inês** C. D. B. Fonseca, do Departamento de Agronomia da UEL pelas sugestões, aconselhamentos no delineamento experimental e na estatística do projeto de pesquisa.

À minha namorada **Juliana** pelo amor e estímulo em todos os momentos.

AGRADEÇO de Coração!

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Fisiologia da Reprodução na Cadela.....	5
2.2 Maturação <i>In Vivo</i>	8
2.3 Complexo <i>Cumulus</i> Oócito.....	11
2.4 Meios de Transporte de Ovários e Colheita de Oócitos.....	12
2.5 Maturação <i>In Vitro</i>	15
2.6 Fatores de Crescimento.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Ovários e Oócitos.....	28
3.2 Maturação Oocitária.....	29
3.3 Coloração e Avaliação Nuclear.....	30
3.4 Coloração e Avaliação Citoplasmática.....	31
3.5 Análise Estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Avaliação dos Aspectos Gerais das Doadoras.....	32
4.1.1 Raça das Doadoras.....	32
4.1.2 Idade das Doadoras.....	33
4.1.3 Condição Reprodutiva das Doadoras.....	33
4.1.4 Fase do Ciclo Estral das Doadoras.....	34
4.1.5 Distribuição dos COCs Grau 1 para Avaliação Nuclear.....	34

4.2 Avaliação do Estádio de Maturação dos Oócitos.....	35
4.2.1 Vesícula Germinativa (VG).....	35
4.2.2 Quebra de Vesícula Germinativa (QVG).....	36
4.2.3 Final de Metáfase I (MI).....	37
4.2.4 Degenerados.....	39
4.3 Avaliação do Estádio de Maturação Citoplasmática.....	40
4.3.1 Distribuição dos COCs Grau 1 para Avaliação Citoplasmática..	42
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS.....	54
8. APÊNDICES.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AI.....	Anáfase I
AMPc.....	Adenosina monofosfato cíclico
bFGF.....	Fator de crescimento derivado do fibroblasto
BSA.....	Albumina sérica bovina
BWW.....	"Briggs-Whitten-Whittingham"
Cn.....	Grupo controle corado para núcleo
Cc+n.....	Grupo controle corado para citoplasma
COCs.....	Complexos <i>cumulus</i> oócitos
DME/F-12.....	"Dulbecco eagle" modificado/ nutrientes F-12 Ham
DNA.....	Ácido dextrorribonucleico
eCG.....	Gonadotrofina coriônica eqüina
Ec+n.....	Grupo com IGF-I corado para citoplasma
EGF.....	"Epidermal growth factor"
En.....	Grupo com IGF-I corado para núcleo
FF.....	Fluido folicular
FIV.....	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH.....	Hormônio folículo estimulante
hCG.....	Gonadotrofina coriônica humana
hIGF-I.....	IGF-I humano
IGF-I.....	Fator de crescimento derivado de insulina tipo I
IGF-II.....	Fator de crescimento derivado de insulina tipo II
LH.....	Hormônio luteinizante
MI.....	Metáfase I
MII.....	Metáfase II
MIV.....	Maturação <i>in vitro</i>
NaCl.....	Cloreto de sódio
NCSU.....	"North Carolina State University"
OSH.....	Ovario-histerectomia
PBS.....	Salina fosfato tamponada
PDGF.....	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PIV.....	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PVA.....	Álcool polivinílico
QVG.....	Quebra de vesícula germinativa
rIGF-I.....	IGF-I de origem murina
RNA.....	Ácido ribonucléico
SFB.....	Soro fetal bovino
SmC.....	Somatomedina
SOF.....	Fluído sintético tubárico
TALP.....	"Tyrode" modificada
TCM 199.....	Meio de cultivo de tecidos 199
TGF- α	Fator de crescimento de transformação- α
TGFBP.....	Proteína de ligação do TGF
TYH.....	Solução Krebs-Ringer bicarbonato
VG.....	Vesícula germinativa

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Complexos <i>cumulus</i> oócitos classificados como grau 1 selecionados para maturação <i>in vitro</i> . Jaboticabal-SP, 2007.....	29
Figura 2. Oócitos tratados com hialuronidase 0,2%, para a remoção das células do <i>cumulus</i> . Jaboticabal-SP, 2007.....	30
Figura 3. Fotomicrografia de oócito em estágio de vesícula germinativa (VG) corado com bis-benzimida (Hoechst 33342). Jaboticabal-SP, 2007.....	35
Figura 4. Distribuição dos oócitos encontrados em QVG (quebra de vesícula germinativa), após avaliação nuclear, nos grupos M0, C e E (Momento zero, Controle e Experimental) Jaboticabal-SP, 2007.....	36
Figura 5. Fotomicrografia de oócito em estágio de quebra de vesícula (QVG) corado com bis-benzimida (Hoechst 33342) Jaboticabal-SP, 2007.....	37
Figura 6. Oócitos em MI (metáfase I) após avaliação nuclear nos grupos. M0 (Momento zero); C (Controle) e (Experimental). Jaboticabal-SP, 2007.....	38
Figura 7. Fotomicrografia de oócito em estágio final de metáfase I (MI) corado com bis-benzimida (Hoechst 33342). Jaboticabal-SP, 2007.....	38
Figura 8. Frequência de oócitos degenerados após avaliação nuclear nos grupos M0 (momento zero), C (controle) e E (experimental) Jaboticabal-SP, 2007.....	39
Figura 9. Fotomicrografia de oócito degenerado corado com bis-benzimida (Hoechst 3342). Jaboticabal-SP, 2007.....	40
Figura 10. Fotomicrografias de oócitos corados com Lens culinaris para avaliação citoplasmática. (A) oócito com citoplasma imaturo, (B) oócito com citoplasma maturo. Jaboticabal-SP, 2007.....	41

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição de freqüências racial e individual dos complexos <i>cumulus</i> oócitos caninos (COCs). Jaboticabal-SP, 2007.....	32
Tabela 2. Distribuição de freqüências das doadoras e dos complexos <i>cumulus</i> oócitos caninos (COCs) por faixa etária. Jaboticabal-SP, 2007.....	33
Tabela 3. Distribuição de freqüências de condição reprodutiva dos complexos <i>cumulus</i> oócitos caninos (COCs). Jaboticabal-SP, 2007.....	33
Tabela 4. Distribuição de freqüências das doadoras e dos complexos <i>cumulus</i> oócitos (COCs) caninos nas diferentes fases do ciclo estral e piometra Jaboticabal-SP, 2007.....	34
Tabela 5. Distribuição de freqüências dos oócitos classificados como grau 1, avaliados pela coloração nuclear (bisbenzimidá)*, nos diferentes grupos experimentais de coloração. Jaboticabal-SP, 2007.....	34
Tabela 6. Distribuição de freqüências dos oócitos caninos em estágio de vesícula germinativa (VG) maturados <i>in vitro</i> entre os grupos experimentais. Jaboticabal-SP, 2007.....	35
Tabela 7. Distribuição de freqüências dos oócitos caninos em estágio de quebra de vesícula germinal (QVG) entre os grupos experimentais na maturação <i>in vitro</i> . Jaboticabal-SP, 2007.....	36
Tabela 8. Distribuição de freqüências dos oócitos caninos em estágio de metáfase I (MI) entre os grupos experimentais na maturação <i>in vitro</i> . Jaboticabal-SP, 2007.....	37
Tabela 9. Distribuição de freqüências dos oócitos caninos degenerados entre os grupos experimentais na maturação <i>in vitro</i> . Jaboticabal-SP, 2007.....	39
Tabela 10. Distribuição em números absolutos e relativos dos oócitos grau 1 corados para núcleo (n) e citoplasma (c+n) após maturação <i>in vitro</i> . Jaboticabal-SP, 2007.....	41
Tabela 11. Distribuição dos números absolutos e relativos dos oócitos avaliados para maturação citoplasmática. Jaboticabal-SP, 2007.....	42

EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO IGF-I SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS (*Canis familiaris*): AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA

RESUMO – A presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar os prováveis efeitos do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) sobre a maturação *in vitro* (MIV), nuclear e citoplasmática, de oócitos caninos retirados de ovários de cadelas. Os complexos *cumulus* oócitos (COCs) foram maturados *in vitro* em meio SOF (“synthetic oviductal fluid”). Foram utilizadas 40 cadelas submetidas ovario-histerectomias para esterilização cirúrgica ou para o tratamento de piometra. As doadoras foram classificadas em grupos conforme raça, faixa etária, condição reprodutiva e fase do ciclo estral. Os COCs (n=1474) foram liberados dos folículos pela técnica de fatiamento dos ovários e maturados por 72 horas, exceto o grupo M0 (momento zero). O meio de cultivo base, foi o SOF, suplementado ou não com o IGF-I. Foram selecionados apenas COCs classificados como grau 1 para a MIV. Os COCs foram distribuídos em três grupos:: M0 (processados no mesmo dia da colheita da mesma forma que os demais), C (SOF) and E (SOF + IGF-I). Após o período de incubação ou no dia da colheita (M0) os oócitos foram corados para avaliação da maturação nuclear com bis-benzimida (Hoechst 33342) e para a maturação citoplasmática com *Lens culinaris*. O percentual de COCs/doadora de todas fêmeas foi 35,21% para as fêmeas sem raça definida; 39,69% para adultas (>10 meses); 39,83% para multíparas, e 39,20% para aquelas fêmeas em diestro (P<0.05). O percentual de oócitos degenerados foi muito alto tanto na soma total (74.0%) quanto entre os grupos experimentais (M0=59.43; C=75.44; E=80.52%), sendo as diferenças estatisticamente significativas (P<0.05). Na maturação nuclear apenas 3,02% de todos os oócitos submetidos a esta avaliação atingiram o estágio de MI (M0=2,83%; C= 4,19%, e E=2,10). Da mesma forma que a retomada meiótica as taxas de maturação citoplasmática foram muito baixas, 15,83% no total e 12,90%; 25,58%, e 8,69% respectivamente para os grupos M0, C, e E. Estes resultados indicam que a suplementação ou não do meio SOF para a maturação nuclear e/ou citoplasmática não melhorou as taxas de MIV nos oócitos caninos. Fêmeas sem raça definida, adultas, multíparas e em diestro forneceram mais COCs grau 1. Portanto, mais estudos são necessários para determinar os componentes que faltam ou aqueles que sejam nocivos aos COCs caninos nos diferentes meios de cultivo, bem como as necessidades metabólicas da MIV nesta espécie. Estas informações contribuirão para a otimização dos protocolos de MIV, etapa fundamental para a fecundação e produção *in vitro* de embriões, importantes para a aplicação das biotecnologias da espécie canina em canídeos selvagens.

Palavras-Chave: Oócito, IVM, IGF-I, SOF, cadela, maturação nuclear e citoplasmática

EFFECT OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I (IGF-I) ON IN VITRO MATURATION OF CANINE OOCYTES (*Canis familiaris*): CYTOPLASMIC AND NUCLEAR ASSESS

SUMMARY – This study was performed to identify the possible effects of insulin-like growth factor-i (IGF-I) on in vitro maturation (IVM) evaluated by nuclear and cytoplasmic of bitch cumulus oocyte complexes (COCs) matured *in vitro* in synthetic oviductal fluid (SOF) medium. For this purpose ovaries were collected from 40 bitches undergoing ovariohysterectomy for neutering or due to pyometra. The donors females were classified into groups based on breed, age, reproductive status and stage of the estrous cycle. The COCs (n=1474) were released from the follicles by slicing the ovaries and matured *in vitro* for 72 hours in the base culture medium SOF supplemented or no with IGF-I. Only grade 1 COCs were used for IVM, and were divided into three groups: M0 (zero collection time), C (SOF) and E (SOF + IGF-I). After incubation period, the maturation of the nucleus was examined by staining the oocytes with Hoechst 33342 and the cytoplasmic maturation by means of *Lens culinaris* agglutinin. The M0 group also was examined to cytoplasmic and nuclear maturation with the same staining dyes. From all females donors were collected 35.21, 39.69, 39.83 and 39.2% COCs per bitch were collected from mongrel, adult (>10 months), multiparous, and diestrus females, respectively ($P<0.05$). The percentage of degenerated oocytes was very high in the total sum (74.0%) and amongst experimental groups (M0=59.43; C=75.44; E=80.52%) with significant statistical differences ($P<0.05$) between them. And from all groups only 3.02% oocytes reached MI (M0= 2.83; C=4.19; E=2.10%). Alike nuclear meiotic resumption the cytoplasmic maturation rates were low, 15.83% in the total and 12.90 (M0); 25.58 (C); E (8.69%). In conclusion, these results indicate that supplementation of SOF or the medium alone either to nuclear or/and cytoplasmic maturation does not increase the rate of IVM canine oocytes. However, in the mongrel, adult, multiparous and diestrus bitches were obtained more grade 1 COCs. Hence, more studies are necessities in order to determining lack components or deleterious to the canine COCs in different culture media as well as metabolic needs in the IVM. This knowledge will enable the MIV protocols, fundamental step to *in vitro* fecundation and embryo production, essential to application of canine biotechnologies to non-domestic canine species.

Key-words: Oocyte, IVM, IGF-I, SOF, bitch, nuclear and cytoplasmic maturation

1. INTRODUÇÃO

A maturação de oócitos *in vitro* é um complexo mecanismo na qual são realizadas tentativas de se reproduzir as condições observadas no folículo ovariano pré-ovulatório e na tuba uterina. As pesquisas nesta área do conhecimento representam potenciais contribuições para o estudo dos mecanismos básicos envolvidos na maturação e na interação entre os gametas. As biotécnicas da reprodução empregadas em animais de companhia podem ser adaptadas aos carnívoros não domésticos para a melhoria do desempenho reprodutivo, e para os estudos de conservação da biodiversidade (LUVONI, 2000).

Apesar da maturação *in vitro* ser útil para o estudo da fisiologia do oócito e potencialmente poder ser extrapolada às espécies filogeneticamente relacionadas, sua eficiência na cadela continua sendo baixa quando comparada às outras espécies domésticas. As taxas de maturação descritas por FARSTAD (2000) variam de 0 a 58% para retomada da meiose, e em média 20% para metáfase II (MII).

Estes baixos índices de maturação podem ser explicados pela baixa competência meiótica dos oócitos em função das características do ciclo estral da espécie e também pela ineficiência dos meios de maturação *in vitro* (WILLINGHAM-ROCKY *et al.*, 2003).

Os cães (*Canis familiaris*) diferem consideravelmente de outras espécies em sua fisiologia da reprodução. Para os canídeos o processo de maturação continua após a ovulação (YAMADA *et al.*, 1992; OLSON *et al.*, 1999).

O desenvolvimento do oócito *in vivo* necessita de um período de 72 horas para retomada da meiose e progressão até MII, incluindo a maturação e fertilização dos oócitos dentro da tuba uterina (TSUTSUI, 1989; YAMADA *et al.*, 1992).

In vivo os oócitos permanecem viáveis por um período superior a

96 horas, e as condições ideais para a maturação *in vitro* podem diferir de outros mamíferos que ovulam oócitos na MII da primeira divisão meiótica (CONCANNON *et al.*, 1989; HEWITT & ENGLAND, 1997,1999b; OTOI *et al.*, 2000).

O oócito canino é ovulado com a vesícula germinal intacta, sendo que o primeiro corpúsculo polar não é liberado e a primeira divisão meiótica não é completada em pelo menos 48 horas após a ovulação (HOLST & PHEMISTER, 1971; NICKSON *et al.*, 1993; HEWITT & ENGLAND, 1999a).

O processo de maturação nuclear do oócito compreende o término da primeira redução meiótica, incluindo as fases desde a progressão de diplótene da primeira prófase meiótica até MII. *In vivo*, esse processo tem início simultaneamente com o pico pré-ovulatório de LH e, *in vitro*, com a retirada do oócito do ambiente folicular em outros mamíferos (OTOI *et al.*, 2000; HEWITT & ENGLAND, 1997,1998a).

Exceto para a cadela e para canídeos selvagens a maturação meiótica refere-se ao processo de conversão dos oócitos completamente crescidos, dos folículos antrais, em oócitos não fertilizados antes da ovulação, seguido da estimulação por gonadotrofinas Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e LH. O processo envolve a progressão nuclear de dictiatio (diplótene) da primeira prófase meiótica (MI) até a MII, e alterações meióticas para ativação do oócito na fertilização (STABENFELDT & SHILLE, 1977; HUNTER, 1980). Portanto, a maturação meiótica (nuclear), e a maturação das demais organelas celulares (citoplasmática) são condições essenciais para que ocorra a fertilização do oócito e desenvolvimento inicial dos embriões (LUVONI, 2000).

Conceitualmente o controle endócrino da função ovariana foi ampliado para um sistema regulatório mais complexo, incluindo mecanismos modulatórios parácrino e autócrino. Nesse sistema estão os fatores de crescimento peptídeos, as prostaglandinas, os hormônios (LH, FSH, Prolactina), o hormônio do crescimento e a ocitocina (TSAFRIRI & ADASHI, 1994).

Em estudos de maturação e fecundação *in vitro* diversos

protocolos foram propostos com resultados semelhantes. As pesquisas conduzidas com a espécie canina utilizam meios de cultivo bastante semelhantes aos empregados nas demais espécies, com mínimas adaptações. O conhecimento da regulação do crescimento folicular e da maturação oocitária são importantes para o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de novas biotecnologias como a fertilização *in vitro* e a transferência de núcleo. A capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário dependem da maturação nuclear e citoplasmática do oócito (LORENZO *et al.*, 2002), e entre os fatores que podem influenciar a maturação oocitária estão a atmosfera gasosa, meio de cultivo, temperatura, suplementação protéica e fatores de crescimento.

Considerando-se as particularidades conhecidas da fisiologia reprodutiva da fêmea canina, a utilização de meios com as características semelhantes ao meio tubárico favoreceriam a melhoria dos resultados. Assim, o meio fluido sintético de tuba uterina (SOF), inicialmente modificado, desenvolvido para ovinos e bovinos pode ser utilizado para maturação *in vitro* de oócitos caninos (DURRANT *et al.*, 1998; HEWITT & ENGLAND, 1999b; BOLAMBA *et al.*, 2002).

Oócitos podem ser colhidos de folículos antrais e pré-antrais. Diferentes trabalhos têm estudado a adição de soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA), como fontes proteicas, na maturação destes oócitos. Na utilização de folículos a utilização do meio SOF foi proposta como uma alternativa para a maturação de oócitos caninos daqueles folículos (DURRANT *et al.*, 1998; BOLAMBA *et al.*, 1998, 2002)..

Vários métodos têm sido utilizados para aumentar a taxa de maturação, como a adição de fatores de crescimento, SFB, soro de fêmea em estro, hormônios e fluido folicular (FF) ao meio de cultivo, e ainda co-cultivo com células do cumulus e células da granulosa, entretanto estas condições não são similares às aquelas apresentadas *in vivo* (BOLAMBA *et al.*, 1998).

Os estudos sobre a maturação de oócitos e conseqüentemente sobre a fecundação *in vitro* (FIV) e produção *in vitro* de embriões (PIV) na

espécie canina representam uma valiosa contribuição para a melhoria dos índices de desenvolvimento embrionário nesta espécie, e também para os canídeos em vias de extinção, portanto vem despertando o interesse da comunidade científica nos últimos anos.

Desta forma a pesquisa produz conhecimentos que potencialmente contribuem para a elucidação de aspectos pertinentes aos complexos mecanismos da fisiologia da maturação e fecundação dos oócitos, bem como podem subsidiar outras pesquisas nas áreas de biotecnologia da reprodução em canídeos domésticos e selvagens.

Tendo em vista a necessidade de aprofundar conhecimentos sobre a biologia da reprodução na espécie canina, este trabalho objetivou estudar o efeito do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) adicionado ao meio SOF, sobre a cinética da maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos caninos maturados por um período de 72 horas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia da Reprodução na Cadela

Diferentemente das demais espécies os canídeos, em especial os cães (*Canis familiaris*), apresentam algumas particularidades em sua fisiologia da reprodução. Os canídeos são monoéstricos, embora na maioria das raças de cães a sazonalidade não seja óbvia, exceto para a raça Basenji, cujas fêmeas apresentam estro no outono. Na cadela, cada fase do ciclo estral é longa, quando comparadas aos animais de produção, sendo que o proestro e estro duram em média nove dias, o diestro 75 dias e o anestro em torno de 125 dias (CONCANNON, 1989).

Embriologicamente o ovário desenvolve-se a partir de um espessamento da porção ventral do ducto mesonéfrico, descrito como prega genital. As células germinativas produzidas no saco vitelínico migram e colonizam as gônadas indiferenciadas. Aquelas células são chamadas de oogônias, após a colonização e diferenciação de gônada indiferenciada para ovário, dando início ao processo de multiplicação mitótica das células somáticas e germinativas (AUSTIN & SHORT, 1982; NODEN & DE LAHUNTA, 1990). O ovário é revestido pela túnica albugínea recoberta pelo epitélio germinativo e é dividido em uma porção medular e outra cortical. O compartimento medular possui tecido conjuntivo fibroelástico, nervos e vasos. Exceto para a égua, as diferentes estruturas de desenvolvimento do folículo, incluindo formas atrésicas, corpos hemorrágicos, corpos lúteos e *corpus albicans* são encontradas no córtex ovariano (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

Os ovários dos mamíferos exercem funções exócrinas, a liberação de gametas, e endócrinas, a produção de estrógeno, progesterona, ocitocina, relaxina, inibina e ativina (TSAFRIRI & ADASHI, 1994).

Os folículos são as unidades funcionais dos ovários, proporcionando um microambiente para o crescimento e para a maturação do oócito, e também produzem hormônios esteróides e peptídicos. Nestes as

células somáticas, células da granulosa e da teca, mantém os oócitos até seu crescimento máximo. Segundo GORE-LANGTON & ARMSTRONG (1994); TSAFRIRI & ADASHI, 1994, as células somáticas provavelmente iniciam o processo de crescimento da célula germinativa. O crescimento folicular e proliferação das células da granulosa podem ser iniciados pelos próprios oócitos ou pelos fatores ovarianos independentemente das influências hormonais, conforme ZHOU *et al.* (1991).

As células somáticas presentes no folículo são responsáveis pela nutrição do oócito e regulam a maturação nuclear e citoplasmática dos folículos selecionados para ovulação, e também participam da atresia daqueles que não são selecionados. Em parte estas alterações são induzidas pelos produtos secretados por aquelas células no fluido folicular que permeia o oócito. Por outro, lado as projeções celulares ("gap junctions") do *cumulus* se comunicam diretamente com o citoplasma do oócito promovendo a transferência dos nutrientes e demais fatores modulatórios (GORE-LANGTON & ARMSTRONG, 1994).

Estruturalmente os oócitos são compostos de núcleo (vesícula germinativa), nucléolo, mitocôndrias, complexo de Golgi, grânulos corticais, ribossomos, fibrilas citoplasmáticas e zona pelúcida. Junções comunicantes são observadas entre o oócito e as células da granulosa, que formam a *corona radiata*, estabelecidas antes mesmo da formação da zona pelúcida e, são responsáveis pela nutrição do oócito. A zona pelúcida, de natureza glicoproteica possui origem controversa entre as diversas espécies animais, podendo ser derivada das células foliculares ou do oócito ou mesmo de ambas estruturas (GREENWALD & TERRANOVA, 1988).

Em cadelas a produção de oócitos a partir das células primordiais pode ocorrer após o nascimento, em até dois meses. Os folículos primordiais podem ser observados no córtex ovariano em três semanas e a foliculogênese pode ocorrer em até três meses após o nascimento (ANDERSEN & SIMPSON, 1973, citados por McDOUGALL *et al.*, 1997).

O desenvolvimento folicular com o primeiro estro e ovulação, aparentemente têm início abrupto, sem ondas anovulatórias de crescimento folicular. Para STABENFELDT & SHILLE (1977) provavelmente ocorra após a puberdade. Segundo CONCANNON (2003), não existe uma concordância sobre o processo ovulatório, que ocorre em sincronia durante um período de 12 horas durante o estro.

A ovulação ocorre espontaneamente em um a dois dias após a descarga pré-ovulatória de LH no início do estro, e transcorre em um intervalo de poucas horas. Os folículos ovarianos luteinizam antes da ovulação, expondo os oócitos a altas concentrações de progesterona, situação oposta às muitas outras espécies domésticas, onde o estrógeno predomina no ambiente folicular preovulatório (STABENFELDT & SHILLE, 1977; FARSTAD, 2000).

Para HOLST & PHEMISTER (1971); CONCANNON (2003) os oócitos são ovulados em um ou dois dias após o início do estro, em uma forma imatura, e a formação do corpúsculo polar foi detectada na porção distal da tuba uterina após três dias da cobertura. HOLST & PHEMISTER (1971) observaram que o diâmetro do oócito canino, entre 118 a 135 μm , é semelhante aos de outras espécies domésticas, entre 120 a 180 μm . Ainda segundo esta pesquisa a penetração dos espermatozóides ocorreria durante a primeira divisão de maturação com a presença regular destes antes de se completar a segunda divisão. Aqueles oócitos ovulados sob uma forma imatura dispõe de um período de tempo de alguns dias entre a ovulação, fertilização, formação dos pronúcleos e clivagem para sua maturação.

Segundo YAMADA (1992) os oócitos ovulados permanecem férteis por até 108 horas, apresentando a vesícula germinativa (vg) e a primeira divisão meiótica incompleta pelo menos em até 48 horas após a ovulação. Os espermatozóides caninos podem permanecer viáveis no trato genital feminino por até 268 horas após a cobertura.

O oócito é ovulado no início da MI, portanto, nos canídeos os oócitos são ovulados como oócitos primários e a ruptura da vesícula germinativa ocorre logo após a ovulação. Foi demonstrado por HYTTEL *et al.* (1990) que em oócitos de raposa o núcleo torna-se periférico e que a expansão do *cumulus* ocorre antes da ovulação, ou seja, dois dias após a descarga do LH. Ainda naquela espécie os pesquisadores observaram a quebra da vesícula germinativa, a MI e a perda de contato juncional com as células da granulosa em três dias após o aparecimento do LH. A formação do primeiro corpúsculo polar e

a MII em três dias após a ovulação. A completa maturação daquelas células foi observada no quinto dia, e a degeneração no sexto dia pós-LH.

Por outro lado, no trato genital da cadela o espermatozóide pode manter-se viável por até 6 dias após a cobertura e pode penetrar oócitos imaturos (HEWITT & ENGLAND, 1998b). Conforme relatado por YAMADA *et al.* (1992) os espermatozóides podem permanecer viáveis por até 268 horas.

2.2 Maturação *In Vivo*

Para a maioria das espécies domésticas a maturação dos oócitos é um longo processo no qual concorrem vários fatores. Iniciando-se com a oogônia no ovário fetal até o final da maturação oocitária, na ovulação. Quando retirados dos folículos e maturados *in vitro* os oócitos da maioria dos mamíferos sofre maturação espontânea. Segundo HUNTER (1980) a maturação oocitária é dividida em quatro fases: pré-natal, dictiatio ou parada nuclear, crescimento citoplasmático e retomada da meiose.

A produção de oócitos primários é completada até o nascimento em função das ondas de mitose que provocam a proliferação das oogônias, com posterior meiose e atresia observadas mesmo durante a vida intra-uterina. Com o início da meiose todas as oogônias são transformadas em oócitos. Os folículos primários são envoltos por uma camada de células da granulosa que adquirem mais camadas na medida em que a maturação progride (McDOUGALL *et al.*, 1997).

O folículo passa a ser secundário quando as divisões celulares resultam em duas ou mais camadas de células da granulosa e ainda não apresenta o antro ou cavidade. O oócito dentro deste folículo apresenta-se envolto por uma camada glicoproteica, a zona pelúcida. A formação da zona pelúcida e a participação das células somáticas são dois processos essenciais para garantir a funcionalidade do gameta feminino (HUNTER, 1980).

O folículo é chamado de terciário ou antral quando possui camadas de células da granulosa e a camada da teca, originadas do estroma ovariano,

que delinea e separa o folículo dos demais. Com o início da formação do antro a teca sofre diferenciação em duas estruturas vascularizadas, sendo a interna com múltiplas camadas de células que sob a influência do LH secretam andrógenos, e a externa composta de tecido conjuntivo frouxo com função de suporte ao folículo. O estímulo gonadotrófico promove a multiplicação das células da granulosa e a secreção de fluido folicular que se acumula e expande o antro. Neste processo o oócito é circundado por células da granulosa, formando o *cumulus*-oócito, que permanecem com o oócito após a ovulação. A primeira divisão meiótica iniciada na vida fetal continua até diplóteno ou paquíteno quando é parada com a cromatina arranjada ao redor do nucléolo em um grande núcleo ou vesícula germinativa (vg) (GREENWALD & ROY (1994); HAFEZ & HAFEZ (2000)).

Para a maioria dos animais domésticos o processo de maturação nuclear de oócito compreende o término da primeira redução meiótica, incluindo as fases de diplóteno da primeira prófase meiótica até MII. *In vivo*, esse processo é sincronizado com a descarga pré-ovulatória de LH e, *in vitro*, com a retirada do oócito do ambiente folicular (HOLST & PHEMISTER, 1971; WASSARMAN & ALBERTINI, 1994).

Exceto para canídeos a maturação meiótica refere-se ao processo de conversão dos oócitos completamente crescidos, dos folículos antrais, em oócitos não fertilizados antes da ovulação, seguido da estimulação por gonadotrofinas, FSH e LH. O processo envolve a progressão nuclear de dictiatio (diplotene) da primeira prófase meiótica (MI) até a MII, e alterações meióticas para ativação do oócito na fertilização. Portanto, a maturação meiótica (nuclear), e a maturação das demais organelas celulares (citoplasmática) são condições essenciais para que ocorra a fertilização do oócito e desenvolvimento inicial dos embriões. O núcleo do oócito primário permanece nesta condição invariável até a atresia ou retomada da meiose, em diacinese, em resposta aos hormônios gonadotróficos se estiver em um folículo terciário saudável. A meiose progride para metáfase, anáfase e telófase, com a formação do primeiro corpúsculo polar e arranjos cromossômicos em metáfase do segundo fuso meiótico. Os conjuntos

cumulus-oócitos (COCs) são ovulados nesta fase, descrita como a mesma do oócito secundário, para a maioria dos mamíferos (WASSARMAN & ALBERTINI, 1994).

Na maioria dos mamíferos o oócito é ovulado ao atingir a metáfase da segunda divisão meiótica (MII). Esta é a segunda etapa de uma parada de desenvolvimento temporário. A segunda maturação meiótica só prossegue após a penetração do oócito pelo espermatozóide. As demais etapas de maturação ocorrem na tuba uterina e demoram 2 a 3 dias. Na ovulação as células do *cumulus* ao redor do oócito são compactas e possuem múltiplas camadas, e o ooplasma é escuro devido ao alto conteúdo de lipídeo. A expansão do *cumulus* é observada com a maturação do oócito, entretanto, as camadas mais internas das células do *cumulus* permanecem ligadas ao oócito até a fase de mórula (AUSTIN & SHORT, 1982; FARSTAD, 2000; KIM *et al.*, 2004).

As características dos oócitos na ovulação e a persistência das células do *cumulus* durante o transporte e a maturação nas tubas uterinas podem explicar os baixos resultados da maturação oocitária na espécie canina (KIM *et al.* 2004)

Para maioria das espécies mamíferas, o oócito completa sua primeira divisão meiótica no folículo preovulatorio. O oócito canino é ovulado no estágio dictioto, ou seja, a vesícula germinativa está intacta, o primeiro corpúsculo polar não é liberado e a primeira divisão meiótica não é completada em pelo menos 48 a 60 horas após a ovulação. Portanto, para os canídeos o processo continua após a ovulação (YAMADA *et al.*, 1992; OLSON *et al.* 1999).

Os oócitos caninos não são fertilizáveis até cerca de 60 horas após a ovulação, apesar de poderem ser penetrados logo após a ovulação, sugerindo que o bloqueio à polispermia pode ocorrer antes da maturação ser completada (TSUTSUI, 1989; CONCANNON *et al.*, 1989; RENTON *et al.*, 1991; HAY *et al.*, 1997; DURRANT *et al.*, 1998; HEWITT & ENGLAND, 1998b,1999; BOLAMBA *et al.* 1998, 2002). Para que os oócitos atinjam o estágio de MII é necessária a interação de diversos fatores. *In vivo* a sinalização via esteróides modula a síntese protéica envolvida no processo de maturação oocitária.

2.3 Complexos *Cumulus* Oócitos

Os complexos *cumulus* oócitos (COCs) podem ser classificados em três graus distintos, conforme proposto por HEWITT & ENGLAND (1999):

Grau 1: pigmentação escura e com uma ou mais camadas completas de células do *cumulus*, compactas;

Grau 2: pigmentação clara, com camadas incompletas de células do *cumulus*;

Grau 3: coloração pálida, sem formato definido, incompleta camada de células do *cumulus*; São oócitos considerados degenerados.

A morfologia dos COCs e o diâmetro do oócito são parâmetros utilizados para inferir sobre a competência de maturação. Objetivando melhores resultados na maturação *in vitro* recomenda-se apenas a seleção de COCs de grau 1, selecionados para maturação *in vitro* (GREENWALD & TERRANOVA, 1988; YAMADA *et al.*, 1992; HEWITT & ENGLAND, 1997, 1998a). Alguns grupos de pesquisa recomendam para os protocolos de maturação *in vitro* a utilização de oócitos com diâmetro aproximado de 100µm, contendo ooplasma escuro circundado por massa espessa e bem formada de células do *cumulus* (HYTTEL & MADSEN, 1987; CHERR *et al.*, 1988).

Para OTOI *et al.* (2001) as fases do ciclo estral exercem influência sobre o diâmetro médio dos oócitos. Os autores encontraram diâmetro médio >120µ dos ovários oriundos da fase folicular, quando comparados às outras fases. Também observaram um maior percentual de oócitos colhidos no diestro, quando comparados ao anestro. Apesar da maior frequência de MII observada naqueles oócitos de maior diâmetro, colhidos na fase folicular, não foram observadas diferenças entre as frequências de maturação entre as demais fases estudadas. Os ovários em diestro forneceram oócitos com maiores diâmetros, quando comparados aos ovários em anestro.

2.4 Meios de Transporte de Ovários e Colheita de Oócitos

Quando retirados do organismo vivo os ovários necessitam de condições adequadas para serem mantidos. Diversos meios de preservação e transporte são descritos, entre eles a NaCl 0,9% aquecida entre 35°C e 39 °C ou refrigerada a 4 °C, salina tamponada (PBS) e meio 199 com hepes e BSA suplementados ou não com antibióticos e antimicóticos (NICKSON *et al.* 1993; HAY *et al.* 1997; HEWITT & ENGLAND, 1999a,b; FUJII *et al.*, 1999; LORENZO *et al.* 2002; CUI *et al.* 2006).

Para a lavagem dos ovários, bem como a colheita dos oócitos, várias técnicas foram testadas em diversos experimentos.

YAMADA *et al.* (1992) descreveram a lavagem dos ovários com salina suplementada com gentamicina a 37°C e manutenção dos oócitos retirados por punção de folículos antrais em meio TYH (solução Krebs-Ringer bicarbonato modificada) com 10% de soro fetal bovino inativado e sulfato de gentamicina.

OTOI *et al.* (2001) utilizaram o PBS modificado suplementado com gentamicina para a lavagem dos ovários e colheita dos oócitos retirados por fatiamento em temperatura ambiente.

Os COCs foram lavados e mantidos em meio TCM 199 com sais de Earle, Hepes, BSA e sulfato de gentamicina, fatiamento em PBS com gentamicina por FUJII *et al.* (2000).

Os ovários foram fatiados em PBS com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) por NICKSON *et al.* (1993).

A lavagem e o fatiamento dos ovários em TCM 199 com sais Earle, Hepes, penicilina, sulfato de estreptomicina e bicarbonato de sódio foram empregadas nos trabalhos de HEWITT & ENGLAND (1997,1998a), e DURRANT *et al.* (1998).

O PBS com 0,4% de BSA foi utilizado por OTOI *et al.* (2000), para a lavagem dos ovários e obtenção dos oócitos.

Os ovários foram fatiados e os COCs foram mantidos em TCM 199 com 20% soro fetal bovino inativado, penicilina, estreptomicina e bicarbonato de sódio nos estudos de HEWITT & ENGLAND (1999).

Para YAMADA (1993) os oócitos demonstram competência meiótica quando colhidos diretamente de folículos pré-ovulatórios, sugerindo que os eventos de maturação ocorrem no folículo, embora não a retomada da meiose.

É possível utilizar alternativamente soluções de digestão como, por exemplo, meio BWB ("Biggers-Whitten-Whittingham") modificado sem BSA contendo colagenase e Dnase durante 1 hora a 37°C para fragmentos ovarianos (1-2mm) (DURRANT *et al.*, 1998; BOLAMBA *et al.*, 1998,2002,2006).

DURRANT *et al.* (1998) compararam três protocolos de digestão para recuperação de folículos de tecido ovariano: digestão e isolamento dos folículos em até três horas da colheita dos ovários; estocagem a 4°C por um período de 18 a 24 horas antes do processamento, e a digestão dos ovários no mesmo dia da colheita com incubação a 4°C por 18 horas antes do isolamento dos folículos. O protocolo de digestão seguido de refrigeração a 4°C apresentou a menor porcentagem de oócitos degenerados, porém com folículos apresentando oócitos com camadas de células da granulosa danificadas ou ausentes. A refrigeração seguida de digestão alterou as células da granulosa, mas não os oócitos sensíveis ao dano enzimático.

Baseado na observação de que os oócitos recém-ovulados, ainda com vesícula germinativa intacta, necessitam pelo menos 48 horas para completar a MI, recentes pesquisas estabeleceram 72 horas como o período de maturação ideal para cães (OTOI *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2004; ROTA & CABIANCA, 2004).

YAMADA *et al.* (1992) compararam os tempos 0, 24, 48 e 72 horas de maturação, sendo que neste último foi observado o maior percentual (31,9%) de oócitos atingindo metáfase II.

BOLAMBA *et al.* (1998) compararam aqueles mesmos tempos na maturação de oócitos obtidos da colheita de folículos e observaram uma tendência de aumento nos percentuais das células em MI e MII em 48 horas e 72 horas de maturação. Em outra pesquisa, BOLAMBA *et al.* (2002) avaliaram a maturação de oócitos obtidos de cultivo de folículos em meio SOF modificado. Os autores demonstraram um aumento percentual dos oócitos atingindo MI a MII diretamente proporcional ao tempo de maturação e que nos grupos que foram adicionados soros (BSA e FBS) o aumento naquele percentual foi estatisticamente demonstrado após 72 horas.

HEWITT & ENGLAND (1999b), pesquisando o efeito do SOF e da adição de células epiteliais tubáricas sobre a maturação *in vitro*, avaliaram os tempos 48 e 96 horas e demonstraram que o cultivo de oócitos em meio SOF não apresentou efeito sobre a proporção de oócitos em quebra de vesícula germinativa (QVG) após 48 horas, mas apresentou efeito positivo sobre a proporção de oócitos com QVG após 96 horas. Segundo os pesquisadores o efeito é atribuído às concentrações de BSA testadas nos tratamentos com SOF e não a diferença entre o SOF e o controle. No experimento com células tubáricas ficou evidenciado que não houve efeito positivo sobre a proporção de oócitos em quebra de vesícula em nenhum dos tempos testados. Por outro lado, as células tubáricas demonstraram um efeito sobre a proporção de oócitos em MII após 96 horas. A diferença observada foi atribuída à inclusão de BSA nos tratamentos. Para VG o cultivo por 48 horas apresentou uma boa proporção de oócitos em QVG, e baixas percentagens de oócitos em MII. Por outro lado, em 96 horas apresentou maiores proporções de oócitos em QVG e baixas proporções de oócitos em MII.

2.5 Maturação *In Vitro*

Em estudos de maturação e fecundação *in vitro*, diversos protocolos propostos especialmente para bovinos e suínos foram adaptados

para caninos, com menores taxas quando comparadas às demais espécies. As pesquisas conduzidas com a espécie canina apresentam resultados contraditórios com taxas de maturação entre zero e 58% para oócitos maturando até metáfase II. Em diferentes meios de cultivo a maturação para metáfase II está em torno de 20% (FARSTAD, 2000).

A maioria dos estudos de maturação de oócitos em cães utiliza o meio de cultivo de tecidos (TCM 199), modificado ou não, sob condições de temperatura e umidade variáveis (THEISS, 1997; HEWITT & ENGLAND, 1997,1998a,b ; KIM *et al.*, 2004).

Além do TCM são descritos o TYH (YAMADA *et al.*, 1992) e a mistura do meio Dulbecco Eagle modificado com o meio de Ham F12 (DME/F-12), descrita por BOLAMBA *et al.* (2002, 2006).

O meio TCM 199 além de modificado pode ser suplementado com esteróides e outras substâncias que favoreçam o desenvolvimento oocitário, tais como soro fetal bovino (SFB) e BSA. Segundo BOLAMBA *et al.* (2002) o emprego destas substâncias aumenta a sobrevivência dos oócitos em cultura, pois suporta a maturação e a conseqüente fecundação à medida que previne alterações desfavoráveis da zona pelúcida e favorece a aderência das células do *cumulus* ao oócito.

Em cães, várias concentrações de soro foram adicionadas ao meio TCM 199, tais como 10% de soro de cadelas em estro no (HEWITT & ENGLAND, 1997) e 5% de soro fetal bovino suplementado com antibiótico e 0,3% de BSA (OTOI *et al.*, 2000; HEWITT & ENGLAND, 1997).

HEWITT *et al.* (1995) avaliaram a influência de diferentes concentrações (5, 10 e 20%) de soro de cadelas em anestro, estro e diestro na maturação oocitária *in vitro*. Em função da maior concentração de estrógeno e progesterona do soro de cadelas em estro, maior proporção de oócitos retomou a meiose até estágios de metáfase I e II. A adição de hormônios ao meio de cultivo para a maturação pode ser usada para mimetizar os eventos pré-

ovulatórios *in vivo*, empregando-se soro de cadelas em estro na concentração de 10%.

Em outra pesquisa, HEWITT *et al.* (1998) na tentativa de verificar as melhores condições de cultivo de oócitos caninos, compararam as taxas de maturação de oócitos cultivados em diferentes protocolos, variando essencialmente o tipo e a concentração de substâncias suplementadas ao meio de maturação padrão TCM 199 (5%, 10% e 20% de SFB; 0,3% e 4% de BSA). Como conclusão, verificaram que a suplementação com 5% SFB era inadequada, resultando em alta taxa de oócitos degenerados e que 0,3% de BSA era o tratamento ótimo para maturação até metáfase I, anáfase I e metáfase II, durante 48 horas de cultivo. Ainda, segundo os autores, a suplementação com 20% de soro fetal bovino favoreceria a maturação até 96 horas, portanto, sugeriram a troca dos meios após 48 horas de cultura com o objetivo de aumentar a taxa de maturação, pois reforçam a idéia de que o SFB era indicado para evitar o “endurecimento” da zona pelúcida.

Na espécie canina os níveis hormonais circulantes são característicos durante o estágio de maturação oocitária na qual ocorre o fenômeno de luteinização pré-ovulatória. Desta forma, os oócitos em estágio de vesícula germinativa estão sob ação de níveis decrescentes de estrógenos e progressivos de progesterona (CONCANNON *et al.*, 1989; RENTON *et al.*, 1991; HEWITT & ENGLAND, 1997).

Em um estudo conduzido por YAMADA *et al.* (1992), utilizou-se a suplementação hormonal, no qual fêmeas foram submetidas a protocolos de superovulação, para posterior maturação *in vitro* de oócitos puncionados de folículos pré-ovulatórios. Neste trabalho os autores observaram metáfase II em 9,1% dos oócitos após 24 horas de cultivo, 27,3% após 48 horas e 31,9% após 72 horas de cultivo. Não foi observada nenhuma fase além de MII.

O estudo *in vitro* das influências hormonais no desenvolvimento oocitário em cadelas foi avaliado utilizando-se meios de maturação suplementados com estrógeno e progesterona, ambos em doses fixas, por HEWITT *et al.* (1998). Os autores não observaram diferença na porcentagem de

maturação entre os meios de maturação e o grupo controle após 48 e 96 horas, concluindo que os hormônios esteróides não são essenciais à maturação oocitária *in vitro*, apesar de terem observado uma redução sobre as taxas de maturação.

Estudos de BOLAMBA *et al.* (1998) utilizando meio Dulbecco Eagle modificado e mistura de nutrientes F-12 Ham (DME/F-12) suplementado com FSH, hCG e estradiol para cultivar oócitos em folículos pré-antrais avançados e antrais precoces, cultivados por 24, 48 e 72 horas. Segundo eles os resultados desta pesquisa permitiram demonstrar que para alguns oócitos caninos cultivado em folículos pré-antrais e antrais foi possível a retomada da meiose ao estágio de metáfase e obtiveram porcentagem muito pequena de oócitos que alcançou de metáfase I a metáfase II.

Em outra pesquisa BOLAMBA *et al.* (2006), avaliaram meio de maturação semelhante por 66 horas no qual, além da suplementação com FSH, LH e estradiol, utilizaram fator de crescimento epidermal (EGF) e observaram que o fator de crescimento isoladamente não foi suficiente para a maturação dos oócitos, e também não foi observado efeito sobre expansão das células do cumulus. Os autores concluíram que o EGF adicionado ao meio suplementado com FSH e LH aumentou a expansão das células do cumulus e maturação.

Em raposas, foi avaliada a influência da suplementação do meio de maturação com FSH e foi verificado que esta gonadotrofina induz alterações metabólicas, aumentando a taxa de maturação dos oócitos até MII. Por outro lado, para a cadela, a adição de FSH e LH aos meios de maturação não melhoraram a porcentagem de oócitos maturados após 48 e 96 horas, entretanto, os autores questionam a concentração das gonadotrofinas, sugerindo a adição de quantidades superiores às fisiológicas (HEWITT & ENGLAND, 1999a).

Originariamente o meio SOF foi desenvolvido para o cultivo de embriões de ruminantes baseado em componentes das secreções tubáricas de ovinos por Tervit *et al.* (1972) e ROSENKRANS *et al.* (1990). O meio vem

sendo modificado por TAKAHASHI & FIRST (1992); BOLAMBA *et al.* (2002) e ROTA & CABIANCA (2004).

Na tentativa de mimetizar os processos reprodutivos fisiológicos *in vitro* algumas pesquisas utilizaram o meio SOF e células da tuba uterina. Esta proposta tem como base o conhecimento de que a maturação oocitária *in vivo* nas cadelas ocorre no interior da tuba uterina, portanto, as secreções tubáricas potencialmente exerceriam papel importante no desenvolvimento dos oócitos. Ainda, acredita-se que a interação física dos gametas e embriões com o epitélio da tuba uterina tem importância em suportar a fecundação e o desenvolvimento embrionário, respectivamente, por facilitar a absorção de secreções presentes (HEWITT & ENGLAND, 1999a; BOLAMBA *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos por HEWITT & ENGLAND (1999) sugerem que o cultivo de oócitos caninos em meio SOF melhorou a porcentagem de oócitos que reiniciaram a maturação *in vitro* após 96 horas, quando comparados a 48 horas de cultivo, mas não afetou o restante da maturação nuclear. A composição do meio SOF nas cadelas pode ser diferente da conhecida para as outras espécies, por exemplo: níveis protéicos, carboidratos e íons bicarbonato com fonte de dióxido de carbono para manutenção do pH. A alta taxa protéica no meio de maturação oocitária em cadelas pode ser a chave para o melhor desenvolvimento embrionário, pois se verificou que concentrações crescentes de BSA melhoram a taxa de desenvolvimento oocitário. O acréscimo de BSA aos meios de maturação pode facilitar a aderência de fatores de crescimento e evitar decréscimo na concentração de oxigênio no meio.

Na pesquisa OLSON *et al.* (1999) a eficiência da maturação oocitária em três meios sintéticos que simulam o microambiente da tuba uterina foi avaliada. Foi verificado que os meios propostos melhoraram as taxas de maturação em relação ao meio controle, porém sem diferença importante em relação aos meios clássicos dos estudos de maturação *in vitro*.

Considerando que espermatozoides podem estar presentes na tuba uterina até mesmo antes da ovulação, e que podem penetrar oócitos imaturos, SAINT-DIZIER *et al.* (2001) pesquisaram a influência das células

espermáticas na maturação oocitária em cães. Os autores verificaram que a penetração de espermatozóides no oócito pode induzir a meiose *in vitro*, pois tem efeito estimulatório sobre oócitos precoces (vesícula germinativa). Por outro lado, HEWITT & ENGLAND (1998b), em dados ainda não publicados na ocasião, relataram que a maturação de oócitos antes da co-incubação com espermatozóides não apresentou efeitos benéficos sobre a penetração dos oócitos.

Atualmente, sabe-se que a taxa de degeneração dos oócitos caninos é bastante elevada, pois a maturação é delicada e apenas os oócitos pré-ovulatórios são mais facilmente maturados *in vitro*. Para os canídeos, a maturação *in vitro* apresenta sucesso limitado com taxas de maturação até MII de apenas 20% (FARSTAD, 2000), o que comprova que os sistemas de cultivo são modelos inadequados em relação ao ambiente fisiológico, necessitando modificações e adaptações.

Tanto a maturação como a fecundação *in vitro* são relativamente mais efetivas no gato doméstico (*Felis catus*) e algumas espécies de felinos não domésticos quando comparadas aos canídeos, em condições de cultivo já padronizadas (GOODROWE *et al.*, 2000).

Em cadelas, aparentemente, a fase do ciclo estral não afeta a MIV (HEWITT & ENGLAND, 1997; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003), entretanto CINONE (1992) encontrou o proestro resultando em oócitos de melhor qualidade.

Segundo OTOI *et al.* (2001) na fase folicular do ciclo estral os oócitos foram colhidos em maior quantidade e aqueles com diâmetros superiores a 120 µm demonstraram maior competência meiótica para atingir MII.

Para REYNAUD *et al.* (2005) não foram observados efeitos da idade e da raça das doadoras, e nem da interação destas variáveis sobre a colheita dos COCs.

No estudo de MARTINS (2005) o protocolo que utilizou oócitos de doadoras em estro e com maturação em meio SOF apresentou melhores

resultados aos demais protocolos. Nesta pesquisa foi avaliada a taxa de maturação nuclear os COCs obtidos de fêmeas em estro e anestro maturados nos meios SOF E TCM 199 por um tempo, de 24 horas, que demonstrou ser ineficaz para cultivo até MII.

A suplementação dos meios de maturação com soro apresenta resultados contraditórios, enquanto que em alguns experimentos utilizando soro de cadela no estro apresentaram melhorias sobre as taxas de maturação (OTOI *et al.*, 1999), em outros estudos não foram observados efeitos sobre a maturação (RODRIGUES & RODRIGUES, 2003).

Usualmente a BSA a 0,3% resulta em melhores resultados quando comparada ao soro fetal bovino, mas no experimento de HEWITT & ENGLAND (1998b), 20% de soro representou uma ótima concentração quando os oócitos foram cultivados por período de 96 horas. O soro pode ser necessário na prevenção do endurecimento da zona pelúcida.

Estudos conduzidos por HEWITT & ENGLAND (1997) demonstraram que os hormônios gonadotróficos algumas vezes utilizados nos meios são inefetivos na maturação. Por outro lado, SONGSASEN *et al.* (2003) encontraram efeito benéfico do eCG sobre os oócitos.

Nos oócitos de mamíferos a maturação meiótica inicia-se na vida pré-natal ou após o nascimento com uma parada em diplotene (a primeira parada meiótica). Esta etapa é conhecida como dictioto da prófase da primeira divisão meiótica. A quebra da vesícula germinativa é um critério de maturação do oócito (TSAFRIRI & ADASHI, 1994).

HEWITT & ENGLAND (1998a), descreveram a classificação do grau de maturação nuclear, nos seguintes estádios:

- Estádio de vesícula germinativa (gv): núcleo vesicular com nucléolo distinto circundado por filamentos finos de cromatina;
- Estádio de quebra da vesícula germinativa (qvg): reinício da meiose com algum grau de descondensação da cromatina e desaparecimento da vesícula nuclear. O nucléolo é corado

fracamente e os cromossomos são facilmente visíveis (longos e finos) agrupados ao redor dele;

- Estádio entre reinício da meiose e final da metáfase I (MI, AI e MII): cromossomos enrolam-se, adquirem espessura menos delgada e não são mais distinguíveis, formando pares bivalentes de cromossomos.
- Metáfase I: formação de pares de cromossomos;
- Anáfase I: dois grupos de cromossomos (afastamento dos pares e movimentos em direções opostas à região equatorial)
- Metáfase II: grupos densos de cromossomos, formando o primeiro corpúsculo polar e outro grupo mais afastado permitindo a visualização individual dos cromossomos.

Para a avaliação da maturação citoplasmáticas são consideradas algumas características das organelas das células, tais como: posição dos grânulos citoplasmáticos e das mitocôndrias (HYTTEL & MADSEN,1987) .

2.6 Fatores de Crescimento

O processo de foliculogênese é controlado por fatores endócrinos, representados pelas gonadotrofinas, inibinas, prolactina, esteróides e por complexos fatores locais, como as prostaglandinas, a ocitocina, o hormônio do crescimento e os fatores de crescimento.

Os fatores de crescimento são complexos sistemas que desempenham papel regulatório e modulatório sobre as funções ovariana e uterina, resultando em efeitos tróficos sobre o endométrio e o embrião, bem como sobre o crescimento e regeneração tissulares (JENNISCHE *et al.*, 1992). Em mamíferos os fatores de crescimento estão envolvidos na estimulação das células foliculares e também na maturação do oócito (LORENZO *et al.* 2002).

Para ARMSTRONG & WEBB (1997) os fatores de crescimento são proteínas ou peptídeos que podem apresentar ações autócrinas, ou seja, interagir diretamente com o mesmo tipo celular no qual foram produzidos, ou

parácrinas, interagindo com outros tipos celulares no folículo, para modular a resposta celular às gonadotrofinas. Estes fatores apresentam ainda ações juxtácrinas, como a ativação de receptores em células adjacentes por fatores ligados à membrana, e intrácrinas através da estimulação da célula na qual o fator é produzido que permitem o controle das células da teca e da granulosa.

Usualmente os fatores de crescimento são estocados sob a forma inativada no ambiente extracelular, isolados ou ligados a moléculas específicas (LOGAN & HILL, 1992).

Dentre estes fatores intraovarianos, GREENWALD & ROY (1994), destacaram o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento de transformação- α (TGF- α), os fatores semelhantes à insulina I e II (IGF-I e IGF-II) e o fator de crescimento de fibroblasto (bFGF).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II são peptídeos com similaridades estruturais à pró-insulina, conhecidos como somatomedinas. Eles são membros de uma família de peptídeos relacionados à insulina e podem participar na maturação do oócito, ovulação, implantação e embriogênese. Estes fatores são hormônios peptídicos com baixo peso molecular e características estruturais e atividade metabólica semelhantes à pró-insulina (YOSHIMURA, 2003).

Os IGFs atuam sobre o crescimento e a diferenciação da maioria das células. O sistema é composto de IGF-I e IGF-II, receptores, proteínas de ligação e as proteases das proteínas de ligação. Além dos efeitos mitogênicos sobre o metabolismo e crescimento celulares, aqueles fatores exercem localmente também efeitos parácrinos e autócrinos sobre a proliferação celular (YOSHIMURA, 2003).

BANG & HALL (1992) ressaltaram que a expressão parácrina provavelmente esteja relacionada ao crescimento de modo órgão-específico, enquanto as funções endócrinas dos IGF-I e II estejam associadas ao anabolismo e crescimento corporal de uma forma integrada.

Eles são membros de uma super família de peptídeos séricos ligados que evoluíram de uma duplicação genética ocorrida a milhões de anos que resultou na insulina, IGF-I e II e relaxina (FROESCH *et al.*, 1985; SCHOFIELD, 1992).

TSAFRIRI & ADASHI (1994) classificaram esta família em dois grupos: Os IGF básicos, com ponto isoelétrico entre 8.1 a 8.5, que incluem o IGF humano (hIGF-I) identificado como somatomedina C (SmC) e o rIGF-I de origem murina, e os neutros, como o IGF-II, igualmente de origem murina. Os autores descreveram também ações autócrinas e parácrinas para estes fatores e que possuíam similaridade funcional ao TGF e ao PDGF.

Tanto IGF-I quanto IGF-II são ligados no plasma e outros fluidos biológicos por uma família de proteínas conhecidas como proteínas de ligação que regulam suas disponibilidades às células alvo. Esta família é composta de seis proteínas que foram estudadas *in vivo* nos órgãos reprodutivos e diferentes tecidos sob diferentes condições fisiológicas. Os efeitos dos IGFs sobre as células ovarianas foram evidenciados experimentalmente em humanos, murinos, leporinos, bovinos, ovinos e suínos, sem a devida comprovação *in vivo* (QUETGLAS *et al.*, 2001; YOSHIMURA, 2003; KUMAR & PUROHIT, 2004).

O desenvolvimento folicular cíclico é dependente da cascata de estimulação gonadotrófica para regular a subsequente ontogenia das células da granulosa. Os IGFs podem atuar isoladamente e o mais importante, podem atuar em sinergia com as gonadotrofinas na estimulação de uma variedade de funções das células da granulosa.

O IGF-I foi testado em ratas por FENG *et al.* (1988), em bovinos por LORENZO *et al.* (1994,1995), em coelhas por LORENZO *et al.*, (1996) e YOSHIMURA *et al.*, (1996), em bubalinos por KUMAR; PUROHIT (2004), em eqüinos por CARNEIRO *et al.* (2001) e gatas por KITIYANANT *et al.* (2003), para melhorar os índices de maturação *in vitro*.

A pesquisa de KITIYANANT *et al.* (2003), demonstraram que a adição de IGF-I melhorou as taxas de maturação *in vitro* e que os oócitos que atingiram MII puderam ser utilizados para os estudos de clonagem.

KUMAR & PUROHIT (2004), demonstraram que IGF-I e EGF aumentaram a expansão do *cumulus* em bubalinos, entretanto a associação destes fatores de crescimento promoveu uma melhor resposta, sugerindo que ambos os fatores também aumentaram as taxas de maturação nuclear e de fertilização dos oócitos.

CARNEIRO *et al.* (2001), observaram um efeito positivo do IGF-I sobre a maturação de oócitos eqüinos cultivados durante 36 horas, e que a adição deste fator a um meio de maturação *in vitro* contendo hormônios e soro fetal bovino não resultou em melhoria da maturação nuclear, mas melhorou a maturação citoplasmática, avaliada por meio da clivagem partenogenética. Os autores concluíram que ocorreu um sinergismo entre IGF-I, gonadotropinas, estradiol e soro na maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos.

YOSHIMURA *et al.* (1996), avaliaram o efeito da interação do sistema IGF-I e TGF β (proteínas de ligação do fator de crescimento de transformação) e o sistema renina-angiotensina sobre o crescimento folicular e a ovulação em ovários perfundidos de coelhas. O IGF-I apresentou efeitos positivos sobre o crescimento folicular e sobre a retomada da meiose dos oócitos destes folículos. Os autores concluíram que aquele fator estimulou o crescimento folicular, a produção de estradiol e a maturação dos oócitos através de um mecanismo de interação com seus receptores específicos nas membranas ovarianas e que IGF-I e angiotensina podem interagir nos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular e na ovulação.

LORENZO *et al.* (1996), pesquisaram os efeitos dos fatores de crescimento EGF e IGF-I, isolados ou associados, sobre a maturação de oócitos em coelhas *in vitro*. A adição de IGF-I aumentou a incidência de MII, com os melhores resultados observados na concentração de 100 ng/ml. A utilização de EGF, isolado ou associado ao IGF-I, estimulou a expansão das células do *cumulus*. O IGF-I ou sua associação ao EGF aumentou significativamente a

maturação nuclear nos oócitos leporinos imaturos, e o efeito observado foi mediado pelas células do *cumulus*.

A redução nos níveis de AMPc, inicialmente observada no início do processo de maturação é devido à inibição da adenilato ciclase da membrana do oócito. Em ouriço-do-mar (*Xenopus sp*) o IGF-I induz a maturação do oócito através de um mecanismo que depende da redução no conteúdo de AMPc dentro do oócito causada pela regulação de ambas fosfodiesterase e adenilato ciclase do oócito.

O IGF-I estimula a maturação meiótica de oócitos em folículos de coelhas na ausência de gonadotropina de uma maneira dose-dependente (YOSHIMURA, 2003).

Segundo LORENZO *et al.* (1997), em coelhos, o IGF-I estimula a maturação de complexos *cumulus*-oócitos, enquanto não aumenta a maturação espontânea de oócitos desnudados. Isto implica que o IGF-I atue em presença de células do *cumulus* para mediar o sinal que inicia a maturação do oócito. A suplementação com IGF-I tem um efeito significativo sobre a produção de estradiol e androstenediona pelas células dos complexos *cumulus*-oócito em cultivo.

Em suínos quando o IGF-I foi acrescentado ao meio de maturação *in vitro* de oócitos, apresentou efeitos benéficos sobre subsequente desenvolvimento embrionário, observado pelo estímulo a taxa de clivagem de embriões *in vitro* (XIA *et al.*, 1994).

Em bovinos o IGF-I combinado ao EGF estimulam a expansão do *cumulus*, o metabolismo oxidativo, a maturação nuclear, e a clivagem após a fertilização *in vitro* dos oócitos (RIEGER *et al.*, 1998).

A adição de IGF-I, EGF, FSH e estradiol ao meio de maturação (TCM 199) de oócitos ovinos, foi avaliada por GULER *et al.* (2000). Na concentração de 100 ng/ml o IGF-I os autores não observaram melhorias sobre as taxas de maturação citoplasmática ou nuclear. A suplementação com EGF (10 ng/ml) demonstrou ser positiva ao processo de maturação *in vitro*, bem como

o FSH. O estradiol não apresentou efeito estimulatório sobre a maturação, quando comparado ao fluido folicular empregado neste estudo. Os resultados da pesquisa permitiram inferir que a suplementação do meio não é necessária quando este possui fluido folicular, previamente tratado, ou mesmo soro fetal bovino.

ROTA & CABIANCA (2004) compararam os meios TCM 199 e SOF enriquecidos com soro fetal bovino a 10%, FSH (0,1 UI/ml), LH (10 UI/ml) e estradiol (4 µg/ml). O meio base (TCM 199) foi suplementado com EGF (50 ng/ml) ou com ITS (insulina 10 µg/ml, transferrina 5,5 µg/ml e selênio 5 µg/ml) para pesquisar a competência meiótica de oócitos maturados por um período de 72 horas, colhidos de cadelas em anestro. As autoras encontraram um alta proporção de oócitos degenerados, 37,6%, após o período de cultivo. Quando comparados o meio base e o SOF as taxas maturação nuclear não identificável foram 33,2% e 31,1%, respectivamente. A incorporação do EGF ao sistema de cultivo demonstrou ser ineficiente para promover a maturação até a fase de MII e o efeito positivo atribuído ao ITS foi explicado por suas propriedades antioxidantes, protegendo as células do prolongado período de cultivo.

O EGF (0, 10 e 20 ng/ml) foi comparado ao β-mercaptoetanol (0, 25, 50 e 100 µM) adicionados ao meio TCM 199 por KIM *et al.* (2004) que também pesquisaram o efeito da fase do ciclo ovariano (anestro, folicular e luteal) sobre a qualidade dos oócitos caninos maturados *in vitro*. Os autores observaram que a suplementação com 20 ng/ml de EGF ao meio TCM 199 apresentou aumento significativo sobre a taxa de competência meiótica e atribuíram este resultado favorável ao efeito da fase folicular sobre os oócitos selecionados para o experimento.

BOLAMBA *et al.* (2005) avaliaram o efeito do EGF associado ao FSH (0,5 µg/ml), LH (5 µg/ml) e estradiol (1 µg/ml) no meio F-12/DME, com soro fetal bovino a 20%, sobre a maturação de oócitos e a expansão das células do *cumulus* de folículos pré-antrais e antrais obtidos através de digestão enzimática de ovários. Os autores concluíram que isoladamente o EGF não apresentou

efeito benéfico sobre a maturação dos oócitos e quando ao meio foi acrescentado LH e FSH observaram aumento na expansão das células do *cumulus* e da granulosa.

Os dados obtidos por KIM *et al.* (2004) foram corroborados por CUI *et al.* (2006) que avaliaram os efeitos da fase do ciclo ovariano sobre a qualidade dos oócitos e do EGF em presença ou ausência de BSA sobre a maturação *in vitro* de oócitos caninos em meio NCSU. Os pesquisadores concluem que a fase do ciclo estral influencia a retomada da meiose daquelas células cultivadas *in vitro*, na concentração de 100 ng/ml de EGF em presença de BSA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ovários e Oócitos

Foram utilizados ovários de 37 cadelas submetidas a ovarioossalpingohisterectomias (OSH) eletivas e terapêuticas realizadas no Setor de Obstetrícia Veterinária do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal. As doadoras dos COCs foram agrupadas conforme a raça, faixa etária em peri-púberes (6 a 10 meses) e adultas (> 10 meses), a condição reprodutiva (nulípara, primípara e múltipara), e a fase do ciclo estral determinada através de citologia vaginal¹. Os ovários foram colhidos, liberados das bolsas ovarianas, lavados em solução salina (NaCl 0,9%) e acondicionados em frascos estéreis contendo NaCl 0,9% a 37 °C.

Os ovários foram transportados ao Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Universidade Estadual Paulista-Câmpus de Jaboticabal e processados dentro de um período de uma hora após as cirurgias, mantendo-se a temperatura de 37 °C. No laboratório os ovários foram transferidos para frascos plásticos estéreis contendo solução de PBS completo (Apêndice A), aquecida a 37,5 °C. Nesta solução, os ovários foram fatiados em espaços de aproximadamente 2 mm com lâmina de bisturi nº 24 dentro de placas de Petri de 35 mm descartáveis e estéreis para liberação dos oócitos.

Foram selecionados 1474 COCs classificados como grau 1, conforme classificação descrita por HEWITT & ENGLAND (1999b), ou seja, aqueles COCs com ooplasma uniformemente escuro, com zona pelúcida intacta, e circundado por uma ou mais camadas de células do *cumulus*, foram lavados em solução de PBS acrescida de SFB a 10% e posteriormente em meio TCM 199–Hepes (Figura 1).

¹ Panótico (Bio-cor 1, 2 e 3, Bioshop) e Harris-Shorr.

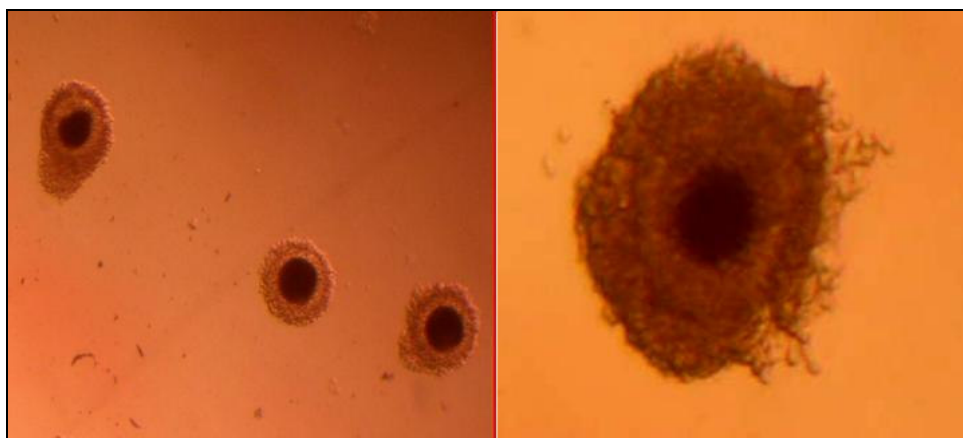


Figura 1. Complexos *cumulus* oócitos recuperados, classificados como grau 1, selecionados para maturação *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2007.

3.2 Maturação Oocitária

Os COCs foram alocados ao acaso em três grupos: M0 (momento da colheita), Controle (SOF) e Experimental (SOF + 100ng/ml de IGF-I). O meio de base de cultivo foi o SOF (Apêndice B).

Os oócitos que fizeram parte do grupo M0 foram corados para núcleo e citoplasma no mesmo dia da colheita. Os protocolos foram os mesmos descritos abaixo, para os grupos Controle e Experimental com maturação de 72 h em estufa.

Padronizou-se que no máximo 15 COCs dos grupos Controle e Experimental fossem colocados em 500µl do meio SOF (acrescido ou não de IGF-I de acordo com o tratamento) em placas de cultivo celular com 4 cavidades de 1ml cada (Nunc).

Os COCs dos grupos Controle e Experimental foram mantidos em estufa com 5% de CO₂ e 95% de umidade a 37,5 °C por 72 horas, quando foram retirados, lavados (3x) em meio TCM 199 Hepes (Apêndice C), passados por

hialuronidase 0,2% para retirada das células do *cumulus* (Figura 2). Após esse procedimento os oócitos foram lavados por 3 vezes em meio TCM 199 Hepes.

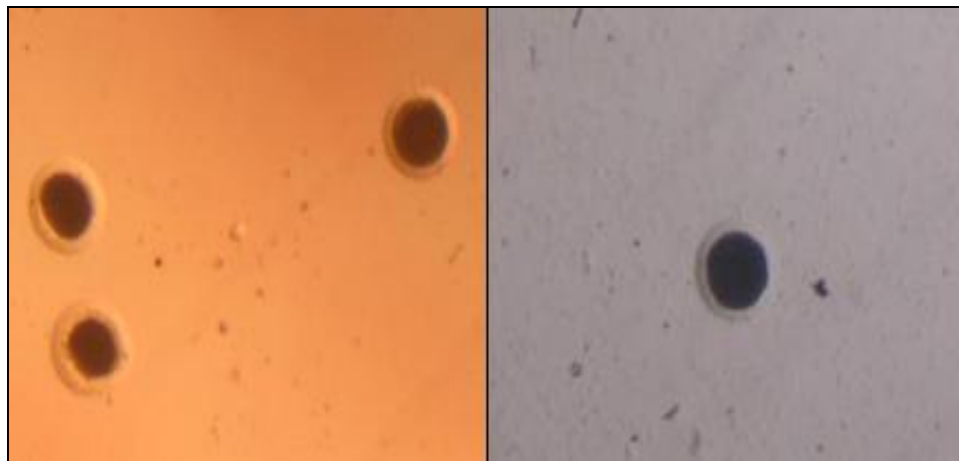


Figura 2. Oócitos tratados com hialuronidase 0,2%, para a remoção das células do *cumulus*. Jaboticabal-SP, 2007.

3.3 Coloração e Avaliação Nuclear

Os oócitos desnudos que perfizeram os grupos Cn e En foram colocados em solução de formaldeído 3% por 30 minutos e, posteriormente, lavados em solução de PBS + PVA. Após a lavagem os oócitos foram corados em ambiente escuro com solução de bis-benzimida² diluídos em glicerol e PBS.

Os oócitos avaliados em lâminas foram divididos em quatro categorias, descritas por HEWITT & ENGLAND (1999b):

1. Vesícula germinativa intacta (VG) - núcleo definido, com ou sem nucléolo, sem condensação da cromatina (caracterizada por um envelope nuclear claro e intacto, pelo menos um nucléolo visível e finos filamentos de cromatina diplóteno/dictiatio);

2. Quebra de vesícula germinativa (QVG) - cromatina descondensada, fora do centro celular;

² Hoechst 33342(Bisbenzimida H33342 Fluorocromo) Sigma-Aldrich B2261.

3. Cromatina condensada (MI/MII) - nenhuma membrana nuclear e formações distintas de cromatina compacta;

4. Oócitos degenerados ou sem cromatina.

3.4 Coloração e Avaliação Citoplasmática

Os oócitos desnudos que fizeram parte dos grupos Cc+n e Ec+n foram colocados em solução de protease 0,5%³ por 5 minutos e posteriormente em solução “tyrode” ácida (Apêndice D) para retirada da zona pelúcida. Após isso, foram lavados (3x) em meio TCM 199 Hepes, e fixados em solução de formaldeído 3% (Apêndice E) por 30 minutos. Posteriormente lavados (3x) em solução de bloqueio (Apêndice F) e colocados em 100µl de solução *Lens culinaris* para α -manose⁴ (Apêndice G) por 20 minutos a 37 °C para coloração dos grânulos corticais. Finalmente lavados em solução de bloqueio e corados em ambiente escuro com solução de bis-benzimida⁵ diluída em glicerol e PBS.

As lâminas contendo os oócitos foram montadas com lamínula, em pasta de parafina e vaselina, e seladas com esmalte, acondicionadas em a 4 °C, para manutenção do meio líquido. Todas as lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência no comprimento de onda 330-385 nm para núcleo e 460-490 nm para grânulos corticais.

3.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o teste não paramétrico de comparação de médias Mann-Whitney quando comparadas duas médias e Kruskal-Wallis quando comparado três médias ou mais, utilizando o nível de significância de 5%.

³ (Sigma-Aldrich P1512)

⁴ (Sigma-Aldrich L 9262)

⁵ Hoechst 33342(Bisbenzimidaz H33342 Fluorocromo) Sigma-Aldrich B2261.

Os dados encontrados foram listados em tabelas contendo números absoluto e relativo.

4. RESULTADOS

Os dados encontrados nos diferentes grupos experimentais estão demonstrados em tabelas e figuras.

4.1 Avaliação dos Aspectos Gerais das Doadoras

4.1.1 Raça das Doadoras

Tabela 1. Distribuição de freqüências racial e individual dos complexos *cumulus* oócitos caninos (COCs). Jaboticabal-SP, 2007.

Raças	Freqüência (%)	COCs/Doadoras
Boxer	1/37 (2,7)	40/1 (40,0) ^a
Labrador	1/37 (2,7)	14/1 (14,0) ^a
Pit Bull	1/37 (2,7)	89/1 (89,0) ^a
Teckel	1/37 (2,7)	70/1 (70,0) ^a
Terrier Brasileiro	1/37 (2,7)	27/1 (27,0) ^a
Pastor alemão	2/37 (5,4)	88/2 (44,5) ^a
Pinscher	2/37 (5,4)	83/2 (41,5) ^a
Poodle	3/37 (8,1)	77/3 (25,7) ^a
SRD	25/37 (67, 6)	986/25 (39,4) ^b
Total	37/37 (100,00)	1474/37 (39,8)

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

4.1.2 Idade das Doadoras

Tabela 2. Distribuição de freqüências das doadoras e dos complexos *cumulus* oócitos caninos (COCs) por faixa etária. Jaboticabal-SP, 2007.

Faixa Etária	Doadoras/Total (%)	COCs/Doadoras
Peri-púbere	4/37 (10,8)	164/4 (41,0) ^a
Adulta	33/37 (89,2)	1310/33 (39,7) ^b
Total	37/37 (100,0)	1474/37 (39,8)

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

4.1.3 Condição Reprodutiva das Doadoras

Tabela 3. Distribuição de freqüências por condição reprodutiva das doadoras dos complexos *cumulus* oócitos caninos (COCs). Jaboticabal-SP,

Condição Reprodutiva	Doadora/Total (%)	COCs/Doadora
Nulípara	15/37 (40,54)	676/15 (45,06 ^a)
Primípara	16/37 (43,24)	559/16 (34,93 ^a)
Multípara	6/37 (16,22)	239/06 (39,83 ^b)
Total	37/37 (100,00)	1474/37 (39,84)

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

4.1.4 Fase do Ciclo Estral das Doadoras

Tabela 4. Distribuição de freqüências das doadoras e dos complexos *cumulus* oócitos (COCs) caninos nas diferentes fases do ciclo estral e piometra. Jaboticabal-SP, 2007.

Diagnóstico	Doadora/Total (%)	COCs/Doadora
Anestro	7/37 (19,0)	266/7 (38,0) ^a
Diestro	20/37 (54,0)	784/20 (39,2) ^b
Estro	2/37 (5,4)	118/2 (59,0) ^a
Proestro	5/37 (13,5)	181/5 (36,2) ^a
Piometra	2/37 (5,4)	80/2 (40,0) ^a
Indeterminado	1/37 (2,7)	45/1 (45,0) ^a
Total	37/37 (100,0)	1474/37 (39,8)

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

4.1.5 Distribuição dos COCs Grau 1 para Avaliação Nuclear

Tabela 5. Distribuição de freqüências dos oócitos classificados como grau 1, avaliados pela coloração nuclear (bis-benzimida)*, nos diferentes grupos experimentais de coloração nuclear. Jaboticabal-SP, 2007.

Grupo (total)	Coloração Nuclear
	Oócitos/total (%)
M0 (173)	75/173 (43,35)
C (333)	124/333 (37,23)
E (369)	143/369 (38,75)
Total (875)	342/ 875 (39,10)

*Hoechst 33342; M0 = Momento zero; C = controle; E = Experimental

4.2 Avaliação do Estádio de Maturação dos Oócitos

4.2.1 Vesícula Germinativa (VG)

Em valores totais, somando os grupos M0, C e E, 34 oócitos foram encontrados em estágio de vesícula germinativa (Figura 3), em números relativos esse valor corresponde a 7,34% do número total avaliado (Tabela 6).

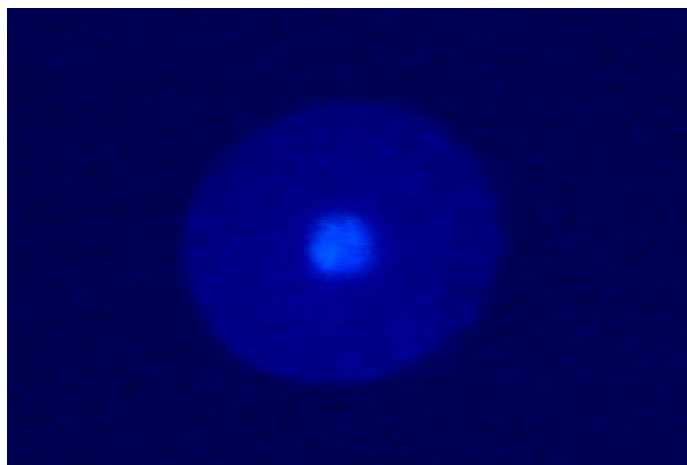


Figura 3. Fotomicrografia de oócito em estágio de vesícula germinativa (VG) corado com bis-benzimida (Hoechst 33342). Jaboticabal-SP, 2007.

Tabela 6. Distribuição de freqüências dos oócitos caninos em estágio de vesícula germinativa (VG) maturados *in vitro* entre os grupos experimentais. Jaboticabal-SP, 2007.

Grupo	Oócitos em VG/Total (%)
M0	13/106 (12,26)
C	11/167 (6,58)
E	10/189 (5,29)
Total	34/462 (7,36)

M0 Momento zero; C = controle; E = Experimental ($P > 0,05$).

4.2.2 Quebra de Vesícula Germinativa (QVG)

Tabela 7. Distribuição de freqüências dos oócitos caninos em estágio de quebra de vesícula germinal (QVG) entre os grupos experimentais na maturação *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2007.

Grupo	QVG /oócitos avaliados (%)
M0	27/106 (25,47)
C	23/167 (13,77)
E	22/189 (11,57)
Total	72/462 (15,58)

M0 = Momento zero; C = controle; E = Experimental

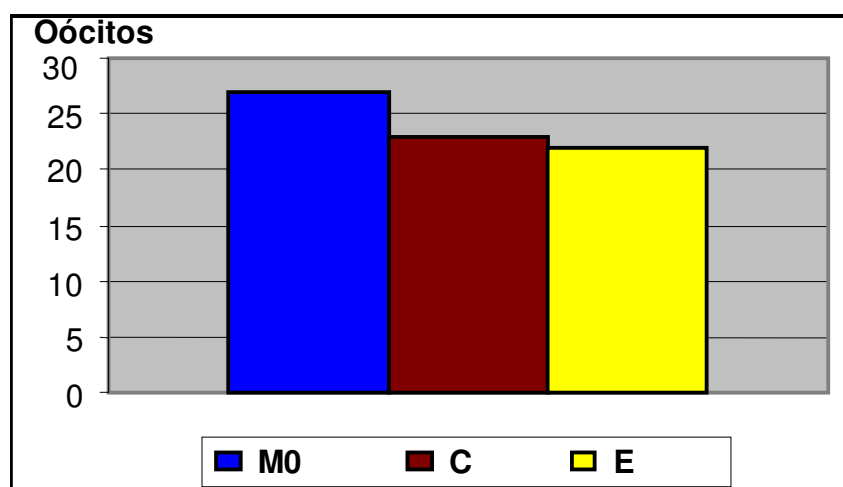


Figura 4. Distribuição dos oócitos encontrados em QVG (quebra de vesícula germinativa), após avaliação nuclear, nos grupos M0, C e E (Momento zero, Controle e Experimental) Jaboticabal-SP, 2007.



Figura 5. Fotomicrografia de oócito em estágio de quebra de vesícula germinativa (QVG) corado com bis-benzimida (Hoechst 33342) Jaboticabal-SP, 2007.

4.2.3 Final de Metáfase I (MI)

Foram encontrados 14 oócitos em fase final de metáfase I (MI), o que corresponde a 3,03% do número total de oócitos avaliados.

Igualmente nos achados anteriores não houve diferenças estatísticas entre o grupo M0 e os demais e entre os grupos maturados (C e E) por 72 horas em meio SOF acrescidos ou não de 100ng/mL de IGF-I de acordo com o tratamento.

Tabela 8. Distribuição de freqüências dos oócitos caninos em estágio de metáfase I (MI) entre os grupos experimentais na maturação *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2007.

Grupo	Oócitos em MI/Grupo (%)
M0	3/106 (2,83)
C	7/167 (4,19)
E	4/189 (2,11)
Total	14/ 462 (3,03)

M0 = Momento zero; C = controle; E = Experimental

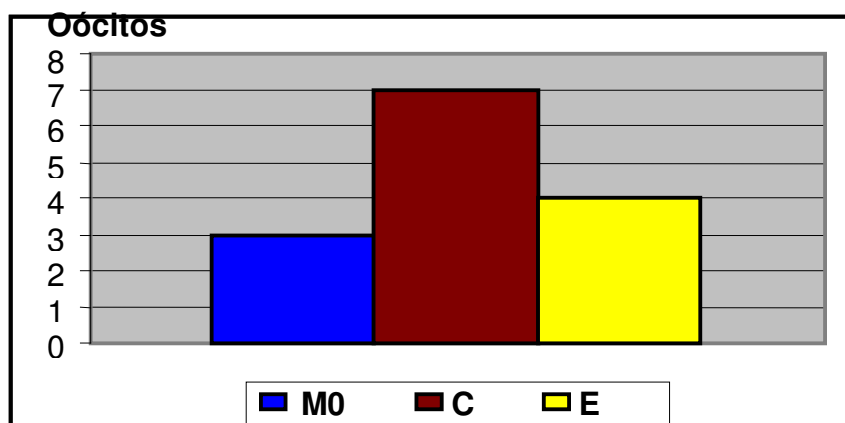


Figura 6. Oócitos em MI (metáfase I) após avaliação nuclear nos grupos. M0 (Momento zero); C (Controle) e E (Experimental). Jaboticabal-SP, 2007.

No grupo M0, não foram encontrados oócitos em MI oriundos de cadelas em anestro. Por outro lado encontrado, em fêmeas no estro, encontrou-se um total de 15,34% de oócitos em MI.

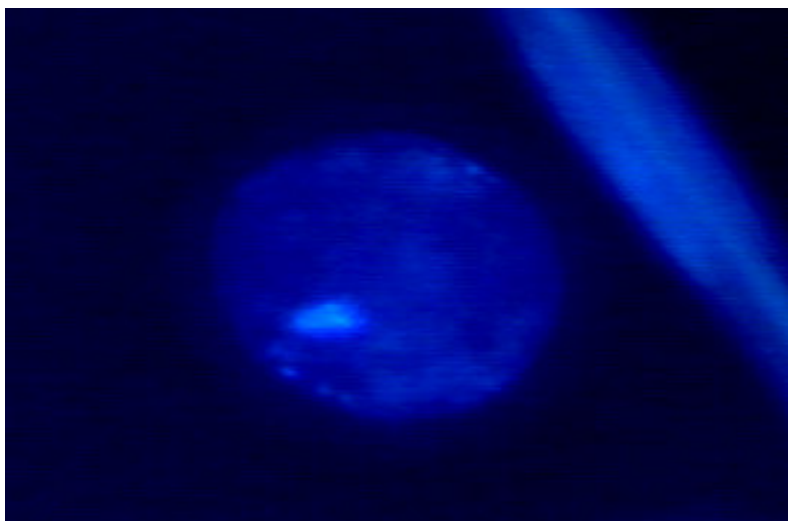


Figura 7. Fotomicrografia de oócito em estágio final de metáfase I (MI) corado com bis-benzimida (Hoechst 33342). Jaboticabal-SP, 2007.

4.2.4 Degenerados

Foram encontrados 342 oócitos degenerados, sem cromatina ou não passíveis de identificação nuclear, que corresponde a 74,0 % do número total de oócitos avaliados.

Houve diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os grupos M0 e C, e M0 e E. Não foram observadas diferenças entre os grupos maturados C e E.

Tabela 9. Distribuição de freqüências dos oócitos caninos degenerados entre os grupos experimentais na maturação *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2007.

Grupo	oócitos degenerados/ oócitos avaliados (%)
M0	63/106 (59,43) ^a
C	126/167 (75,45) ^b
E	153/189 (80,95) ^b
Total	342/462 (74,02)

Letra diferente na mesma linha demonstra diferença estatística ($P < 0,05$).

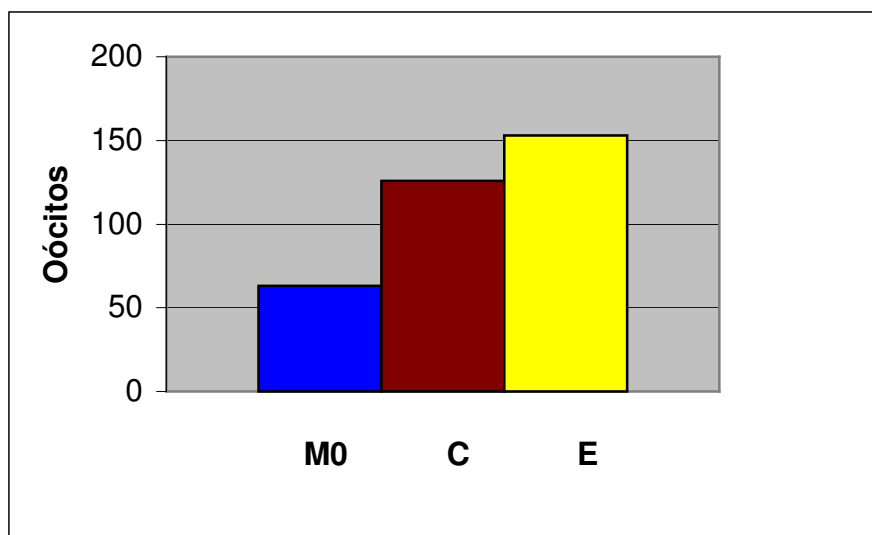


Figura 8. Frequência de oócitos degenerados após avaliação nuclear nos grupos M0 (momento zero), C (controle) e E (experimental). Jaboticabal-SP, 2007.



Figura 9. Fotomicrografia de oócito degenerado corado com bis-benzimida (Hoechst 33342). Jaboticabal-SP, 2007.

4.3 Avaliação do Estádio de Maturação Citoplasmática

Foram alocados nos grupos M0c+n 116 COCs equivalendo a 40,14% do total de COCs destinados ao grupo M0. Destes COCs foram avaliados 31 (26,72%) oócitos pós-coloração.

Para o grupo Cc+n foram alocados 223 COCs o que corresponde 40,10% do total destinado a este grupo e foram avaliados após a coloração 43 (19,28%).

No grupo Ec+n foram destinados 246 COCs, 40,00% do total destinados ao grupo, chegando ao final do processamento 46 (18,69%).

A Figura 10 ilustra oócitos maduros e imaturos corados com *Lens culinaris* para avaliação citoplasmática nesta pesquisa.

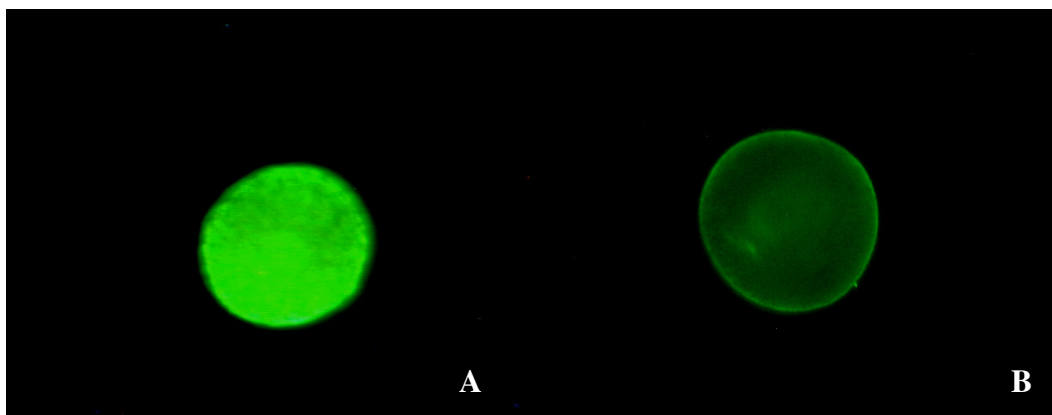


Figura 10. Fotomicrografias de oócitos corados com *Lens culinaris* para avaliação citoplasmática. (A) oócito com citoplasma imaturo, (B) oócito com citoplasma maturo. Jaboticabal-SP, 2007.

As perdas nesse processamento foram superiores às perdas do processamento dos grupos M0n, Cn e En e com isso encontraram-se diferenças estatísticas em todos os grupos, sendo que se somando os três grupos 120 oócitos (20,51%) foram avaliados após a coloração (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição em números absolutos e relativos dos oócitos grau 1 corados para núcleo (n) e citoplasma (c+n) após maturação *in vitro*. Jaboticabal – SP, 2007.

Grupos (oócitos)	Coloração	
	n	c+n
M0 (289)	75/173 (43,35) ^a	31/116 (26,72) ^b
C (556)	124/333 (37,23) ^a	43/223 (19,28) ^b
E (615)	143/369 (38,75) ^a	46/246 (18,69) ^b
Total (1460)	342/875 (39,10)	120/585 (20,51)

M0=Momento zero; C=Controle; E=Experimental. Letra diferente na mesma linha demonstra diferença estatística (P<0,05).

Dos oócitos avaliados para maturação citoplasmática do grupo M0c+n apenas quatro (12,90%) foram considerados maduros. No grupo Cc+n foram encontrados 11 (25,58%) oócitos, e do grupo Ec+n foram encontrados quatro (8,69%).

4.3.1 Distribuição dos COCs Grau 1 para Avaliação Citoplasmática

Tabela 11. Distribuição dos números absolutos e relativos dos oócitos avaliados para maturação citoplasmática. Jaboticabal-SP, 2007.

Grupo	Oócitos avaliados / Oócitos por grupo (%)
M0	4/31(12,90)
C	11/43(25,58)
E	4/46(8,69)
Total	19/120 (15,83)

M0=Momento zero; C=Controle; E=Experimental.

Pela perda de grande parte dos oócitos no processo de coloração citoplasmática e pela quantidade de oócitos considerados maturados, não foi possível fazer uma correlação entre a maturação nuclear e citoplasmática dos mesmos.

5. DISCUSSÃO

A MIV é utilizada rotineiramente na biotecnologia da reprodução humana, bem como em diferentes espécies domésticas. Na espécie canina os embriões produzidos a partir de FIV desenvolvem-se até 8 células após 72 horas, entretanto os resultados ainda são limitados (YAMADA *et al.*, 1992).

O fator de crescimento IGF-I foi adicionado a um meio SOF com o objetivo de avaliar seu efeito sobre as taxas de maturação *in vitro* de oócitos caninos. O SOF foi inicialmente desenvolvido para manter a fecundação e o desenvolvimento embrionário precoce em ovinos, como uma tentativa de mimetizar as secreções do ambiente tubárico (TERVIT *et al.*, 1972; HEWITT & ENGLAND, 1999b).

As doadoras sem raças definidas apresentaram compuseram um grupo que apresentou maior frequência e conseqüentemente maior distribuição individual quando comparadas a algumas raças puras selecionadas para o experimento. Estes achados concordam com a pesquisa de DURRANT *et al.* (1998) que utilizando a técnica de digestão de ovário obtiveram maior número de folículos em doadoras sem raças definidas quando comparadas àquelas com raças puras. Por outro lado, REYNAUD *et al.* (2005) demonstraram não haver diferenças estatisticamente significativas entre os fatores racial e etário, nem sobre a interação entre eles, sobre a colheita de oócitos.

Ainda segundo outros autores, a qualidade dos COCs apresentou correlação negativa com a idade da doadora (RODRIGUES & RODRIGUES, 2003), sendo esta observação confirmada neste trabalho, 89,18% em doadoras adultas, em relação às fêmeas peri-púberes (10,82%), fornecendo um maior número de COCs por doadora.

A idade das doadoras foi estratificada em peri-púbere, fêmeas com idade variando entre 6 e 10 meses, e em adulta, fêmeas com idades superiores a 10 meses. Foi observado uma diferença, estatisticamente significativa, a favor das doadoras mais novas com maior número de COCs recuperados. Estes achados concordam com THEISS (1997) que observou uma diminuição na taxa

de recuperação de oócitos diretamente proporcional ao aumento da idade da doadora. Na pesquisa foi recuperada uma média de 275 oócitos das cadelas classificadas como muito jovens, menores de 1 ano, e 117,4 oócitos dos ovários das doadoras com 3 a 4 anos, e 7,3 oócitos daquelas cadelas com 13 a 14 anos. HEWITT & ENGLAND (1998a) encontraram evidências do efeito da idade sobre a maturação. Oócitos oriundos das doadoras jovens, de 1 a 7 anos, apresentaram taxas significativamente maiores de maturação aos estádios de MI/AI/MII quando comparadas às doadoras mais velhas (acima de 7 anos). Para estes pesquisadores apesar dos oócitos de doadoras mais velhas poderem ser maturados *in vitro* apresentarem capacidade comprometida quando comparados àqueles de fêmeas mais jovens, e portanto, estes possuem maior potencial para maturação.

As fases do ciclo reprodutivo de cada animal foram determinadas através de colpocitologia com colorações rápidas. Das 37 doadoras, 20 estavam na fase diestro, sete em anestro, cinco em proestro, duas em estro, duas não foram realizadas citologias vaginais, pois tinham diagnósticos confirmados de piometra, e uma não pode ser identificada a fase do ciclo estral por falha na colheita e/ou coloração da lâmina.

A influência da fase do ciclo estral das cadelas e, conseqüentemente, dos eventos endócrinos pertinentes a cada período, sobre a taxa de recuperação de oócitos e os índices de maturação ainda é controversa.

Da mesma forma que a maioria das pesquisas, nesta foi utilizado animais submetidos a OSH para a obtenção dos COCs, de diferentes condições reprodutivas e fases do ciclo estral. Segundo dados de NICKSON *et al.* (1993) e HEWITT & ENGLAND (1997) as fases do ciclo estral não influem sobre os resultados da MIV em cadelas.

Neste trabalho, a maioria das doadoras (54,05%) estavam em diestro, obtendo-se nesta fase 39,2 COCs grau 1 por doadora. Do total de doadoras 18,91% estavam em anestro com, 38 estruturas por fêmea, e 5,40% em estro com 59 estruturas por fêmea. No estudo de MARTINS (2005) 52,09% dos COCs grau 1 foram colhidos de cadelas na fase de anestro e 43,17% dos oócitos foram retirados dos ovários do grupo em estro. O número médio de COCs grau 1 obtidos por cadela em anestro foi $46,45 \pm 25,9$ contra $62,16 \pm 8,18$ do grupo em estro. Estes valores são superiores aos encontrados em nossa

pesquisa e provavelmente possam ser justificados pelas variações individuais que podem ocorrer na espécie canina.

Para alguns autores o número de oócitos viáveis colhidos e a taxa de maturação em oócitos cultivados *in vitro* parecem ser afetados pelo ciclo estral (NICKSON *et al.*, 1993; YAMADA *et al.*, 1993; CUI *et al.*, 2006), enquanto que para outros, não existe esta influência sobre os índices de maturação oocitária entre os oócitos colhidos de cadelas no período de anestro e diestro (HEWITT & ENGLAND, 1997; DURRANT *et al.*, 1998; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003). Para HEWITT *et al.* (1998), utilizando diferentes concentrações de SFB (5, 10 e 20%) e de BSA (0,3 ou 4%), sugeriram que a fase do ciclo estral não afetaria o resultado da maturação dentro de cada grupo experimental.

As 37 doadoras utilizadas neste estudo forneceram 1474 COCs grau 1 com uma média de 39,84 COCs/fêmea doadora. Estes valores aproximam-se daqueles encontrados por ROTA & CABIANCA (2004). Quando comparados com demais trabalhos e considerando-se que nesta pesquisa foram colhidos COCs de doadoras em todas as fases do ciclo estral e ainda de fêmeas com piometra, situação semelhante ao diestro, a distribuição de estruturas apresentou um padrão variável e aceitável para a espécie.

Analisando-se a distribuição dos COCs segundo a condição reprodutiva das doadoras, observou-se que apesar do reduzido número (n=6) as fêmeas multíparas apresentaram 39,83 COCs por doadora, valor significativamente diferente das condições nulípara e primípara ($P < 0,05$).

Do número total de COCs Grau 1 selecionados, 289 foram destinados para compor o grupo M0 e foram avaliados 106 oócitos após coloração, demonstrando uma perda total de 63,32 %. No grupo controle, foram alocados 556 COCs e restaram para avaliação após os procedimentos de coloração 167 oócitos, resultando em uma perda de 69,96%. No grupo experimental foram alocados 615 COCs restando 190 oócitos após o processo de coloração, totalizando perda de 69,10%.

Oócitos degenerados ou não passíveis de identificação foram descritos em altas proporções por THEISS (1997), HEWITT *et al.* (1998) e ROTA & CABIANCA (2004), tanto na colheita quanto após o cultivo. Essas

perdas são atribuídas aos processos de maturação, retiradas da camada de células do cumulus, retirada da zona pelúcida, passagem pela solução ácida e várias outras lavagens em soluções que são necessárias para os processos de coloração nuclear e citoplasmática descritas na metodologia.

Considerando o total de oócitos examinados o experimento apresentou 7,34% de núcleos em VG. Estes valores são inferiores aos 62,6% obtidos por YAMADA *et al.* (1992), trabalhando com doadoras superovuladas da raça Beagle, e maturando os COCs em meio m-TYH. Por outro lado, este percentual está próximo ao 5,4% de oócitos em vg maturados em meio SOF da pesquisa conduzida por BOLAMBA *et al.* (2002) com ovários obtidos de doadoras de diversas raças.

O estágio de QVG representou 15,58% de 462 oócitos avaliados entre os grupos estudados nesta pesquisa e estes valores foram aproximados àqueles do estudo de HEWITT *et al.* (1998) que avaliaram a suplementação de SFB ou BSA adicionados ao meio TCM 199, e no SOF utilizado neste experimento foi acrescido BSA e SFB. Para ROTA & CABIANCA (2004), oócitos maturados por 72 horas em meio SOF com adição de BSA apresentaram percentual de QVG de 56,9% de 51 estruturas examinadas.

Assim como no estágio de vg, não houveram diferenças estatísticas ($P>0,05$) entre os grupos M0 em relação aos C e E, resultado igualmente encontrado entre estes grupos por 72 horas em meio SOF acrescidos ou não de 100ng/mL de IGF-I de acordo com o tratamento.

Em MI foram encontrados 14 oócitos, o que corresponde a 3,03% do total dos grupos avaliados. Os resultados apresentados por ROTA & CABIANCA (2004), com 3,9% de oócitos equivalendo a dois oócitos no grupo SOF por 72 horas corroboram com os achados da presente pesquisa. No mesmo ensaio a maturação em meio TCM 199 resultou em 13,7% em MI/Al. Semelhante resultado foi encontrado entre os COCs de grau 1 no experimento conduzido por FUJII *et al.* (2000), que encontraram 7 oócitos em MI equivalendo a 11% em meio TCM 199 por 72 horas.

Da mesma forma como foi observado entre os resultados anteriores não houve diferenças estatísticas entre o grupo M0 e os demais e entre os grupos maturados (C e E) por 72 horas em meio SOF acrescidos ou não de 100ng/ml de IGF-I de acordo com o tratamento na avaliação do estágio de MI.

Do total de oócitos avaliados 74%, foram classificados como degenerados nesta pesquisa. As diferenças entre os grupos M0 e os demais (C

e E) foram estatisticamente significativas ($P < 0,05$). E entre estes não foram observadas diferenças.

Este elevado percentual se aproxima dos 80,2%, obtido por THEISS (1997) que maturou 227 oócitos em meio TCM 199 suplementado com soro de vaca no estro a 10%. No presente estudo foi utilizado meio SOF acrescido de SFB. Por outro lado, aqueles valores são superiores aos de BOLAMBA *et al.* (1998), que cultivaram por 72 horas oócitos obtidos de folículos pré-antrais em meio DME/F-12 com 28,5% de 404 estruturas examinadas.

DURRANT *et al.* (1998) descreveram degeneração dos oócitos em uma perda aproximada de 58% de todos os folículos com oócitos pálidos ou mal-formados recobertos por camadas da granulosa de aspecto normal. Para os folículos pré-antrais, no grupo experimental de folículos com camadas da granulosa incompletas, apresentaram menor percentual de vg (33%) quando comparado aos pré-antral e antral (80%). Os pesquisadores utilizaram a descrição de SPANEL-BOROWSKI (1981) para explicar os dois tipos de atresia. Na atresia tipo A ocorre intensa degeneração do oócito e da zona pelúcida com menores alterações na camada da granulosa. Na atresia tipo B as alterações são específicas da camada da granulosa, o oócito e a zona pelúcida aparentemente estão normais. Segundo esta classificação a atresia tipo A predominou em folículos pré-antrais e a tipo B somente em folículo terciário. Na pesquisa de DURRANT *et al.* (1998) encontraram ambos os tipos de degeneração nos folículos pré-antrais e antrais.

Para ROTA & CABIANCA (2004) e segundo REYNAUD *et al.* (2005) as altas taxas de estruturas de oócitos com núcleos não determinados ou degenerados podem ser drasticamente reduzidas com a utilização de microscopia confocal.

Para a coloração nuclear foram processados 875 oócitos com aproveitamento de 43,35% ($n=173$), 37,23% ($n=333$) e 38,75% ($n=369$) para os grupos M0, C e, respectivamente, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre estes grupos. Estes achados são concordantes com aqueles referidos por FARSTAD (2000) que apontaram uma

variação de zero a 58% nas taxas de maturação *in vitro*. Entretanto, os resultados no presente estudo demonstraram que a maturação nuclear atingiu apenas o estágio de MI em uma baixa proporção de todos os grupos estudados, após o período de cultivo e no momento inicial também. Percentualmente estes valores para os grupos M0, C e E foram 2,83%, 4,19% e 2,10% respectivamente e quando o total de estruturas em MI foi analisado este percentual foi de 3,02%.

No estudo de HEWITT & ENGLAND (1999) os estádios MI, AI e MII foram agrupados e examinados após 48 ou 96 horas de cultivo em meio SOF suplementado com BSA a 0,3% ou 4%. Nos resultados obtiveram 5 e 7% após 48 horas, com suplementação de 0,3 e 4% de BSA, respectivamente. Para 96 horas observaram zero (BSA a 0,3%) e 8% (BSA a 4%) de oócitos em estádios de MI/AI/MII.

No experimento de BOLAMBA *et al.* (2002) folículos pré-antrais foram após 0, 24, 48 e 72 horas e a maturação nuclear foi agrupada nos estádios MI e MII e o meio SOF foi avaliada comparando-se a adição de ou não de BSA (fração V) e SFB. No grupo acrescido do SFB e da BSA os autores obtiveram 7,6% dos oócitos estavam com configuração nuclear em MI/MII enquanto que no grupo controle (SOF) foram encontrados 3,9%. Os mesmos aditivos foram acrescentados ao meio SOF na presente pesquisa.

O trabalho de ROTA & CABIANCA (2004) que utilizaram um grupo controle com o meio SOF obtiveram 3,9% dos oócitos em MI após 72 horas de cultivo, inferior ao nosso resultado, e igualmente a presente pesquisa não obteve nenhuma estrutura em MII.

Para a presente pesquisa foram selecionados 585 oócitos para coloração citoplasmática e alocados nos grupos experimentais. Destes, 120 estruturas puderam ser avaliadas, equivalendo a 26,72% (n=116), 19,28% (n=223) e 18,69% (n=246) das células germinativas examinadas, respectivamente, nos grupos M0, C e E. Analisando-se isoladamente a coloração citoplasmática 4 das 31 estruturas no grupo M0 foram passíveis de leitura, equivalendo a 12,9%. Para o grupo C 25,58% dos oócitos, ou seja, 11

células foram lidas (n=43). No grupo E apenas 4 oócitos, de um total de 46 (8,69%) puderam ser avaliados com a técnica empregada neste estudo.

A adição ao meio TCM 199 dos fatores de crescimento EGF e IGF-I na mesma concentração utilizada neste experimento foi avaliada por LORENZO *et al.* (1994) que encontraram que a utilização dos fatores isolados ou associados apresentou efeito positivo sobre a maturação nuclear e que o EGF isolado ou combinado ao IGF-I estimula a expansão do *cumulus* de oócitos bovinos. Em outra pesquisa os autores (LORENZO *et al.*, 1995) compararam o SFB ou soro de vaca no estro adicionado ao meio TCM 199 e concluíram que o EGF isolado ou associado ao IGF-I foi um indutor potente da maturação meiótica e da expansão das células do *cumulus* e que os soros aumentaram os efeitos dos fatores de crescimento sobre a maturação e a expansão do *cumulus* de COCs bovinos imaturos. Resultados semelhantes foram na maturação de oócitos de coelhas pelo mesmo grupo de pesquisa (LORENZO *et al.*, 1996).

Também QUETGLAS *et al.* (2001) concluíram que a suplementação do meio TCM 199 com IGF-I não apresentou efeitos benéficos sobre a MIV e o cultivo de embriões de bovinos, sugerindo que para que este fator exercesse seu efeito seria necessária a suplementação com aminoácidos.

Em coelhas COCs foram cultivados em meio “Brackett” por LORENZO *et al.* (1997) por 8 ou 16 horas em diferentes concentrações de IGF-I. Na concentração de 100 ng/ml após 16 horas oócitos em MII totalizaram 74,6%, o maior percentual entre os tratamentos. Esta foi a mesma concentração empregada neste estudo.

Para GULER *et al.* (2000) a suplementação do meio TCM 199 com IGF-I não melhorou as taxas de maturação citoplasmática ou nuclear em oócitos de ovelhas. Após 24 horas de cultivo com a adição deste fator de crescimento encontraram 14% e 57% dos oócitos em estádios MI e MII, respectivamente. A maturação citoplasmática foi avaliada 48 horas após inseminação através da taxa de clivagem e pela taxa de desenvolvimento após 8 dias de cultivo. Segundo os autores não houve efeito do IGF-I sobre a taxa de clivagem. Apesar de não utilizarmos a FIV em nosso estudo e a metodologia ser diferente daquela

pesquisa, os reduzidos valores encontrados para avaliação citoplasmática demonstram que o IGF-I provavelmente interferiu negativamente no processo de maturação.

CARNEIRO *et al.* (2001) demonstraram que o IGF-I apresentou efeito positivo sobre a taxa de maturação nuclear de oócitos eqüinos durante 36 horas de cultivo, comparado a 48 horas. Ainda segundo este estudo o IGF-I no meio contendo gonadotrofinas, estradiol e SFB não aumentou as taxas de maturação nuclear, por outro lado incrementou a maturação citoplasmática a qual foi aferida pela clivagem partenogenética. Os autores sugerem uma sinergia entre o fator de crescimento, as gonadotrofinas, o estradiol e o SFB na maturação, citoplasmática e nuclear, do oócito eqüino. Diferentemente daquela pesquisa, que utilizou o meio TCM 199, empregamos o meio SOF sem a adição de gonadotrofinas nem estradiol e os nossos resultados tanto na maturação nuclear quanto na citoplasmática foram muito inferiores aos encontrados para as demais espécies domésticas.

Para a espécie felina KITIYANANT *et al.* (2003) demonstraram que o IGF-I melhorou as taxas de MIV e que os oócitos que atingiram o estágio MII puderam ser utilizados para estudos de transferência nuclear.

As perdas nesse processamento foram superiores às perdas do processamento dos grupos M0n, Cn e En e com isso encontrou-se diferenças estatísticas em todos os grupos.

Dos oócitos avaliados para maturação citoplasmática do grupo M0c+n apenas quatro (12,90%) foram considerados maduros. Quanto aos oócitos do grupo Cn, foram encontrados 11 (25,58%) e do grupo En foram encontrados apenas quatro (8,69%).

Pela perda de grande parte dos oócitos no processo de coloração citoplasmática e pela quantidade de oócitos considerados maturados, não foi possível fazer uma correlação entre a maturação nuclear e citoplasmática dos mesmos.

Na espécie canina a maturação *in vivo* dos oócitos e o desenvolvimento dos embriões apresentam características específicas relativas a tempo, duração e localização. Para muitos grupos de pesquisa o êxito da MIV resulta do efeito de aditivos tais como: gonadotropinas, esteróides, hormônios, fatores de crescimento e fontes proteicas suplementadas aos meios de

maturação (CINONE *et al.*, 1992; NICKSON *et al.*, 1993; HEWITT & ENGLAND, 1999a; REYNAUD *et al.*, 2005), enquanto que para outros grupos a maturação nuclear pode ser obtida com sucesso sem a adição de fontes proteicas ou de soro ao meio (BOLAMBA *et al.*, 2002).

Em nosso estudo a interpretação dos resultados negativos ficou prejudicada em função do alto número de estruturas degeneradas ou não passíveis de identificação do estágio nuclear, semelhantes a diversos relatos publicados (THEISS, 1997; HEWITT *et al.*, 1998; ROTA & CABIANCA, 2004).

O meio SOF, apesar das modificações ainda apresenta resultados modestos na MIV em oócitos caninos. Na formulação proposta em nossa pesquisa, o meio continha SFB e este pode ter mascarado os efeitos de potenciais toxinas presentes no meio, também o soro pode seqüestrar oxigênio reativo e tamponar o pH. Apesar do soro não ser considerado essencial para MIV do oócito canino sua participação é importante para a FIV e para o subsequente desenvolvimento embrionário (BOLAMBA *et al.* 2002).

O aperfeiçoamento da MIV na espécie canina é essencial para que as biotecnologias da reprodução possam ser efetivamente empregadas em benefício das espécies filogeneticamente relacionadas, especialmente os canídeos selvagens, entretanto, como demonstraram os resultados desta pesquisa os avanços neste processo ainda são lentos. Este estudo assim como outros pesquisou um meio diferente, o SOF, em um sistema de cultivo ao qual foi incorporado o IGF-I na tentativa de melhorar os índices de MIV na espécie canina (HEWITT & ENGLAND, 1997; HEWITT *et al.*, 1998; BOLAMBA *et al.*, 2002).

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos sob as condições experimentais deste estudo permitiu concluir que:

1. O meio SOF, com ou sem IGF-I, possibilitou a retomada da meiose em um número reduzido de COCs nos grupos M0, C e E;
2. A utilização do meio SOF com a suplementação do IGF-I resultou em alta frequência de oócitos degenerados;
3. O IGF-I reduziu a frequência de maturação citoplasmática quando comparado aos demais grupos;
4. A adição do IGF-I não exerceu efeito sobre a cinética da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas maturados *in vitro* em 72 horas.
5. As baixas taxas de retomada da meiose e de maturação citoplasmática provavelmente sejam devidas às condições inadequadas de cultivo ou à baixa competência meiótica da população de oócitos;

6. Mais pesquisas são necessárias para detectar os componentes que faltam ou que sejam deletérios aos COCs maturados nos diferentes meios de cultivo, bem como as necessidades metabólicas dos oócitos caninos na MIV. Estas informações possibilitarão o aperfeiçoamento dos protocolos de MIV,

etapa fundamental para a FIV e PIV, para que as biotécnicas da reprodução possam ser empregadas nos estudos de conservação da biodiversidade.

7. REFERÊNCIAS

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

ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 139-146, 1997.

AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Reproduction in mammals – germ cells and fertilization**. 2. ed. Cambridge, 1982. 177p.

BANG, P.; HALL, K. Insulin-like growth factors as endocrine and paracrine hormones. Cap. 7. In: SCHOFIELD, P.N. (Ed.) **The insulin-like growth factors – structure and biological functions**, Oxford, p. 221-239, 1992.

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

BOLAMBA, D.; RUSS, K.D.; OLSON, M.A. *et al.* In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**, v.58, p.1689-1703, 2002.

BOLAMBA, D.; RUSS, K.D.; HARPER, S.A.; *et al.* Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 65, p. 1037-1047, 2006.

CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C. *et al.* Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 899-905, 2001.

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

CINONE, M.; GHEIN, A.; CAIRA, M. *et al.* Collection and maturation of oocytes of domestic bitches. **International Congress on Animal Reproduction**, 12., proceedings, v. 4, p. 1767-1769, 1992.

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

CONCANNON, P. W. Reproductive biology and breeding management of the female dog. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n.2. p. 157-165, 2003.

CUI, X.S.; JIN, Y.X.; SHEN, X.H. *et al.* Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 267-274, 2006.

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

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

FROESCH, E.R.; SCHMID, C.; SCHWANDER, J. *et al.* Actions of insulin-like growth factors. **Annual Review on Physiology**, v. 6, p. 400-420, 1985.

FUJII, M.; OTOI, T.; MURAKAMI, M. *et al.* The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by slicing method. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 62, n. 3, 305-307, 2000.

GOODROWE, K.L.; WALKER, S.L.; RYCKMAN, D.P. *et al.* Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, n.2, p.389-403, 2000.

GORE-LANGTON, R.E.; ARMSTRONG, D.T. Follicular steroidogenesis and its control. Cap. 11. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. *et al.* **The Physiology of Reproduction**, 2 ed. New York: Raven, 1994, p. 571-627.

GREENWALD, G.S.; ROY, S.K. Follicular development and its control. Cap. 12. In: Knobil, E.; Neill, J.D. *et al.* **The Physiology of Reproduction**, 2 ed. New York: Raven, 1994, p. 629-724.

GREENWALD, G.S.; TERRANOVA, P.F. Follicular selection and its control. Cap. 11. In: Knobil, E.; Neill, J.D. *et al.* **The Physiology of Reproduction**, 2 ed. New York: Raven, 1988, p. 387-488.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Folliculogenesis, egg maturation, and ovulation. 5 ed. In: Hafez, E.S.E.; Hafez, B. **Reproduction in Farm Animals**, 7. ed., Philadelphia, Lippincot Williams & Wilkins, 2000, p. 68-81.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J. *et al.* Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v.51, p.91-108, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of pre-ovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of the domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v.51, n.83-91, 1997.

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

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

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

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Synthetic oviductal and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.55, p.63-75, 1999b.

HEWITT, D.A.; WATSON, P.F.; ENGLAND, G.C.W. Effect of concentration of serum on in vitro maturation of domestic bitch oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Abstrac Series: v.15, p.66-67, 1995.

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.1083-1101, 1998.

HOLST, P.A.; PHEMISTER, R.D. The prenatal development of the dog: preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v. 5, p. 194-206, 1971.

HUNTER, R.H.F. **Physiology and technology of reproduction in female domestic animals**. Academic Press, London, 1980. 393p.

HYTTEL, P.; FARSTAD, W.; MONDAIN-MONVAL, M. *et al.* Structural aspects of oocyte maturation in the blue fox (*Alopex lagopus*). **Anatomy and Embryology**, v. 181, 325-331, 1990.

JENNISCHE, E.; ISGAARD, J.; ISAKSSON, O.G.P. Local expression of insulin-like growth factors during tissue growth and regeneration. Cap. 9. In: SCHOFIELD, P.N. (Ed.) **The insulin-like growth factors – structure and biological functions**, Oxford, 1992. p. 221-239.

KIM, M.K.; FIBRIANTO, Y.H.; OH, J.J. *et al.* Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation of canine oocytes

collected from dogs with different stages of the estrus cycle. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 3, p. 253-258, 2004.

KITIYANANT, Y.; SAIKHUN, J.; PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. **Theriogenology**, v.59, p.1775-1786, 2003.

KUMAR, D.; PUROHIT, G.N. Effect of epidermal and insulin-like growth factor-I on cumulus expansion, nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes. **Veterinarski Arhiv**, v. 74, n. 1, p. 13-25, 2004.

LOGAN, A.L.; HILL, D.J. Bioavailability: Is this a key event in regulating the actions of peptide growth factors? **Journal of Endocrinology**, v. 134, p. 137-161, 1992.

LORENZO, P.L.; ILLERA, M.J.; ILLERA, J.C. *et al.* Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte IVM with addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 697-701, 1994.

LORENZO, P.L.; ILLERA, M.J.; ILLERA, J.C. *et al.* Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 44, p. 109-118, 1995.

LORENZO, P.L.; REBOLLAR, P.G.; ILLERA, M.J. *et al.* Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 107, p. 109-117, 1996.

LORENZO, J.C.; ILLERA, G.; SILVÁN, C.J. *et al.* Steroid-level response to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 35, p. 11-29, 1997.

LORENZO, P.L.; LIU, I.K.M.; ILLERA, J.C. *et al.* Steroid response in mare oocytes matured in vitro with growth factors. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.363, 2002. Special Issue: Proceedings Annual IETS Conference.

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

MARTINS, L. R. **Maturação nuclear de oócitos de cadelas em estro e anestro submetidas à maturação *in vitro***. 2005. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

McDOUGALL, K.; HAY, M.A.; GOODROWE, K.L. *et al.* A. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and

mature bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v. 51, p. 25-31, 1997.

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

NODEN, D.M.; DE LAHUNTA, A. **Embriología de los animales domésticos**. Zaragoza, Acribia, 1990. 399p.

OLSON, M.A.; RUSS, K.; SANDLER, J. *et al.* Effect of media formulation on nuclear maturation of cultured dog oocytes. **Biology of Reproduction**, v.60, supplement 1, p. 185, 1999.

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

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

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

QUETGLAS, M.D.; COELHO, L.A.; GARCIA, J.M. *et al.* Effect of insulin-like growth factor-1 during in vitro oocyte maturation and in vitro culture of bovine embryos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 207-211, 2001.

RENTON, J.P.; BOYD, J.S.; ECKERSALL, P.D. *et al.* Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, p.221-231, 1991.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N. *et al.* In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, v. 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.

ROSENKRANS, C.F.; Jr. ZENG, G.Z.; SCHOFF, P.K. *et al.* A simple medium for in vitro development of bovine embryos. **Journal of Animal Science**, Supplement, v. 68, p. 430, 1990. Abstract.

RIEGER, D.; LUCIANO, A.M.; MODINA, S. *et al.* The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, p. 123-130, 1998.

ROTA, A.; CABIANCA, G. In vitro maturation rates of canines oocytes from anoestrous bitches in simple media. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 44, p. 105-109, 2004.

SAS **Statistical Analysis System**. v.6.03 Cary: SAS Institute, 1988, 1028p.

SAINT-DIZIER, M.; SALOMON, J.F.; PETIT, C. *et al.* In vitro maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v.57, p.147-159, 2001.

SCHOFIELD, P.N. **The insulin-like growth factors – structure and biological functions**, Oxford, 1992, p. 1-4.

SONGSASEN, N., Y., I., GOMEZ, M.; LEIBO, S.P. Effects of meiosis-inhibiting agents and equine chorionic gonadotropin on nuclear maturation of canine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, p. 435-445, 2003.

SPANIEL-BOROWSKI, K. Morphological investigations on follicular atresia in canine ovaries. **Cell Tissue Review**, v. 214, p. 158-168, 1981.

STABENFELDT, G.H.; SHILLE, V.M. Reproduction in the dog and cat. In: COLE, H.H, CUPPS, P.T. (Ed.), **Reproduction in Domestic Animals**, 3 ed., New York: Academic Press, 1977, p. 499-527.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v.37, p.147-159, 2001.

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 493-497, 1972.

THEISS, T. Collection, in vitro maturation and fertilization of oocytes in the dog. **Diss. Med. Vet.** Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilian Universität, München, 1997.

TSAFRIRI, A.; ADASHI, E.Y. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. Cap. 15. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Ed.) **The Physiology of Reproduction**, 2., New York, Raven, p. 817-860, 1994.

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

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. Cap. 3. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Ed.) **The Physiology of Reproduction**, 2., New York, Raven, p. 79-122, 1994.

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

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H. *et al.* Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v.46, p.853-858, 1992.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWANO, Y. *et al.* In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v.47, p.227-229, 1993.

YOSHIMURA, Y.; ANDO, M.; NAGAMATSU, S. *et al.* Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 152-160, 1996.

YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors and their binding proteins – potential relevance to reproductive physiology. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 2, p. 1-24, 2003.

XIA, P.; TEKPETEY, F.R.; ARMSTRONG, D.T. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. **Molecular Reproduction Development**, v. 38, p. 373-379, 1994.

ZELEZNIK, A.J.; BENYO, D.F. Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. Cap. 49. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. *et al.* **The Physiology of Reproduction**, 2 ed. New York: Raven, p. 751-782, 1994.

ZHOU, J.; CHIN, E.; BONDY, C. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3281-3288, 1991.

8. APÊNDICES

A. PBS Completo e PBS Ca+2 Mg+2 Free

Componentes	PBS Completo	PBS Ca+2 Mg+2 Free
Água Milli-Q q.s.p.	1l	1l
NaCl (137mM/171mM)	8g	10g
KCl (2,7mM/3,4mM)	0,2g	0,25g
Na ₂ HPO ₄ -Anidro (8mM)	1,15g	-
Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O (4mM)	-	1,44g
KH ₂ PO ₄ (1,5mM/1,8mM)	0,2g	0,25g
CaCl ₂ -2H ₂ O (0,7mM)	0,1g	-
MgCl ₂ -6H ₂ O (0,5mM)	0,1g	-
DL-Glucose (5,5mM)	1g	-
Antibiótico	5ml	-

Adicionar os elementos na ordem em que aparecem, sob agitação por quinze minutos, ajustar o pH para 7,2, filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C), por até um mês. Obs: Diluir o CaCl₂ e o KH₂PO₄ em água e adicioná-los lentamente à solução para não precipitar.

B. Meio SOF

Soluções Estoque	A Solução de Sais	B Solução de Bicarbonato	C Solução de Piruvato	D Solução de CaCl ₂	L- Glutamina
Água Milli-Q	9,84ml	10ml	1ml	1ml	1ml
NaCl (1,1M)	0,629g	-	-	-	-
KCl (72mM)	0,0534g	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄ (12mM)	0,0162g	-	-	-	-
MgSO ₄ -7H ₂ O (7,4mM)	0,0182g	-	-	-	-
DL-Ácido Lático	60µl	-	-	-	-

(60%) (50 μ M)					
Bicarbonato de Sódio (250mM)	-	0,210g	-	-	-
<i>Phenol Red</i> (260 μ M)	-	0,001g	-	-	-
Piruvato Sódico (100mM)	-		0,011g	-	-
CaCl ₂ -2H ₂ O (178mM)	-	-	-	0,0262g	-
L-Glutamina (200mM)	-	-	-	-	0,02923g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem e armazenar em geladeira (4°C). Os estoques A, B, D e L-Glutamina devem ser preparados semanalmente, mas o estoque C, diariamente.

B.1 - SOF estoque	10ml	20ml
Água Milli-Q	7,8ml	15,6ml
Estoque A	1ml	2ml
Estoque B	1ml	2ml
Estoque D	100 μ l	200 μ l
L-Glutamina	10 μ l	20 μ l
BME Essenciais (50X)	100 μ l	200 μ l
MEM Não-Essenciais (100X)	100 μ l	200 μ l
Myo-Inositol (2,8mM)	0,005g	0,01g
Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado (340 μ M)	0,001g	0,002g

Adicionar os componentes na ordem, filtrar em membrana de 0,22 μ m e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

B2. Meio SOF final (SOF estoque + 2,5% de SFB+ 5mg BSA/ml):

SOF final	1ml	5ml
SOF estoque	1ml	5ml
Estoque C	2 μ l	10 μ l
Antibiótico (Pen G Potássica)	5 μ l	25 μ l
BSA (CIV) (5mg/ml)	0,005g	0,025g
SFB	25 μ l	125 μ l

Obs: Adicionar o BSA por último, esperar dissolver, filtrar em membrana de 0,22 μ m e colocar na estufa úmida de CO₂ para equilibrar a temperatura e a atmosfera gasosa.

C. Meio de Lavagem de Oócitos (TCM 199 Hepes)

Solução Mãe TCM 199 Hepes	10mL	50ml
----------------------------------	-------------	-------------

Água Milli-Q	10ml	50ml
TCM 199	0,095g	0,475g
Bicarbonato de Sódio (5mM)	0,0042g	0,021g
Hepes Sódico (10mM)	0,026g	0,130g
Hepes Ácido (10mM)	0,024g	0,120g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22 μ m e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

Meio de Lavagem	10ml	50ml
Solução Mãe TCM 199 Hepes	9ml	45ml
SFB	1ml	5ml
Estoque C (Piruvato)	20 μ l	100 μ l
Antibiótico	50 μ l	250 μ l

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22 μ m e armazenar em geladeira (4°C), por até um dia.

D. Solução “Tyrodes” Ácida (ajustar pH 2,1 com HCl 1N)

Água Milli-Q	100 ml
NaCl (0,14 M)	0,8 g
KCl (2,7 mM)	0,02 g
MgCl ₂ .6H ₂ O (0,5 mM)	0,01 g
CaCl ₂ .2H ₂ O (1,7 mM)	0,02 g
Glicose (5,5 mM)	0,1 g
PVA (0,1%)	0,1 g

E. Solução Formaldeído

PBS	10 ml
Formaldeído (3%)	300 μ l

F. Solução de Bloqueio

PBS	100 ml
BSA (1 mg/ml)	0,1 g

Glicina (100 mM)	0,7507 g
Azida de sódio (0,2%)	0,2 g

G. Estoque de *Lens Culinaris* (Lecitina; -20°C)

PBS ou Água Milli-Q	10 ml	100 µl
Lecitina (10 µg/µl)	0,01 g	0,0001 g

H. Soro Fetal Bovino (SFB)

Centrifugar o sangue fetal bovino, coletado em abatedouro em tubos de centrifuga de vidro, por duas vezes em centrífuga refrigerada a 3500 rpm (1800xg) por 10 minutos, desprezando-se o sedimento. Inativar os complementos deste plasma por meio de aquecimento a 56°C por trinta minutos. Filtrá-lo em membrana de 0,45 e 0,22µm e aliquotar em volume de uso.

I. Hialuronidase 0,2%

10 ml de PBS Ca⁺⁺ livre, 0,01g de PVA (0,1%); 0,02g de Hialuronidase. PBS Ca⁺⁺ livre + 0,1% de PVA. Estocar 100 µl e congelar a -70 °C, antes de utilizar deixar na estufa (39°C) por 30 minutos. Obs.: Filtrar o PBS + PVA e então adicionar a hialuronidase. O Ca⁺⁺ mantém as ligações entre as células. A Hialuronidase remove as células do cumulus.

J. Estoque Hoechst 33342

1 mL de solução PBS completo com 0,01g de PVA
0,001g de Hoechst (protegido da luz)
aliquotar em 10 µl em freezer -20°C

K. Hoechst Para o uso (protegido da luz)

100µL de PBS + 900µl de glicerina ou glicerol
10µL de estoque aliquotado de Hoechst

L. Pronase 0,5%

PBS	20 ml
PVA (0,1%)	0,020 g

Pronase (5 mg/ml)	0,100 g
-------------------	---------

M. Solução de lavagem PBS + PVA 0,3%

PBS	100ml
PVA	0,03g