

LÍLIAN RIGATTO MARTINS

MATURAÇÃO NUCLEAR DE OVÓCITOS DE CADELAS EM ESTRO E
ANESTRO SUBMETIDOS À MATURAÇÃO *IN VITRO*.

Botucatu

2005

LÍLIAN RIGATTO MARTINS

MATURAÇÃO NUCLEAR DE OVÓCITOS DE CADELAS EM ESTRO E
ANESTRO SUBMETIDOS À MATURAÇÃO *IN VITRO*.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista - UNESP –
Campus de Botucatu para a obtenção do título
de Mestre em Medicina Veterinária. Área de
Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a Adj. Maria Denise Lopes

Botucatu

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL:

Martins, LÍlian Rigatto

Efeito do *status* reprodutivo sobre a maturação nuclear de ovócitos
caninos submetidos à maturação *in vitro* em dois meios de cultivo/
LÍlian Rigatto Martins. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: Maria Denise Lopes

Assunto

1. Canino - Reprodução 2. Maturação ovocitária

CDD

Palavras-chave: *Status* reprodutivo; Maturação; Ovócito; Cadelas

DEDICO A

Minha mãe, Leila, Leilane e Leo,
pelo carinho, amor e compreensão.

AGRADEÇO

À minha orientadora, Prof^a. Maria Denise Lopes, pelo carinho e dedicação durante todo o período de convivência que tivemos.

Aos professores da Área de Reprodução Animal, em especial aos professores Nereu Carlos Prestes, meu orientador durante os estágios de quinto ano e durante as Iniciações Científicas; à Professora Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, orientadora de residência e ao Professor Sony Dimas Bicudo, que sempre me incentivou em todos os momentos e pelo qual nutro grande carinho e amizade.

Às minhas duas grandes amigas, Carla Bianchini Ponchirolli e Suzane Lílian Beier. A elas, meu carinho, respeito e agradecimento por todas as anestésias e pelo auxílio no laboratório nos mais estranhos horários.

À Christina Novelli Silveira por todas as conversas gostosas, pelos sábios conselhos e, é claro, pelas aulas de francês.

À Premier Pet, pelo fornecimento da ração comercial para os animais pertencentes a esse estudo.

À Dr^a. Adriana Polachini do Valle, à bióloga Nádia dos Reis Carvalho e às funcionárias, Vânia Vieira Mello Vidal, Nelmara Camargo e Angélica Batista Ribeiro do Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Unesp, Campus de Botucatu, pelo auxílio nas dosagens de progesterona.

À Prof. Dra. Luzia Aparecida Trinca, do Departamento de Bioestatística do IB, Unesp - Botucatu, pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Às bibliotecárias Rosemeire Aparecida Vicente pela elaboração da ficha catalográfica e Rosemary Cristina da Silva pela realização das correções das referências bibliográficas.

À Leila Rigatto Martins, pelas correções gramaticais da dissertação.

Ao Sr. Luís, funcionário do Canil, que nos auxiliou no manejo dos animais.

Agradeço ainda àqueles que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

MARTINS, L.R. **Maturação nuclear de ovócitos de cadelas em estro e anestro submetidos à maturação *in vitro***. Botucatu. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Unesp.

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a taxa de maturidade nuclear dos ovócitos provenientes de cadelas em estro e em anestro submetidos à maturação em dois meios de cultivo, TCM 199 (*Tissue Culture Medium*) e SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*) durante 24 horas. A parte experimental foi dividida em dois grupos; grupo 1, cadelas em anestro e grupo 2, constituído de cadelas em estro. Em cada grupo, os ovócitos foram removidos dos ovários e metade deles foi imediatamente corada com Hoescht 33342 e classificados como VG (vesícula germinativa), QVG (quebra da vesícula germinativa), MI (metáfase I) e D/NI (degenerados/não passíveis de identificação) e a outra parte foi maturada em SOF e em TCM 199 por 24 horas, corados e avaliados conforme descrição anterior. Foram recuperados 511 e 373 ovócitos grau I nos grupos 1 e 2 respectivamente. O número médio de ovócitos grau I obtidos por cadela no anestro foi de $46,45 \pm 25,23$. Para as fêmeas do grupo 2, este valor foi de $62,16 \pm 8,18$ ovócitos/cadela. O protocolo que utilizou ovócitos provenientes de doadoras em estro e maturação *in vitro* no SOF foi superior aos demais protocolos testados, demonstrando que a maturação ovocitária é beneficiada pela associação entre a fase do ciclo estral e o meio de maturação *in vitro* (58% MI). Quando submetidos à maturação *in vitro* os ovócitos provenientes

de fêmeas em estro e em anestro apresentam taxas de QVG semelhantes (21,68% TCM 199 e 23,61% SOF – anestro; 20% TCM199 e 23% SOF - estro), porém a taxa de MI foi superior no grupo de ovócitos provenientes de fêmeas em estro (9,79% TCM 199 e 9,72% SOF – anestro; 25% TCM 199 e 58% SOF – estro). Pôde-se ainda evidenciar que em todos os protocolos testados, o tempo de maturação *in vitro* de 24 horas foi insuficiente para a obtenção da configuração nuclear de metáfase II.

Palavras-chave: Cadelas, Maturação; Ovócitos; Ciclo reprodutivo.

Nuclear maturation of *in vitro* matured oocytes from estrus and anoestrus bitches. MARTINS, L.R.. Botucatu. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Unesp.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the nuclear maturation of *in vitro* matured oocytes originating from estrus and anoestrus bitches. Two different culture media were used, TCM 199 (*Tissue Culture Medium*) and SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*). The experimental part was divided into two groups: group 1, consisting of anoestrus bitches, and group 2, consisting of estrus bitches. In each group, oocytes were harvested from ovaries and half of them were immediately stained with Hoechst 33342 and classified as in GV (germinal vesicle), GVBD (germinal vesicle breakdown), MI (metaphase I) and D/NI (degenerated/non identifiable). The other part was matured in SOF or TCM media for 24 hours, stained and evaluated as described previously. There were 511 and 373 grade I oocytes recovered in groups 1 and 2, respectively. The mean number of oocytes obtained per anoestrus bitch was 46.45 ± 25.23 . For females in group 2, this value was 62.16 ± 8.18 oocytes / bitch. The protocol that utilized estrus donor's oocytes and *in vitro* maturation in SOF was superior to the other protocol tested, demonstrating that the association between phase of the estrus cycle and maturation medium is beneficial for oocyte *in vitro* maturation (58% MI). Oocytes from estrus and anoestrus bitches submitted to *in vitro* maturation presented similar rates of GVBD (21.68% TCM 199 and 23.61% SOF – anoestrus; 20% TCM199 and 23% SOF - estrus). However the MI rate was higher in

the estrus group (9.79% TCM 199 and 9.72% SOF – anoestrus; 25% TCM 199 and 58% SOF – estrus). It was demonstrated, in all the protocols tested, that 24 hours *in vitro* maturation was insufficient for obtaining nuclear configuration of metaphase II.

Key words: Bitches, Maturation; Oocytes; Reproductive Cycle.

Resumo

Abstract

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS E TABELAS

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Aspectos da fisiologia reprodutiva da cadela (<i>Cannis familiaris</i>)	19
2.2. Aspectos da maturação de ovócitos caninos	20
2.2.1. Obtenção de ovócitos caninos	20
2.2.2. Influência da fase do ciclo estral sobre a maturação <i>in vitro</i>	21
2.2.3. Sistemas e meios de maturação <i>in vitro</i>	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Animais	29
3.2. Citologia vaginal	30
3.3. Dosagem de progesterona sérica	31
3.4. Ovários e recuperação dos ovócitos	32
3.5. Classificação dos CCO	33
3.6. Avaliação da configuração nuclear	33
3.7. Maturação ovocitária <i>in vitro</i>	34
3.7.1. Grupo 1	34
3.7.2. Grupo 2	36

3.8. Análise estatística	37
4. RESULTADOS	39
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS	62

Anexo

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

	Pág.
Figura 1 - CCO de cadela não submetido à maturação (aumento 8x)	38
Figura 2 - Ovócito de cadela em estágio de vesícula germinativa (aumento 200x)	38
Figura 3 - Ovócito de cadela em estágio de quebra de vesícula germinativa (aumento 200x)	38
Figura 4 - Ovócito de cadela em estágio de metáfase I (aumento 100x) ..	38
Gráfico 1 - Comparação entre a frequência relativa de CCO nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro e em estro, não submetidos à maturação <i>in vitro</i> ($p < 0,007$) - Botucatu, 2005	41
Gráfico 2 - Comparação entre a frequência relativa de CCO nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro, submetidos à maturação <i>in vitro</i> em dois meios de cultivo, TCM 199 e SOF ($p > 0,007$) - Botucatu, 2005	43

Gráfico 3 - Comparação entre a frequência relativa de CCO nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em estro, submetidos à maturação *in vitro* em dois meios de cultivo, TCM 199 e SOF ($p<0,007$) - Botucatu, 2005 45

Gráfico 4 - Comparação entre a frequência relativa de CCO nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro e em estro, submetidos à maturação *in vitro* em TCM 199 ($p<0,007$) - Botucatu, 2005 46

Gráfico 5 - Comparação entre a frequência relativa de CCO nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro e em estro, submetidos à maturação *in vitro* em SOF ($p<0,007$) - Botucatu, 2005 47

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
Quadro 1 - Correlação entre concentração sérica de progesterona e os eventos reprodutivos na cadela	32
Quadro 2 - Composição dos meios de maturação <i>in vitro</i> utilizados no grupo de fêmeas em anestro. Botucatu, 2004	35
Quadro 3 - Composição dos meios de maturação <i>in vitro</i> utilizados no grupo de fêmeas em estro. Botucatu, 2004	36
Tabela 1 - Frequência absoluta e relativa de CCO recuperados de 11 fêmeas em anestro pertencentes ao Grupo 1 - Botucatu, 2005	39
Tabela 2 - Frequência absoluta e relativa de CCO recuperados de 6 fêmeas em estro, pertencentes ao Grupo 2 - Botucatu, 2005	39
Tabela 3 - Frequência absoluta e relativa de CCO grau I avaliados, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro, não submetidos à maturação <i>in vitro</i> - Botucatu, 2005	40
Tabela 4 - Frequência absoluta e relativa de CCO Grau I avaliados,	

nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG) e metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em estro, não submetidos à maturação *in vitro* - Botucatu, 2005 40

Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa de CCO grau I avaliados, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro, submetidos à maturação *in vitro* em dois meios de cultivo, TCM 199 e SOF ($p > 0,007$) - Botucatu, 2005 42

Tabela 6 - Frequência absoluta e relativa de CCO grau I nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em estro, submetidos à maturação *in vitro* em dois meios de cultivo, TCM 199 e SOF ($p < 0,007$) - Botucatu, 2005 44

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de tecnologias como a fertilização *in vitro* (FIV), o cultivo e a transferência de embriões têm obtido sucesso na maioria dos mamíferos. Embora muitos estudos estejam sendo realizados para a determinação das necessidades de cultivo para a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos caninos, a eficiência dessa tecnologia nas cadelas é ainda muito baixa quando comparada com as outras espécies. As baixas taxas de MIV nas cadelas podem ser devido às condições sub-ótimas de cultivo ou a uma baixa competência meiótica dos ovócitos caninos (FARSTAD, 2000b).

Dessa forma, a maturação e a fertilização de ovócitos *in vitro* são procedimentos que ainda precisam ser investigados na espécie canina para que programas de preservação de gametas venham a ser estabelecidos em canídeos com risco de extinção (HEWITT & ENGLAND, 1997b).

Ressalta-se que o cão doméstico é o modelo comparativo mais adequado aos estudos direcionados à conservação dessas espécies (LUVONI et al., 2001).

A maturação e fertilização dos ovócitos nos cães são eventos únicos em relação a outras espécies domésticas. As ovulações ocorrem entre o segundo e sétimo dia após o início do comportamento do estro; na maioria das vezes no terço inicial do estro (WILDT et al., 1978 apud Yamada, 1992). Os ovócitos liberados apresentam núcleo na fase de vesícula germinativa e a primeira divisão meiótica não se completa até 48 horas após o processo de ovulação nas tubas uterinas (VAN DER STRICHT, 1923; TSUTSUI, 1975).

Recentemente, Fontbonne et al. (2004) observaram figuras de metáfase I (MI) entre 46 e 84 horas demonstrando que a maturação ovocitária *in vivo* na tuba uterina da cadela requer no mínimo 50 horas para atingir a fase de metáfase II (MII). Os ovócitos caninos liberados permanecem viáveis por cerca de 108 horas (TSUTSUI & SHIMIZU, 1975; TSUTSUI, 1989).

A maioria dos autores que trabalha com biotécnicas que envolvem a maturação, o cultivo e a fertilização *in vitro* de ovócitos de cadelas é unânime em afirmar a dificuldade que existe na obtenção de resultados satisfatórios.

Atribui-se a essa dificuldade a falta de compreensão sobre todos os eventos reprodutivos da cadela bem como as particularidades existentes nesta espécie, incluindo o ambiente hormonal; o reinício e a progressão da meiose; a ausência de um meio de maturação definido para a espécie e o papel do oviduto sobre a maturação ovocitária (MAHI & YANAGIMACHI, 1976; HEWITT & ENGLAND, 1998a,b; OTOI et al., 1999; FARSTAD, 2000b; GOODROWE et al., 2000; , 2000; BOGLIOLO et al., 2002; RODRIGUES & RODRIGUES, 2002a; SONGSASEN et al., 2002; et al., 2003; WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003; FONTBONNE et al., 2004; LUVONI et al., 2005).

Essas informações indicam a necessidade de pesquisas no campo da MIV e da FIV em cães. Em vista do exposto, a presente pesquisa tem ao objetivo de testar em cadelas as seguintes hipóteses:

- 1) Os ovócitos submetidos a uma maturação intra-folicular prévia, apresentam uma taxa de MIV mais alta, favorecendo os procedimentos de fertilização *in vitro* na espécie canina?

2) Existe influência do meio de cultivo nas taxas maturação nuclear ovocitária *in vitro*.

Para testar as hipóteses levantadas foi realizada:

✓ Avaliação da taxa de maturidade nuclear dos ovócitos provenientes de cadelas em estro e anestro submetidos à maturação em dois meios de cultivo, TCM 199 (*Tissue Culture Medium*) e SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nossos conhecimentos sobre as etapas que envolvem a FIV são relativamente recentes, uma vez que remontam o fim do século XIX. Nos mamíferos os conhecimentos iniciais sobre a FIV foram obtidos por meio de experiências com coelhos, ratos, camundongos e com o gato doméstico (VAN BENEDEN, 1875 apud SCRIBAN, 1999; VAN DER STRICHT, 1923).

A primeira FIV de sucesso em mamíferos foi realizada na França em 1953, em coelhas, a partir de espermatozóides capacitados no útero (CHANG, 1955).

A fertilização de ovócitos caninos *in vivo* foi observada pela primeira vez por Van Der Stricht (1923) quando se verificou a penetração espermática de ovócitos em vários estágios de maturação, incluindo a fase dictiada, entretanto nessa fase, não foram observadas modificações na cabeça do espermatozóide até a extrusão do segundo corpúsculo polar.

Foi somente em 1976, dois anos antes do nascimento do primeiro produto da FIV em humanos, que Mahi e Yanagimachi publicaram o primeiro trabalho demonstrando a possibilidade de realização da maturação ovocitária *in vitro* na espécie canina. Nessa publicação, os autores realizaram ainda, o primeiro teste de penetração espermática nesta espécie, utilizado até os dias de hoje.

O primeiro relato de êxito na fertilização *in vitro* de ovócitos obtidos através de crescimento intrafolicular adequado na espécie canina e sua subsequente inovulação ocorreu em 2001, com o trabalho de England et al. Vinte dias após a

transferência dos embriões foi diagnosticada a gestação nessa fêmea, visualizando três conceptos caninos. Dois dias após o ultra-som, não se identificaram os fetos.

A taxa mais alta de maturação ovocitária obtida nas cadelas é de 39% de MII, relatada por Nickson et al. (1993) e as taxas de reinício da meiose se encontram entre 0 e 58% (FARSTAD, 2000b).

2.1. Aspectos da fisiologia reprodutiva da cadela (*Cannis familiaris*)

Entre os animais domésticos, o cão apresenta uma biologia reprodutiva incomum. A cadela é monoéstrica, ovulando somente uma a duas vezes ao ano, com intervalos de 5 a 12 meses, sendo submetida a longos períodos de influência progestacional (JOHNSTON et al., 2001).

Os ovócitos das cadelas são liberados em um estado imaturo, como ovócitos primários, e não podem ser fertilizados imediatamente (CONCANNON et al., 1989).

A fertilização só ocorre após a maturação do ovócito primário, isto é, após a extrusão do primeiro corpúsculo polar e o final da primeira divisão meiótica, para formação do ovócito secundário (TSUTSUI, 1989).

Enquanto esses eventos de maturação acontecem antes da ovulação na maioria das espécies, na cadela eles não ocorrem até pelo menos 48 horas após a ovulação (ENGLAND & CONCANNON, 2002). Finalmente, a fase lútea do ciclo de uma cadela gestante ou não é similar, em duração (JOHNSTON et al., 2001).

O oviduto canino sustenta, por um longo período, a sobrevivência dos ovócitos que são ovulados na fase de vesícula germinativa e é nesse órgão que se completa a maturação, ocorre a fecundação e o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Holst & Phemister, 1971).

2.2. Aspectos da maturação de ovócitos caninos

2.2.1. Obtenção de ovócitos caninos

A maioria dos folículos nas cadelas permanece sob a superfície ovariana e não se torna aparente até alguns dias antes do momento da ovulação, sendo impossível puncioná-los individualmente. Portanto, a técnica de aspiração folicular mostra-se dificultosa nas cadelas, devido à pequena dimensão dos folículos ovarianos dessa espécie. A taxa de recuperação ovocitária com a utilização da aspiração folicular é inferior àquela obtida com a técnica de *slicing* (NICKSON et al., 1993).

Diversos laboratórios têm utilizado ovócitos obtidos a partir de folículos corticais mais profundos através do *slicing* ou “fatiamento”. Por meio desta técnica os ovários são fatiados ao longo do comprimento e da largura com um instrumento cortante, com a finalidade de se obter um número maior de ovócitos a partir do ovário canino (SHIMAZU et al., 1992; NICKSON et al., 1993; HEWITT & ENGLAND, 1997a).

Os ovócitos caninos podem também ser obtidos através da digestão ovariana. Através desse método os ovários são colocados em uma solução enzimática, geralmente composta por collagenase e Dnase, por uma hora a 37 °C. O produto obtido da digestão é filtrado e colocado em uma solução para lavagem (DURRANT et al., 1998; BOLAMBA et al., 2002).

2.2.2. Influência da fase do ciclo estral sobre a MIV

Diversos autores buscam avaliar o efeito dos eventos endócrinos pré-ovulatórios *in vivo* sobre os ovócitos da cadela e sua subsequente influência na maturação *in vitro* (HEWITT & ENGLAND 1997a; LUVONI, 2000; OTOI et al., 2001; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003; WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003; SONGSASEN et al., 2004). Porém, quando são consideradas as condições reprodutivas das fêmeas doadoras, os resultados são controversos, razão pela qual há continuidade do processo investigatório.

A síntese lipídica ocorre em ovócitos em crescimento e funciona como um dos primeiros indicadores de maturação ovocitária (TESORIERO, 1982). Ovócitos caninos classificados como Grau I apresentam grandes quantidades de material lipídico, o que lhes confere aparência escura e homogênea, evidenciando o início da maturação citoplasmática e permitindo a nítida distinção entre os ovócitos caninos e das demais espécies.

Após longo período no interior do folículo, o ovócito canino deve adquirir competência à fecundação, denominada maturação, processo constituído por um conjunto de modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (SCRIBAN, 1999).

Podem-se distinguir três tipos de maturação: a nuclear, que corresponde ao reinício da meiose e expulsão do primeiro corpúsculo polar pelo núcleo do ovócito; a citoplasmática, caracterizada pela capacidade do citoplasma descondensar o núcleo do espermatozóide e transforma-lo em pró-núcleo masculino, e a maturação de membrana que permite à zona pelúcida do ovócito reconhecer os espermatozóides de sua espécie (SCRIBAN, 1999). Mimetizar essa experiência *in vitro*, com a reconstituição de todas as etapas que envolvem a maturação *in vivo* dentro do

ambiente laboratorial, é um objetivo comum.

Aplicam-se à cadela protocolos de maturação *in vitro* utilizados rotineiramente em outras espécies domésticas, especialmente a bovina. O insucesso obtido com a transferência dos conhecimentos do processo de maturação *in vitro* da espécie bovina para a canina fomenta a experimentação de protocolos eficazes ao objeto deste estudo.

Ademais, deve-se considerar ainda a diversidade dos ambientes bioquímico e biofísico *in vitro* para o imprescindível estudo sobre sistemas e tempo de cultivo, tensão de oxigênio e temperatura, meios de maturação *in vitro* e sua suplementação.

Segundo Fujii et al. (1999), proporções semelhantes de complexos *cumulus-ooforus* (CCO) grau I podem ser recuperadas de cadelas em todas as fases do ciclo estral e a presença de tecido lúteo pode ou não estar associada à recuperação de uma menor quantidade de CCO grau I em cadelas. De acordo com os resultados obtidos por Rodrigues & Rodrigues (2003), pode-se concluir que não houve diferença na proporção de CCO grau I e II em animais na fase folicular e no anestro **(52,8 ± 39,2 x 46,6 ± 36,5)**.

Nickson et al. (1993) afirmaram que o número médio de ovócitos Grau I obtidos por cadela no final do anestro é superior **(104 x 46)** ao número obtido no diestro, informando ainda que cadelas na fase de diestro forneceram os ovócitos de pior qualidade.

Estudos demonstraram que somente ovócitos com várias camadas de células do *cumulus* se desenvolvem *in vitro*. O papel das células do *cumulus in vivo* é o da transferência de nutrientes das células da granulosa para o ovócito, e esse papel pode ser mais importante na cadela que em outras espécies (NICKSON et al., 1993).

In vivo, as células do *cumulus*, que geralmente estão ausentes nas outras

espécies domésticas logo após a fertilização, permanecem unidas ao ovócito da cadela até o estágio de mórula. Contudo, nos estudos *in vitro*, as células do *cumulus* começam a se deteriorar após 48-72 horas de cultivo (NICKSON et al., 1993).

Yamada et al. (1993) demonstraram que a competência meiótica (MII) de ovócitos de cadelas na fase pré-ovulatória que receberam estimulação gonadotrófica foi superior a de ovócitos de cadelas não estimuladas **(31,9% x 12,1%)**. Sugeriram que a maturação pré-ovulatória do ovócito é um fator importante para a aquisição de competência meiótica e sua subsequente maturação *in vitro*.

Luvoni et al. (2001), estudando a influência dos diferentes estágios do ciclo estral da cadela sobre a taxa de MIV e as comunicações existentes entre o ovócito e as células do *cumulus* concluíram que a presença dessas comunicações no final do proestro foi acompanhada da habilidade dessa população ovocitária reiniciar a meiose.

Os ovócitos de fêmeas no proestro atingiram as fases de telófase I (TI) e MII em taxas mais elevadas que as populações provenientes de cadelas em anestro **(11,1 % x 0%)**. Esses resultados indicam que, durante o anestro, não há junções permeáveis entre os ovócitos e as camadas de células do *cumulus* que os revestem. Em contraste, uma correlação positiva foi observada entre a presença de *gap-junctions* permeáveis em ovócitos provenientes de cadelas em final de proestro.

Willingham-Rocky et al. (2003) estudaram o efeito da fase do ciclo estral sobre a maturação *in vitro* de ovócitos caninos suplementados com 0, 20, 200 e 2000 ng de progesterona, observaram que ovócitos coletados de cadelas em estro e diestro apresentaram taxas semelhantes de MII entre si, porém superiores a de ovócitos coletados de cadelas em anestro e proestro.

Hewitt & England (1997a) relataram que as taxas de maturação *in vitro* entre

ovócitos coletados de ovários de cadelas nos estágios de proestro e estro são semelhantes às comparados aos estágios de anestro e diestro. Concluíram que o ambiente hormonal *in vivo* não afeta a subsequente maturação *in vitro* de ovócitos Grau I.

Rodrigues & Rodrigues (2003) avaliaram a influência do *status* reprodutivo sobre a maturação *in vitro* de ovócitos caninos, mas não observaram influência da fase do ciclo estral sobre o processo de maturação (proestro/estro 5,4%; diestro 4,2% e anestro 4,4%).

2.2.3. Sistemas e meios de maturação *in vitro*

O cultivo em gota é o sistema utilizado mais amplamente em todas as espécies, inclusive na canina, e é caracterizado por gotas de meio de cultivo cobertas por óleo mineral. Nesse sistema, o principal fator biofísico é representado pela proporção entre número de ovócitos e volume de meio (LUVONI et al., 2005).

Otoi et al. (2002) avaliaram o efeito da densidade ovocitária sobre a competência meiótica de ovócitos coletados de cadelas em anestro e em diestro. Verificaram que a taxa de ovócitos de cadelas em anestro, a atingir a fase da MII submetidos à maturação na proporção de 10 ovócitos em 100µL é maior, quando comparada à maturação de 5 ovócitos para o mesmo volume (**$10,4 \pm 4,9 \times 5,3 \pm 1,6$**).

Esses autores não observaram interferência da densidade ovocitária em cadelas em diestro e verificaram que a inibição do reinício da meiose é caracterizada por uma alta proporção de ovócitos em relação ao meio; esse fato pode ocorrer devido aos fatores produzidos e secretados pelas células do *cumulus* do meio de

cultura.

Bogliolo et al. (2002) verificaram um efeito positivo sobre as taxas de maturação ovocitária quando os ovócitos foram cultivados em células provenientes da porção ampular do oviduto de cadelas em estro. No entanto, Landim-Alvarenga et al. (2001) não observaram efeito benéfico com a adição de células do oviduto bovino ao meio de maturação *in vitro* de ovócitos caninos.

As tubas uterinas suportam a sobrevivência de ovócitos que são liberados no estágio de vesícula germinativa e nesse local completam sua maturação, sofrem a fertilização e se desenvolvem até a fase de blastocisto (HOLST & PHEMISTER, 1971).

O sucesso no sistema de maturação ovocitária deve ser baseado nessas condições, entretanto, a falta de informações precisas sobre o ambiente tubárico, dificulta o conhecimento das condições de cultivo adequadas para essa espécie (BOGLIOLO et al., 2002).

Luvoni et al. (2003) foram os pioneiros na realização do cultivo em oviduto ligado. Embora não seja prática, a técnica apresentou bons resultados após 30 horas de cultivo (**63,8% de GVBD; MI e MII 12,5 a 31,9%**), porém não assegura a sobrevivência dos ovócitos após 48 horas (**59,3 % de degenerados**).

A obtenção de resultados satisfatórios na maturação ovocitária depende do tempo de cultivo ao qual os ovócitos são submetidos, uma vez que deve existir um balanço entre o tempo mínimo necessário à maturação *in vivo* e o tempo máximo para se obter o maior número de ovócitos em MII e o menor número de ovócitos degenerados.

Fontbonne et al. (2004) demonstraram que a presença de ovócitos na fase de MII *in vivo* ocorre somente a partir de 50 horas após a ovulação. No entanto, *in vitro*

os protocolos relacionados ao tempo de maturação diferem bastante. São descritos protocolos tão breves quanto 24 horas e tão longos quanto 120 horas (LUVONI et al., 2005).

Nickson et al. (1993) observaram que a proporção de ovócitos que apresentaram extrusão do segundo corpúsculo polar (II CP) não variou significativamente entre 24 e 72 horas de cultivo, indicando que todos os ovócitos capazes de sofrer maturação apresentam a extrusão do II CP após 24 horas de cultivo.

Yamada et al. (1992), estudando a maturação, fertilização e desenvolvimento de ovócitos *in vitro* em cadelas, observaram uma taxa de maturação ovocitária de 31,9% após 72 horas de cultura. Nesse experimento, os autores utilizaram ovócitos de cadelas submetidas a tratamento super-ovulatório.

Hewitt et al. (1998) testando diferentes suplementações no meio TCM 199, mostraram que as características e necessidades de maturação ovocitária canina diferem em relação ao período de tempo durante o qual são cultivados. O protocolo que utilizou 0,3% de BSA (albumina sérica bovina) apresentou sucesso com 48 horas de cultivo e o protocolo com 20% de soro fetal bovino (SFB), com 96 horas. Hewitt & England (1997a) não encontraram diferença significativa entre dois tempos de maturação, empregados sobre populações de ovócitos caninos submetidos à maturação em TCM 199 e suplementados com estradiol, progesterona, ambos os hormônios e o grupo controle.

Landim-Alvarenga et al. (2001) encontraram 18% de MI/MII cultivando ovócitos de cadela em presença de 0,3% de BSA por 36 horas seguidas de mais 24 horas e meio com 4% de BSA. Este resultado foi estatisticamente diferente dos 12% de MI/MII obtidos no mesmo experimento utilizando 20% de SFB.

Os meios de MIV utilizados para cadelas são adaptações dos meios descritos para bovinos. Esses meios podem ser divididos em simples e complexos. Os meios simples são soluções salinas acrescidas de fontes de energia como lactato, piruvato e glicose. Os complexos são meios que contêm aminoácidos, vitaminas e outros componentes (GARDNER & LANE, 2000).

Os meios mais utilizados na MIV canina são Modified Krebs Ringer Bicarbonate (mKRB) (YAMADA et al., 1992, 1993), Synthetic Oviduct Fluid (SOF) (HEWITT & ENGLAND, 1999a,b; BOLAMBA et al., 2002) e o mais comumente utilizado, TCM 199 (HEWITT & ENGLAND, 1997a; HEWITT et al., 1998; OTOI et al., 2000a,b; RODRIGUES & RODRIGUES, 2002a,b; 2003; BOGLIOLO et al., 2002; SONGSASEN et al., 2002; LUVONI et al., 2003; WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003).

Meios como o TCM-199 e HF-10 na presença ou ausência de suplementação hormonal ou sérica têm sido usados, mas a eficiência da maturação permanece baixa (FARSTAD, 2000b; LUVONI, 2000).

BOLAMBA et al. (2002), em experimento sobre maturação ovocitária em cadelas, conseguiram taxas de 10% de MI/II quando utilizaram meio SOF em 48 horas de cultivo e 12,2% com 72 horas de cultivo.

HEWITT & ENGLAND (1999a) também trabalhando com meio SOF, mostraram que o meio em questão aumentou a taxa de maturação nuclear, quando suplementado com altas concentrações de proteína **(27% em 0,3 % BSA x 62% em 4% BSA)**, mas somente após um período prolongado (96 h)

O efeito da suplementação dos meios de maturação com hormônios e outros componentes não está ainda esclarecido. Meios sem suplementação, como o SOF, também foram avaliados e foi observado que os ovócitos foram maturados *in vitro*

nas mesmas taxas que em meios suplementados (**6,6 a 10% x 7,6 a 12.2%**) (BOLAMBA et al., 2002).

Vários autores estudaram os efeitos da suplementação de estrógeno, progesterona ou a combinação de ambos (HEWITT & ENGLAND, 1999c; WILLINGHAM & KRAMER, 2001; VANNUCHI, 2003; KIM et al., 2004) com a adição de soro de cadela em estro (SCE) (NICKSON et al., 1993; OTOI et al., 1999), estradiol e gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (HANNA et al., 2004) e gonadotrofinas (HEWITT & ENGLAND, 1999c).

Nos cães, os ovócitos imaturos, no interior dos folículos são expostos a níveis altos de estrógeno e progesterona devido à luteinização pré-ovulatória dos folículos. Seguindo a ovulação, os ovócitos caninos ainda são expostos a níveis altos de progesterona e estrógeno na bursa e tuba, sugerindo que esses hormônios têm uma relação importante no reinício da meiose e na progressão para os estágios de MII (METCALFE, 1999).

Experimento realizado para determinar a taxa de MII de ovócitos caninos expostos a diferentes fontes protéicas adicionados ao meio de maturação TCM-199, demonstrou que a suplementação protéica não aumentou a taxa de maturação ovocitária (**2,1% controle x 1,3% BSA**) (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002a).

Vários tipos e concentrações de soros e proteínas - soro fetal bovino (SFB), SCE - têm sido utilizados em estudos de MIV no cão (MAHI e YANAGIMACHI, 1976; YAMADA et al., 1992; NICKSON et al., 1993).

Nickson et al. (1993) utilizaram um meio contendo 10% de SCE e 20µg/mL de estradiol para MIV de ovócitos caninos. Cerca de 39% de ovócitos de cadelas em vários estágios do ciclo estral alcançaram MII após 72 horas de cultivo. Essa é a maior taxa de maturação *in vitro* canina descrita na literatura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Essa pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ, Unesp/Botucatu. Foram utilizadas dezessete (17) fêmeas da espécie canina, adultas, de $3,1 \pm 1,2$ anos, de diversas raças, peso médio de $8,6 \pm 2,3$ Kg, provenientes do Canil Central da Unesp, Campus de Botucatu e de criatórios particulares. Aquelas provenientes do Canil Central foram abrigadas no canil da Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu; esses animais foram alojados em sistema “outdoor” e expostos à luz natural; foram alimentados com ração comercial (Golden Formula – Premier Pet[®]) duas vezes ao dia em quantidades ideais para manutenção do peso corpóreo e água disponível *ad libitum*.

Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo 1 – Composto por onze (11) cadelas saudáveis adultas em anestro, com idade média de $3,1 \pm 1,2$ anos, de diversas raças, com peso médio de $8,8 \pm 1,9$ Kg. Após OSH (ovariosalpingohisterectomia), os ovócitos provenientes dos ovários de seis (6) cadelas foram imediatamente avaliados para configuração nuclear. Os ovócitos recuperados das outras cinco (5) fêmeas foram submetidos à maturação *in vitro* em dois meios de cultivo.

Grupo 2 – Constituído por seis (6) cadelas, sem raça definida, com idade média de $3,0 \pm 0,6$ anos e peso médio de $8,6 \pm 3,2$ Kg. Esses animais foram submetidos à OSH no estro. Os ovócitos provenientes dos ovários de três (3) fêmeas foram imediatamente avaliados quanto à sua configuração nuclear, enquanto os ovócitos resgatados das três (3) fêmeas restantes foram submetidos à maturação *in vitro* em dois meios de cultivo. Uma fêmea pertencente a esse grupo foi submetida ao protocolo hormonal para indução do estro (VERSTEGEN et al., 1999). Esse protocolo hormonal consistiu na administração de $5 \mu\text{g/Kg/dia}$ de cabergolina (Galastop[®] – Ceva) por via oral até os sinais de proestro.

Antes da realização das OSH, as dezessete (17) cadelas foram submetidas a um exame clínico geral e a um exame reprodutivo através da inspeção visual de vulva, vagina e mamas. Foram realizados exames citológicos para identificação da fase do ciclo estral e dosagens de progesterona sérica para confirmação das fases do ciclo estral.

3.2. Citologia vaginal

Os exames citológicos foram realizados com o uso de escova ginecológica. As amostras foram coradas através do método de coloração do tipo panótico (Hematocor[®]) e a identificação dos tipos celulares baseou-se nos critérios adotados por Johnston et al. (2001). A citologia vaginal foi avaliada baseando-se na porcentagem de células superficiais sob microscopia óptica comum (aumento de 200x) para animais em fase folicular e na ausência desse tipo celular, para animais em anestro. A citologia vaginal constituiu-se em um teste de triagem, uma vez que a dosagem sérica de progesterona foi realizada para confirmar o *status* reprodutivo da

fêmea e o momento da ovulação.

3.3. Dosagem de progesterona sérica

As amostras de sangue foram coletadas através de punção da veia jugular em tubos sem anticoagulante. Foram retirados 5,0 mL com seringas de 5,0 mL e agulhas 30x08. O sangue foi centrifugado (centrífuga LS-3 – Celm[®]) por 10 minutos a 955 g para obtenção do soro.

O soro foi enviado ao Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Unesp, Campus de Botucatu, onde foi realizada a dosagem sérica de progesterona pelo método de quimioluminescência (ENGLAND & CONCANNON, 2002; ROOT-KUSTRITZ, 2001), através do sistema ELECSYS 2010.

Foram incluídos no Grupo 1, somente animais que apresentaram concentrações de progesterona inferiores a 1 ng/mL em associação à citologia vaginal, compatíveis com a fase de anestro (ROOT-KUSTRITZ, 2001).

No Grupo 2, fêmeas no estro, o início da fase folicular foi identificado por modificações de comportamento, edema de vulva, presença de secreção sero-sanguinolenta e pelo exame de citologia vaginal; a partir desse momento a progesterona foi mensurada diariamente até atingir uma concentração entre 3,0 e 3,9 ng/mL. Vinte e quatro horas após a detecção dessa concentração de progesterona, esses animais foram submetidos à OSH (ROOT-KUSTRITZ, 2001).

Quadro 1 - Correlação entre concentração sérica de progesterona e os eventos reprodutivos na cadela

Progesterona sérica (ng/ml)	Evento
Menor que 1,0	Anestro ou proestro
1,0 – 1,9	Ovulação menos 3 dias
2,0 – 2,9	Ovulação menos 2 dias
3,0 – 3,9	Ovulação menos 1 dia
4,0 – 10,0	Dia da ovulação
-	Ovulação mais 2 dias Melhor dia para o acasalamento
Maior que 10,0 com escamas na citologia vaginal	Ovulação mais 1 a 5 dias

A margem de erro estimada é de ± 1 dia. Adaptado de Root-Kustritz, 2001.

3.4. Ovários e recuperação dos ovócitos

As fêmeas do Grupo 1 e 2 foram submetidas à OSH de rotina. Os ovários foram mantidos em solução fisiológica 0,9% a 25°C (PALMA, 1993) por cerca de 1 hora até o processamento. A recuperação dos CCO foi realizada através da técnica de *slicing* (fatiamento) em DMPBS (Dulbecco's modified phosphate buffered saline).

Para realizar a classificação, os CCO foram mantidos em Placas de Petri

contendo DPBS e 5% de BSA (albumina sérica bovina).

3.5. Classificação dos CCO

Os CCO (Figura 1) foram avaliados sob lupa estereomicroscópica (Leica MZ 12,5) e classificados de acordo com critérios morfológicos de HEWITT e ENGLAND, 1997, em:

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

Grau II: CCO com ooplasma levemente pigmentado, com camadas de células do *cumulus* incompletas;

Grau III: ooplasma pálido, freqüentemente disforme e sem células do *cumulus*.

Após a devida seleção, somente CCO grau I foram aproveitados.

3.6. Avaliação da configuração nuclear

Os CCO grau I dos dois grupos foram submetidos à lavagem com solução de hialuronidase (tipo V – Sigma[®] – H-6259) 0,4% e 5% de BSA (Sigma[®] - fração V) para remoção das células do *cumulus* e posterior coloração.

Após serem totalmente desnudos, os CCO foram transferidos para gotas de 10µL de glicerol bisbenzimidaz (HOECHST 33342 - Hoechst[®]) e transferidos para lâminas histológicas, sendo recobertos com lamínula e examinados em microscópio invertido (Leica[®] DM IRD) equipado com luz ultra-violeta (comprimento de onda de

400 a 600 nm).

A maturação nuclear foi avaliada segundo os critérios de LANDIM-ALVARENGA (1999) da seguinte forma:

VG (vesícula germinativa): o ovócito apresenta núcleo esférico, localizado central ou perifericamente ao ooplasma (Figura 2);

QVG (quebra da vesícula germinativa): quando o núcleo do ovócito apresenta carioteca irregular ao redor da cromatina condensada e dispersa (Figura 3);

MI (metáfase I): caracterizado pela presença dos cromossomos arranjados na placa metafásica e localizados perifericamente no ooplasma (Figura 4);

MII (metáfase II): presença dos cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma e do corpúsculo polar no espaço perivitelínico;

D/NI: Degenerados ou não passíveis de identificação

3.7. Maturação ovocitária *in vitro*

3.7.1. Grupo 1

Os CCO de Grau I pertencentes ao Grupo 1 foram maturados em meios TCM 199 e SOF, acrescidos de gonadotrofinas, progesterona, estrógeno e SCE. Cento e quarenta e três (143) ovócitos foram lavados três vezes em gotas de 100 µL de TCM 199 e cento e quarenta e quatro (144) ovócitos em SOF.

Quadro 2 - Composição dos meios de maturação *in vitro* utilizados no grupo de fêmeas em anestro. Botucatu, 2004

TCM 199/SOF	10 mL
BSA (4%)	0,04g
Piruvato stock (11 µg/µL) (AnexoB)	20µL
FSH (50µg/mL) (Anexo C)	10µL
LH (1µg/mL) (Anexo D)	100µL
Filtrar (22 µm)	Filtrar
Estrógeno (1 µg/µL) (Anexo E)	1µL/mL
Gentamicina (15 µg/µL) (Anexo A)	5µL/mL
Progesterona (1µg/µL) (Anexo H)	1µL/mL
Soro de cadela em estro (Anexo G)	Adicionar 10% do volume total

Posteriormente, essa população de ovócitos foi dividida em no máximo 20 ovócitos/poço em placas do tipo “four well” (Nunc[®], Dinamarca). Estes ovócitos permaneceram em 400 µL de seus respectivos meios de maturação e recobertos por 100 µL de óleo mineral (Anexo F) e foram mantidos em estufa (Forma Scientific[®]) a 39° C e 5% de CO₂ em alta umidade.

Após 24 horas, esses ovócitos foram desnudos e avaliados conforme descrito no item anterior.

3.7.2. Grupo 2

Os CCO do Grupo 2 foram submetidos a um processo de maturação nuclear adicional, também em dois meios de cultivo; TCM 199 e SOF acrescidos de progesterona, estrógeno, soro de cadela em estro e sem gonadotrofinas.

Quadro 3 - Composição dos meios de maturação *in vitro* utilizados no grupo de fêmeas em estro. Botucatu, 2004

TCM 199/SOF	10 mL
BSA (4%)	0,04g
Piruvato stock (11 µg/µL) (Anexo B)	20µL
Filtrar (22 µm)	Filtrar
Estrógeno (1 µg/µL) (Anexo E)	1µL/mL
Gentamicina (15 µg/µL) (Anexo A)	5µL/mL
Progesterona (1µg/µL) (Anexo H)	1µL/mL
Soro de cadela em estro (Anexo G)	Adicionar 10% do volume total

Após 24 horas, esses ovócitos foram desnudos e avaliados para configuração nuclear conforme descrito no Grupo 1.

3.8. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa SAS[®] (Statistical Analysis System) para Windows, 2000 (SAS Institute, Inc., São Francisco, CA) ou através do Microsoft[®] Excel 2000 (Microsoft Corporation).

Foram calculadas as frequências relativa e absoluta de ovócitos classificados como VG, GVBD, MI e degenerados ou não identificáveis nos dois grupos de fêmeas (Grupos 1 e 2).

Os grupos foram comparados quanto ao efeito dos meios de cultivo e das fases do ciclo estral sobre as populações ovocitárias utilizando-se o Teste Qui-quadrado ($\alpha = 0,05$). Posteriormente, esta análise foi desmembrada em vários testes Qui-quadrado, comparando as amostras duas a duas utilizando $\alpha = 0,007$. Utilizou-se esse nível de significância menor para controlar a probabilidade de erro tipo I, já que foram feitas sete comparações.

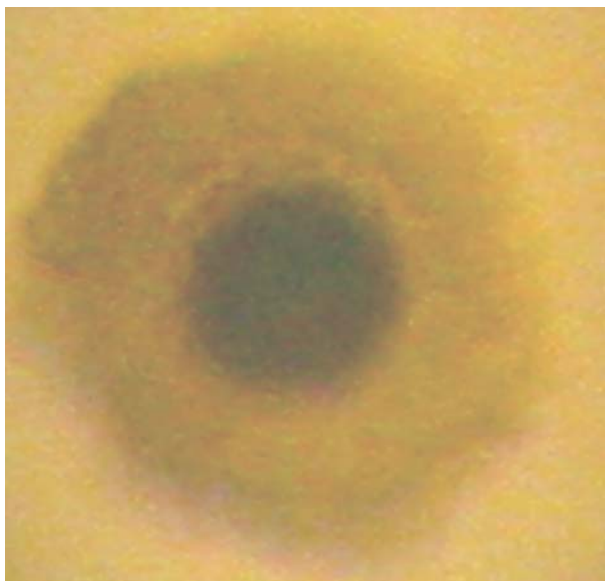


Figura 1 - CCO de cadela não maturado (aumento 8x)



Figura 2 - Ovócito de cadela em estágio de vesícula germinativa (aumento 200x)



Figura 3 - Ovócito de cadela em estágio de quebra de vesícula germinativa (aumento 200x)



Figura 4 - Ovócito de cadela em estágio de metáfase I (aumento 100x)

5. RESULTADOS

Foram obtidos 981 ovócitos dos ovários das fêmeas em anestro e 864 ovócitos das fêmeas em estro. Dos 981 ovócitos (Grupo 1), 511 foram classificados como grau I e dos 864 ovócitos da fêmea em estro (Grupo 2), 373 ovócitos foram classificados como grau I.

O número médio de ovócitos grau I obtidos por cadela no anestro foi de $46,45 \pm 6,07$. Para as fêmeas do grupo 2, este valor foi de $62,16 \pm 8,18$ ovócitos/cadela.

A perda de ovócitos durante a pesquisa foi de 4,07%.

Tabela 1 - Frequência absoluta e relativa de CCO recuperados de 11 fêmeas em anestro pertencentes ao Grupo 1 - Botucatu, 2005

Parâmetros	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
CCO coletados	981	100
CCO Grau I	511	52,09
Avaliados	485	49,44
Perdas	26	2,65

Tabela 2 - Frequência absoluta e relativa de CCO recuperados de 6 fêmeas em estro, pertencentes ao Grupo 2 - Botucatu, 2005

Parâmetros	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
CCO coletados	864	100
CCO Grau I	373	43,17
Avaliados	363	42,01
Perdas	10	1.15

Tabela 3 - Frequência absoluta e relativa de CCO grau I avaliados, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro, não submetidos à maturação *in vitro* - Botucatu, 2005

Parâmetros	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Avaliados	198	100
GV	85	42,93
GVBD	41	20,71
MI	0	0
MII	0	0
Degenerados/Não passíveis de identificação	72	36,36

Tabela 4 - Frequência absoluta e relativa de CCO Grau I avaliados, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG) e metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em estro, não submetidos à maturação *in vitro* - Botucatu, 2005

Parâmetros	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Avaliados	163	100
GV	35	21,47
GVBD	71	43,56
MI	25	15,34
MII	0	0
Degenerados/Não passíveis de identificação	32	19,63

No grupo de cadelas em anestro, cujos ovócitos não foram maturados *in vitro*, pôde-se observar predomínio da fase de vesícula germinativa (42,93%). O número de CCO degenerados ou não passíveis de identificação foi superior ao observado no grupo de cadelas em estro (36,36% x 19,63%).

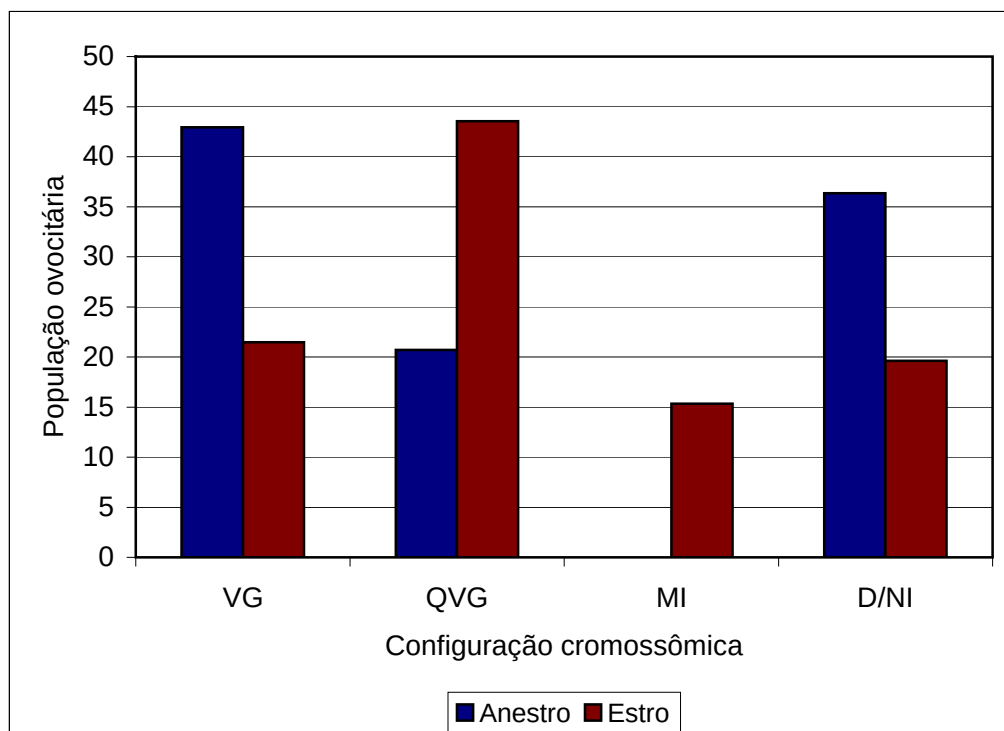


Gráfico 1 - Comparação entre a frequência absoluta de CCO nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro e em estro, não submetidos à maturação *in vitro* ($p < 0,007$) - Botucatu, 2005

Os CCO de cadelas em estro apresentaram melhores taxas de reinício (QVG) e progressão da meiose do que CCO de fêmeas em anestro.

Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa de CCO grau I avaliados, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro, submetidos à maturação *in vitro* em dois meios de cultivo, TCM 199 e SOF ($p > 0,007$) - Botucatu, 2005

Parâmetros	Frequência absoluta		Frequência relativa (%)	
Meios de maturação <i>in vitro</i>	TCM 199	SOF	TCM 199	SOF
Avaliados	143	144	100	100
GV	35	36	24,47	25
GVBD	31	34	21,68	23,61
MI	14	14	9,79	9,72
MII	0	0	0	0
Degenerados/Não passíveis de identificação	63	60	44,06	41,67

Ovócitos de cadelas em anestro não apresentaram diferenças significativas nas taxas de maturação nuclear quando submetidos à maturação *in vitro* com SOF e TCM 199.

Ovócitos provenientes de fêmeas em anestro, maturados *in vitro*, apresentaram taxas de maturação nuclear superior aos ovócitos não submetidos à maturação.

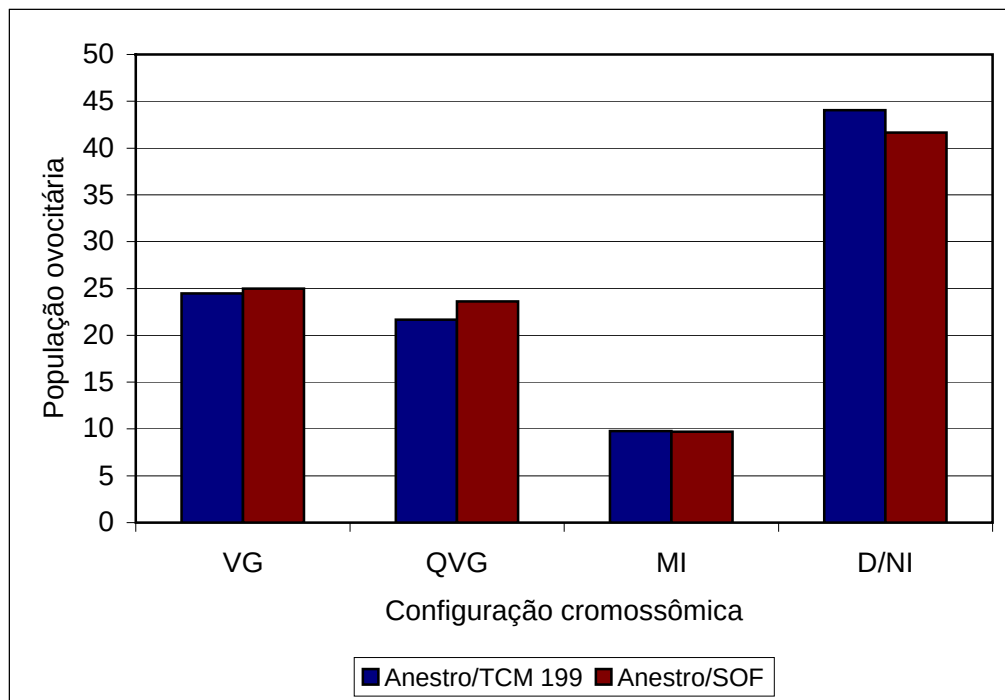


Gráfico 2 - Comparação entre a frequência absoluta de CCO nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro, submetidos à maturação *in vitro* em dois meios de cultivo, TCM 199 e SOF ($p > 0,007$) - Botucatu, 2005

Tabela 6 - Frequência absoluta e relativa de CCO grau I nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em estro, submetidos à maturação *in vitro* em dois meios de cultivo, TCM 199 e SOF ($p < 0,007$) - Botucatu, 2005

Parâmetros	Frequência absoluta		Frequência relativa (%)	
Meios de maturação <i>in vitro</i>	TCM 199	SOF	TCM 199	SOF
Avaliados	100	100	100	100
GV	11	4	11	4
GVBD	20	23	20	23
MI	25	58	25	58
MII	0	0	0	0
Degenerados/Não passíveis de identificação	44	15	44	15

Houve diferença significativa nas taxas de maturação de ovócitos provenientes de cadelas em estro e maturados em SOF (58%) e em TCM199 (25%). A taxa de ovócitos degenerados e não passíveis de identificação foi superior no grupo maturado em TCM 199 (44%).

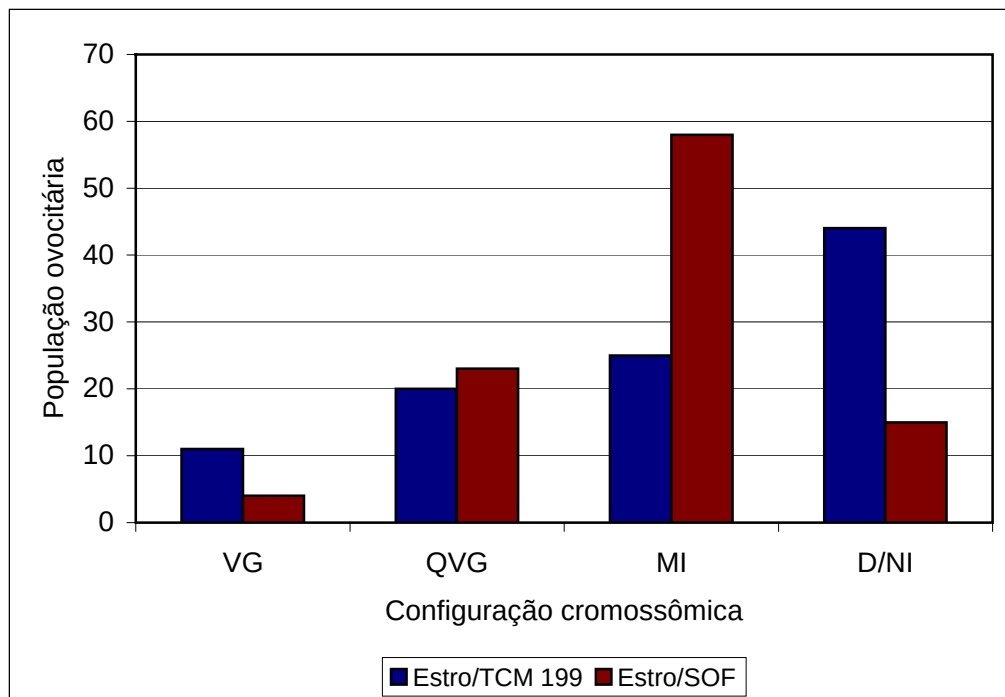


Gráfico 3 - Comparação entre a frequência absoluta de CCO nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em estro, submetidos à maturação *in vitro* em dois meios de cultivo, TCM 199 e SOF ($p < 0,007$) - Botucatu, 2005

O gráfico 3 demonstra a superioridade do tratamento realizado com o SOF combinado ao *status* reprodutivo de estro das fêmeas.

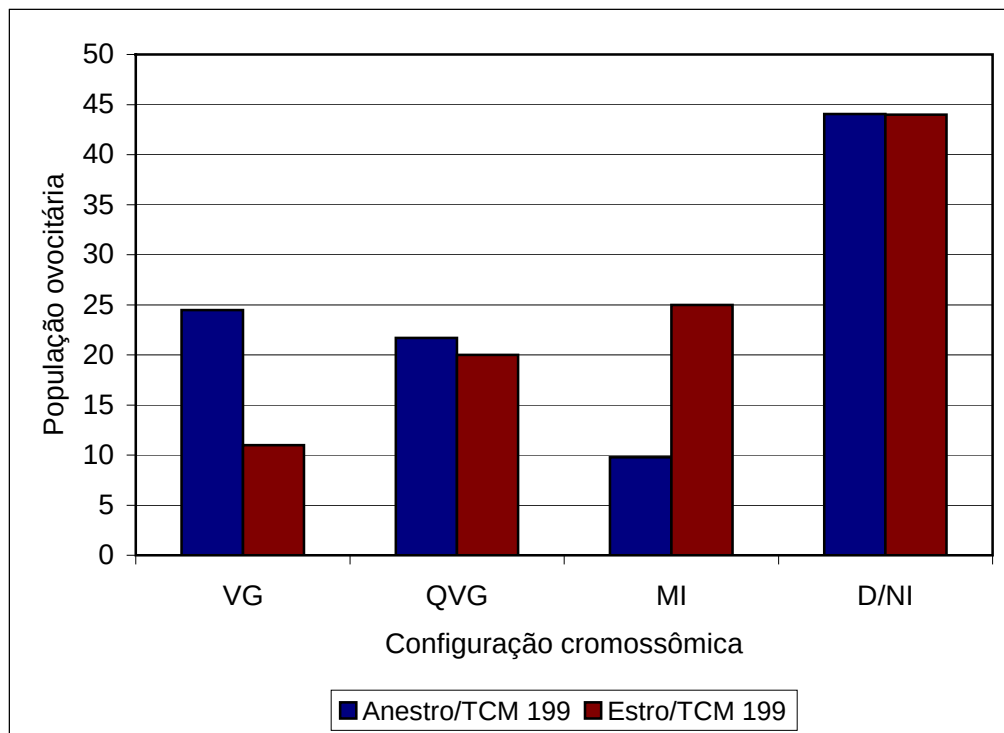


Gráfico 4 - Comparação entre a frequência absoluta de CCO nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados ou não passíveis de identificação (D/NI) do grupo de cadelas em anestro e em estro, submetidos à maturação *in vitro* em TCM 199 ($p < 0,007$) - Botucatu, 2005

Os dois grupos apresentaram taxa de reinício da meiose (QVG) semelhante. O grupo estro/TCM 199 mostrou superioridade na taxa de progressão da meiose (MI).

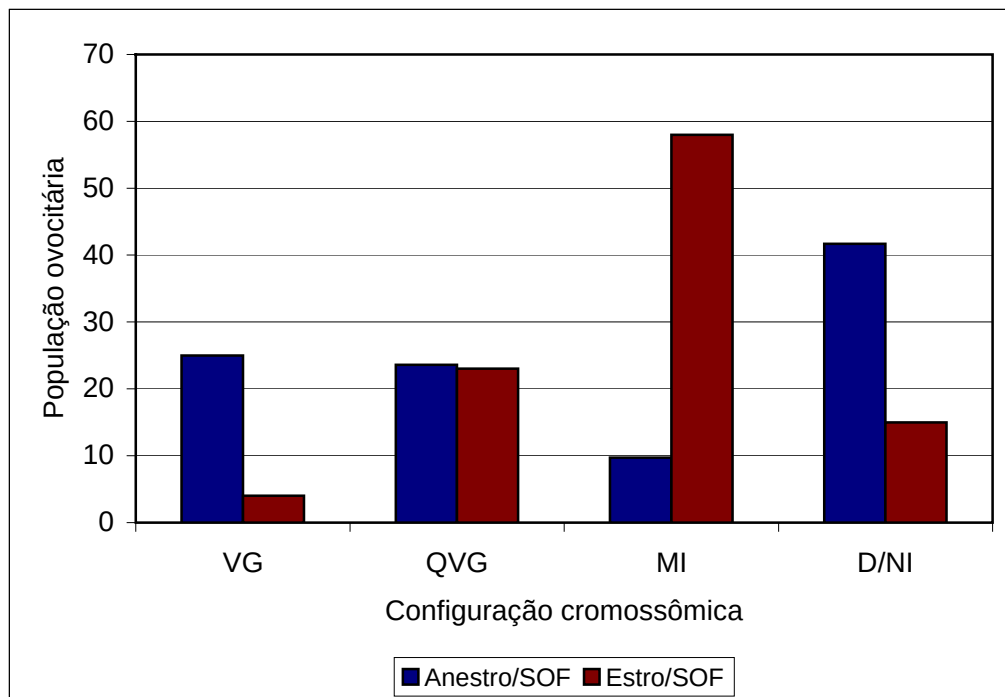


Gráfico 5 - Comparação entre a frequência absoluta de CCO nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e degenerados ou não passíveis de identificação do grupo de cadelas em anestro e em estro, submetidos à maturação *in vitro* em SOF ($p < 0,007$) - Botucatu, 2005

O grupo de fêmeas em estro, cujos ovócitos foram maturados em SOF apresentaram taxa de QVG semelhante ao grupo em anestro (23% x 23,61%).

Fêmeas em estro, cujos ovócitos foram maturados em SOF apresentam porcentagem de MI superior ao grupo de fêmeas em anestro (58% x 9,72%). A taxa de ovócitos degenerados e não passíveis de identificação foi inferior no grupo de ovócitos maturados em SOF e provenientes de fêmeas em estro.

7. DISCUSSÃO

De acordo com Claude Bernard, cientista francês, “Nós devemos, na medida do possível, com auxílio das análises experimentais, transportar os mecanismos fisiológicos para fora do organismo. Este isolamento nos permite ver e compreender melhor as condições detalhadas do fenômeno, a fim de, em seguida, pesquisa-las dentro do organismo e interpretar seu real papel”

Nesse contexto, a FIV se mostra uma técnica preciosa que permite a compreensão dos mecanismos *in vivo* da reprodução. Mas sua realização está condicionada a conhecimentos prévios, principalmente, no que diz respeito aos protocolos de maturação *in vitro* ainda tão controversos na espécie canina.

Dessa forma, nossa intenção foi analisar a possibilidade de que ovócitos submetidos à maturação prévia *in vivo* apresentassem uma taxa de maturação nuclear mais alta, favorecendo os procedimentos de fertilização *in vitro* na espécie canina. Além disso, objetivamos avaliar a influência de dois diferentes meios de cultivo nas taxas maturação nuclear ovocitária.

A literatura apresenta diversos protocolos de maturação *in vitro* adaptáveis à cadela, no entanto, sua fisiologia reprodutiva única dificulta a definição de um sistema de cultivo *in vitro*. Atualmente a taxa de maturação ovocitária nas cadelas é caracterizada por resultados insatisfatórios e altamente variáveis, provavelmente isso se deva à baixa competência dos ovócitos selecionados ou às condições de cultivo inadequadas (FARSTAD, 2000a,b; LUVONI et al., 2005).

O presente trabalho consiste na utilização de protocolos que avaliam o efeito do *status* reprodutivo da fêmea doadora na obtenção de melhores resultados de maturação ovocitária e na comparação de dois meios de maturação diferentes – SOF e TCM 199.

O comportamento, a citologia vaginal e o padrão da concentração sérica de progesterona foram semelhantes aos mesmos parâmetros observados nos demais animais desse estudo, assim como descrito por Verstegen et al. (1999).

Também não foram observadas diferenças entre o número de ovócitos recuperados e quanto à taxa e maturação nuclear no grupo de animais em estro.

Pudemos observar em nosso estudo que a proporção de ovócitos grau I/cadela obtida durante o estro foi de **62,16 ± 8,18** e durante a fase de anestro, foi de **46,45 ± 6,07**. Fujii et al. (1999) e Rodrigues & Rodrigues (2003) observaram não haver diferenças entre as proporções nas duas fases.

Nossos resultados referidos na tabela 4 mostram uma porcentagem de 15,34% de ovócitos em MI antes de serem submetidos à MIV em fêmeas no estro. Esse fato não é relatado na literatura e provavelmente significa que essas fêmeas podem liberar os ovócitos já maduros em MI ou MII ou eventualmente degenerados em pequena proporção.

Esse resultado, entretanto, não encontra respaldo na literatura desde que a maioria dos autores relata que as cadelas liberam ovócitos em estágio de VG (HOLST & PHEMISTER, 1971; LUVONI, 2000; OTOI et al., 2000b; FARSTAD, 2000a,b; SONGSASEN et al., 2004).

Quando comparamos os resultados das tabelas 3 e 4, constatamos uma influência positiva da fase de estro em detrimento à fase de anestro na configuração nuclear de ovócitos não submetidos ao processo de maturação ovocitária.

No estro, o ovócito e as células do *cumulus* que o circundam são unidos metabolicamente através de *gap junctions*, que permitem a troca de nutrientes, íons e pequenas moléculas reguladoras, tais como cálcio e cAMP (adenosina monofosfato cíclico), envolvidos na diferenciação meiótica e na maturação citoplasmática dos CCO. Essa associação física que ocorre através das *gap junctions* é um requisito importante para o reinício da meiose (LUVONI et al., 2001).

O estágio do ciclo estral influencia o *status* funcional das *gap junctions* entre as células do *cumulus* e os ovócitos. Luvoni et al. (2005) evidenciaram em seu laboratório, que nenhuma comunicação entre as células do *cumulus* e o ovócito estava presente nos CCO coletados de cadelas em anestro, enquanto aproximadamente 89% estavam presentes em CCO provenientes de cadelas em proestro. A presença e persistência dessas comunicações no proestro/estro foram responsáveis pela habilidade dos ovócitos reiniciarem a meiose e atingirem os estágios de TI e MII em proporções mais altas que ovócitos provenientes de cadelas em anestro.

Sabe-se ainda que durante o crescimento intra-folicular, uma alta taxa de atividade transcripcional ocorre no ovócito mamífero. Essa atividade leva à síntese de DNA e proteínas, que sustentam e regulam a maturação citoplasmática (HYTTEL et al., 1989).

Nossa intenção de analisar a configuração nuclear dos ovócitos previamente à maturação foi de se estabelecer inicialmente um taxa de “pseudomaturação” (BOLAMBA et al., 2002). De acordo com esse autor, a alta taxa de QVG obtida

nessa situação pode ser explicada pelo fato de que os ovócitos coletados provavelmente eram provenientes de folículos com diâmetro aproximado de 210 µm classificados pelo autor como folículos pré-antrais avançados.

Mahi & Yanagimachi (1976) e Hewitt et al. (1998) relataram 1,1 e 5,1% respectivamente de ovócitos provenientes de folículos antrais na fase de QVG no momento 0h.

Nossos resultados de QVG em uma população de ovócitos não submetidos à maturação foram de 20,71% no anestro e 43,56% no estro. Em trabalho semelhante Bolamba et al. (2002) obtiveram uma taxa de 19,4%. A QVG manifesta-se inicialmente por uma condensação da cromatina e dissolução da membrana nuclear, iniciada pela onda pré-ovulatória de LH ou por uma degeneração atrésica do folículo *in vivo*.

Nossa taxa de 43, 56% de QVG no estro pode ser explicada pela própria fase do ciclo estral onde existe um estímulo provocado pela onda pré-ovulatória de LH, mas não explica nossos resultados na fase de anestro.

Ainda, devemos considerar que ovócitos de mamíferos quando liberados de folículos antrais são capazes de reiniciar a meiose espontaneamente. Esse fato é continuamente utilizado para estudar os fatores que contribuem para a inibição ou promoção dos estágios finais de maturação ovocitária (POPE et al., 1997).

Ovócitos provenientes de fêmeas em anestro submetidos à MIV apresentaram taxa de maturação nuclear superior aos ovócitos na mesma fase não submetidos à maturação **(31,47% TCM; 33,33% SOF x 20, 71% não submetidos à maturação)** vistos na tabela 3 x tabela 5. Yamada et al. (1993) observaram que ovócitos de cadelas em anestro não apresentavam tendência de reinício de meiose. Um efeito similar da fase do ciclo estral sobre a competência meiótica foi observado

por Luvoni et al. (2001), cujos resultados indicaram que os CCO caninos isolados de ovários durante o anestro são incapazes de completar a meiose e que as comunicações entre os compartimentos germinal e somático através de *gap junctions* estão ausentes, sugerindo assim uma relação entre a presença dessas comunicações e a competência meiótica.

A despeito da fase de anestro e dos resultados obtidos por Yamada et al. (1993) e Luvoni et al. (2001), nossos resultados demonstraram a influência do meio de maturação sobre os ovócitos.

Reiteramos que as condições de cultivo têm um efeito significativo na permissão dos ovócitos de expressar seu potencial, contudo são os constituintes dos ovócitos é que controlam sua habilidade para responder à condição de cultivo. Além disso, nosso meio de cultivo utilizados em ovócitos de fêmeas em anestro continham gonadotrofinas, responsáveis por um estímulo inicial no desenvolvimento ovocitário.

Ovócitos provenientes de fêmeas em estro apresentaram taxa de maturação nuclear superior no meio SOF do que ovócitos na mesma fase não submetidos à maturação **(45% TCM, 81% SOF x 58,9% não submetidos à maturação)** observados na tabela 4 x tabela 6.

Nesse item, devemos levar em consideração que, a despeito da taxa dos ovócitos não submetidos à maturação ser superior à taxa de ovócitos submetidos à maturação com TCM 199, a porcentagem de MI nas células submetidas à maturação é da ordem de 25% e nas células não maturadas, 15,34%. Isso implica que nas células submetidas à maturação houve uma progressão superior do estágio de QVG para MI, o que é necessário para o ovócito ser fertilizado.

Quando submetidos à maturação em TCM199 ou SOF, os grupos de ovócitos em estro e anestro apresentaram taxas de QVG da meiose semelhantes **(21,68% TCM**

199 x 23,61% SOF – anestro; 20% TCM 199 x 23% SOF - estro), porém a taxa de MI foi superior no grupo em estro nos dois meios considerados **(9,79% TCM 199 x 9,72% SOF – anestro; 25% TCM 199 x 58% SOF – estro)**. Após a QVG, nem todos os ovócitos se desenvolvem e liberam o primeiro corpúsculo polar. A habilidade de sofrer a QVG e progredir da fase de MI e MII é adquirida separadamente e seqüencialmente durante o cultivo *in vivo* (SORENSEN & WASSARMAN, 1976).

Os nossos resultados demonstraram que na fase de anestro, não houve diferença significativa entre os meios de maturação utilizados. Independente da estimulação ovocitária pelos componentes do meio de cultivo, os ovócitos de fêmeas em anestro podem ser em sua maioria, células menores e ainda com potencial limitado para se desenvolverem adequadamente.

Assim, compartilhamos das conclusões de Hewitt e England (1999c), que relataram que a adição de FSH e LH ao meio de cultivo não melhora as taxas de QVG em ovócitos caninos, indicando a existência de uma população juvenil e incompetente de ovócitos selecionados para MIV.

Nosso protocolo que utilizou ovócitos provenientes de doadoras em estro e maturação *in vitro* no SOF foi superior aos demais protocolos testados. Esse resultado vem reiterar o conceito de que os ovócitos caninos, assim como os de outros canídeos silvestres sofrem desenvolvimento final no oviduto, fato este que motivou a escolha do meio SOF para esse estudo *in vitro*.

O SOF foi desenvolvido por Tervit et al. (1972) para mimetizar as propriedades fisiológicas do fluido do oviduto e tem sido utilizado com sucesso na MIV de ovócitos bovinos (LONERGAN et al., 1994; GANDHI et al., 2000;) e cultivo *in vitro* de embriões bovinos e ovinos (TAKAHASHI & FIRST, 1992; BERNARDI et al., 1996; HILL et al., 1996; KESKINTEPE & BRACKETT, 1996).

Bolamba et al. (2002) utilizando SOF, SOF + 3 mg/mL de BSA, SOF + 20% SFB e SOF + 3 mg/mL BSA + 20% SFB na maturação de ovócitos provenientes de folículos pré-antrais avançados (210 μ m) por 48 e 72 horas, observaram que nenhuma suplementação é necessária quando se trabalha com esse meio, pois os resultados nessa comparação foram semelhantes. Afirmaram ainda que a competência de ovócitos retirados de folículos pré-antrais avançados foi obtida utilizando somente o SOF sem suplementação.

Diferentemente dos ovócitos das demais espécies, a maioria dos ovócitos imaturos da espécie canina não reinicia a meiose ou não se desenvolve até M II quando retirados dos folículos e cultivados *in vitro*, apesar das condições de cultivo utilizadas (WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003).

Uma única comparação entre meios simples e complexos para maturação *in vitro* canina foi relatada por Hewitt & England (1999a). Nesse estudo, os autores não observaram diferença significativa entre os meios SOF acrescido de 4% de BSA e TCM 199 na proporção de ovócitos sofrendo QVG após 48 horas de cultivo.

Tem-se observado que entre os meios complexos, o TCM199 apresenta as melhores condições para a maturação nuclear de ovócitos caninos até MII (CINONE et al., 1992). Entretanto, por meio do nosso estudo, foi possível evidenciar a superioridade do meio SOF – simples - em relação ao TCM 199 – complexo - quando utilizados ovócitos de cadelas em estro e submetidos à maturação por 24 horas.

Ao contrário, não foi constatada diferença entre os meios de maturação quando utilizamos ovócitos provenientes de fêmeas no anestro, sugerindo uma interação entre a fase do ciclo estral e o meio de cultivo.

Nos nossos meios de cultivo, além da adição de 1µg/mL de progesterona foi utilizada suplementação de 10% de SCE considerada como outra fonte de progesterona, considerando ainda que os ovócitos eram provenientes de cadelas no estro, portanto com uma estimulação progestacional alta. A progesterona exerce um efeito estimulador sobre a síntese do fator promotor de maturação (MPF) no ovócito, responsável pela quebra da vesícula germinativa (SALUSTRI et al., 1993).

Willingham e Kramer (2001), utilizando TCM 199 acrescido de 10% de SCE, avaliaram os efeitos de diferentes concentrações de progesterona no meio. Levantaram a hipótese que a exposição dos ovócitos caninos à progesterona, antes da ovulação e posteriormente no oviduto, contribuía para o reinício da meiose. Esses autores obtiveram 19,2% de MII com 2,0 µg/mL de progesterona e 1,9% no tratamento controle.

Vannucchi (2003) inferiu que a progesterona pode acelerar o processo de maturação nuclear dos ovócitos de cadela, pois em meios de maturação sem hormônios, só foi possível verificar ovócitos em metáfase II após 96 horas. Além disso, a presença de progesterona associada ou não ao estrógeno promove o aparecimento de uma taxa menor de estruturas degeneradas.

Mahi & Yanagimachi (1976), maturaram, em TCM 199, ovócitos provenientes de cadelas em estágios aleatórios do ciclo estral e obtiveram após 24, 48 e 72 horas, taxas de MI/MII de 5,9%, 22,5% e 25,4% respectivamente. Essas taxas são inferiores às descritas por Yamada et al. (1992). Considerando-se o período de maturação de 24 h, os autores obtiveram 17,6% QVG e 5,9%MI/MII, taxas bem inferiores às descritas em nosso trabalho.

Na literatura consultada, a taxa mais alta de maturação até MII foi obtida por Nickson et al. (1993) que utilizaram TCM 199 contendo 10% de SCE e 20 µg/mL de

estradiol. Em nosso estudo, os ovócitos foram submetidos à maturação em meio com concentração de estradiol inferior (1 µg/mL) de acordo com os trabalhos de Hewitt & England (1997a), Bolamba et al. (1998), Bogliolo et al. (2002) e Kim et al. (2004).

Rodrigues & Rodrigues (2002a) utilizando TCM 199 acrescido de estrógeno, FSH, hCG e ECS (soro de vaca em estro), maturaram por 72 horas CCO grau I e II provenientes de cadelas em estágios aleatórios do ciclo estral (7% MI). Em seguida, os autores substituíram ECS por 0,4% BSA e por 10% SCE. Observaram que as maiores taxas de MI (20%) foram obtidas no meio com BSA. Os ovócitos submetidos à maturação em meio com 10% de SCE não progrediram para MII (10,4% MI e 0% MII). Nossos resultados mostraram taxas de 9,79% de MI em fêmeas no anestro e 25% MI no estro, quando submetidos à maturação em TCM199 com SCE.

Nickson et al. (1993) relataram que a adição de SCE e estrógeno tem um efeito sobre a MIV de ovócitos de cadelas que se encontram em vários estágios do ciclo estral, no que se refere à taxa de maturação, essa foi similar à de ovócitos pré-ovulatórios presentes em ovários de cadelas em estro.

Em vista dessas observações e pelo fato desse relato apresentar as maiores taxas de MIV em cadelas, avaliamos a maturação em meio acrescido de SCE, estrógeno (1 µg/mL) e na fase do estro, considerando que a suplementação estrogênica no nosso meio foi inferior a do autor.

Otoi et al. (1999) compararam diferentes concentrações de soro de cadela em anestro, estro e diestro, as quais foram adicionadas ao meio de maturação (TCM 199) de ovócitos de cadelas em anestro e diestro e submetidos à maturação por 72 horas. As maiores taxas de MII (12,4%) foram obtidas com soro de cadela em estro, sugerindo que a suplementação com SCE favorece a MIV de ovócitos caninos.

Songsassen et al. (2004), avaliaram a influência das diferentes fases do ciclo estral sobre a taxa de maturação ovocitária. Após maturação dos ovócitos em TCM 199, evidenciaram taxas de MII semelhantes nos diferentes grupos. Vale ressaltar que os autores se basearam apenas na morfologia ovariana para determinação da fase do ciclo estral, diferentemente do nosso estudo onde identificamos o estro por meio do comportamento, citologia vaginal e concentração de progesterona sérica.

Sugerimos ainda em nosso estudo, que quanto maior o tempo de permanência do ovócito canino sob maturação intra-folicular, maior seria a probabilidade de reinício e progressão da meiose *in vitro*. Dessa forma, a exposição do ovócito a níveis de estrógeno, progesterona e fatores ainda desconhecidos favoreceriam sobremaneira a taxa de maturação ovocitária *in vitro*.

Songsassen et al. (2004) complementam essa sugestão, informando que o tamanho ovocitário é um fator mais importante que as fases do ciclo na maturação meiótica.

Otoi et al. (2001) observaram que a maioria significativa dos ovócitos que atingiu MII em seu estudo foi resgatada de fêmeas na fase folicular do ciclo (16.1%). Seus resultados sugerem que o ciclo estral da cadela afeta a taxa de maturação do ovócito cultivado *in vitro*. Além disso, os efeitos da fase do ciclo estral sobre a taxa de maturação podem resultar de diferenças entre a distribuição de tamanhos dos ovócitos coletados dos ovários em cada estágio do ciclo estral.

No trabalho de Hewitt & England (1997a), os autores avaliaram os eventos endócrinos pré-ovulatórios sobre a maturação ovocitária de cães domésticos comparando os estágios de proestro e estro. Afirmaram que o ambiente hormonal *in vivo* não afeta a subsequente maturação *in vitro* dos ovócitos através da observação da semelhança entre as taxas de MI-MII nos dois grupos (37% - QVG, 19% MI/MII -

proestro; 41% - QVG e 11% MI/MII - estro), porém os ovócitos foram obtidos em dois momentos ($2,36 \pm 0,58$ ng/mL na primeira hemiovariectomia e $4,96 \pm 0,75$ ng/mL).

As OSH realizadas para a obtenção de ovócitos em nosso experimento foram realizadas quando as concentrações de progesterona atingiam $9,1 \pm 0,6$ ng/mL. Esses valores, de acordo com Root-Kustritz (2001) correspondem ao dia da ovulação, reforçando o nosso objetivo de obter ovócitos previamente submetidos ao ambiente intra-folicular.

Yamada et al. (1992) utilizaram ovócitos provenientes de cadela em estro induzido e obtiveram taxas de MII após 24, 48 e 72 horas, de 9,1%, 27,3% e 31,9% respectivamente. Yamada et al. (1993) sugerem que o desenvolvimento pré-ovulatório do ovócito possa ser importante para sua subsequente maturação *in vitro*.

Willingham-Rocky et al. (2003) observaram que ovócitos coletados de cadelas em estro e diestro apresentaram taxa de maturação até MII superior àqueles obtidos no anestro ou em proestro, portanto o estágio do ciclo estral é um fator importante como critério de seleção para uso de ovócitos em experimentos *in vitro*.

Rodrigues & Rodrigues (2003) maturaram CCO graus I e II durante 72h em TCM acrescido de ECS, estrógeno, FSH, hCG em cadelas nas fases folicular (proestro e estro), lútea (diestro), em anestro e gestantes ou com piometra. Concluíram que MIV não é influenciada pelo *status* reprodutivo da fêmea. Esses autores afirmam que a qualidade do ovócito é o indicador mais confiável do seu potencial do que o meio ambiente hormonal da fêmea no momento da doação.

Em todos os protocolos testados em nosso experimento, a configuração nuclear de metáfase II não foi observada durante o tempo de maturação utilizado.

Fontbonne et al. (2004) observaram que, *in vivo*, dentro das primeiras 44 horas pós-ovulação, os ovócitos se encontram em VG ou QVG. Ovócitos em MI

foram observados principalmente, entre 46 e 84 horas e a primeira MII pôde ser visualizada com 50 horas.

Levando-se em consideração, o tempo fisiológico necessário para a maturação, um balanço entre o sistema de cultivo e o período de incubação é necessário para a obtenção de melhores taxas de maturação ovocitária e conseqüentemente menores taxas de degeneração ovocitária.

No entanto, em um projeto piloto realizado em nosso laboratório, encontramos um grande número de ovócitos degenerados em protocolos com tempo superior a 36 horas de cultivo. Talvez, como relatado por Luvoni et al. (2005), o uso de diferentes sistemas de cultivo seqüenciais deve ser considerado quando ovócitos caninos são submetidos à maturação por períodos mais longos.

Bogliolo et al. (2002) utilizando TCM 199 suplementado com 10% de SCE, FSH, LH, progesterona, estradiol e cisteamina obtiveram taxa de 40% de QVG após 48 horas de cultivo, sendo 36% de VG e 4% de metáfase II. Quando cultivados por 72 horas, não houve diferença significativa nas taxas de QVG e MI. Resultados similares têm sido descritos em outros estudos por Otoi et al. (1999) e Yamada et al. (1993). As maiores taxas de maturação ovocitária obtidas por Hewitt & England (HEWITT & ENGLAND, 1997a; HEWITT et al., 1998) foram após 72 a 96 horas, enquanto que no trabalho descrito por Nickson et al. (1993) a maior taxa de MII foi obtida após 24 horas. Em todos os protocolos testados em nosso estudo, o tempo de maturação *in vitro* de 24 horas mostrou-se insuficiente para a obtenção da configuração cromossômica de metáfase II.

A diferença no tempo de incubação pode estar relacionada às diferentes condições de cultivo utilizadas, como a qualidade dos ovócitos, e a idade e estágio do ciclo estral da doadora.

A habilidade de se preservarem as células germinativas de animais domésticos e animais em extinção é um pré-requisito importante para a introdução de técnicas reprodutivas modernas em programas de extensão e conservação. A recuperação de quantidades consideráveis de folículos pré-antrais e CCO é somente a primeira etapa a ser considerada (LOPES, 2002).

Em vista do exposto, visando melhorar a eficiência dos protocolos de maturação *in vitro* em cadelas, é imprescindível a realização de estudos complementares, a fim de que todos os procedimentos de FIV na espécie canina possam ser realizados rotineiramente, da mesma forma que os são nas demais espécies domésticas de produção.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

- 1) A maturação ovocitária é beneficiada pela interação entre a fase do ciclo estral – estro – e o meio de maturação *in vitro* – SOF.
- 2) Os ovócitos submetidos à maturação intra-folicular prévia apresentam taxa de MIV mais alta.

8. REFERÊNCIAS*

BERNARDI , M.L.; FLÉCHON, J.E.; DELOUIS, C. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v.106, p.161-167, 1996.

BOGLIOLO, L.; ZEDA, M.T.; LEDDA S.; LEONI, G.; NAITANA, S.; PAU, S. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.42, p.265-273, 2002.

BOLAMBA, D.; 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.; SANDLER, J.L.; DURRANT, B.S. *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.

CHANG, M.C. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. **J. Exp. Zool.**, v.128, p. 379-405, 1955.

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

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

CONCANNON, P.W.; McCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.39, p.3-25, 1989.

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

ENGLAND, G.C.W.; CONCANNON, P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. (Eds.) **Recent advances in small animal reproduction**. Ithaca:International Veterinary Information Service, 2002. Disponível em: < www.ivis.org >. Acesso em 10 jan. 2004.

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

FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v.53, p.175-186, 2000a.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.375-387, 2000b.

FONTBONNE, A.; REYNAUD, K.; MARCELO, N.; DUMASY, M.; CHASTANT-MAILARD, S. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 5., 2004, São Paulo. **Abstracts...** São Paulo, 2004. p.144-146.

FUJII, M.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; TANAKA, M.; UNE, S.; SUZUKI, T. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by slicing method. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, n.3, p.305-307, 1999.

GANDHI, A.P.; LANE, M.; GARDNER, D.K.; KRISHER, R.L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Hum. Reprod.**, v. 15, p.395-401, 2000.

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

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

HANNA, C.B.; WESTHUSIN, M.E.; KRAEMER, D.C. The effects of eCG and estradiol on canine oocytes during *in vitro* maturation. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, n.2, p.275, 2004.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. **J. Reprod. Fert.**, v.51, p.83-91, 1997a.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance *in vitro*. **Anim. Reprod. Sci.**, v.50, p. 123-139, 1997b.

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

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

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. **Anim. Reprod. Sci.**, v.55, p.63-75,

1999a.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Culture conditions required to induce capacitation and the acrosome reaction of canine sperm *in vitro*. **Vet. Rec.**, v.144, p.22-23, 1999b.

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

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.

HILL, J.L.; WALKER, S.K.; BROWN, G.H.; NANCARROW, C.D. The effects of an ovine oviductal estrus-associated glycoprotein on early embryo development. **Theriogenology**, v.46, n.8, p.1367-1377, 1996.

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

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructure aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.38, p.35-47, 1989.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. The canine estrous cycle. In: JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 2001. p.16-31.

KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilizes and cultured in completely defined media. **Biol. Reprod.**, v.55, p.333-339, 1996.

KIM, M.K.; FIBRIANTO, Y.H.; OH, H.J.; JANG, G.; KIM, H.J.; LEE, K.S.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. Effects of estradiol-17 and progesterone supplementation

on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, article in press, 2004.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Produção *in vitro* de embriões eqüinos: avanços e limitações. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.27, n.1, p.54,1999.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Maturação *in vitro* de ovócitos caninos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, n.3, p.477-478, 2001.

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Development of bovine embryos *in vitro* following oocyte maturation under defined conditions. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.34, p.329-339, 1994.

LOPES, M.D. **Análise histológica, ultra-estrutural e avaliação da maturação nuclear de ovócitos de gatas domésticas (*Felis catus*)**. 2002. 138f. Tese (Livredocência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

LUVONI, G.C. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.40, p.502-512, 2000.

LUVONI, G.C.; LUCIANO, A.M.; MODINA, S.; GANDOLFI, F. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocytes on the efficiency of *in vitro* maturation. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.57, p.141-146, 2001.

LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. **Reprod. Domest. Anim.**, v.38, n.5, p.410-414, 2003.

LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, n.1, p.41-59, 2005.

MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocyte *in vitro*. **J. Exp. Zool.**, v.196, p.189-196, 1976.

METCALFE, S.S. **Assisted reproduction in the bitch**. 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Monash, Vitoria, Austrália, 1999.

NICKSON, D.A.; BOYD, J.S.; ECKERALL, P.D.; FERGUSON, J.M.; HARVEY, M.J.A.; RENTON, J.P. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.231-240, 1993.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.11, p.387-390, 1999.

OTOI, T.; MURAKAMI, M.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; UNE, S.; SUZUKI, T. Development of canine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Vet. Rec.**, v.146, p.52-53, 2000a.

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

OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI, M.; KARJA, N.W.K.; SUZUKI, T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from ovaries of bitches at various estrous cycles. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.13, n.2/3, p.151-155, 2001.

OTOI, T.; WILLINGHAM, L.; SHIN, T.; KRAEMER, D.C.; WESTHUSIN, M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. **Reproduction**, v.124, p.775-781, 2002.

PALMA, G.A. Transferencia de los embriones. In: PALMA, G.A.; BREM, G. **Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina**. Buenos Aires:Editora Hemisferio Sur S.A. Cap. 8, p. 143-162, 1993.

POPE, C.E.; McRAE, M.A.; PLAIR, B.L.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. *In vitro* and *in vivo* development of embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of cat oocytes. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.51, p.69-82, 1997.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Maturation of canine oocytes in TCM-199 supplemented with different proteins. In: EVSSAR CONGRESS, 3., 2002, Liège. **Proceedings...Liège**, 2002a. p. 94-95.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under heterologous hormone supplementation. In: EVSSAR CONGRESS, 3, 2002, Liège. **Proceedings...Liège**, 2002b. p. 158-159.

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

ROOT-KUSTRITZ, M.V. Use of Commercial Luteinizing Hormone and Progesterone Assay Kits in Canine Breeding Management. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. (Eds.) **Recent advances in small animal reproduction**. Ithaca:International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso 20 ago. 2004.

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

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

SHIMAZU, Y.; YAMADA, S.; KAWANO, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; MAITO, K.; TOYODA, Y. *In vitro* capacitation of canine spermatozoa. **J. Reprod. Dev.**, v.38, n.1, p.67-71, 1992.

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

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

SORENSEN, R.A.; WASSARMAN, P.M. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. **Dev. Biol.**, v.50, p.531-536, 1976.

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.963-978, 1992.

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

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

TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.39, p.269-275, 1989.

TSUTSUI, T.; SHIMIZU, T. Studies on the reproduction in the dog. IV. On the fertile period of ovum after ovulation. **Jpn. J. Anim. Reprod.**, v.21, p. 65-69, 1975.

VAN DER STRICHT, O. Étude comparée des ovules des mammifères aux différentes périodes de l'ovogénèse, d'après les travaux du Laboratoire d'Histologie et d'Embryologie de l'Université de Gand. **Arch. Bio Paris**, v.33, p.229-300, 1923.

VANNUCCHI, C.I. **Estudo da maturação nuclear *in vitro* de ovócitos de cães em**

meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas de tuba uterina. 2003. 77f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

VERSTEGEN, J.P.; ONCLIN, K.; SILVA, L.D.M.; CONCANNON, P.W. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. **Theriogenology**, v.51, p.597-611, 1999.

WILLINGHAM-ROCKY, L.A.; KRAEMER, D.C. Effect of progesterone supplementation on the resumption of meiosis of canine oocyte matured *in vitro*. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. 2001, Omaha. **Proceedings...** Omaha: IETS, 2001, v.55, n.1, p.498.

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

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.46, p.853-858, 1992.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWANO, Y.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.227-229, 1993.

ANEXO A - Gentamicina

Gentamicina 0,15 g

Milli Q 10 mL

Concentração final de 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

ANEXO B - Piruvato stock

Piruvato P-2256.....0,11 g

Solução salina 10 mL

Concentração final de 11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

ANEXO C - FSH (Folltropin[®])

Folltropin 500 UI1 frasco

TCM 199.....1 mL

Filtrado, aliquotado em 20 μL e mantido sob congelação. Concentração final de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

ANEXO D - LH (Profasi[®])

Profasi 500 UI0,005 g/mL

Concentração final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

ANEXO E - Estradiol 17- β

Estradiol Sigma E-8875.....0,010g

Etanol.....10 mL

Aliquotado em 20 μ L e mantido sob congelação. Concentração final 1 μ g/ μ L.

ANEXO F - Óleo mineral M8410

Autoclavado, acrescido de 10% de solução salina e equilibrado em estufa.

ANEXO G - Soro de cadela em estro

Sangue de quatro cadelas em estro, coletado em tubo sem anticoagulante, permanecendo em repouso até a retração do coágulo e centrifugado a 955 g. Posteriormente foi inativado pelo calor por 30 minutos a 56° C e armazenado a -20° C (OTOI et al., 1999). A concentração de progesterona nos soros foi de 8,6, 8,8; 9,7; 9,8 ng/mL.

ANEXO H - Progesterona

Progesterona 1 mg

Dimetil sulfóxido (DMSO) 1 mL

Concentração final de 1 μ g/ μ L.