

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITOS DO DIÂMETRO OOCITÁRIO, CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA
EM VG E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUINASE p34^{cdc2} NA MATURAÇÃO
IN VITRO DE OÓCITOS CANINOS**

LEDA MARIA COSTA PEREIRA

**Botucatu
SÃO PAULO - BRASIL
Janeiro de 2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DO DIÂMETRO OOCITÁRIO, CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA
EM VG E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUINASE p34^{cdc2} NA MATURAÇÃO
IN VITRO DE OÓCITOS CANINOS**

LEDA MARIA COSTA PEREIRA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal.

Orientadora: *Profª Titular Maria Denise Lopes*

Botucatu
SÃO PAULO - BRASIL
Janeiro de 2014

Nome do Autor(a): Leda Maria Costa Pereira.

Título: EFEITOS DO DIÂMETRO OOCITÁRIO, CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA EM VG E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUINASE p34^{cdc2} NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Titular Maria Denise Lopes

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr^a. Maricy Apparício - Ferreira

Membro

Departamento de Obstetrícia Veterinária

Faculdade de Jaguariúna (FAJ)

Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 29 de janeiro de 2014

Primeiramente à **Deus**,
por sempre me acompanhar
em todas as minhas escolhas e caminhos.

Aos meus pais, **Jacyara Costa e Dirceu Moura**
por tudo que eles representam em minha vida.

Ao meu querido companheiro de vida
e profissão **Paulo Bersano**.

A minha avó amada **Dirce Moura** (*in memorian*) ,
meus avôs queridos **Jorge Costa** (*in memorian*) e
Otávio Moura (*in memorian*) e
Tia **Graça Costa** (*in memorian*),
que apesar de não estarem mais nesse plano,
acompanharam-me a todo momento em meus pensamentos.
A vovó **Moema**, pelo enorme carinho, amor, e luta pela vida,
pessoa querida que estará sempre em meu coração.

dedico este trabalho com muito amor

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", *Campus* de Botucatu, especialmente ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela grande oportunidade de realizar o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, na área de Reprodução Animal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (FAPESP 2011/13197-1), indispensável para a realização deste trabalho.

À Professora Maria Denise Lopes, por ter sido mais do que uma orientadora e por ter sempre acreditado e investido em meu potencial. Palavras não são suficientes para expressar minha sincera gratidão. Muito obrigada pelo apoio, preocupação, paciência, compreensão nos momentos difíceis, conversas, conselhos, amizade, respeito mútuo e aprendizados proporcionados.

À Professora Lucilene Delazari dos Santos (CEVAP) pela grande ajuda nos conhecimentos acerca das proteínas, pela disponibilização do laboratório e auxílio na realização de ELISA, pela paciência, amizade, apoio e orientação nos momentos de dificuldade.

À Professora *Maricy Apparício-Ferreira* (Faculdade de Jaguariúna- FAJ), por sempre se mostrar disponível mesmo distante, pelos ensinamentos, amizade, apoio e trocas de experiências.

À Professora Fernanda da Cruz Landim, pela disponibilização do Laboratório de Fertilização *in vitro* (FIV), contribuindo para a realização dos experimentos.

Ao Departamento de Cirurgia Veterinária, especialmente ao Professor Alfredo Feio Lima, por deixar participar de suas aulas e campanhas de castração para a coleta dos ovários.

Ao Professor José Carlos Pantoja, pela enorme paciência nas análises estatísticas e construção dos gráficos, por sua atenção e disponibilidade em sempre querer ajudar.

À Professora Lidia Raquel de Carvalho, do Departamento de Bioestatística do IB, pelo auxílio na interpretação dos resultados do ELISA e construção dos gráficos.

Ao Professor José Rodrigo Pauli (UNICAMP) pela disponibilização do prototo Ortovanato de Sódio no momento crucial do meu experimento.

Ao Professor Nereu Carlos Prestes, pelo apoio, atenção, ensinamentos, amizade proporcionados desde o período de estágio supervisionado e por sempre estar disponível quando precisei.

Aos colegas do Laboratório de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal (REPAS).

À todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, pela recepção, ensinamentos e convívio durante o período do mestrado.

À Bioethicus e a Unidade de Vigilância Ambiental (UVA) de São Manuel, especialmente ao Veterinário Paulo Targa, por permitir a coleta de material para os experimentos.

Aos funcionários da Reprodução Cristina, Edilson, Valter e Ana (Cirurgia), pelo apoio, ajuda, carinho, conversas, e pelos momentos agradáveis durante esse trajeto.

Ao saudoso bibliotecário Dino Cesar Aparecido Oyan (*in memoriam*), pela amizade, confiança, apoio, ajuda, conselhos, desde o primeiro momento que cheguei em Botucatu e a bibliotecária Rose pela elaboração da ficha catalográfica, meu muito obrigado.

À Deus, pelo dom da vida, pela proteção, por sempre guiar meus caminhos e me ensinar a ser forte enfrentando com sabedoria as dificuldades e barreiras que sempre aparecem no caminho. Obrigada pelo amor, força e suporte para prosseguir nessa jornada.

À minha mãe Jacyara de Assis Costa, por ser a minha melhor amiga e essa pessoa forte, batalhadora, guerreira, corajosa, a qual me orgulho muito. Muito obrigada pelos preciosos ensinamentos e por todos os sacrifícios realizados para que hoje eu estivesse aqui. Obrigada pelas palavras valiosas que me fizeram ter força para aguentar a distância e perseguir meus objetivos e por ser esse exemplo de vida, o qual sempre me espelhei.

À meu pai Dirceu Moura Pereira, pelo apoio constante, pelas risadas nos momentos de estresse, ensinamentos e por compreender minha ausência em tantos momentos difíceis. Obrigada pelas palavras e carinho nos momentos de dificuldade e por ser essa pessoa maravilhosa e única.

Ao meu amor Paulo Ricardo de Oliveira Bersano, por ser meu porto seguro e verdadeiro companheiro em todos os momentos dessa trajetória. Pelo apoio constante, enorme paciência nos momentos de ansiedade e estresse, pelos ensinamentos, ajuda e auxílio em todas as etapas dos experimentos. Muito obrigada pelo seu carinho, cumplicidade, amor, incentivo, fidelidade, compreensão nos momentos de angústia e por todos os momentos maravilhosos. Agradeço a Deus todos os dias por ter te colocado em minha vida. Todos os dias ao seu lado são únicos.

Aos meus queridos irmãos Lívia Cristiane Pereira e Dirceu Moura Pereira Jr, pelo amor, carinho, apoio, torcida e incentivo às minhas conquistas e aos meus queridos sobrinhos que amo muito Larissa, Thiago, Matheus e Thais.

À toda a família Bersano, especialmente ao José Guilherme Bersano, por terem me acolhido tão bem e ser uma segunda família para mim. Obrigado por todo o carinho, atenção, apoio, momentos felizes e por me proporcionarem uma segunda casa.

As amigas Aline Dunham e Elisângela Trigo pela amizade sincera, carinho, apoio, incentivo, risadas, alegrias e por entender minha ausência demonstrando que a amizade perdura independente do tempo ou distância. Obrigada pelos momentos inesquecíveis ao longo destes anos.

Ao meus filhos caninos Raj e Wilbhart, por me proporcionarem tantos momentos de alegria. Pela fidelidade, carinho, amor incondicional, risadas nos momentos de desespero, distração das preocupações e por serem uma fonte de inspiração ao meu trabalho.

À todas as cadelinhas que auxiliaram na concretização desse estudo e a todos os animais que me fazem ter orgulho de ter escolhido essa profissão.

À todos que não foram aqui mencionados mas, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Em tudo somos atribulados, mas não angustiados;

Perplexos, mas não desanimados;

Perseguidos, mas não desamparados;

Abatidos, mas não destruídos.

II Coríntios 4:8-9

BIOGRAFIA

LEDA MARIA COSTA PEREIRA, filha de Jacyara de Assis Costa e Dirceu Moura Pereira, nasceu em Salvador, BA, aos 26 de fevereiro de 1983.

Possui graduação em Psicologia, pela Faculdade Ruy Barbosa (Salvador), concluída em 2004. No período de 2006 a 2008, realizou especialização em Psicopedagogia Assistencial e Institucional pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

Concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Bahia (UFBA) em fevereiro de 2011. Em agosto do mesmo ano ingressou no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP *Campus* de Botucatu), cujos trabalhos de mestrado em Biotecnologia Animal na área de Reprodução Animal, foram conduzidos.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: EFEITO DAS FASES DE ANESTRO E DIESTRO NO DIÂMETRO OOCITÁRIO, CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA EM VG E NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS.

Tabela 1	Avaliação da maturação nuclear de oócitos caninos nas fases de anestro e diestro do ciclo estral após maturação <i>in vitro</i> . Botucatu, 2013.....	44
Tabela 2	Média e desvio padrão, tamanho máximo e mínimo do diâmetro dos oócitos de cadelas nas fases de anestro e diestro antes da maturação <i>in vitro</i> . Botucatu, 2013.....	44
Tabela 3	Configuração nuclear de oócitos caninos em estágio de VG (vesícula germinativa) na fase de anestro e diestro do ciclo estral antes do processo de MIV. Botucatu, 2013.....	44

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 1: EFEITO DAS FASES DE ANESTRO E DIESTRO NO DIÂMETRO OOCITÁRIO, CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA EM VG E NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS.

- Gráfico 1 Distribuição dos estágios de maturação nuclear conforme as fases de diestro e anestro ($p \leq 0.05$). vg: vesícula germinativa, qv: quebra de vesícula, m1: metáfase I, m2: metáfase II, de: degenerado. Botucatu, 2013..... 43
- Gráfico 2 Distribuição dos estágios de vesícula germinativa conforme as fases de diestro e anestro ($p \leq 0.05$). Classificação de vesícula germinativa (vg1, vg2, vg3, vg4) e deg: degenerado. Botucatu, 2013..... 43

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUINASE $p34^{cdc2}$ NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS

- Gráfico 1 Mensuração da atividade quinase $p34^{cdc2}$ durante os tempos 24, 48 e 72 horas da MIV de oócitos caninos. Botucatu, 2013..... 59

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: EFEITO DAS FASES DE ANESTRO E DIESTRO NO DIÂMETRO OOCITÁRIO, CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA EM VG E NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS.

- Figura 1 (A) Realização do método do "*slicing*" para a liberação dos COCs. (B) Ovários após a realização do método do "*slicing*". (C) Transferência dos COCs selecionados para o meio de lavagem. (D) Fotomicrografia de COCs de diferentes graus. (1): COC grau 1 (selecionado para maturação), (2) e (3): COCs grau 2 e 3, respectivamente (não selecionados para maturação). Aumento 40X. (E) Transferência dos COCs para placa de quatro poços contendo o meio de maturação, onde ficarão incubados por período de 72 horas. (F) Oócitos tratados com hialuronidase 0.2%, para a remoção das células do *cumulus*. Aumento 40X. Botucatu, 2013..... 39
- Figura 2 Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas em diferentes estágios de maturação nuclear após cultivo *in vitro*. Avaliação e classificação da cromatina. (A): Vesícula Germinativa (VG). (B): Quebra de Vesícula Germinativa (QVG), (C): Metáfase I (M-I). (D): Metáfase II (M-II), (E): Degenerado ou não passível de identificação. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 330-385 nm. Aumento 200X. Botucatu, 2013..... 40
- Figura 3 (A): Oócitos obtidos de cadelas na fase de anestro antes da MIV (B): Mensuração do diâmetro do oócito, sem a zona pelúcida, obtido da fase de anestro, antes da MIV (C): Oócitos obtidos de cadelas na fase de diestro antes da MIV (D): Mensuração do diâmetro do oócito, sem a zona pelúcida, obtido da fase de diestro, antes da MIV. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 330-385 nm. Aumento 200X. Botucatu, 2013..... 41
- Figura 4 Fotomicrografia de oócitos de cadelas antes da maturação *in vitro*, para avaliação e classificação da cromatina em vesícula germinativa (VG). (A): VG-1, filamentos difusos de cromatina com poucos sinais de condensação. (B): VG-2, maior dispersão dos filamentos de cromatina, observando-se a presença de nucléolos centralmente dispersos. (C): VG-3, condensação parcial da cromatina, ausência de nucléolos e do envelope nuclear. (D): VG-4, alta compactação da cromatina, localização periférica no nucleoplasma. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 330-385 nm. Aumento 200X. Botucatu, 2013..... 42

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUINASE p34^{cdc2} NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS

- Figura 1 (A): Ovários de cadelas para ser processados. (B): *Slicing* de um ovário (C): Placas de Petri com os ovarios fatiados (D): Observação dos oócitos para seleção e maturação. Aumento 40X. Botucatu, 2013..... 57
- Figura 2 (A): Lupa estereomicroscópica (Leica[®] MZ 12.5) para uso na manipulação dos oócitos (B): Oócitos obtidos de cadelas para elaboração do extrato de proteínas. Aumento 40X. (C): Sonicador de ponta - Branson Digital Sonifier[®] (D): Tubo graduado de vidro contendo solução de lise com oócitos caninos (seta) para serem sonicados. (E): Material refrigerado em gelo, pronto para ser sonicado. (F): Indicação dos parâmetros do equipamento com tempo de 25s e potência a 10%. Botucatu, 2013..... 58

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos da fisiologia reprodutiva da cadela (<i>Canis familiaris</i>).....	3
2.2. Maturação oocitária <i>in vivo</i> na cadela.....	4
2.3. Maturação oocitária <i>in vitro</i>	6
2.3.1. Fatores que podem influenciar a maturação <i>in vitro</i>	9
2.4. Influência do ciclo estral na maturação <i>in vitro</i> de oócitos caninos..	12
2.5. Influência do diâmetro na maturação <i>in vitro</i> de oócitos caninos.....	13
2.6. Configuração da cromatina em vesícula germinativa (VG).....	15
2.7. Mecanismos de regulação da maturação <i>in vitro</i>	18
3. OBJETIVOS.....	21
4. CAPÍTULO 1: EFEITO DAS FASES DE ANESTRO E DIESTRO NO DIÂMETRO OOCITÁRIO, CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA EM VG E NA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS CANINOS.....	22
4.1. Resumo.....	23
4.2. Introdução.....	24
4.3. Material e métodos.....	25
4.3.1. Aspectos éticos e origem do material em estudo.....	25
4.3.2. Obtenção e classificação dos oócitos.....	26
4.3.3. Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro na maturação nuclear de oócitos caninos após MIV.....	26
4.3.4. Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro no diâmetro de oócitos caninos antes da MIV.....	27
4.3.5. Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro na configuração de cromatina em VG de oócitos caninos antes da MIV.....	28

4.3.6.	Análise estatística.....	28
4.4.	Resultados.....	29
4.4.1.	Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro na maturação nuclear de oócitos caninos após MIV.....	29
4.4.2.	Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro no diâmetro de oócitos caninos antes da MIV.....	29
4.4.3.	Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro no diâmetro de oócitos caninos antes da MIV.....	29
4.5.	Discussão.....	30
4.6.	Conclusão.....	35
4.7.	Agradecimentos.....	36
4.8.	Referências.....	36
4.9.	Anexos.....	39
5.	CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUINASE p34 ^{cdc2} NA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS CANINOS.....	45
5.1.	Conteúdo.....	46
5.2.	Introdução.....	47
5.3.	Materiais e método.....	48
5.3.1.	Animais.....	48
5.3.2.	Obtenção e classificação dos oócitos.....	49
5.3.3.	Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	49
5.3.4.	Preparação do extrato de oócitos.....	50
5.3.5.	Mensuração da atividade quinase p34 ^{cdc2}	50
5.3.6.	Análise estatística.....	51
5.4.	Resultados.....	51
5.5.	Discussão.....	51
5.6.	Conclusão.....	54
5.7.	Agradecimentos.....	55
5.8.	Referências.....	55
5.9.	Anexos.....	57
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	60
7.	REFERÊNCIAS.....	62
	ANEXOS.....	69

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência das fases de anestro e diestro no diâmetro oocitário, na configuração da cromatina em VG e na competência de oócitos caninos, assim como analisar a cinética da atividade quinase p34^{cdc2} durante a maturação *in vitro* de oócitos caninos após 24, 48 e 72 horas de cultivo *in vitro*. Os ovários foram obtidos de cadelas submetidas à ovariário-salpingo-histerectomia eletiva (OSH). Para avaliar o diâmetro e a configuração da cromatina em VG, os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram submetidos à solução de hialuronidase 0,2% para a remoção das células do *cumulus* e corados com Hoechst. A avaliação da configuração nuclear dos oócitos caninos foi realizada após 72h de maturação *in vitro*. Para a realização do ELISA, foi realizado um extrato de proteínas dos oócitos após 24, 48 e 72 horas de cultivo *in vitro*. Quanto ao diâmetro médio oocitário, os resultados não demonstraram diferença ($p > 0,05$) entre as fases de anestro e diestro (77,62 μm x 78,64 μm). Comparando-se as fases reprodutivas, maior frequência de oócitos nos estágios de M-I (19,1%) e M-II (14%) foi observada na fase de diestro. Entretanto, essas diferenças não foram significativas ($p > 0,05$). Foram classificados quatro estágios de configuração da cromatina identificados como VG-1, VG-2, VG-3 e VG-4. As alterações observadas na configuração da cromatina foram caracterizadas como, transição de uma cromatina dispersa (VG-1, VG-2) para parcialmente condensada (VG-3) até atingir um estágio totalmente condensado (VG-4). Os resultados evidenciaram diferença ($p < 0,05$) entre as fases de anestro e diestro, com maior proporção de VG-1 e VG-2 durante o anestro e de VG-3 e VG-4 durante o diestro. A atividade quinase p34^{cdc2} mostrou-se tempo-dependente, atingindo o pico máximo em 48h de MIV ($p < 0,01$). Após 72h, a atividade demonstrou um decréscimo. Dessa forma, a identificação de fatores relacionados à retomada e progressão da meiose *in vivo* é de suma importância para a realização de adaptações adequadas e aperfeiçoamento das condições de cultivo.

Palavras-chave: Diâmetro, ciclo estral, vesícula germinativa, atividade quinase, oócito.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of stages of anestrus and diestrus in oocyte diameter, configuration of chromatin in GV stage and competence of canine oocytes, as well as analyze the kinetics of p34^{cdc2} kinase activity during *in vitro* maturation of canine oocytes after 24, 48 and 72 hours of *in vitro* culture. Ovaries were obtained from bitches after elective ovariectomy (OSH). To evaluate the diameter and configuration of chromatin in GV stage, *cumulus-oocyte* complexes (COCs) were subjected to 0,2% hyaluronidase solution for removal of *cumulus* cells and stained with Hoechst. The assessment of nuclear configuration of canine oocytes was analysed after 72 hours *in vitro* maturation. To perform the ELISA was performed an extract of proteins from oocytes after 24, 48 and 72 hours of *in vitro* culture. For the mean oocyte diameter, the results showed no difference ($p > 0.05$) between phases of anestrus and diestrus (77,62 μm x 78,64 μm). Comparing the reproductive phases, higher frequency of oocytes in stages of MI (19,1%) and M-II (14%) was observed in the diestrus phase. However, these differences were not significant ($p > 0.05$). Four stages of chromatin configuration identified as GV-1, GV-2, GV-3 and GV-4 were classified. The observed changes in chromatin configuration been characterized as a transition dispersed chromatin (GV-1, GV-2) for partially condensing (GV-3) until it reaches a fully condensed phase (GV-4). The results showed difference ($p < 0.05$) between phases of anestrus and diestrus, with a higher proportion of GV-1 and GV-2 during anestrus and GV-3 and GV-4 during diestrus. The p34^{cdc2} kinase activity was shown to be time-dependent, reaching a peak at 48h of IVM ($p < 0,001$). After 72h, the activity showed a decrease. Thus, identification of factors related to the resumption and progression of meiosis *in vivo* is critical for making appropriate adjustments and improvement of culture conditions.

Keywords: Diameter, estrous cycle, germinal vesicle, kinase activity, oocyte.

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos autores que trabalha com biotecnologias reprodutivas na espécie canina especialmente a maturação *in vitro* (MIV) e a fertilização *in vitro* (FIV), concordam de forma unânime da grande dificuldade em se obter resultados satisfatórios. A maior parte dos conhecimentos envolvendo a MIV de oócitos caninos é adquirida baseada em experimentos realizados em outros mamíferos. Entretanto os índices e a eficiência da maturação na espécie canina não são muito promissores. Em cadelas, a taxa de MIV tem demonstrado sucesso limitado variando de 0 a 58% para oócitos maturados até a anáfase I e metáfase II (M-II) (NICKSON et al., 1993; HEWITT e ENGLAND, 1997). Esses índices baixos podem ser decorrentes da qualidade dos oócitos utilizados ou até mesmo da ausência de padrões para a suplementação dos meios de cultura com hormônios, proteínas ou vitaminas (FARSTAD et al., 2000).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na maturação oocitária é essencial na identificação de estratégias para o desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro*, melhorando as técnicas de reprodução assistida. Dessa forma, os novos conhecimentos adquiridos com relação a MIV e a FIV poderão promover a maximização do potencial de preservação do genoma de canídeos ameaçados de extinção. Neste cenário, o cão doméstico é utilizado como modelo experimental para o desenvolvimento dessas técnicas, devido a similaridade da sua fisiologia reprodutiva e suas respostas a experimentos *in vitro* (DURRANT et al., 1998).

A espécie canina apresenta algumas particularidades reprodutivas que merecem destaque. Na cadela a ovulação ocorre 1 a 2 dias após o pico pré-ovulatório de LH, ainda no início da fase de estro e os folículos ovarianos iniciam sua luteinização antes mesmo das ovulações, além disso, esses oócitos são liberados ainda imaturos, no início da primeira divisão meiótica. Assim, após a ovulação, os oócitos requerem de 2 a 5 dias para completar a maturação (OTOI et al., 2000). O ambiente das tubas uterinas exerce importância fundamental para a maturação oocitária canina, já que ao contrário do que se observa em outras espécies, em canídeos a tuba uterina é

responsável por sustentar durante um extenso período a sobrevivência dos oócitos (LUVONI et al., 2005).

O tempo de cultivo recomendado para a MIV de oócitos caninos varia enormemente (acima de 120h), mas os resultados da completa maturação são ainda controversos e insatisfatórios. Desta forma, a avaliação da retomada da meiose assume grande importância nessa espécie para avaliar a progressão da maturação nuclear ao longo de todo o tempo de cultivo (SILVA et al., 2008). Muitas etapas permanecem não padronizadas dentro do processo de maturação, dentre elas a obtenção e seleção dos oócitos, a idade e o estágio do ciclo estral das doadoras. Além disso, os meios de cultivo *in vitro* para maturar oócitos de outras espécies são considerados inadequados para MIV de oócitos caninos.

A compreensão adequada das necessidades metabólicas do oócito em sistemas de cultivo de MIV pressupõe a necessidade de novos estudos para que seja estabelecida uma condição ideal para que os oócitos adquiram competência e tornem-se apto a serem fertilizados e capazes de sustentar o desenvolvimento embrionário inicial (BARRETO, 2007). Assim, as atuais pesquisas na área de reprodução assistida em canídeos estão concentrando seus esforços nos protocolos de MIV buscando entender a dinâmica do ciclo celular e testar novas concentrações e associações de hormônios, fatores de crescimento, antioxidantes, procurando ajustar da melhor forma possível, todas as variáveis envolvidas no processo.

Dessa forma, esta pesquisa buscou avaliar os fatores que pudessem influenciar na competência de oócitos caninos como, o diâmetro oocitário, a fase do ciclo estral da doadora, a configuração da cromatina em VG e a cinética da proteína p34^{cdc2}, com o propósito de melhor compreensão dos baixos índices de maturação nuclear encontrados na cadela.

2. REVISÃO DE LITERATURA

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

Os canídeos são conhecidos por uma biologia reprodutiva que os diferenciam de outras espécies. A cadela doméstica geralmente apresenta dois ciclos estrais por ano, porém, esses ciclos podem variar de um a quatro, a depender da raça ou de características individuais dos animais. Desta forma, são considerados animais monoéstricos, predominantemente não estacionais (JOHNSTON et al., 2001).

O ciclo estral da cadela é dividido em quatro fases bem definidas: proestro, estro, diestro e anestro. Essas fases sofrem influências hormonais, que induzem transformações morfológicas, clínicas, citológicas (JOCHLE e ANDERSEN, 1977).

O proestro pode persistir de uma a três semanas e está associado a secreção do FSH (hormônio folículo estimulante) que promove aumento do crescimento folicular e aumento das concentrações de estrógeno produzido pelas células da granulosa (CONCANNON e DIGREGORIO, 1986). O ápice das concentrações do estrógeno é observado de 24 a 48 horas antes do início do estro. A transição do proestro para o estro é marcada por uma inversão hormonal, representada pelo declínio dos níveis de estradiol e aumento da concentração da progesterona, denominado de luteinização pré-ovulatória (CONCANNON et al., 1989).

Este fenômeno é diferente de outras espécies domésticas, nas quais o estrógeno predomina no ambiente folicular pré-ovulatório (FARSTAD et al., 2000). A luteinização pré-ovulatória é observada em outras espécies como suínos, primatas e roedores, mas nas cadelas este processo é particularmente característico, já que as células foliculares sofrem luteinização 60 a 70 horas antes da ovulação e o aumento pré-ovulatório da progesterona ocorre imediatamente antes, ou coincide, com pico de LH (CONCANNON et al., 1977).

Após o estro, o animal entra em fase lútea (diestro), dominada pelos efeitos da progesterona, que embora, apresente concentrações semelhantes entre animais gestantes ou não, em cadelas prenhes a sua concentração

declinará abruptamente por ocasião do parto, e nas cadelas não prenhes o declínio ocorrerá de maneira gradual, devido ausência de um mecanismo luteolítico (JEFFCOATE, 1998). Com a finalização do estro, inicia-se um longo período de inatividade ovariana, denominado anestro (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003).

2.2. Maturação oocitária *in vivo* na cadela

A maturação oocitária consiste em uma série de eventos que ocorrem de forma ordenada para que o oócito torne-se apto a ser fecundado. Esses eventos são complexos e dependem da correta dinâmica de separação dos cromossomos como também da redistribuição das organelas citoplasmáticas e do acúmulo mRNA, proteínas e fatores de transcrição necessários para que esse processo ocorra. Qualquer alteração nesse processo pode acarretar em anormalidades na fecundação e no conseqüente desenvolvimento embrionário (MATTIOLI, 1989).

O processo de maturação oocitária *in vivo*, pode ser dividido em três aspectos funcionais: 1) a maturação nuclear caracterizada pela modificação da cromatina em VG até M-II, incluindo nesses eventos nucleares a quebra da vesícula germinativa, desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do 1º corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico; 2) a maturação citoplasmática que reflete todas as transformações na distribuição e organização das organelas individuais da fase de VG até M-II e 3) maturação molecular que é o conjunto de instruções acumuladas durante o estágio de VG, a qual envolve o acúmulo de mRNA específico e que controla tanto a maturação nuclear quanto a citoplasmática até o período de transição do controle do genoma materno para o do zigoto (MEINECKE et al., 2001).

O ciclo celular, tanto a mitose como a meiose, compreende quatro fases distintas: prófase, metáfase, anáfase e telófase. A meiose pode ocorrer em duas etapas denominadas meiose I e meiose II, sendo a prófase I da meiose dividida em cinco estágios: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese (estágio de vesícula germinativa) (JORDÃO e ANDRADE, 2012).

A maturação tem início na vida pré antral e na maioria dos mamíferos, o processo meiótico passa por dois momentos de estagnação. A 1ª estagnação

ocorre na prófase da meiose I, conhecido também como estágio de vesícula germinativa, e permanece assim por meses ou anos até a puberdade. Momentos antes da ovulação, os oócitos são estimulados a responder à onda pré-ovulatória de hormônio luteinizante (LH) para reiniciar a meiose, com a dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina no processo denominado de quebra da vesícula germinativa (QVG) (QUETGLAS, 2007).

Após o rompimento da vesícula germinativa ocorre a progressão da maturação nuclear, passando pelos estágios de metáfase I, anáfase I e telófase I (término da primeira divisão meiótica) completando o primeiro ciclo meiótico com a expulsão do primeiro corpúsculo polar e, atingindo a metáfase II. Nesse estágio o oócito é bloqueado pela segunda vez, e permanece desta forma até o momento da fecundação até atingir o estágio de metáfase II, da segunda divisão meiótica, em que é novamente bloqueado. Com a entrada do espermatozoide no citoplasma durante a fecundação, o oócito completa a sua segunda divisão meiótica, com a extrusão do segundo corpúsculo polar (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005; QUETGLAS, 2007).

Os canídeos, devido algumas particularidades referentes ao ciclo estral sofrem um processo de maturação diferenciado. Enquanto que em outras espécies de mamíferos os oócitos em fase de vesícula germinativa (prófase I) sofrem reinício da meiose nas etapas finais da maturação folicular, sendo ovulados em metáfase II (com a extrusão do 1º corpúsculo polar). Em canídeos os oócitos são liberados em estágio imaturo, no início da primeira divisão meiótica, ainda em fase de vesícula germinativa (OTOI et al., 2000).

Oócitos em estágio de VG estão presentes na tuba uterina, 44 horas após a ovulação, ou dois dias após a onda pré ovulatória de LH. A fase de metáfase I (M-I) ocorre de 44 a 48 horas após a ovulação, sendo caracterizada pela extrusão do 1º corpúsculo polar. O 2º corpúsculo polar é liberado após o término da meiose II, ou seja, após a fertilização, em média 54 horas após a ovulação (LUVONI et al., 2006). A maturação nuclear só está completa 48 a 72 horas após a ovulação.

Dessa forma, os estágios subsequentes da maturação meiótica, como a quebra da vesícula germinativa, metáfase I, anáfase I e metáfase II, assim como a fecundação ocorrem na tuba uterina e a competência meiótica ocorre tanto em ambiente intra como no extra folicular (LUVONI et al., 2005).

Enquanto na maioria dos mamíferos, o tempo total em que os oócitos permanecem no oviduto varia de três a quatro dias, nos oócitos caninos este período varia de 8,5 a 9 dias (HOLST e PHEMISTER, 1971).

O oócito canino se diferencia das outras espécies, pela grande quantidade de material lipídico em seu citoplasma, o que lhe confere um aspecto escuro e homogêneo. Essa síntese lipídica aumenta conforme o crescimento do oócito e caracteriza um dos aspectos da maturação oocitária (TESORIERO, 1982).

2.3. Maturação oocitária *in vitro*.

A MIV é considerada uma das etapas mais importantes da produção *in vitro* de embriões. O processo de maturação oocitária é composto por diversas modificações estruturais e moleculares no citoplasma (maturação citoplasmática) que culminam com a configuração cromossômica em M-II (maturação nuclear) precedendo a penetração do espermatozoide e a consequente fecundação e desenvolvimento embrionário (ROTH e HANSEN, 2005). Por meio desse processo é possível cultivar *in vitro* até a maturação, grande quantidade de oócitos imaturos presentes no ovário. Para isso, diferentes sistemas de cultivo vêm sendo desenvolvidos visando manter a viabilidade, e obter oócitos maduros para a produção *in vitro* de embriões. Entretanto, os oócitos maturados *in vitro* não possuem a mesma capacidade de desenvolvimento que os oócitos maturados *in vivo* (CHIAN et al., 2004).

Os principais métodos utilizados para a obtenção de oócitos em mamíferos são: aspiração dos folículos e fatiamento dos ovários ou “*slicing*”. Apesar de sua simplicidade, a primeira técnica não é muito utilizada em canídeos pela dificuldade de se visibilizar os folículos, já que ficam localizados na região cortical do tecido ovariano, tornando-se aparentes poucos dias antes do momento da ovulação (OTOI et al., 2000). A técnica de fatiamento permite obter oócitos de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento ou até em atresia. Entretanto, este processo pode ser responsável pela baixa obtenção de oócitos de qualidade adequada (Hewitt et al., 1999). Outro método utilizado é o da digestão ovariana, no qual os ovários são colocados em solução enzimática,

geralmente composta por colagenase e DNase, por 1 hora a 37°C (BOLAMBA et al., 2002).

Em estudos de MIV e FIV, diversos protocolos propostos especialmente para bovinos e suínos foram adaptados para caninos, com menores taxas quando comparadas às demais espécies. A composição de um meio de maturação deve obedecer aos seguintes requisitos: conter produtos que se assemelhem aos das células tubáricas; ser suplementado com fonte proteica; conter hormônios, como gonadotrofinas, e ocasionalmente fatores de crescimento; conter substâncias antibacterinas e/ou antifúngicas. Atualmente os meios mais usados são o fluido sintético de oviduto (SOF) (BOLAMBA et al., 2002); e o meio de cultura de tecidos (TCM 199) (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003), acrescidos de proteínas, hormônios, antioxidantes e fatores de crescimento (RIBEIRO et al., 2010).

O meio TCM 199 deve ser suplementado com esteroides e outras substâncias que favoreçam o desenvolvimento oocitário como, por exemplo, o soro fetal bovino (SFB), albumina sérica bovina (BSA) e soro de cadela em estro. De acordo com Bolamba et al. (2002), a utilização dessas fontes proteicas aumenta a sobrevivência dos oócitos, pois suporta a maturação e a consequente fecundação à medida que previne alterações desfavoráveis da zona pelúcida e favorece a aderência das células do *cumulus* ao oócito.

O meio SOF ainda é pouco utilizado na MIV de oócitos caninos. Hewitt e England (1999) obtiveram resultados limitados em cultivo de oócitos de cadelas utilizando esse meio, particularmente em relação à maturação nuclear, o que pode ser devido à constituição do fluido tubárico variar entre as espécies e os diferentes estágios reprodutivos. Segundo esses autores, a composição do meio SOF, elaborada com base nas características conhecidas de outras espécies, pode ser inadequada para as cadelas. Esse fato pode ser atribuído aos níveis de proteínas, de carboidratos e de íons bicarbonato como fonte de dióxido de carbono para a manutenção do pH.

A suplementação com hormônios nos meios de maturação apresenta resultados variados e inconclusivos sobre seus benefícios. Acredita-se que o desenvolvimento da competência do oócito em iniciar o processo de maturação implica numa ação coordenada de estímulos hormonais, caso contrário, o desenvolvimento não ocorre (LUVONI et al., 2005). De acordo com Sirard et al.

(2007) a capacidade dos oócitos atingirem a M-II em cultivo é relacionada às condições de maturação *in vitro*. Desta forma, a adição de gonadotrofinas e esteroides ao meio de maturação possibilita a maturação *in vitro* destas estruturas fora do folículo, ocasionando um aumento do potencial de fecundação e desenvolvimento embrionário.

Um estudo realizado por Kim et al. (2005) demonstrou que a associação de hormônios esteroides (estrógeno e progesterona na concentração de 2µg/mL apresentou melhor efeito sobre a maturação de oócitos caninos (16,6% de metáfase II) quando comparada a mesma concentração isoladamente (estrógeno: 14,7% e progesterona: 10,8%). Segundo esses autores, a associação de estradiol e progesterona pode aumentar as taxas de maturação dependendo das concentrações hormonais que são utilizadas. De acordo com Apparicio-Ferreira (2010) a utilização de meios sequenciais utilizando hCG, progesterona e estradiol apresenta efeitos benéficos na competência meiótica. Goretti et al. (2011) utilizando o soro de cadela em estro associada ao meio TCM 199 encontraram alta taxa de oócitos atingindo o estágio de metáfase II (47%) após 96 horas de cultivo. Uma pesquisa conduzida por Hewitt e England (1997) demonstrou que hormônios gonadotróficos algumas vezes utilizados nos meios não apresentam efeito na maturação.

Os fatores de crescimento são utilizados como alternativa de suplementação nos meios de cultivo para aumentar as taxas de maturação. Dentre os principais fatores de crescimento estudados estão o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (RIBEIRO et al., 2010). O IGF pode participar na maturação do oócito, ovulação, implantação e embriogênese. Além dos efeitos mitogênicos sobre o metabolismo e crescimento celulares, esses fatores exercem também efeitos parácrinos e autócrinos sobre a proliferação celular (YOSHIMURA, 2003). Entretanto, apesar dos efeitos descritos, o acréscimo do IGF nos meios de maturação de oócitos caninos não demonstrou resultados positivos conforme demonstrado no trabalho de Oliveira et al. (2009) que utilizou meio TCM 199 acrescido de 100 ng /mL de IGF-I e as taxas de M-II foram em torno de 3,44%.

O EGF é um fator de crescimento bastante usado em meios de maturação e seu principal efeito é estimular a síntese de glutathione no meio intracelular do oócito (CHAVES et al., 2010). Kim et al. (2004) observaram uma

porcentagem maior de oócitos atingindo M-II quando suplementados com 20 ng/mL de EGF (13%). Em outra pesquisa, utilizando uma associação de 100 nM de cada um dos seguintes fatores de crescimento: IGF-1, GH humano, TGF α , EFG, os autores observaram que esta combinação foi significativamente benéfica para a competência meiótica, resultando em 49% de oócitos em M-II (ALHAIDER e WATSON, 2009).

Os compostos antioxidantes têm sido amplamente estudados em várias espécies, pois o estresse oxidativo, responsável pelos elevados índices de degeneração e morte celular, representa uma das grandes preocupações nos processos de MIV e FIV. Diante disso, as células possuem um eficiente sistema de defesa contra os danos provocados pelos radicais livres; a glutathiona (GSH), que possui como principal função a detoxificação e antioxidação de componentes endógenos e exógenos, mantendo a condição redox intracelular. Porém, embora as células possuam um adequado sistema de proteção, a manipulação do oócito durante o processo de MIV, retirando-o do ambiente intra folicular, ou seja, do seu equilíbrio interno, e expondo-o a altas tensões de oxigênio, pode gerar um elevado estresse oxidativo, o qual provocará a mobilização de grande quantidade de glutathiona, promovendo o acentuado declínio dos seus níveis. Desta forma, a competência meiótica é reduzida devido elevados níveis de degeneração e morte celular provocada pelos radicais livres, presentes no meio de maturação (PIRES, 2006).

Na MIV, a síntese de GSH pode ser estimulada por alguns substratos (cisteína e cistina) ou precursores (cisteamina e β -mercaptoetanol). Estudos realizados com canídeos demonstraram índices de maturação de 20% e 12,9% de metáfase II em meios suplementados respectivamente com 50 μ M e 100 μ M de β -mercaptoetanol (KIM et al., 2004). Em pesquisa realizada por Pires (2006) a suplementação com cisteína e cisteamina não apresentou influência positiva sobre a maturação oocitária canina.

2.3.1. Fatores que podem influenciar a maturação *in vitro*

No folículo antral observa-se dois tipos de células da granulosa: as células granulosas murais que constituem na camada interna do folículo e as células granulosas do *cumulus oophorus*. As células do *cumulus* têm a função

de fornecer nutrientes ao oócito, mecanismo de grande importância para a espécie canina já que essas células mantêm-se ligadas ao embrião até o estágio de mórula (NICKSON et al., 1993). Segundo Matzuk et al. (2002), durante o crescimento intra-folicular, caracterizado por alta atividade transcricional, a íntima associação entre o oócito e as células do *cumulus* é requisito para o crescimento folicular normal e aquisição da competência meiótica.

De acordo com Tanguet et al. (2002) a célula do *cumulus* apresenta três funções biológicas essenciais: a) antes da ovulação, o *cumulus* exerce controle sobre a maturação do oócito; b) durante a ovulação, conduz o oócito ao interior do oviduto; c) após a fecundação, participa dos mecanismos que controlam o acesso do espermatozoide ao oócito. Na maturação oocitária, a célula do *cumulus* desempenha um papel de destaque já que mantém o oócito em bloqueio meiótico, participa na indução da meiose por conduzir o sinal de LH ao oócito e são responsáveis pela maturação citoplasmática do mesmo. Estas funções podem ser atribuídas a sua rede de junções comunicantes e as suas características metabólicas específicas.

O oócito e as células do *cumulus* estão conectados funcional e fisicamente por uma complexa rede de comunicação bidirecional mediada pelas junções GAP, através da qual ocorre a transferência de nutrientes, íons e pequenas moléculas como o cálcio e o AMPc para os compartimentos internos (GANDOLFI et al., 2005). Segundo Viaris De Lesegno et al. (2008), momentos antes da ovulação, os oócitos e as células do *cumulus* demonstram sinais de comunicação, porém, após três dias da ovulação, a comunicação se desfaz. Assim, de acordo com Rodriguez e Farin (2004), a diminuição das junções GAP é um fato cronologicamente relacionado à maturação oocitária e, portanto, essas junções teriam papel essencial na coordenação entre a maturação nuclear e citoplasmática.

Diversos fatores podem influenciar na habilidade do oócito em completar a maturação oocitária. O número de camadas das células do *cumulus* constitui-se um dos critérios adotados para a adequada seleção oocitária. Entretanto, esta característica deve ser associada à avaliação do aspecto citoplasmático, o qual deve ser escuro, homogêneo, devido a grande quantidade de lipídeo em seu interior. De acordo com Hewitt e England (1997), os COCs podem ser

divididos em 3 graus, com base na avaliação do aspecto citoplasmático do oócito. São eles: grau 1: pigmentação escura com uma ou mais camadas de células do *cumulus*; grau 2: pigmentação clara com camadas incompletas de células do *cumulus*; grau 3: pigmentação pálida, sem formato definido e sem células do *cumulus* aderidas, sendo considerados degenerados. Apenas os COCs grau 1 devem ser selecionados para a MIV.

A importância da seleção de oócitos com base na morfologia foi demonstrada por Nickson et al. (1993) quando foi observado a degeneração de oócitos com apenas uma camada de células do *cumulus*, enquanto parte dos oócitos com mais de uma camada de células do *cumulus* continuava a se desenvolver em cultivo. Segundo Rodrigues et al. (2009), a integridade do fenótipo do complexo *cumulus*-oócito é considerada tanto um indicador da sua viabilidade como um potente marcador da capacidade de transcrição de genes envolvidos na maturação e desenvolvimento embrionário inicial.

A idade da cadela doadora influencia diretamente no número de oócitos recuperados. Segundo Durrant et al. (1998), os ovários de fêmeas caninas pré-púberes apresentam menor proporção de folículos em estágio avançado de desenvolvimento e maiores quantidades de folículos degenerados, indicando atresia acelerada durante os primeiros meses de vida. Além disso, estes ovários apresentam parcela menor de oócitos, com tamanho inferior e com camada incompleta de células do *cumulus* (NICKSON et al., 1993). Fêmeas com idade superior a sete anos apresentam comprometimento na habilidade de maturação oocitária.

Quanto ao período de cultivo *in vitro* não há um tempo pré-estabelecido. Experimentos sobre MIV em cadelas demonstraram períodos de incubação muito variados. Alguns autores afirmam que a completa maturação meiótica ocorre após 24 a 48h de cultivo (SAINT-DIEZER et al., 2001; DE LOS REYS, 2005; LUVONI et al., 2005), enquanto há estudos que relatam 72 a 96h como período necessário para alcançar maiores índices de maturação (SUZUKAMO et al., 2009; ALHAIDER e WATSON, 2009). Entretanto, a maioria dos trabalhos preconiza o período de 72 horas como o ideal para a completa maturação meiótica.

2.4. Influência do ciclo estral na maturação *in vitro* de oócitos caninos

A influência da fase do ciclo estral na maturação oocitária está sob investigação e os resultados mostram-se controversos. Alterações morfológicas que ocorrem no oócito canino durante as diferentes fases do ciclo estral podem influenciar na habilidade do oócito em se comunicar com as células do *cumulus* e, conseqüentemente, alterar a capacidade de competência meiótica. Resultados de estudos mostram que os oócitos obtidos de folículos pré-ovulatórios (estro e proestro) completam a maturação nuclear com mais sucesso do que aqueles obtidos em outras fases do ciclo (SONGSASEN e WILDT, 2007). De acordo com Martins et al. (2006), a alta porcentagem na progressão da meiose observada nos oócitos obtidos de fêmeas durante o estro deve-se provavelmente a exposição desses oócitos a um ambiente folicular rico em estradiol, progesterona e outros fatores ainda desconhecidos. Entretanto, segundo Luvoni et al. (2005) apesar de oócitos advindos de animais em anestro serem menos aptos para alcançar a M-II, nenhuma hipótese pode ser confirmada com relação à influência do ciclo estral sobre a competência meiótica.

Goretti et al. (2011), contrariando estudos anteriores, demonstraram utilizando soro de cadela em estro, que os oócitos de cadelas em anestro podem atingir a M-II, obtendo uma alta taxa de maturação (47,7%). Segundo Feldman e Nelson (2004), o anestro fisiológico não constitui uma fase quiescente do ciclo estral com relação aos parâmetros endócrinos já que são observados picos esporádicos de secreção de LH, elevações das concentrações de FSH, além de flutuações dos níveis de estrógeno, enquanto a concentração sérica de progesterona permanece baixa. Essa condição pode sugerir que os oócitos oriundos de cadelas em anestro também sofram influência de substâncias importantes para seu desenvolvimento, sendo, assim, viáveis para serem submetidas ao processo de maturação *in vitro*.

Luvoni et al. (2001) destacaram a importância das comunicações das junções *gap* na competência oocitária. Esses autores mostraram que, enquanto os COCs obtidos de cadelas em anestro apresentam as junções *gap* fechadas, os COCs obtidos de cadelas no final do proestro possuem 89% dessas junções abertas, fato este que poderia explicar as baixas taxas de maturação de oócitos

obtidos de cadelas em anestro, mesmo após um período de 72 ou 96 horas de cultivo. Segundo estes autores os oócitos obtidos da fase de anestro teriam baixo potencial em atingir a M-II devido à falta de comunicação entre as células somáticas e o oócito, impossibilitando desta forma o transporte de moléculas entre estes padrões celulares.

Segundo Rodrigues e Rodrigues (2003), a maturação nuclear *in vitro* não é influenciada pelo estágio reprodutivo, sendo a qualidade do oócito, o indicador mais confiável do potencial de competência meiótica.

De acordo com Nickson et al. (1993), apesar dos resultados serem controversos, os oócitos provenientes de cadelas na fase de diestro seriam mais competentes que os oócitos obtidos na fase de anestro. Esse fato deve ser considerado de fundamental importância já que para uma suplementação adequada, um meio de cultivo deve ser elaborado com base nas necessidades metabólicas relativas a cada fase do ciclo estral para que, dessa forma, o meio de maturação *in vitro* possa simular da forma mais fidedigna possível às modificações que ocorrem *in vivo* na cadela.

2.5. Influência do diâmetro na maturação *in vitro* de oócitos caninos

A aquisição da competência meiótica é um processo coordenado que envolve alterações morfológicas, ultraestruturais e de transcrição no compartimento nuclear e citoplasmático do oócito. De acordo com Romão et al. (2010), a competência meiótica é adquirida durante a fase de crescimento do folículo, quando ocorrem as modificações citoplasmáticas essenciais para o desenvolvimento do embrião, como a síntese e o armazenamento de proteínas e RNA, desenvolvimento de mecanismos que regulam o transporte de cálcio intracelular, redistribuição de organelas citoplasmáticas, e modulação da atividade das proteínas quinase.

A maturação oocitária é iniciada quando os oócitos são removidos do ambiente folicular. Entretanto, de acordo com Mermillod (2001), nem todos os oócitos recuperados dos ovários tem a habilidade de progredir para um embrião viável, já que a retomada da meiose pelo oócito somente é possível a partir de um determinado estado do seu crescimento. Esse estado de

competência meiótica, segundo esse autor, corresponde igualmente a um determinado tamanho folicular, variável entre as espécies.

Otoi et al. (2000) ao classificarem os oócitos em três grupos de diferentes diâmetros ($>100\ \mu\text{m}$; $100\ \mu\text{m}$; $<100\ \mu\text{m}$), observaram que apenas oócitos com mais de $100\ \mu\text{m}$ de diâmetro avançaram para o estágio de M-II (20%), comparativamente aos oócitos pequenos (4-10%). De acordo com Hewitt e England (1999) quanto maior o oócito maior será a habilidade em transpor à fase de quebra da vesícula germinativa para atingir as fases de M-I, anáfase I e M-II, sendo que o diâmetro superior a $120\ \mu\text{m}$ apresenta maior competência para os estágios finais da maturação, similar ao observado em outras espécies domésticas.

Segundo Wit et al. (2000), o oócito para ser fertilizado *in vivo* é doado por um folículo saudável, durante uma fase específica do ciclo estral. Os oócitos obtidos para a produção *in vitro* são obtidos de folículos em diferentes etapas do desenvolvimento e em fases distintas do ciclo estral, sendo assim, expostos a diferentes concentrações de estradiol, progesterona, LH e FSH. Lee et al. (2008) ao avaliar o diâmetro de oócitos com e sem a zona pelúcida em diferentes fases do ciclo reprodutivo (fase folicular, lútea, anestro e oócitos ovulados *in vivo* coletados da tuba uterina) observaram que apenas os oócitos ovulados *in vivo* possuíam diâmetros significativamente maiores quando comparados às demais fases.

Segundo Reynaud et al. (2009), a expansão das células do *cumulus* ocorre dentro do folículo após o pico de LH. Entretanto, a capacidade de resposta à onda pré-ovulatória de LH somente é adquirida quando os folículos atingem 50 a 60% do diâmetro ovulatório. Além disso, de acordo com esses autores, se o oócito canino, comportar-se de modo semelhante ao camundongo, no qual a expansão das COCs está correlacionada com a aquisição de competência meiótica, isto sugere que nesta espécie, a competência provavelmente é adquirida somente por oócitos provenientes de folículos maiores que 4mm de diâmetro.

De acordo com Songsasen e Wildt (2005) apesar dos estudos relatarem que apenas os oócitos com diâmetro superior a $110\ \mu\text{m}$ sejam capazes de retomar a meiose este não deve ser o único fator limitante do sucesso na MIV na espécie canina já que, em média, apenas 20% dos oócitos com diâmetro

maior do que 110 µm atingem a fase de M-II quando cultivados em diferentes meios de maturação. Dessa forma, não se deve atribuir a competência oocitária à apenas um fator determinante, já que a ação coordenada de diversos fatores contribui para o crescimento e desenvolvimento do oócito.

2.6. Configuração da cromatina em vesícula germinativa (VG)

De acordo com Lodde et al. (2007) o oócito de mamíferos adquire uma série de competências durante o desenvolvimento folicular que desempenha um papel fundamental na fertilização e nos estágios subsequentes de pré-implantação e desenvolvimento embrionário. Durante a fase de crescimento, o genoma do oócito sofre influência de diversos níveis de regulação, no qual mudanças dinâmicas na função e arquitetura da cromatina possibilitam um importante mecanismo epigenético para o controle da expressão gênica global (DE LA FLUENTE, 2006). A configuração da cromatina vem sendo descrita em macacos *Rhesus* (SCHRAMM et al., 1995), ratos (ZUCOTTI et al., 1998), ovinos (DE SMEDT et al., 1994), bovinos (COHAN e HUNTER, 2003) e na espécie canina (LEE et al., 2008; REYNAUD et al., 2009; VIARIS DE LESEGNO et al., 2008).

A configuração mais descrita de cromatina em oócitos de mamíferos é a classificação proposta em ratos de cromatina SNS (nucléolo não circundado por cromatina) e SN (nucléolo circundado por cromatina), cuja transição de um estágio para outro é acompanhada da condensação da cromatina. Essa compactação da cromatina teria associação com a síntese de RNA. De acordo com Zucotti et al. (1998) os oócitos com a configuração SN teriam um melhor diâmetro, melhor capacidade e potencial na retomada da meiose, maturação e desenvolvimento embrionário.

Reynauld et al. (2009) descreveram três tipos de configurações de VG relacionadas com o pico de LH e a ovulação nas cadelas. A difusa seria caracterizada por uma cromatina homogênea distribuída por todo o nucleoplasma, com um aspecto difuso e presença de um ou ocasionalmente dois nucléolos. Na parcialmente agrupada a cromatina é parcialmente agrupada ao redor do nucléolo, enquanto na agrupada a cromatina é restrita a uma área específica do núcleo.

Viaris De Lesegno et al. (2008) descreveram cinco configurações de VG, em cadelas, sendo duas identificadas em oócitos *in vivo* (VGc: vesícula germinativa central e VGp: vesícula germinativa periférica) e as outras três após o cultivo *in vitro* (VG1, VG2 e VG3). Os oócitos que exibiram padrão VG1 e VG2 foram menos desenvolvidos em termos de maturação nuclear e citoplasmática quando comparados a VGp. Dessa forma, esses autores sugeriram que tanto VG1 como VG2 são provenientes de oócitos em VGc enquanto os oócitos com padrão VG3, metáfase I, metáfase II e degenerados se originam de oócitos em VGp.

Em estudo realizado por Lodde et al. (2007), apenas 6% dos oócitos classificados como VG-0 foram capazes de completar a primeira divisão meiótica, a maior parte dos oócitos em VG-1, VG-2 e VG-3 conseguiram atingir o estágio de M-II e uma maior porcentagem de oócitos em VG-2 e VG-3 atingiram o estágio de blastocisto quando comparados com os oócitos em estágio de VG-1, demonstrando que a fase da configuração da cromatina teria relação com a competência oocitária.

De acordo com Crozet et al. (1986), os oócitos com cromatina fibrilogramular são encontrados envolvendo de forma ativa uma atividade transcricional sendo o processo de compactação associado a uma acentuada diminuição na síntese de RNA. Estudo realizado por De Smedt et al. (1994) demonstraram que a aquisição da competência meiótica em oócitos de ovinos foi acompanhada por uma compactação nucleolar na configuração da cromatina e uma acentuada diminuição na síntese de RNA. As mudanças morfológicas na VG refletem a síntese ativa de RNA que possibilita o acúmulo de transcriptos maternos necessários para a retomada da meiose e consequente desenvolvimento embrionário (FAIR et al., 1996). Gilchrist e Thopmson (2007) afirmaram que o uso de oócitos transcricionalmente ativos na maturação *in vitro* pode fazer com que a retomada da meiose ocorra de forma precoce, antes que o estoque de mRNA seja suficiente para sustentar o desenvolvimento embrionário.

Diversos estudos (LEE et al., 2008; REYNAUD et al., 2009; VIARIS DE LESEGNO et al., 2008) apontam a influência da fase do ciclo estral com a competência oocitária, observando-se maior porcentagem na progressão da meiose nos oócitos obtidos da fase de diestro ou folicular quando comparados

com oócitos obtidos da fase de anestro. Lee et al. (2008) descreveram cinco configurações de VG em oócitos. Os autores observaram que a configuração de cromatina de oócitos obtidos de cadelas na fase de anestro era predominantemente VG-2 enquanto que oócitos provenientes de cadelas na fase folicular ou ovulados *in vivo* apresentavam-se no estágio de VG-5 (57,4% e 100% respectivamente) sugerindo que as alterações na configuração da cromatina ocorrem em ordem sequencial durante a progressão do ciclo estral.

Segundo Reynauld et al. (2009), utilizando-se folículos pré-ovulatórios foi observado 69% e 21% de oócitos, respectivamente, com cromatina parcialmente agrupada e totalmente agrupada. De acordo com esses autores, há grande indicativo de que ambas as configurações de cromatina, parcialmente e totalmente agrupada, são competentes para retomada da meiose, sendo essa transição associada não apenas com maturação nuclear, mas também com a citoplasmática. Antes do pico de LH, a configuração de cromatina agrupada torna-se predominante (60% para 80%). O aparecimento do LH induz a mudanças na configuração da cromatina, com o aumento da proporção de configurações totalmente agrupadas. Durante os dois dias após a ovulação, não há mudanças observadas na configuração da cromatina. Alguns oócitos ainda possuem cromatina parcialmente agrupada. Essa observação, segundo esses autores, é consistente com o fato de que a cadela necessita de 56 a 72 horas após a ovulação para atingir o estágio de M-II.

Segundo Viaris De Leseño et al. (2008) a ondulação do envelope nuclear é um evento que antecede a onda de LH, e que associado ao deslocamento do núcleo em direção a periferia representam o primeiro sinal que induz a maturação. Dessa forma, para que a maturação oocitária final ocorra são necessários dois sinais distintos: um antes do pico de LH para induzir a maturação e outro cerca de três dias após a ovulação para induzir a retomada meiótica. A presença de oócitos com sinais de maturidade citoplasmática obtidos de ovários de fêmeas em anestro pode ser consequência da sua exposição a gonadotrofinas durante a segunda parte desta fase, o que pode ser um indicativo da presença de ondas foliculares durante esta fase do ciclo. Entretanto, como a população de VGp é inferior a VGc durante este período, levanta-se a hipótese que a provável evolução

destes oócitos seja a atresia e que oócitos pré-ovulatórios seriam provenientes da população de VGc.

2.7. Mecanismos de regulação da maturação *in vitro*

As mudanças moleculares também são essenciais para que os oócitos tornem-se aptos a completar os estágios finais da maturação. Oócitos de diversas espécies necessitam da síntese e da ativação de uma variedade de proteínas para que seja possível o reinício da meiose e a progressão da maturação. Entre as proteínas mais importantes que regulam o mecanismo da maturação estão o MPF (fator promotor da maturação) e as proteínas da família MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos-proteínas - ERK1 e ERK2) (SHENG et al., 2002). As MAPKs são mediadas pela fosforilação de diversos substratos, incluindo fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto e elas catalisam a fosforilação e a ativação de diversas proteínas quinases. A retomada do ciclo celular meiótico é influenciada principalmente pelo MPF. O fator promotor da meiose é um dos principais reguladores das alterações morfológicas que ocorrem durante a maturação do oócito, regulando a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear e a reorganização dos microtúbulos (MOTLIK, 1998).

O MPF é uma proteína heterodimérica, que pertence à família das proteínas quinases, sendo constituído por uma subunidade catalítica, a quinase dependente de ciclina denominada cdk1 ou p34^{cdc2}, que controla a divisão celular e uma subunidade reguladora, a ciclina B1 (MERMILLOD, 2000). As proteínas quinases e fosfatases estão envolvidas no reinício e na completa maturação meiótica do oócito. Oócitos em fase de crescimento apresentam níveis muito baixos de p34^{cdc2} e não são capazes de progredirem da fase G2 (intervalo entre a síntese de DNA e a divisão celular) para a fase M (divisão celular, meiose). A aquisição da competência meiótica está associada com a ativação da p34^{cdc2} no final do desenvolvimento oocitário e com a presença de quantidade adequada de ciclina B1 para haver matéria prima suficiente para ativação do pré-MPF (DE VANTERY et al., 1996). Em sua forma inativa, pré-MPF, a subunidade catalítica se apresenta fosforilada nos resíduos Thr14 (treonina 14) e Tyr15 (tirosina 15) (GAUTIER et al., 1988). O MPF é ativado

quando ocorre a associação das duas subunidades, p34^{cdc2} e ciclina B, e desfosforilação dos resíduos Thr14 e Tyr15, cuja reação é catalisada pela enzima cdc 25 fosfatase (CURCIO et al., 2006).

A ativação do MPF que se caracteriza bioquimicamente pela retomada da meiose e, conseqüentemente, o início da maturação parece ser regulada também pelos níveis de AMPc no complexo *cumulus*-oócito. Segundo Josefsberg et al. (2003) a elevada concentração de AMPc intra-oocitário inibe a ativação do MPF, por prevenir a desfosforilação dos resíduos Th14 e Tyr 15 e reprimir a síntese de ciclina B. De acordo com Kovo et al. (2006), a concentração de MPF oscila entre as divisões celulares. O MPF apresenta atividade acentuada em oócitos nas fases de reinício das divisões meióticas, alcançando seu maior nível na meiose I. Enquanto o decréscimo na concentração deste fator é observado durante a transição da anáfase para a telófase, antes da liberação do primeiro corpúsculo polar.

Estudos indicam que a atividade do MPF é regulada pela localização espacial e concentração de suas subunidades no citoplasma celular. Em um estudo realizado por Quetglas (2010), avaliando-se a localização espacial da ciclina B1, p34^{cdc2} e MAPK, observou-se que os oócitos em vesícula germinativa apresentaram uma marcação granular em todo o citoplasma e também no núcleo. Uma pesquisa realizada por Naito et al. (1995) comparou as concentrações de p34^{cdc2} e ciclina B1 em oócitos suínos, demonstrando maior concentração de p34^{cdc2} livres do que o complexo p34^{cdc2} ciclina B1, levantando a hipótese de que a síntese de ciclina B1 não seria requisito para a progressão na transição G2/M.

Kanatsu-Shinohara et al. (2000) compararam as concentrações de p34^{cdc2} e ciclina B1 em oócitos de camundongo incompetentes e competentes para retomar a meiose e observaram que as concentrações de ambos são aproximadamente 3 vezes maior em oócitos competentes, quando comparados com oócitos incapazes de retomar a meiose. No entanto, a concentração de ciclina B1 mostrou-se até 7 vezes maior do que a de p34^{cdc2} em ambos os estágios. De acordo com esses autores, como a ciclina B1 está em excesso tanto em oócitos imaturos quanto em oócitos maduros, o p34^{cdc2} desempenharia um papel mais central na regulação da ativação do MPF.

Suzukamo et al. (2009) realizaram o primeiro estudo avaliando a atividade das proteínas MAPK e p34^{cdc2} em oócitos de cadelas. Nesse estudo a atividade da MAPK mostrou-se tempo-dependente, revelando aumento após 48h de cultivo, atingindo um pico na sua atividade em 72h. As atividades de 72h e 96h foram maiores quando comparadas com outros períodos do cultivo. A atividade da p34^{cdc2} também se mostrou tempo dependente, porém, observou-se um decréscimo após 72 horas. Segundo os autores, esse estudo sugere que as mudanças nas atividades das duas quinases dependem do *status* nuclear conforme observado em outras espécies. De acordo com os autores o período ótimo para maturação *in vitro* de oócitos caninos é de 72 horas.

3. OBJETIVOS

- i* Avaliar a influência das fases de anestro e diestro, no diâmetro dos oócitos, configuração da cromatina em VG e na competência dos oócitos.

- ii* Avaliar a cinética da atividade quinase p34^{cdc2} durante a maturação *in vitro* de oócitos caninos após 24, 48 e 72 horas de cultivo *in vitro*.

4. CAPÍTULO 1: EFEITO DAS FASES DE ANESTRO E DIESTRO NO DIÂMETRO OOCITÁRIO, CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA EM VG E NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS.

**Leda Maria Costa Pereira¹, Paulo Ricardo de Oliveira Bersano^{2,3},
Maria Denise Lopes¹.**

Trabalho a ser submetido para publicação na Revista
"Theriogenology" - ISSN: 0093-691X

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil

² Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³ Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

4.1. Resumo

Na espécie canina as taxas de maturação oocitária são baixas e a porcentagem de oócitos que permanecem em estágio de vesícula germinativa (VG) independente das condições de cultivo, é alta. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência das fases de anestro e diestro no diâmetro oocitário, na configuração da cromatina em VG e na maturação nuclear de oócitos caninos. Os ovários de 110 fêmeas foram isolados, fatiados e os complexos *cumulus-oócito* (COCs) liberados. Para avaliar o diâmetro e a configuração da cromatina em VG, os COCs selecionados, imaturos, foram submetidos à solução de hialuronidase 0.2% para a remoção das células do *cumulus* e corados com 10 µg/ml de Hoechst 33342. Outro grupo de oócitos foi avaliado, quanto as taxas de maturação, após 72h de cultivo. Em relação ao diâmetro médio oocitário, os resultados não demonstraram diferença ($p > 0,05$) entre os oócitos obtidos das fases de anestro e diestro (77.62 µm x 78.64 µm, respectivamente). Após a maturação *in vitro*, comparando-se as fases reprodutivas, observou-se que embora a frequência de metáfase I (M-I) e metáfase II (M-II) ter sido maior nos oócitos obtidos da fase de diestro, não houve diferença entre as fases ($p < 0,05$). Foi observado nessa pesquisa modificações e remodelamento da cromatina na VG, conforme a fase do ciclo estral. Foram classificados quatro estágios de configuração da cromatina identificados como VG-1, VG-2, VG-3 e VG-4. As alterações observadas na configuração da cromatina foram caracterizadas como, transição de uma cromatina dispersa (VG-1, VG-2) para parcialmente condensada (VG-3) até atingir um estágio totalmente condensado (VG-4). Os dados analisados da configuração da cromatina mostraram uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fases de anestro e diestro, com maior proporção de VG-1 e VG-2 durante o anestro e de VG-3 e VG-4 durante o diestro. A identificação de fatores relacionados à retomada e progressão da meiose *in vivo* é de suma importância para a realização de adaptações adequadas e aperfeiçoamento das condições de cultivo.

Palavras-chave: Ciclo estral, diâmetro, vesícula germinativa, oócito, cadela.

4.2. Introdução

A fisiologia reprodutiva da cadela apresenta particularidades que a diferencia de outras espécies domésticas. Na cadela a ovulação ocorre 1 a 2 dias após o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), ainda no início da fase de estro e os folículos ovarianos iniciam sua luteinização antes mesmo da ovulação, além disso, esses oócitos são ovulados imaturos, no início da primeira divisão meiótica. Assim, após a ovulação, os oócitos requerem de 2 a 5 dias para completar a maturação [1,2].

A maioria dos conhecimentos envolvendo a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos caninos é baseada em experimentos realizados em outros mamíferos com poucas adaptações. Entretanto, os índices e a eficiência da maturação oocitária não são promissores, o que reflete à ineficiência dos meios de cultivo utilizados. Em cadelas, a taxa de MIV tem demonstrado sucesso limitado variando de 0 a 58% para oócitos maturados até a anáfase I e metáfase II [2,3,4]. A baixa competência meiótica desses oócitos quando submetidos a condições artificiais de cultivo é considerada como um grande obstáculo para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas nessa espécie.

O melhor entendimento das mudanças morfológicas e funcionais envolvendo a retomada da meiose é essencial para promover o incremento da taxa de maturação. A associação das fases de anestro e diestro com a competência oocitária ainda está sob investigação e os resultados mostram-se controversos. Willingham-Rocky et al [5] afirmaram que o estágio do ciclo estral do doador é o fator chave no critério de seleção para oócitos caninos meioticamente competentes. De acordo com Rodrigues e Rodrigues [6], a maturação nuclear *in vitro* não é influenciada pelo estágio do ciclo estral, sendo a qualidade do oócito, o indicador mais confiável do potencial de competência meiótica.

Segundo Otoi et al [7] as melhores taxas de MIV são obtidas de oócitos provenientes das fase de proestro e estro, como consequência de um diâmetro oocitário maior encontrado na fase folicular do ciclo estral. Esses mesmos autores, em um estudo realizado sobre a distribuição dos oócitos conforme as fases do ciclo estral observaram que a porcentagem de oócitos com diâmetro maior do que 120µm em ovários em fase folicular foi significativamente mais

alta que aquela encontrada em ovários na fase de anestro (5,5%) e diestro (13,3%). De acordo com Hewitt e England [8], quanto maior o oócito, maior é a habilidade dessa célula em transpor à fase de quebra da vesícula germinativa (QVG) atingindo as fases de metáfase I, anáfase I e metáfase II.

De acordo com Lodde et al [9], o oócito de mamíferos adquire uma série de competências durante o desenvolvimento folicular que desempenha papel fundamental na fertilização e nos estágios subsequentes de pré-implantação e desenvolvimento embrionário. Durante a fase de crescimento, o genoma do oócito sofre influência de diversos níveis de regulação, no qual mudanças dinâmicas na função e arquitetura da cromatina possibilitam um importante mecanismo epigenético para o controle da expressão gênica global [10]. Dessa forma, uma remodelação da cromatina vem sendo estudada em diversas espécies, buscando estabelecer a associação entre a ultra-estrutura oocitária e sua habilidade de retomada da meiose.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência das fases de diestro e anestro no diâmetro dos oócitos, assim como sua configuração de cromatina em VG e na competência dos oócitos. Estas fases reprodutivas foram propostas devido a facilidade de obtenção dos ovários de cadelas em fases longas do ciclo estral, sendo anestro em torno de 4 a 5 meses e diestro por volta de 2 meses. Todavia, não há dados suficientes na literatura sobre a influência dessas fases na competência meiótica.

4.3. Material e métodos

4.3.1. Aspectos éticos e origem do material em estudo

Os ovários foram obtidos de cadelas consideradas híginas ao exame clínico, de diversas raças, com idades entre 6 meses e 7 anos, submetidas à ovário-salpingo-histerectomia (OSH) eletiva no Serviço de Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP. O estudo teve o aceite da Câmara de Ética da FMVZ – UNESP *Campus* de Botucatu com protocolo número 176/2011.

4.3.2. Obtenção e classificação dos oócitos

Após a OSH, os ovários foram isolados assepticamente, imersos em solução fisiológica (NaCl 0.9%) e imediatamente transportados a uma temperatura de 4°C para o Laboratório de Reprodução Animal de Pequenos Animais e Silvestres, onde foram processados no prazo máximo de 4 horas após a remoção. A identificação da fase do ciclo estral foi baseada na classificação proposta por Otoi et al [11] da fase de anestro (ovários com ausência de folículos ou corpo lúteo) e diestro (ovários com a presença de um ou mais corpos lúteos pronunciados). No laboratório, os ovários foram transferidos para placas de Petri de vidro estéreis contendo solução aquecida a 37°C de PBS/PVA adicionada de 10% de soro fetal bovino (SFB).

Nesta solução, os ovários foram seccionados em fatias finas ("*slicing*"), ao longo de seu comprimento e largura, com lâmina de bisturi nº 24, para a liberação dos complexos *cumulus*-oócito (COCs) (Fig 1A e 1B). Os COCs foram identificados e quantificados sob lupa estereomicroscópica (Leica® MZ 12.5) e avaliados com relação à homogeneidade, coloração do citoplasma e número de camadas de células do *cumulus*, de acordo com os critérios morfológicos adotados por Hewitt e England [3] (Fig 1D). Dessa forma, apenas os COCs grau 1, ou seja, aqueles com ooplasma homogêneo, escuro e rodeado completamente por uma ou mais camadas de células do *cumulus*, foram selecionados para esse estudo. Durante o processo de seleção os COCs foram lavados três vezes em meio de lavagem TCM-199 suplementado de 25mM de HEPES, 0.2mM de piruvato de sódio e 5mM de bicarbonato de sódio e 75 µg/mL de gentamicina (Fig 1C).

4.3.3. Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro na maturação nuclear de oócitos caninos após MIV.

Foram utilizados ovários obtidos de 36 cadelas, 18 na fase de anestro e 18 na fase de diestro. Foi isolado um total de 850 oócitos após *slicing*. Destes, apenas 469 oócitos foram classificados como grau I e utilizados para avaliação da maturação nuclear. Os COCs grau 1 de cada grupo após serem selecionados e lavados foram divididos em grupos de até 20 oócitos e

transferidos para placas de cultivo de quatro poços contendo 500 μL de meio de maturação (Fig. 1E). O meio utilizado foi o TCM 199 suplementado com 25mM de HEPES, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, 26mM de bicarbonato de sódio, 1.5mM de piruvato de sódio, 2.9mM lactato de sódio pentahidratado, 0.6 mM de cisteína, 0.03UI/mL de hCG, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de FSH, 20 $\mu\text{g/mL}$ de E_2 e 10ng/mL fator de crescimento epidermal (EGF) (Suzukamo et al [12] modificado). As placas foram acondicionadas em estufa úmida a 38°C em atmosfera de 5% de CO_2 em ar por um período de 72 horas.

Após o cultivo, os COCs foram colocados em placas contendo 200 μL de solução de hialuronidase 0.2%, durante 5 minutos e, aspirados repetidamente com a pipeta de 50 μL para a retirada completa das células do *cumulus* (Fig. 1F). Após serem totalmente desnudos, os oócitos foram então transferidos para uma solução fixadora de paraformaldeído a 3.7%, por 20 minutos, sendo lavados novamente no PBS/PVA para a inativação da hialuronidase e corados com uma gota de bisbenzimidazina (Hoechst 33342), diluído em glicerol na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula e avaliados com auxílio do microscópio de fluorescência Leica[®] DFC 310 FX, com comprimento de onda de 330-385 nm. A classificação do estágio de maturação nuclear foi realizada segundo os critérios adotados por Hewitt e England [3], baseada na morfologia do DNA: vesícula germinativa (VG) (Fig. 2A) quebra de vesícula germinativa (QVG) (Fig. 2B) metáfase I (M-I) (Fig. 2C) metáfase II (M-II) (Fig. 2D), e degenerados ou não passíveis de identificação (Fig. 2E).

4.3.4. Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro no diâmetro de oócitos caninos antes da MIV.

Foram utilizadas 41 fêmeas caninas (29 cadelas em fase de anestro e 12 em fase de diestro). Foi isolado um total de 700 oócitos após *slicing*. Destes, apenas 223 oócitos foram classificados como grau I e utilizados para avaliação da maturação nuclear. Os COCs grau 1 selecionados, imaturos, após serem passados 3 vezes em meio de lavagem foram submetidos por 5 minutos à solução de hialuronidase a 0.2% para a retirada das células do *cumulus*. Após esse processo, os oócitos foram então transferidos para uma solução fixadora

de paraformaldeído a 3.7%, por 20 minutos, sendo lavados novamente no PBS/PVA e corados com uma gota de bisbenzimidida (Hoechst 33342), diluído em glicerol na concentração de 10 µg/mL, para avaliação do diâmetro oocitário, sem a zona pelúcida. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula e avaliados com auxílio do microscópio de fluorescência Leica® DFC 310 FX, com comprimento de onda de 330-385 nm. O diâmetro foi mensurado por meio do software Leica e Byo System View®.

4.3.5. Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro na configuração de cromatina em VG de oócitos caninos antes da MIV.

Foram utilizadas 33 cadelas, sendo 20 fêmeas em anestro e 13 fêmeas em diestro. Um total de 920 oócitos foi isolado após *slicing* e destes, apenas 566 oócitos foram classificados como grau I e utilizados para avaliação da configuração nuclear. Os COCs selecionados foram submetidos por 5 minutos à solução de hialuronidase 0.2% para a retirada das células do *cumulus*. Para o desnudamento completo, os oócitos foram transferidos para microtubos e colocados no agitador por 3 minutos. Em seguida submetidos a várias pipetagens para a liberação completa das células do *cumulus*. Os oócitos foram então transferidos para uma solução de paraformaldeído a 3.7%, por 20 minutos, sendo lavados novamente no PBS e corados com uma gota de bisbenzimidida (Hoechst 33342), diluído em glicerol na concentração de 10 µg/mL. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula e avaliados com auxílio do microscópio de fluorescência Leica® DFC 310 FX, com comprimento de onda de 330-385 nm, para classificação da configuração da cromatina. A avaliação da configuração nuclear foi baseada no remodelamento e posicionamento da cromatina e seguiu os critérios adotados por Lodde et al [9].

4.3.6. Análise estatística

Para estimar a associação entre as fases de anestro e diestro e a maturação nuclear, foi utilizado o teste de Fisher (PROC GLM, SAS Institute [13]). Esse mesmo teste foi utilizado para avaliar a associação entre essas fases do ciclo estral e a configuração da cromatina em VG. A análise de

variância (PROC GLM, SAS Institute [13]) foi usada com o objetivo de comparar o diâmetro médio dos oócitos obtidos das diferentes fases - anestro e diestro. O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para $p < 0,05$ (nível de significância menor que 0.05).

4.4. Resultados

4.4.1. Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro na maturação nuclear de oócitos caninos após MIV

Os resultados dos estágios da maturação nuclear conforme as fases de anestro e diestro estão expressos na tabela 1 e gráfico 1. Comparando-se as fases reprodutivas observou-se maior proporção de oócitos no estágio de VG (9.1%) na fase de anestro. Maior frequência de oócitos no estágio de M-I (19.1%) e M-II (14%) foram observados na fase de diestro. Não houve diferença ($P > 0.05$) nos estágios de maturação nuclear entre as fases de diestro e anestro.

4.4.2. Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro no diâmetro de oócitos caninos antes da MIV.

Os resultados referentes ao diâmetro dos oócitos nas fases de diestro e anestro encontram-se na tabela 2. Os oócitos foram mensurados antes do processo de maturação *in vitro* (Fig. 3A e 3C) e através da medição realizada (Fig. 3B e 3D) observou-se um diâmetro maior nos oócitos obtidos da fase de diestro (78.64 μm) quando comparado com os oócitos obtidos da fase de anestro (77.62 μm). Entretanto, esses dados não foram significativos ($P > 0,05$).

4.4.3. Avaliação dos efeitos das fases de anestro e diestro na configuração de cromatina em VG de oócitos caninos antes da MIV.

A configuração da cromatina dos oócitos em VG foi classificada em quatro estágios diferentes denominados VG-1, VG-2, VG-3 e VG-4.

O estágio de VG-1 (Fig. 4A) foi caracterizado como oócitos com filamentos difusos e poucos sinais de condensação da cromatina. Nesse

estágio, os filamentos apresentaram-se organizados de forma circular e homogênea e evidenciou-se a presença do nucléolo. No estágio de VG-2 (Fig. 4B) observou-se que os filamentos de cromatina mantiveram o contorno homogêneo e circular, localizando-se centralmente no nucleoplasma, semelhante ao estágio de VG-1. Entretanto, houve uma maior dispersão dos filamentos de cromatina que adquiriram um aspecto fibrino-granular e ausência de sinais de condensação da cromatina, observando-se também a presença do nucléolo.

O estágio de VG-3 (Fig. 4C) foi representado por condensação parcial da cromatina, com filamentos organizados de forma homogênea, sem contorno e desfragmentados visando maior compactação da cromatina. No estágio de VG-4 (Fig. 4D) observou-se alta compactação da cromatina, representada por um pequeno círculo situado numa área específica do núcleo. No estágio de VG-3, assim como no VG-4, não foi observada a presença do nucléolo e nem do envelope nuclear.

Os resultados da distribuição dos estágios de oócitos em VG durante as fases de anestro e diestro estão expressos na tabela 3 e gráfico 2. Comparando-se as fases reprodutivas, observou-se alta proporção de oócitos no estágio de VG-1 (29.3%) e VG-2 (22.5%) na fase de anestro. Maior frequência de oócitos no estágio de VG-3 (27.6%) e VG-4 (22.8%) foi observada na fase de diestro. As diferenças nos estágios de vesícula germinativa entre as fases de diestro e anestro foram significativas ($P < 0.05$).

4.5. Discussão

Embora seja uma técnica utilizada rotineiramente em muitas espécies (bovinos, suínos e felinos), em canídeos, o sistema de MIV é considerado ineficiente. Esse fato é comprovado pelos baixos índices de M-I e M-II e elevadas taxas de oócitos degenerados [14]. Vários fatores vêm sendo apontados como possíveis influenciadores nesses baixos índices como, as características morfológicas dos complexos *cumulus*-oócito, o diâmetro oocitário, a fase do ciclo estral da cadela doadora, a suplementação do meio de cultivo assim como as características ultraestruturais do oócito.

A influência do ciclo estral vem sendo associada à competência oocitária, entretanto não há um consenso na literatura sobre os benefícios acerca da fase reprodutiva da cadela na capacidade de desenvolvimento oocitário, de forma que essa questão continua a ser alvo de pesquisas. Alguns estudos mostram que os oócitos obtidos de folículos pré-ovulatórios e durante a fase folicular (estro e proestro) completam a maturação nuclear com mais sucesso do que aqueles obtidos em outras fases do ciclo [15]. Entretanto, segundo Luvoni et al [16] apesar de oócitos advindos de animais em anestro serem menos aptos em atingirem a M-II, nenhuma conclusão adicional pode ser tirada com relação à influência do ciclo estral sobre a competência meiótica.

Por razões práticas a maturação *in vitro* (MIV) nas cadelas é frequentemente realizada com oócitos coletados do anestro ou diestro, após OSH. Além disso, estas fases reprodutivas apresentam longo período (4 a 5 meses no anestro e 2 meses no diestro), tornando mais provável a obtenção de ovários nestes estágios do ciclo estral. Dessa forma não foi possível avaliar, nesse estudo, a relação das fases de proestro e estro com a progressão da maturação nuclear. Nessa pesquisa, observou-se maior porcentagem de oócitos obtidos da fase de diestro atingindo os estágios de M-I – M-II (33.1% vs 24.8%) quando comparados com os oócitos na fase de anestro, entretanto, não foi observada diferença ($P>0.05$) entre essas fases reprodutivas.

Segundo Hewitt e England [3] a suplementação hormonal nos meios de cultivo é baseada no fato de que os oócitos caninos em fase de VG estão sujeitos, *in vivo*, à concentrações decrescentes de estrógeno e crescentes de progesterona no folículo pré-ovulatório. Diante do exposto e da dificuldade de se estabelecer um meio de cultivo adequado para a espécie canina, procurou-se nesse experimento adicionar hormônios e fatores de crescimento que tornasse o meio mais rico e permitisse a simulação da forma mais fidedigna possível do ambiente *in vivo* dessa espécie.

Nesta pesquisa verificou-se menor quantidade de oócitos obtidos da fase de anestro completando os estágios finais da maturação, quando comparado com os oócitos obtidos da fase de diestro. Apesar de não ter sido observada diferença ($P>0,05$) deve-se atentar para o fato de que a

suplementação de gonadotrofinas requeridas para uma maturação nuclear adequada pode diferir conforme o estágio do ciclo estral da fêmea doadora.

A cisteína é um dos antioxidantes mais rotineiramente utilizados para combater os efeitos deletérios dos radicais livres através da estimulação da síntese de glutathione. Entretanto, a concentração utilizada nesse estudo parece não ter sido suficiente para proteger o oócito do estresse oxidativo sofrido na MIV, fato este comprovado pelas elevadas taxas de degeneração observadas tanto na fase de anestro (47.2%) como na fase de diestro (39.5%). Esses resultados levantam a necessidade de se estabelecer um meio específico para a cadela que se baseie não apenas nas concentrações ideais de gonadotrofinas e esteroides, mas em um ambiente que possibilite um pH, nível de oxigênio, proteínas e glicose similares ao ambiente do oviduto.

Em um estudo realizado por Hewitt e England [3] não houve influência da fase do ciclo estral na maturação oocitária. Entretanto, esses autores observaram a presença de folículos em diferentes fases de desenvolvimento, ou seja, uma população bastante heterogênea. Com isso, sugeriram que a retirada de oócitos de folículos selecionados permitiria a obtenção de oócitos com maior potencial de desenvolvimento *in vitro*, evitando-se a colheita ao acaso. De forma similar a esses autores também foi encontrada uma população mista não apenas com relação à morfologia, mas também com relação ao diâmetro, o que pode afetar de forma significativa a taxa de maturação. A seleção oocitária pela morfologia e diâmetro oocitário, na tentativa de se realizar uma amostra mais homogênea poderia aumentar a competência, evitando-se também a grande perda de material durante o processo de maturação nuclear.

A maturação oocitária é iniciada quando os oócitos são removidos do ambiente folicular. Entretanto, de acordo com Mermillod [17] nem todos os oócitos recuperados dos ovários tem a habilidade de progredir para um embrião viável, já que a retomada da meiose pelo oócito somente é possível a partir de um determinado estado do seu crescimento. Esse estado de competência meiótica, segundo esse autor, corresponde igualmente a um determinado tamanho folicular, variável entre as espécies.

Otoi et al [18], sugeriram que o diâmetro ideal para o oócito ser selecionado para a maturação *in vitro* e conseqüentemente se desenvolver até

os estágios finais da maturação, seria de aproximadamente 110µm. De acordo com esses autores, o diâmetro poderia ser um dos fatores a serem considerados para explicar as baixas taxas de maturação *in vitro* encontradas na cadela, já que com base nos achados desse estudo, a média do diâmetro dos oócitos encontrados não reflete a condição ideal para a uma maturação adequada.

Nossos resultados não demonstraram diferença significativa entre os oócitos obtidos das fases de anestro (77.62 µm) e diestro (78.64 µm), mas em ambas as situações o tamanho médio obtido é inferior aquele considerado ideal para a retomada da meiose (110µm); além disso, o tamanho mínimo observado foi de 59.58 µm e 62.51 µm, muito inferior ao necessário para obtenção de taxas de maturação ideais. Desta forma, mesmo quando se consideram fases específicas do ciclo estral temos que considerar uma população heterogênea do ponto de vista de diâmetro oocitário, o que talvez influencie de forma significativa a taxa de maturação. Portanto, é essencial a seleção de oócitos, levando-se em consideração esse fator para possibilitar que os oócitos adquiram a habilidade necessária para atingirem os estágios finais da maturação.

Alguns estudos [9,19,20] demonstram que a competência oocitária estaria relacionada também com modificações e remodelamentos da cromatina na VG. Os estudos relatando as alterações da cromatina na VG na espécie canina são recentes e escassos. Diversas técnicas podem ser usadas para descrever essa remodelação como, a microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e a microscopia confocal [20,21]. Este trabalho, portanto, que utilizou microscopia de luz e fluorescência (coloração Hoescht), pode ser considerado pioneiro no Brasil para a melhor visualização da cromatina e do nucléolo nessa espécie animal.

Segundo Lee et al [19] observa-se alterações na configuração da cromatina, caracterizada por transição de uma cromatina dispersa (VG-1, VG-2), para parcialmente agrupada (VG-4) até atingir um estágio totalmente agrupado (VG-5). Os estágios de VG-1 e VG-2 são semelhantes à descrição realizada nesse trabalho e os estágios de VG-4 e VG-5 foram similares aos de VG-3 e VG-4. Da mesma forma, que no experimento realizado por Lee et al [19], verificou-se uma remodelação da cromatina, representada por filamentos

dispersos, até se atingir um estágio de compactação visível pelo alto grau de condensação da cromatina.

Chohan e Hunter [22] descreveram cinco configurações de cromatina em VG (VG-1 a VG-5). Segundo esses autores a aquisição da competência meiótica é influenciada pelo estágio de desenvolvimento da VG no momento do isolamento do oócito. Com base na classificação desses autores, pode-se observar que a configuração de VG-1 e VG-2 são similares às encontradas no presente estudo. Os estágios de VG-5 no estágio inicial e de VG-5 observados por esses autores são análogos, respectivamente, aos estágios de VG-3 e VG-4 relatados nessa pesquisa. Segundo esses autores a aquisição da competência meiótica é influenciada pelo estágio de desenvolvimento da VG no momento do isolamento do oócito. Dessa forma, os oócitos que retomam a meiose *in vitro*, são provavelmente aqueles em estágios de VG-4 ou VG-5 antes da maturação. Em nosso estudo os oócitos obtidos das cadelas na fase de diestro, apresentaram-se com maior frequência nos estágios de VG-3 e VG-4, correspondentes aos estágios de VG-5 inicial e VG-5 dos referidos autores, portanto, mais hábeis em se desenvolverem até os estágios finais da maturação nuclear.

As mudanças morfológicas no nucléolo ou a organização da cromatina refletem a síntese ativa de RNA que possibilita o acúmulo de transcriptos maternos necessários para a retomada da meiose e consequente desenvolvimento embrionário [23]. Gilchrist e Thompson [24] afirmaram que o uso de oócitos transcricionalmente ativos na maturação *in vitro* pode fazer com que a retomada da meiose ocorra de forma precoce, antes que o estoque de RNAm seja suficiente para sustentar o desenvolvimento embrionário. Essa afirmação, pode explicar as baixas taxas de maturação dos oócitos no estágio de alta atividade de transcrição. Os oócitos no estágio de alta compactação da cromatina (inativos transcricionalmente) representado pelos estágios de VG-3 e VG-4 nesse estudo seriam os oócitos mais competentes em completar a maturação.

Diversos estudos [3,5,6,7,16] apontam a influência da fase do ciclo estral sobre a competência oocitária, observando-se maior porcentagem na progressão da meiose em oócitos obtidos da fase de diestro ou folicular quando comparados com oócitos obtidos da fase de anestro. Nesse estudo, os

dados mostraram que as configurações da cromatina em VG foram distintas nas fases de anestro e diestro. No anestro observou-se uma frequência maior de oócitos nos estágios mais iniciais de desenvolvimento, ou seja, VG-1 (29.3%) e VG-2 (22.5%) quando comparado ao diestro VG-1 (2.6%) e VG-2 (8.1%). No diestro observou-se uma proporção mais elevada de oócitos em estágios mais avançados de desenvolvimento, ou seja, VG-3 (27.6%) e VG-4 (22.8%) quando comparado aos oócitos em estágio de anestro VG-3 (15.7%) e VG-4 (5.1%). Assim, fica claro o envolvimento dos hormônios esteroides sobre os estágios da configuração da cromatina em VG conforme a progressão do ciclo estral, sendo os oócitos em VG-3 e o VG-4 mais capazes de atingir os estágios finais da maturação nuclear, possibilitando a obtenção de taxas de maturações mais elevadas, fertilização e consequente desenvolvimento embrionário.

Esses dados apontam para a necessidade de uma seleção mais rigorosa de oócitos, levando-se em consideração características de posicionamento e remodelação da cromatina e o diâmetro oocitário. Essas características possibilitariam selecionar uma amostra mais homogênea em termo de competência oocitária já que os oócitos normalmente utilizados na maturação *in vitro* são aqueles obtidos de folículos em várias etapas do desenvolvimento e em fases distintas do ciclo estral, expostos, portanto, a diferentes concentrações de gonadotrofinas e hormônios esteroides.

4.6. Conclusão

Com base nos resultados, pode-se inferir que a competência oocitária está associada a diversas variáveis. Apesar de não haver associação significativa entre as fases do ciclo estral e do diâmetro com a competência oocitária, os dados mostram que as configurações da cromatina em VG foram distintas nas fases de anestro e diestro. A configuração nuclear da vesícula germinativa, representada pela sua transição de dispersa para parcialmente ou totalmente agrupada, pode estar associada à habilidade para a retomada da meiose e consequente competência oocitária, demonstrando que cadelas na

fase de diestro poderiam representar melhor escolha para obtenção de oócitos mais competentes.

Assim, a identificação dos fatores relacionados à retomada e progressão da meiose *in vivo* é de suma importância para que seja possível realizar adaptações adequadas e alcançar condições de cultivo, simulando da forma mais fidedigna possível as condições *in vivo* da cadela.

4.7. Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (FAPESP 2011/13197-1).

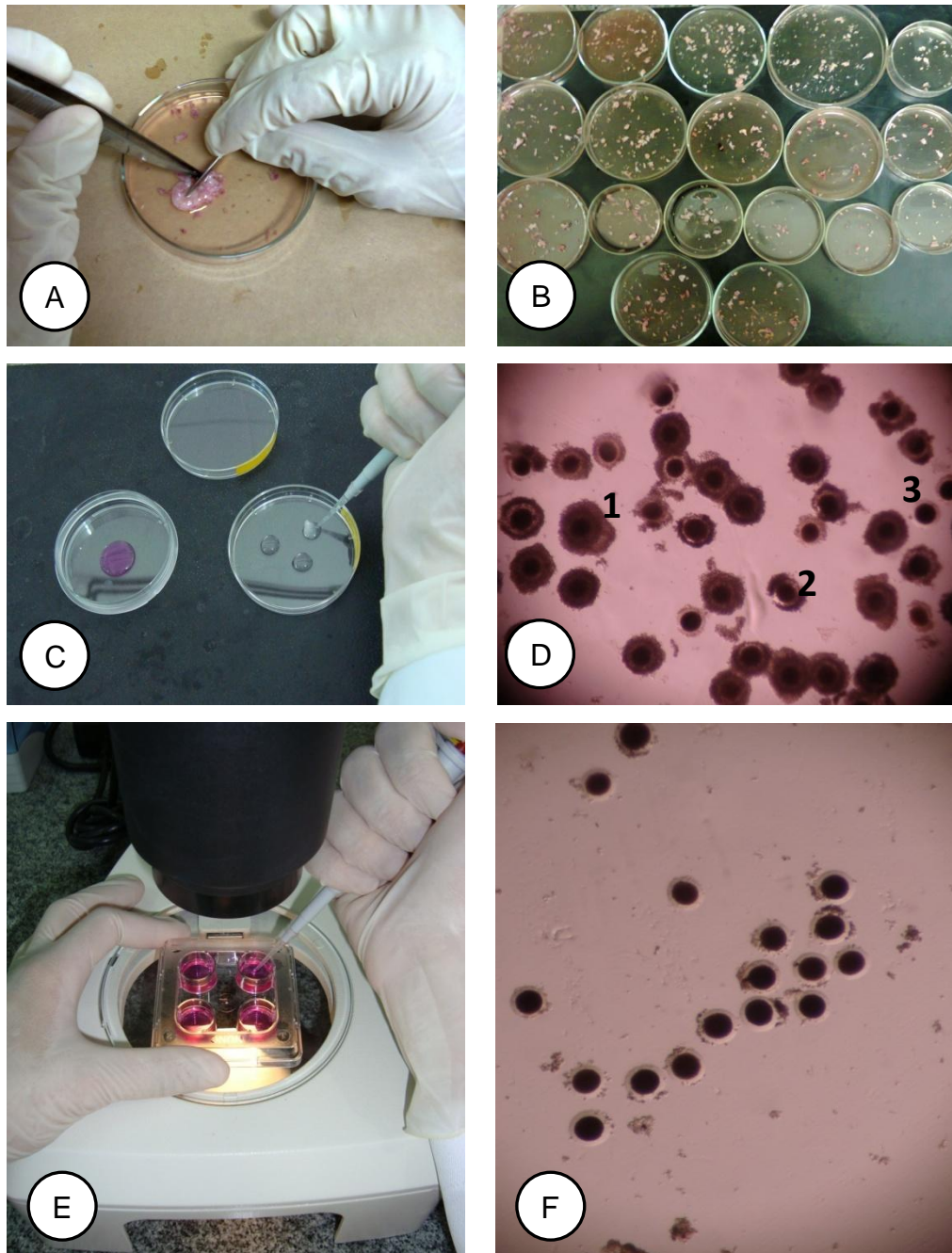
4.8. Referências

- [1] Tsutsui T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil* 1989;39:269-275.
- [2] Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ, Renton JP. Molecular biology methods of monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitch. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:231-240.
- [3] Hewitt DA, England GCW. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;51:83-91.
- [4] Bolamba D, Borden-Russ KD, Durrant BS. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essencial. *Theriogenology* 2002;58:1689-1703.
- [5] Willingham-Rocky LA, Hinrichs K, Westhusin ME, Kraemer DC. Effects of stage of oestrus cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. *Reproduction* 2003;126:501-508.
- [6] Rodrigues BA, Rodrigues JL. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. *Theriogenology* 2003;60:59-66.
- [7] Otoi T, Ooka A, Murakami M, Karja NWK, Suzuki T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrus cycle. *J Fertil Dev* 2001;13:151-155.

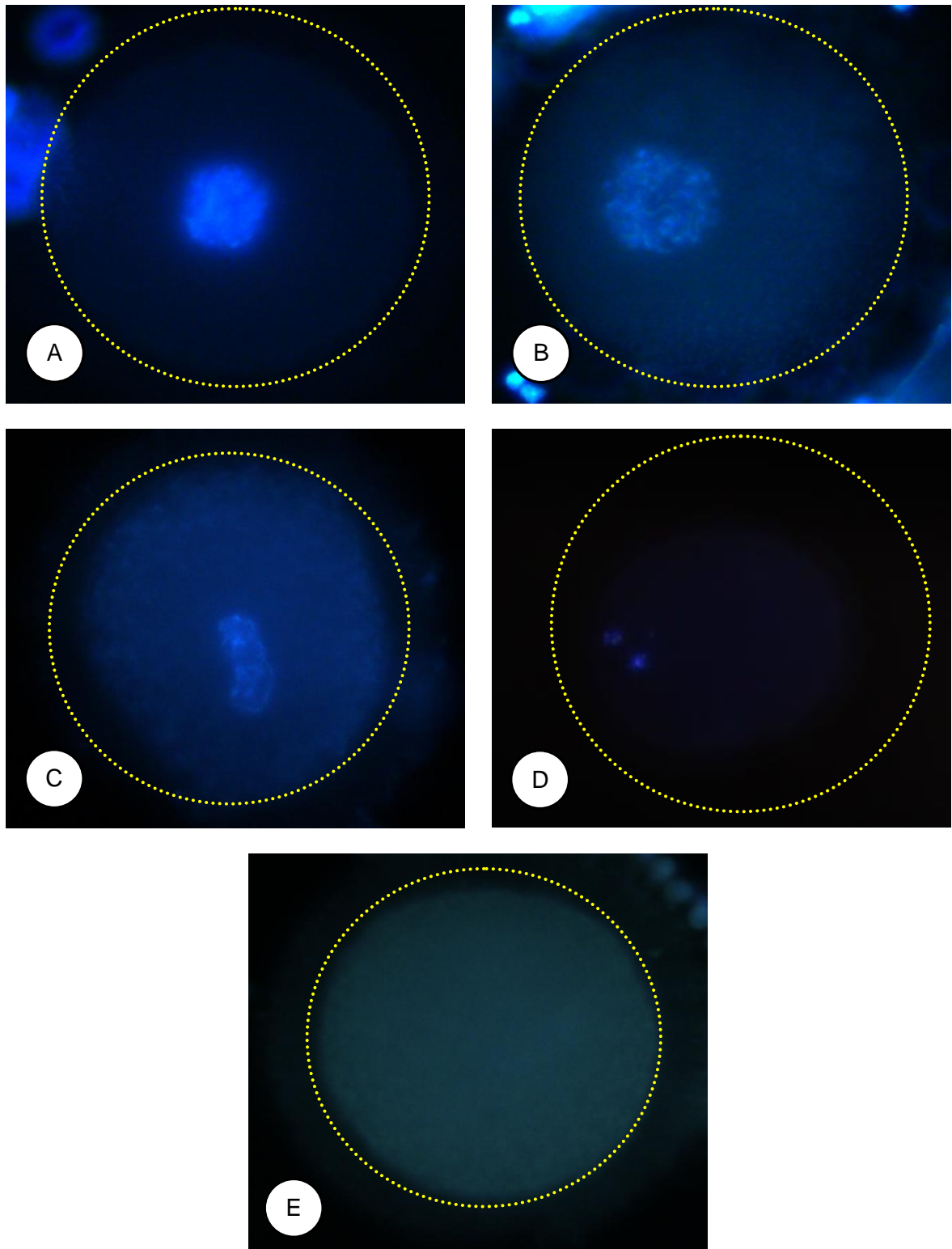
- [8] Hewitt DA, England GCW. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell co-culture for canine oocyte maturation *in vitro*. Anim Reprod Sci 1999;55:63-65.
- [9] Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F, Luciano AM. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. Mol Reprod Dev 2007;74:740-749.
- [10] De La Fluente R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. Dev Biol 2003;292:1-12.
- [11] Otoi T, Willingham L, Shin T, Kraemer DC, Westhusin M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. Reproduction 2002;124:775-781.
- [12] Suzukamo C, Hoshina M, Moriya H, Hishiyama N, Nakamura S, Kawai F, Sato H, Ariga M, Ito J, Kashiwazaki N. Kinetics of nuclear status and kinase activities during *in vitro* maturation of canine oocytes. J Reprod Dev 2009;55(02):116-120.
- [13] SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.
- [14] Luvoni GC, Chigioni S, Perego L, Lodde V, Modina S, Luciano AM. Effect of gonadotropins during *in vitro* maturation of feline oocytes on oocyte-cumulus cells functional coupling and intracellular concentration of glutathione. Anim Reprod Sci 2006;96:66-78.
- [15] Songsasen N, Wildt DE. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. Anim Reprod Sci 2007;91:2-22.
- [16] Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. Theriogenology 2005;63:41-59.
- [17] Mermillod P. Croissance et maturation de l'ovocyte *in vivo* et *in vitro*. In: Thibault C; Levasseur M. La Reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris: Ellip Édit Mark 2001;348-366.
- [18] Otoi T, Yamamoto K, Koyoma N, Tachikawa S, Suzuki T. Bovine oocyte diameter in relation to development competence. Theriogenology 1997;48:769-774.
- [19] Lee HS, Yin XJ, Jin YX, Kim NH, Cho SG, Bae IH, Kong IK. Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine. Anim Reprod Sci 2008;103:336-347.

- [20] De Leseqno CV, Reynaud K, Pechoux C, Thoumire S, Maillard SC. Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. *Mol Reprod Dev* 2008;75:115-125.
- [21] Reynaud K, De Leseqno CV, Chebrout M, Thoumire S, Chastant-Maillard S. Follicle population, *cumulus* mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology* 2009;72:1120-1331.
- [22] Chohan KR, Hunter AG. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following *in vitro* maturation. *Anim Reprod Sci* 2003;76:43–51.
- [23] Fair T, Hyttel P, Greve T, Boland M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Mol Reprod Dev* 1996;43:503–512.
- [24] Gilshrist RB, Thopmson JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 2007;67:6-15.

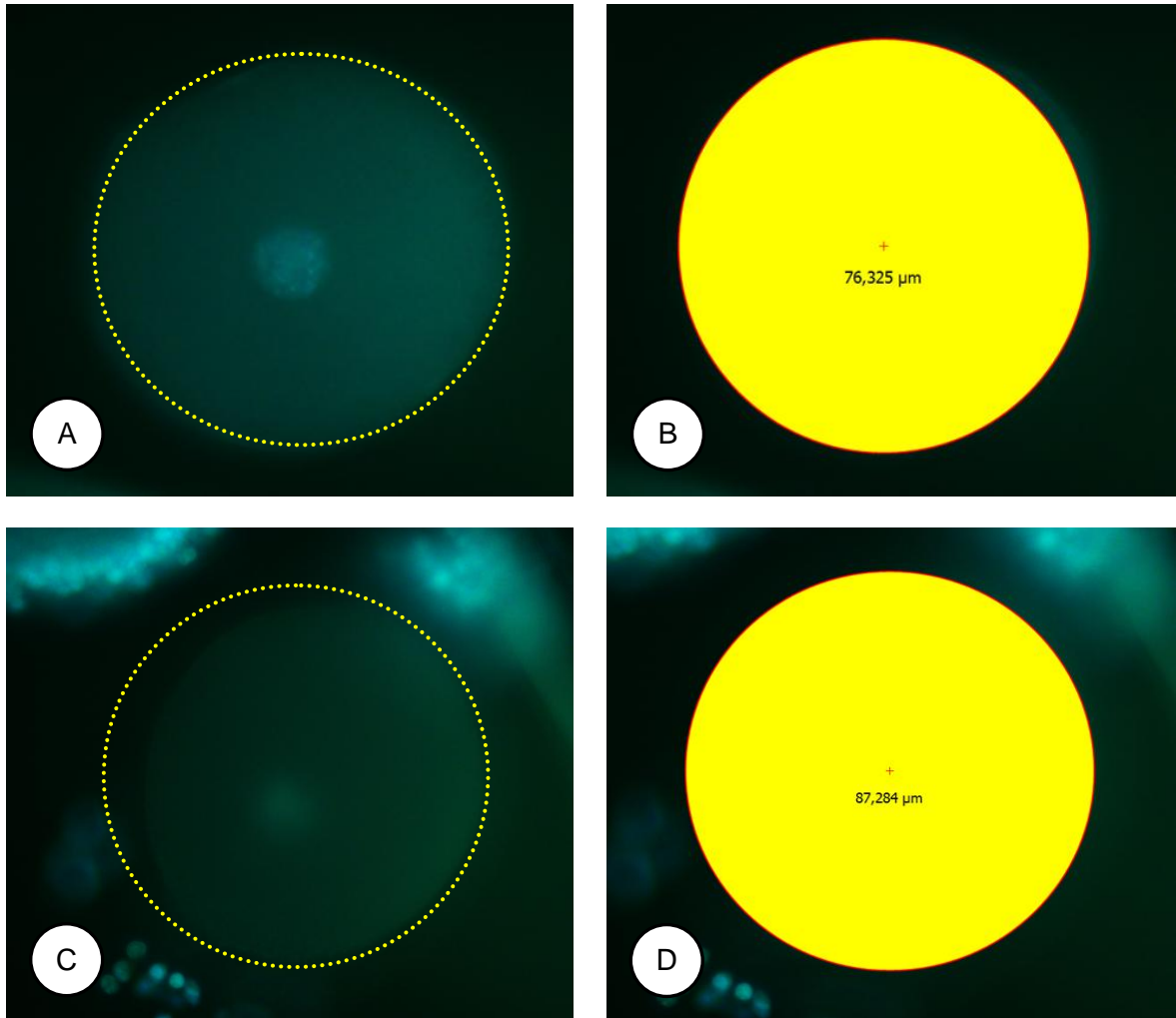
4.9. Anexos



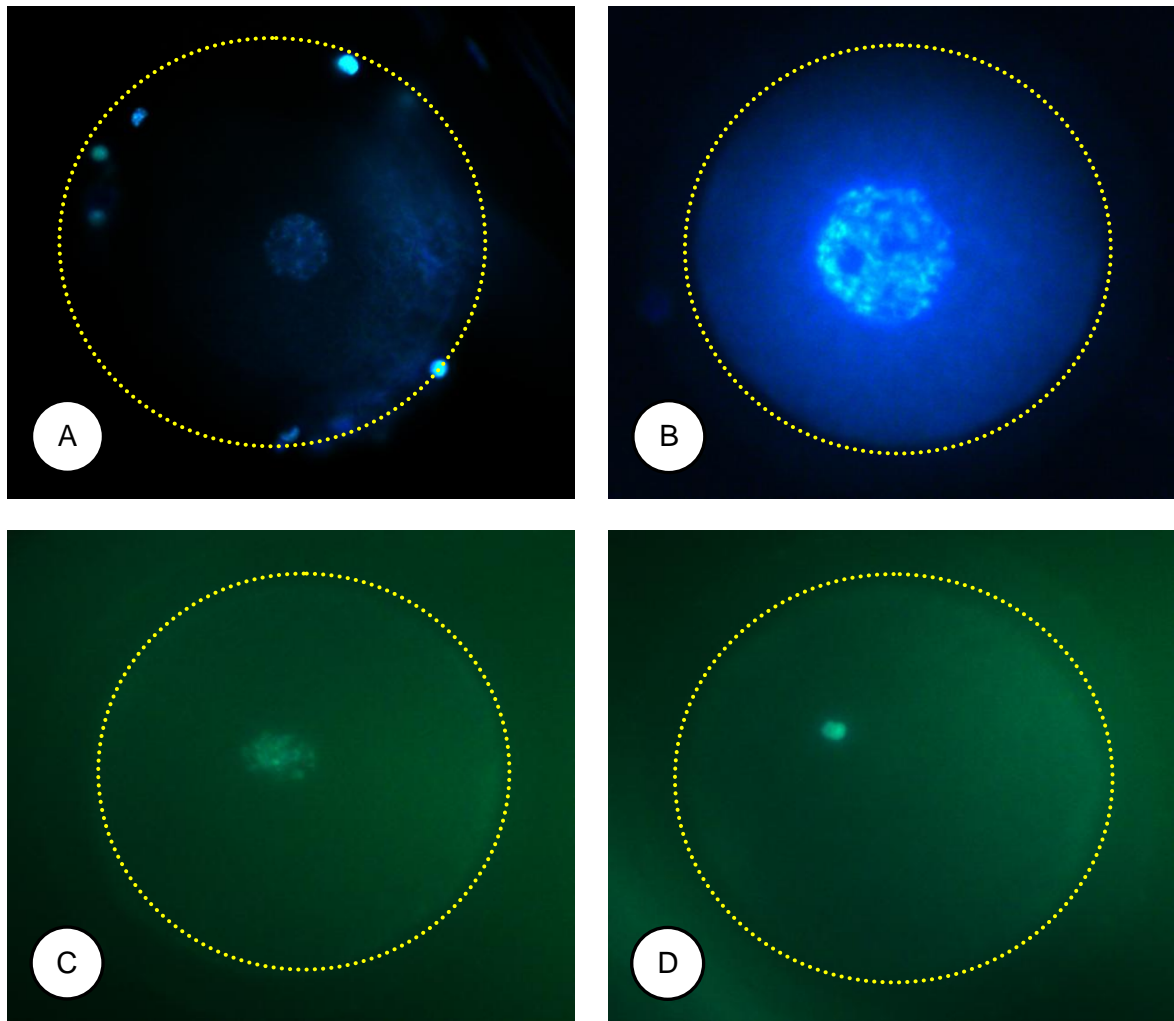
Figuras 1: (A) Realização do método do "slicing" para a liberação dos COCs. (B) Ovários após a realização do método do "slicing". (C) Transferência dos COCs selecionados para o meio de lavagem. (D) Fotomicrografia de COCs de diferentes graus. (1): COC grau 1 (selecionado para maturação), (2) e (3): COCs grau 2 e 3, respectivamente (não selecionados para maturação). Aumento 40X. (E) Transferência dos COCs para placa de quatro poços contendo o meio de maturação, onde ficarão incubados por período de 72 horas. (F) Oócitos tratados com hialuronidase 0.2%, para a remoção das células do *cumulus*. Aumento 40X. Botucatu, 2013.



Figuras 2: Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas em diferentes estágios de maturação nuclear após cultivo *in vitro*. Avaliação e classificação da cromatina. **(A):** Vesícula Germinativa (VG). **(B):** Quebra de Vesícula Germinativa (QVG), **(C):** Metáfase I (M-I). **(D):** Metáfase II (M-II), **(E):** Degenerado ou não passível de identificação. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 330-385 nm. Aumento 200X. Botucatu, 2013.



Figuras 3: (A): Oócitos obtidos de cadelas na fase de anestro antes da MIV (B): Mensuração do diâmetro do oócito, sem a zona pelúcida, obtido da fase de anestro, antes da MIV (C): Oócitos obtidos de cadelas na fase de diestro antes da MIV (D): Mensuração do diâmetro do oócito, sem a zona pelúcida, obtido da fase de diestro, antes da MIV. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 330-385 nm. Aumento 200X. Botucatu, 2013.



Figuras 4: Fotomicrografia de oócitos de cadelas antes da maturação *in vitro*, para avaliação e classificação da cromatina em vesícula germinativa (VG). **(A):** VG-1, filamentos difusos de cromatina com poucos sinais de condensação. **(B):** VG-2, maior dispersão dos filamentos de cromatina, observando-se a presença de nucléolos centralmente dispersos. **(C):** VG-3, condensação parcial da cromatina, ausência de nucléolos e do envelope nuclear. **(D):** VG-4, alta compactação da cromatina, localização periférica no nucleoplasma. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 330-385 nm. Aumento 200X. Botucatu, 2013.

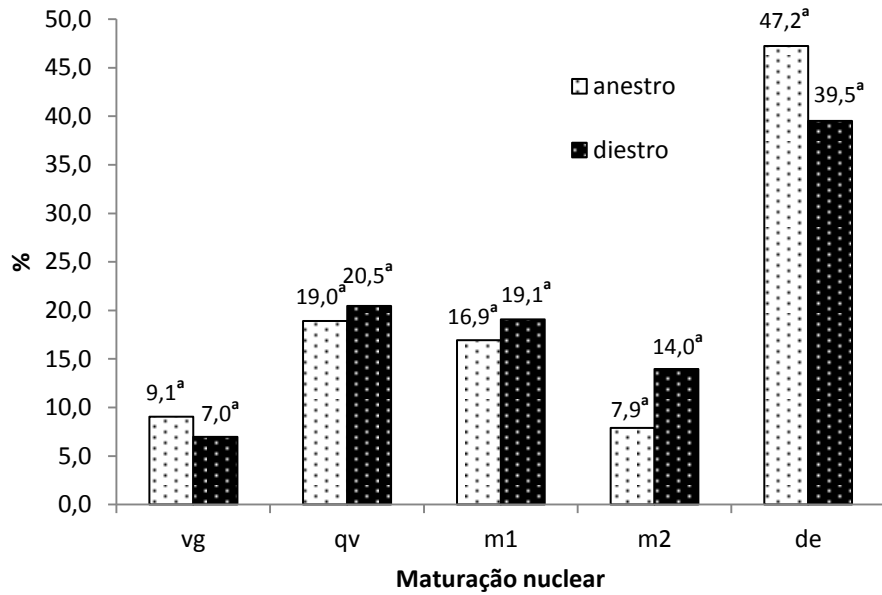


Gráfico 1. Distribuição dos estágios de maturação nuclear conforme as fases de diestro e anestro ($p \leq 0.05$). **vg**: vesícula germinativa, **qv**: quebra de vesícula, **m1**: metáfase I, **m2**: metáfase II, **de**: degenerado. Botucatu, 2013.

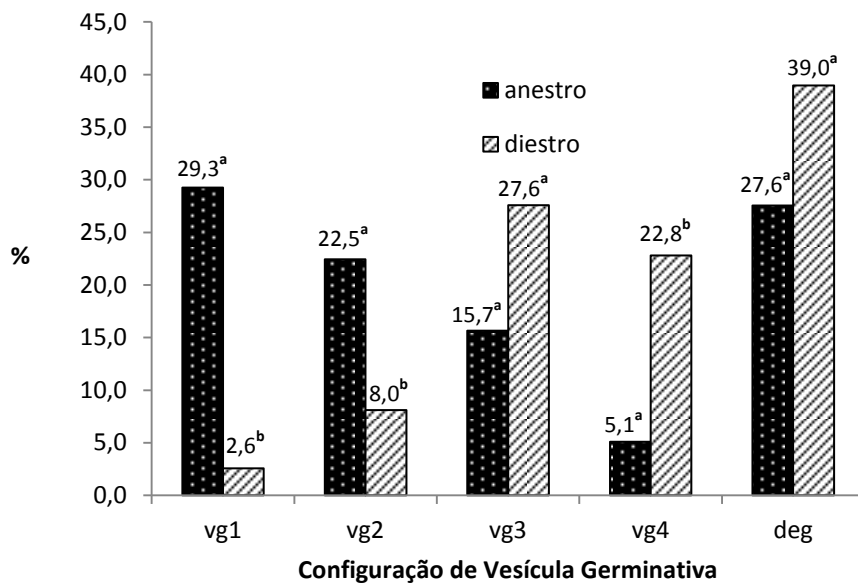


Gráfico 2. Distribuição dos estágios de vesícula germinativa conforme as fases de diestro e anestro ($p \leq 0.05$). Classificação de vesícula germinativa (**vg1**, **vg2**, **vg3**, **vg4**) e **deg**: degenerado. Botucatu, 2013.

Tabela 1. Avaliação da maturação nuclear de oócitos caninos nas fases de anestro e diestro do ciclo estral após maturação *in vitro*. Botucatu, 2013.

Fase Reprodutiva	Qtde	N° de oócitos avaliados (n %)				
		VG	QVG	M-I	M-II	DEG
Anestro	254	23 (9,1) ^a	48 (19,0) ^a	43 (16,9) ^a	20 (7,9) ^a	120 (47,2) ^a
Diestro	215	15 (7,0) ^a	44 (20,5) ^a	41 (19,1) ^a	30 (14,0) ^a	85 (39,5) ^a

Valores com letras iguais sobrescritas minúsculas na mesma coluna, não diferem entre si ($p \leq 0,05$). **VG**: vesícula germinativa, **QVG**: quebra de vesícula germinativa, **M-I**: metáfase I, **M-II**: metáfase II, **DEG**: degenerado.

Tabela 2. Média e desvio padrão, tamanho máximo e mínimo do diâmetro dos oócitos de cadelas nas fases e diestro e anestro antes da maturação *in vitro*. Botucatu, 2013.

Fase	N°oócitos	Média do diâmetro (μm)	Desvio padrão	Tamanho mínimo (μm)	Tamanho máximo (μm)
Anestro	169	77.62	7.94	59.58	120.33
Diestro	54	78.64	8.12	62.51	125.40

Valores expressos na tabela não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Tabela 3. Configuração nuclear de oócitos caninos em estágio de VG (vesícula germinativa) na fase de anestro e diestro do ciclo estral antes do processo de MIV. Botucatu, 2013.

Fase Reprodutiva	N° de oócitos avaliados (n %)				
	VG-1	VG-2	VG-3	VG-4	DEG
Anestro	86 (29.3) ^a	66 (22.5) ^a	46 (15.7) ^a	15 (5.1) ^a	81 (27.6) ^a
Diestro	07 (2.6) ^b	22 (8.1) ^b	75 (27.6) ^b	62 (22.8) ^b	106 (39.0) ^a

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas (a,b) na mesma coluna, diferem entre si ($p \leq 0,05$). Classificação de vesícula germinativa (**VG-1**, **VG-2**, **VG-3**, **VG-4**) e **DEG**: degenerado.

5. CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUINASE p34^{cdc2} NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS

Leda Maria Costa Pereira¹, Paulo Ricardo de Oliveira Bersano^{2,3}, Lucilene Delazari dos Santos³, Maria Denise Lopes¹.

Trabalho a ser submetido para publicação na Revista
"Reproduction in Domestic Animals" - ISSN: 09366768

¹. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

². Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil

³. Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

5.1. Conteúdo

O controle do ciclo celular é regulado por uma cascata de eventos coordenados que podem atuar influenciando na expressão ou repressão da atividade de proteínas relacionadas a retomada da meiose, através de processos de fosforilação ou desfosforilação. Estudos indicam que a atividade dessas proteínas mostra-se tempo-dependente no processo de maturação *in vitro* (MIV) podendo, dessa forma, colaborar no estabelecimento de um período ótimo de cultivo. Esse trabalho teve o objetivo de avaliar a cinética da atividade quinase p34^{cdc2} durante a MIV de oócitos caninos nos tempos 24, 48 e 72 horas. Os ovários foram obtidos de 40 cadelas submetidas à ovário-salpingo-histerectomia (OSH) eletiva. Após a OSH, os ovários foram imersos em solução fisiológica (NaCl 0.9%) e imediatamente transportados a uma temperatura de 4°C. No laboratório, os ovários foram seccionados em fatias finas ("slicing"), para a liberação dos complexos *cumulus*-oócito (COCs). Apenas os COCs grau 1 foram selecionados e colocados em meio de maturação por um período de 24, 48 e 72 h de maturação. Após o cultivo, os COCs foram colocados em placas contendo 200 µL de solução de hialuronidase 0.2% para a retirada completa das células do *cumulus*. O preparo do extrato de oócitos foi realizado após o cultivo *in vitro* por 24, 48 e 72 h e a atividade da proteína p34^{cdc2} detectada por ELISA. Com base nos resultados verifica-se que a atividade da proteína mostra-se tempo-dependente, atingindo o pico após 48h de MIV (p<0,01). Após 72h, a atividade demonstrou um decréscimo. Com base neste estudo pode-se concluir que a proteína quinase p34^{cdc2} desempenha uma função de suma importância na progressão da meiose em cadelas. Dessa forma, a compreensão melhor dessa proteína assim como de outras que participam do processo de maturação poderá contribuir para o estabelecimento de meios mais adequados que melhorem significativamente as taxas de maturação.

Palavras chave: Proteína quinase, oócitos, p34^{cdc2}, maturação, cadela.

5.2. Introdução

Nos mamíferos, os oócitos ao serem removidos do ambiente folicular, deixam de receber o sinal que mantém o bloqueio meiótico e reiniciam a meiose. Nas cadelas, embora o oócito possa retomar espontaneamente a meiose *in vitro*, as taxas de maturação são muito baixas e a porcentagem de oócitos que permanecem em vesícula germinativa (VG) é alta. Durante a ovogênese as informações necessárias para o desenvolvimento embrionário inicial são transcritas e armazenadas sob a forma de mRNA ou traduzidas e armazenadas sob a forma de proteínas (Allard et al. 2005). Qualquer alteração na síntese e conseqüentemente no estoque destas proteínas podem acarretar em graves conseqüências no desenvolvimento oocitário.

A retomada do ciclo celular meiótico é influenciada principalmente pelo fator promotor da meiose (MPF), que é um dos principais reguladores das alterações morfológicas que ocorrem durante a maturação do oócito, regulando a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear e a reorganização dos microtúbulos (Motlik 1998).

O MPF é uma proteína heterodimérica que pertence à família das proteínas quinases, sendo constituído por uma subunidade catalítica, a quinase dependente de ciclina denominada cdk1 ou p34^{cdc2}, que controla a divisão celular e uma subunidade reguladora, a ciclina B1 (Mermillod 2000). A progressão da meiose requer tanto a síntese de ciclina B quanto o seu deslocamento do citoplasma para o núcleo, juntamente com a desfosforilação da subunidade catalítica.

As proteínas quinases e fosfatases estão envolvidas no reinício e na completa maturação meiótica do oócito. Oócitos em fase de crescimento apresentam níveis muito baixos de p34^{cdc2} e não são capazes de progredirem da fase G2 (intervalo entre a síntese de DNA e a divisão celular) para a fase M (divisão celular, meiose). A aquisição da competência meiótica está associada com a ativação da p34^{cdc2} no final do desenvolvimento oocitário e com a presença de quantidade adequada de ciclina B1 para haver matéria prima suficiente para ativação do pré-MPF (De Vantery et al. 1996). Em sua forma inativa, pré-MPF, a subunidade catalítica se apresenta fosforilada nos resíduos Thr14 (treonina 14) e Tyr15 (tirosina 15) (Gautier et al. 1988). O MPF é ativado

quando ocorre a associação das duas subunidades, p34^{cdc2} e ciclina B, e desfosforilação dos resíduos Thr14 e Tyr15, cuja reação é catalisada pela enzima cdc 25 fosfatase. A desfosforilação desses resíduos, assim como a subsequente conversão de MPF-inativo para MPF-ativo é a chave para passagem de G2/M (Curcio et al. 2006). Entretanto, ainda não está elucidado qual das subunidades heterodiméricas do MPF de mamíferos possui papel determinante no controle da atividade do MPF (Ledan et al. 2001).

Kanatsu-Shinohara et al. (2000) compararam as concentrações de p34^{cdc2} e ciclina B1 em oócitos de camundongo incompetentes e competentes para retomar a meiose e observaram que as concentrações de ambos são aproximadamente três vezes maior em oócitos competentes, quando comparados com oócitos incapazes de retomar a meiose. No entanto, a concentração de ciclina B1 mostrou-se até sete vezes maior do que a de p34^{cdc2} em ambos os estágios. De acordo com esses autores, como a ciclina B1 está em excesso tanto em oócitos imaturos quanto em oócitos maduros, o p34^{cdc2} desempenharia um papel mais central na regulação da ativação do MPF.

O objetivo desse estudo foi avaliar a cinética da atividade quinase p34^{cdc2} durante a maturação *in vitro* de oócitos caninos após 24, 48 e 72 horas de cultivo *in vitro*.

5.3. Materiais e método

5.3.1. Animais

Os ovários foram obtidos de 40 cadelas consideradas híginas ao exame clínico, em diferentes fases do ciclo estral, de diversas raças, com idades entre 6 meses e 7 anos, submetidas à ovário-salpingo-histerectomia (OSH) eletiva no Serviço de Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP. O estudo teve o aceite da Câmara de Ética da FMVZ – UNESP *campus* de Botucatu com protocolo número 176/2011.

5.3.2. Obtenção e classificação dos oócitos

Após a OSH, os ovários foram isolados assepticamente, imersos em solução fisiológica (NaCl 0.9%) e imediatamente transportados a uma temperatura de 4°C para o Laboratório de Reprodução Animal de Pequenos Animais e Silvestres, onde foram processados no prazo máximo de 6 horas após a remoção. No laboratório, os ovários foram transferidos para placas de Petri de vidro estéreis contendo solução aquecida a 37°C de PBS/PVA adicionada de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Fig. 1A). Nesta solução, os mesmos foram seccionados em fatias finas ("*slicing*") (Fig. 1B, 1C), ao longo de seu comprimento e largura, com lâmina de bisturi nº 24, para a liberação dos complexos *cumulus*-oócito (COCs).

Os COCs foram identificados e quantificados sob lupa estereomicroscópica (Leica® MZ 12.5) e avaliados com relação à homogeneidade, coloração do citoplasma e número de camadas de células do *cumulus*, de acordo com os critérios morfológicos adotados por Hewitt e England (1997) (Fig1. D). Dessa forma, apenas os COCs grau 1, ou seja, aqueles com ooplasma homogêneo, escuro e rodeado completamente por uma ou mais camadas de células do *cumulus*, foram selecionados para esse estudo. Durante o processo de seleção os COCs foram lavados três vezes em meio de lavagem TCM-199 suplementado de 25mM de HEPES, 0.2mM de piruvato de sódio e 5mM de bicarbonato de sódio e 75 µg/mL de gentamicina.

5.3.3. Maturação *in vitro* (MIV)

Os COCS grau 1 após serem selecionados e lavados foram divididos em grupos de até 20 oócitos e transferidos para placas de cultivo de quatro poços contendo 500 µL de meio de maturação (Fig. 2A). O meio utilizado foi o TCM 199 suplementado com 25 mM de HEPES, 50 µg/mL de gentamicina, 26mM de bicarbonato de sódio, 1.5mM de piruvato de sódio, 2.9 mM lactato de sódio pentahidratado, 0,6mM de cisteína, 0.03UI/mL de hCG, 0.5 µg/ml de FSH, 20 µg/mL de E₂ e 10 ng/mL fator de crescimento epidermal (EGF) (Suzukamo et al. 2009 modificado). As placas foram acondicionadas em estufa úmida a 38°C em atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 24, 48 ou 72 horas.

Após o cultivo, os COCs foram colocados em placas contendo 200 μ L de solução de hialuronidase 0.2%, durante 5 minutos e aspirados repetidamente com a pipeta de 50 μ L para a retirada completa das células do *cumulus*. Após serem totalmente desnudos, o oócitos foram então lavados em PBS/PVA para a inativação da hialuronidase (Fig. 2B).

5.3.4. Preparação do extrato de oócitos

O preparo do extrato de oócitos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Suzukamo et al. (2009) nos tempos 24, 48 e 72 horas. Após completado cada tempo de maturação, os oócitos foram lavados várias vezes em PBS/PVA e transferidos para um tubo de vidro cônico graduado (Fig. 2D) contendo uma solução tampão (solução de lise) constituído de TRIS-20 mM, 150mM de NaCl, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM fosfato de sódio, 1.0 mM β -glicerofosfato, 1.0 mM Na_3VO_4 , 1.0 mg/mL leupeptina e 1.0 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), para realização do extrato de oócitos. Foi utilizada a proporção de 5 μ L da solução tampão para cinco oócitos. Após esse processo, o tubo de vidro foi colocado em um isopor contendo nitrogênio líquido, durante três minutos. Posteriormente, esse mesmo tubo foi transferido para o Sonicador de ponta (Branson Digital Sonifier[®]) (Fig. 2C), para a fragmentação completa do oócito e consequente liberação de suas proteínas. O extrato de oócitos foi sonificado cinco vezes, por 25 segundos (Fig. 2E e 2F), com intervalo de um minuto. Finalizando esse procedimento, o extrato de oócitos foi transferido para um microtubo identificado e armazenado a -80°C.

5.3.5. Mensuração da atividade quinase p34^{cdc2}

O extrato dos oócitos lisados (cinco oócitos/5 μ L de solução tampão) foi misturado com 45 μ L de solução tampão quinase-A, composto por 25 mM tampão HEPES (pH = 7.5), 10 mM MgCl_2 (MBL), 0.1 mM de ATP e 10% solução de peptídeo de vimentina de camundongo. Esta mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos. A reação foi finalizada com a adição de 200 μ L de PBS contendo 50 mM de EGTA (MBL). Posteriormente, o extrato foi centrifugado

por 15 segundos e a fosforilação do peptídeo vimentina de camundongo foi detectada por ELISA (MESACUP[®] cdc2 Kinase Assay Kit).

5.3.6. Análise estatística

A técnica do ELISA foi realizada três vezes e cada experimento foi replicado quatro vezes. A mensuração da atividade quinase p34^{cdc2} durante os tempos 24, 48 e 72 horas da MIV de oócitos caninos foi feita pela análise de variância no delineamento inteiramente ao acaso, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias. O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para p<0.05 (nível de significância menor que 0.05).

5.4. Resultados

As mudanças da atividade quinase p34^{cdc2} durante os tempos 24, 48 e 72 h da MIV de oócitos caninos estão demonstradas no gráfico 1. A atividade quinase p34^{cdc2} no tempo 24h quando comparada ao tempo de 48h apresentou uma diferença altamente significativa (p<0.001). Essa diferença também foi observada comparando-se os tempos 48h e 72h. Foi observado que a atividade quinase p34^{cdc2} atingiu o pico às 48h e decresceu no tempo de 72h de maturação. Dessa forma, foi constatada diferença (p< 0,001) entre os tempos de 24h, 48 e 72h analisados (Gráfico 1).

5.5. Discussão

Em vertebrados, os oócitos permanecem por várias semanas, meses ou anos na prófase da primeira divisão meiótica. Durante esse longo período acumulam de forma gradual, moléculas de mRNA, proteínas, lipídeos e açúcares, conforme aumentam de tamanho. Esse estoque essencial para o fornecimento de energia e informação durante o crescimento oocitário é primordial para o passo final da oogênese, ou seja, a maturação do oócito. Os

oócitos que não adquirem a competência não completam a maturação citoplasmática (Mourot et al. 2006).

Durante a retomada da meiose até a fase materno-zigótica, a transcrição ocorre em um nível muito baixo, dessa forma, os oócitos precisam ter estoques de proteínas e mRNA para atender a demanda durante a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (Racedo et al. 2008). Caso essas informações estejam ausentes, ou sejam, insuficientes, podem ocorrer falhas na maturação nuclear ou citoplasmática, ou em ambas, prejudicando o desenvolvimento subsequente. Estudos mostram que os níveis de mRNA que codificam tais proteínas estão relacionados com o tempo de maturação e qualidade do oócito (Calder et al. 2005). Dessa forma, é de suma importância a identificação de quais as proteínas são mais importantes no controle da meiose; quais podem estar agindo de forma antagônica ou sinérgica, acelerando ou atrasando o processo meiótico; ou até mesmo se as proteínas identificadas em outras espécies como responsáveis pela aquisição da competência estão sendo expressas na cadela.

Os meios de cultivo utilizados para a maturação de oócitos caninos são desenvolvidos com base em adaptações de meios utilizados para outros animais. Apesar dos inúmeros estudos visando desenvolver um meio de maturação com base nas necessidades endócrinas e metabólicas da cadela, os índices de oócitos que atingem os estágios finais da maturação são muito baixos, impossibilitando o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas. Assim, o estudo de proteínas, como a p34^{cdc2}, que estão envolvidas no controle da meiose, pode elucidar o que mantém a maioria dos oócitos no estágio de VG nessa espécie.

De acordo com Kovo et al. (2006), a concentração de MPF oscila entre as divisões celulares. O MPF apresenta atividade acentuada em oócitos nas fases de reinício das divisões meióticas, alcançando seu maior nível na meiose I. Enquanto o decréscimo na concentração deste fator é observado durante a transição da anáfase para a telófase, antes da liberação do primeiro corpúsculo polar. Um estudo em ratos demonstrou que a MPF é elevada na retomada da meiose, antes da QVG - dissolução do nucléolo, condensação cromossômica, reorganização microtubular e dissolução do envoltório nuclear, alcançando nível máximo na M-I (formação da placa metafásica), declina antes da

formação do 1º corpúsculo polar e aumenta de novo antes da M-II. De acordo com o presente estudo, pode-se observar que a proteína quinase p34^{cdc2}, assim como o MPF, oscila entre os diferentes tempos da maturação *in vitro*, exercendo uma função diferente em cada estágio do ciclo celular. Antes da maturação e nas primeiras 24h, observa-se um aumento, porém não significativo, o que demonstra que nos estágios iniciais de desenvolvimento, esta proteína ainda está em processo de tradução.

Em estudo realizado com camundongos, através do tratamento de oócitos com inibidor de síntese protéica, a ciclohexamida, sugeriu-se que o aumento na síntese de ciclinas pode ser responsável pela regulação do MPF, devido a diminuição da ativação de MPF e da retomada da meiose (Hampl e Eppig 1995). Nessa pesquisa pode-se notar a oscilação da proteína quinase p34^{cdc2} em diferentes tempos da maturação, assim como relatado na literatura sobre as mudanças nos níveis de MPF durante os diferentes estágios da maturação. Dessa forma, pode-se inferir, assim como relatado por esses autores, que essa proteína pode exercer influência na regulação do MPF e conseqüentemente no controle do ciclo celular.

Segundo Josefsberg et al. (2003) o declínio da atividade do MPF entre as divisões I e II da meiose, ocorre devido ao processo de degradação da ciclina B. Nesse estudo, observa-se que há um aumento significativo ($p < 0.001$) da proteína quinase p34^{cdc2} entre os momentos de 24h e 48h, e depois um declínio até 72h. Diante desses dados, pode-se sugerir que essa proteína pode exercer um papel de fundamental importância em algum estágio do ciclo celular, como na retomada da meiose, na transição do estágio de VG para a quebra de vesícula germinativa (QVG) ou até mesmo na progressão do estágio de metáfase I (M-I) para metáfase II (M-II). Entretanto, essa função pode ser exercida de diferentes maneiras: controlando diretamente a meiose, interagindo mutuamente com a ciclina B1 para agir na retomada da meiose ou até mesmo servindo de matéria prima para a ativação do MPF.

Uma pesquisa realizada por Suzukamo et al. (2009) demonstrou um aumento da proteína quinase p34^{cdc2} no decorrer da maturação, observando-se um pico da sua atividade às 72h de cultivo e um declínio após esse tempo. De acordo com esses autores, o tempo de 72h seria o ideal para a maturação *in vitro* de oócitos caninos. Contrapondo-se a esses resultados, no presente

estudo observou-se um pico da atividade da proteína quinase p34^{cdc2} no tempo de 48h, com uma diminuição após esse período. Dessa forma, o tempo de 48h poderia ser indicado como o preconizado para o cultivo *in vitro*. Entretanto, de acordo com Tsutsui et al. (1989) e Reynaud et al. (2005) os oócitos requerem mais do que 48h para completar a maturação nuclear dentro do oviduto. Assim sugere-se que apenas a avaliação da atividade da proteína quinase p34^{cdc2} não é o suficiente para entendermos as modificações que ocorrem durante o ciclo celular, sendo necessário o estudo de outras vias de sinalizações que interferem na meiose. Com essa compreensão mais ampla, pode-se avaliar como ocorre a progressão da maturação nessa espécie e determinarmos o meio e o tempo de cultivo mais adequados.

De acordo com Tay et al. (2000), a administração de mRNA de ciclina B1 em oócitos acelera as taxas de maturação em camundongos. O melhor entendimento de quais dessas proteínas são mais importantes na retomada e controle do ciclo celular, pode influenciar no desenvolvimento de um meio de cultivo que possa simular de forma mais adequada o ambiente *in vivo* da cadela. Ao se identificar o que está impedindo a progressão da meiose nessa espécie, se são alterações referentes à expressão gênica, transcrição ou a própria tradução de proteínas, pode-se elaborar meios mais eficientes de maturação, que promovam melhores índices de retomada da meiose e progressão aos estágios finais da maturação nuclear.

5.6. Conclusão

Com base neste estudo podemos concluir que a proteína quinase p34^{cdc2} desempenha uma função de suma importância na progressão da meiose em cadelas. A compreensão melhor dessa proteína assim como de outras que participam do processo de maturação poderá contribuir para o estabelecimento de meios mais adequados que melhorem significativamente as taxas de maturação, permitindo o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas nessa espécie.

5.7. Agradecimentos

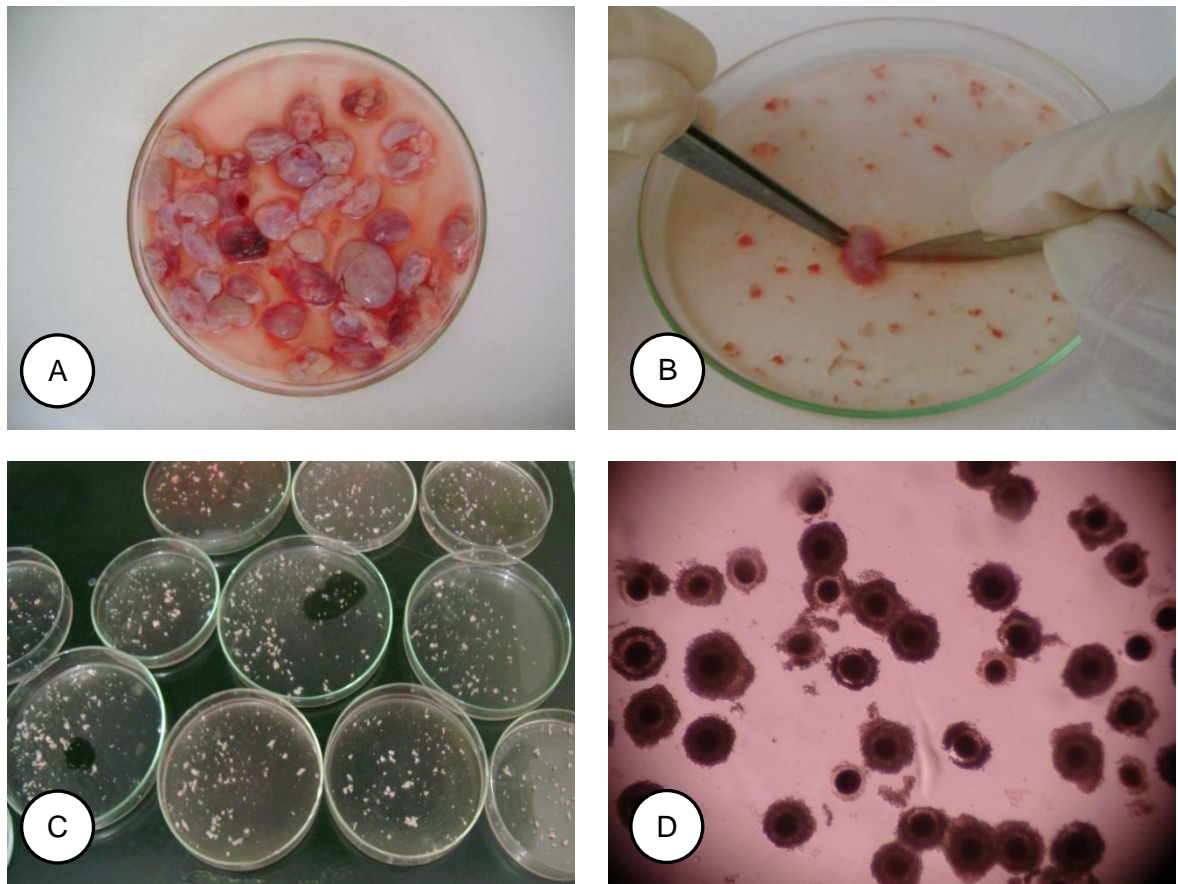
À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (FAPESP 2011/13197-1).

5.8. Referências

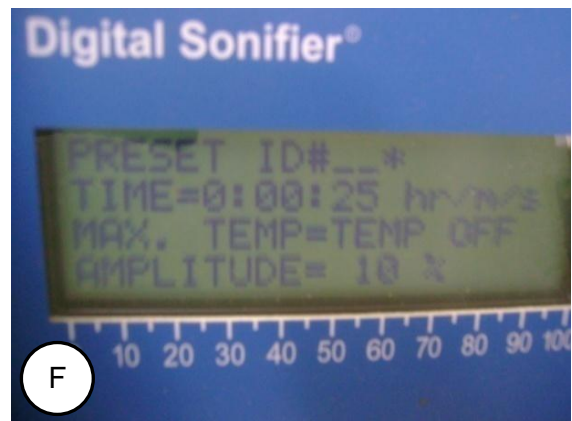
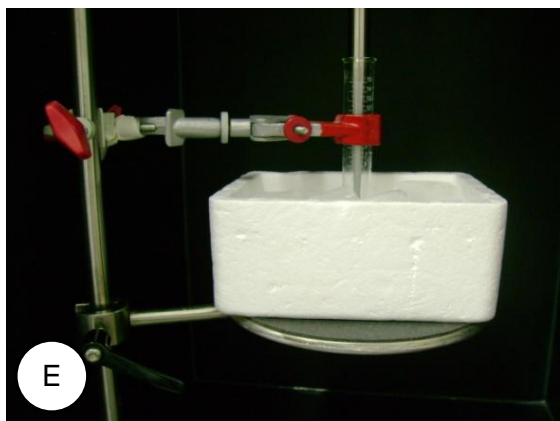
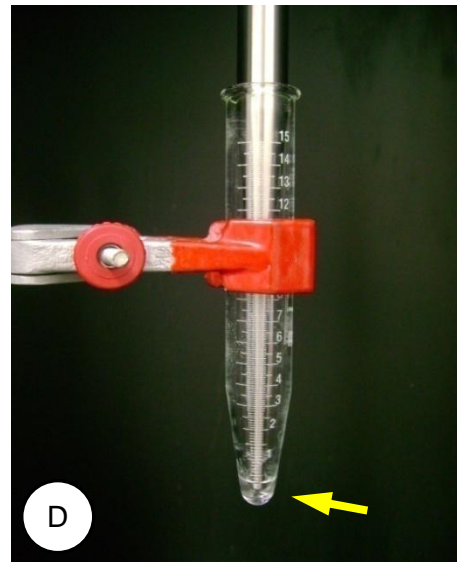
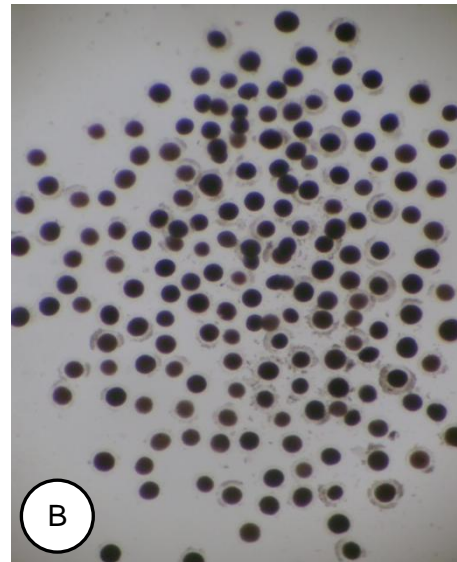
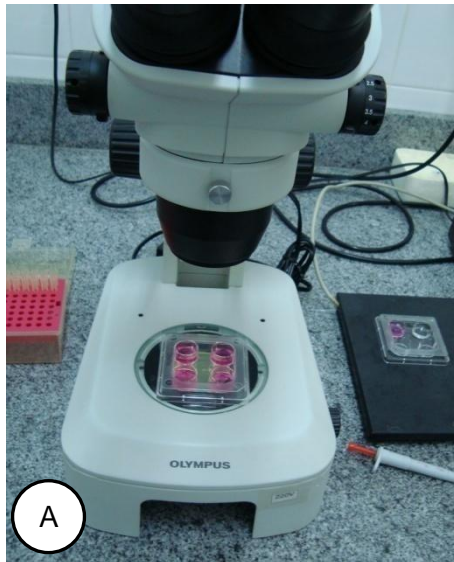
- Allard P, Yang Q, Marzluff WF, Clarke HJ, 2005: The stem-loop binding protein regulates translation of histone mRNA during mammalian oogenesis. *Dev Biol* **286**(01), 195-206.
- Calder MD, Caveney AN, Sirard MA, Watson AJ, 2005: Effect of serum and *cumulus* cell expansion on marker gene transcripts in bovine *cumulus*-oocytes complexes during maturation *in vitro*. *Fertil Steril* **83**, 1077-1085.
- Curcio BR, Leon PMM, Junior FF, Nogueira CEW, Deschamps JC, 2006: Equinos: oogênese, foliculogênese e maturação. *Ver Brás Reprod Anim* **30**(1/2), 28-35.
- De Vantery C, Gavin AC, Vassakki JD, Schorderet-Slatkine S, 1996: An accumulation of 34 cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Dev Biol* **174**, 335-344.
- Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J, 1998: Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene p34^{cdc2}. *Cell* **54**, 433-439.
- Hampl A, Eppig JJ, 1995: Analysis of the mechanism of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development* **121**, 925- 933.
- Hewitt DA, England GCW, 1997: The effect of pre-ovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of the domestic bitch. *J Reprod Fertil* **51**(Suppl), 83-91.
- Josefsberg LB, Galiani D, Lazar S, Kaufman O, Seger R, Dekel N, 2003: MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biol Reprod* **68**, 1282-1290.
- Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS, 2000: Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: Absolute amounts of p34(cdc2), cyclin b1, cdc25C, and weel in meiotically incompetent and competent oocytes. *Biol Reprod* **63**, 1610-1616.
- Kovo M, Kandli-Cohen M, Ben-Haim M, 2006: An active protein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes. *Soc Reprod Fertil* **132**, 33-43.

- Ledan E, Polanski Z, Terret M-E, Maro B, 2001: Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev. Biol* **232**, 400-413.
- Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L, 2000: High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol Reprod Dev* **55**, 89-95.
- Motlik J, Pavlok A, Kubelka M, Kalous J, Kalab P, 1998: Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* **49**, 461-469.
- Mourot M, Dufort I, Gravel C, Algriany O, Dieleman S, Sirard MA, 2006: The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol Reprod Dev* **73**(11), 1367-1379.
- Racedo SE, Wrenzycki C, Herrmann D, Salamone D, Niemann H, 2008: Effects of follicle size and stage of maturation on mRNA expression in bovine *in vitro* matured oocytes. *Mol Reprod Dev* **75**, 17-25.
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, 2005: Viaris De Lesegno C, Chastant-Maillard, S. *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* **130**, 193-201.
- Suzukamo C, Hoshina M, Moriya H, Hishiyama N, Nakamura S, Kawai F, Sato H, Ariga M, Ito J, Kashiwazaki N, 2009: Kinetics of nuclear status and kinase activities during *in vitro* maturation of canine oocytes. *J Reprod Dev* **55**(02), 116-120.
- Tay J, Hodgman R, Richter D, 2000: The control of cyclin B1 mRNA translation during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* **221**, 1-9.
- Tsutsui T, 1989: Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil* **39**, 269-275.

5.9. Anexos

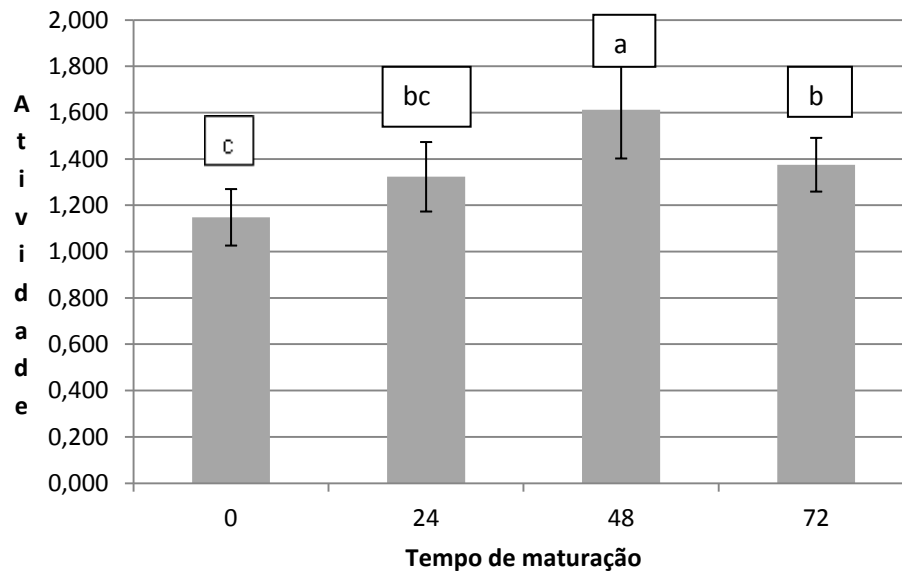


Figuras 1: (A): Ovários de cadelas para ser processados. (B): *Slicing* de um ovário (C): Placas de Petri com os ovarios fatiados (D): Observação dos oócitos para seleção e maturação. Aumento 40X. Botucatu, 2013.



Figuras 2: (A): Lupa estereomicroscópica (Leica[®] MZ 12.5) para uso na manipulação dos oócitos (B): Oócitos obtidos de cadelas para elaboração do extrato de proteínas. Aumento 40X. (C): Sonicador de ponta - Branson Digital Sonifier[®] (D): Tubo graduado de vidro contendo solução de lise com oócitos caninos (seta) para serem sonicados. (E): Material refrigerado em gelo, pronto para ser sonicado. (F): Indicação dos parâmetros do equipamento com tempo de 25s e potência a 10%. Botucatu, 2013.

Gráfico 1. Mensuração da atividade quinase p34^{cdc2} durante os tempos 24, 48 e 72 horas da MIV de oócitos caninos. Botucatu, 2013.



Médias seguidas de pelo menos 1 letra em comum não diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O conhecimento de biotécnicas reprodutivas é de suma importância para promover a maximização do desempenho reprodutivo das espécies animais. Nesse cenário, visando promover a biodiversidade, o cão doméstico (*Canis familiaris*) tem sido utilizado como modelo experimental para estudos da fisiologia da reprodução de canídeos ameaçados de extinção (DURRANTE et al., 1998). Entretanto, o fato da cadela apresentar uma biologia reprodutiva única, impossibilita a elaboração de meios de cultivo adequados para essa espécie. Apesar dos inúmeros estudos, pouco consegue se esclarecer sobre as necessidades endócrinas e metabólicas da cadela.

Nessa pesquisa, pode-se observar que o diâmetro e a fase do ciclo estral não interferem na competência oocitária. Entretanto, identificou-se que a remodelação da cromatina em VG difere conforme a fase do ciclo estral da doadora. Oócitos obtidos de cadelas na fase de diestro, possuem maior parcela dos oócitos nos estágios mais avançados de VG sendo estes mais capazes de completar a maturação. A transição entre os estágios de VG estão associados à atividade transcricional (CROZET et al., 1986). Assim, o melhor entendimento da síntese de RNA e da tradução das proteínas nas fases de anestro e diestro e ao longo do ciclo celular poderia esclarecer porque na cadela, diferentemente das outras espécies, os oócitos se mantêm no estágio de VG.

O controle do ciclo celular é regulado por uma cascata de eventos que são coordenados por uma série de proteínas que podem atuar influenciando na expressão ou repressão da atividade de outras proteínas relacionadas a retomada da meiose, por meio de processos de fosforilação ou desfosforilação. Apesar de algumas destas já terem sido identificadas, o verdadeiro papel que cada uma exerce na maturação oocitária assim como as vias de sinalização responsáveis por iniciar os eventos intracelulares, ainda não estão esclarecidos.

O presente estudo conseguiu identificar a associação da proteína p34^{cdc2} com a progressão da meiose, demonstrado por diferentes graus de atividade dessa proteína ao longo da maturação oocitária por meio do ELISA. Todavia, o estudo de outras proteínas envolvidas no ciclo celular assim como suas interações é essencial para o melhor entendimento de como ocorre o

amadurecimento do oócito e conseqüentemente, a aquisição de sua competência meiótica.

Assim, torna-se primordial, não apenas o estudo de algumas proteínas isoladas, mas novas metodologias que permitam analisar de forma global o conjunto de proteínas expresso na célula de forma mais refinadas, como PCR, RT-PCR, a proteômica dentre outras, que surgem, nesse contexto, como poderosas ferramentas que permitem avaliações mais criteriosas do nível de expressão dessas proteínas, assim como o momento de suas expressões. Desta forma, pode-se identificar quais são as proteínas mais importantes no controle da meiose; quais podem estar agindo de forma antagônica ou sinérgica, acelerando ou atrasando o processo meiótico; ou até mesmo se as proteínas já identificadas em outras espécies como responsáveis pela aquisição da competência, estão sendo expressas na cadela.

Como a competência oocitária está relacionada não apenas com o acúmulo de transcritos, mas com o controle e a eficiência em sua utilização, estas metodologias poderão permitir melhor avaliação de como estão sendo realizadas as sínteses e o armazenamento ao longo do ciclo celular identificando, por este meio, possíveis alterações que possam estar impedindo o processo de reinício da meiose na espécie canina.

Logo, a localização específica destas proteínas no ciclo celular poderá esclarecer também o papel que cada uma exerce em cada estágio da meiose, e se há influência local nas suas atividades e controle da maturação. Como observado na literatura, informações contraditórias sobre a atividade e localização destas proteínas no decorrer da MIV é possível. Sendo também provável que em cadelas ocorram variações quanto a estes fatores, os quais possam ser, sobretudo, importantes marcadores de competência.

REFERÊNCIAS

- ALHAIDER, A.K.; WATSON, P.F. The effects of hCG and growth factors on *in vitro* nuclear maturation of dog oocytes obtained during anestrus. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, n 4, 2009.
- APPARÍCIO-FERREIRA, M. **Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidos em diferentes fases do ciclo estral e cultivados *in vitro* em meios seqüenciais com hormônios e espermatozóides**. 2010. 95p. Tese (Doutorado em medicina veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- BARRETO, L.S.S. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro***. 2007. 88p. Tese (Doutorado em medicina veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K. D.; 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.
- CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.1, p.37-49, 2010.
- CHIAN, R.C.; LIM, J.H.; TAN, S.L. State of the art in in-vitro oocyte maturation. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.16, p.211-219, 2004.
- CHOHAN, K.R., HUNTER, A.G. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following *in vitro* maturation. **Animal Reproduction. Science**, v.76, p.43–51, 2003.
- CONCANNON, P. W. BUTTER, W. R.; HANSEL, W.; KNIGHT, P. I.; HAMILTON, J. M. Pregnancy and parturition in the bitch. **Biology Reproduction**, v.16, p.517-526, 1977.
- CONCANNON, P.W.; DIGREGÓRIO, G.B. Canine vaginal cytology. In: T.J. BURKE. **Small Animal Reproduction and Fertility**. Ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986, p.96-111.
- CONCANNON, P.W., MCCANN, J.P., TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.39, p.3-25, 1989.

- CROZET, N.; KANKA, J., MOTLIK, J.; FULKA, J. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. **Gamete Research**, v.14, p.65-73, 1986.
- CURCIO, B.R; LEON, P.M.M; JUNIOR, F.F; NOGUEIRA, C.E.W; DESCHAMPS, J.C; Equinos: oogênese, foliculogênese e maturação. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.30, n.1/2, p.28-35, 2006.
- DE LA FLUENTE, R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. **Development Biology**, v.292, p.1-12, 2006.
- DE LOS REYES, M., DE LANGE, J., MIRANDA, P., PALOMINO, J., BARROS, C. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.64, p.1-11, 2005.
- DE SMEDT, V.; CROZET, N.; GALL, L. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. **Journal of Experimental Zoology**, v.269, p.128-139, 1994.
- DE VANTERY, C; GAVIN, A.C; VASSAKKI, J.D; SCHORDERET-SLATKINE, S. An accumulation of 34 cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. **Development Biology**, v.174, p.335-344, 1996.
- DURRANT, B.S.; PRATT, N.C.; RUSS, K.D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.917-932, 1998.
- FAIR, T., HYTTEL, P., GREVE, T., BOLAND, M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.503-512, 1996.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.375-387, 2000.
- FELDMAN, E.D., NELSON, R.W., **Canine and feline endocrinology and reproduction**, 3rd ed. St Louis, Saunders, p.752-774, 2004.
- GANDOLFI, F.; BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for animal reproductive efficiency. **Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties**, v.24, p.413-423, 2005.
- GAUTIER, J; NORBURRY, C; LOHKA, M; NURSE, P; MALLER, J. Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. **Cell**, v.54, p.433-439, 1988.

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

GORETTI, C.A.N.; COSTA, E.P.; PAULA, T.A.R.; MACEDO,G.G.; SANTOS,G.M.; ALMEIDA NETO, J.R.M.; PEREIRA,E.C.M. Efeito do soro de cadela em estro na maturação *in vitro* de ovócitos caninos. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.5, p.1054-1059, 2011.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**. v.55, n.63–65, 1999.

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.

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

JEFFCOATE, I. Physiology and Endocrinology of the bitch. In: SIMPSON, Gillian M.; ENGLAND, Gary C.W.; HARVEY, Mike (eds). **BSVA Manual of small animal reproduction and neonatology**. Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association. 1998, cap.1, p.1-9.

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

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.

JORDÃO, B.Q.J.; ANDRADE, C.G.T.J. Ciclo celular e meiose. In: JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9.ed.- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p.175-202.

JOSEFSBERG, L.B; GALIANI,D; LAZAR, S.;KAUFAMAN, O.;SEGER, R.; DEKEL, N. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. **Biology Reproduction**., v.68, p.1282-1290, 2003.

KANATSU-SHINOHARA, M.; SCHULTZ,R. M.; KOPF, G.S. Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: Absolute amounts of p34(cdc2), cyclin b1, cdc25C, and weel in meiotically incompetent and competent oocytes. **Biology Reproduction**, v.63, p.1610-1616, 2000.

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

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.

KOVO, M.; KANDLI-COHEN, M.; BEN-HAIM, M. An activeprotein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes. **Society for Reproduction and Fertility**, v.132, p.33-43, 2006.

LEE, H.S, YIN, X.J, JIN, Y.X, KIM, N.H; CHO, S,G, BAE, I.H, KONG, I.K. Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine. **Animal Reproduction science**, v.103, p.336-347, 2008.

LOODE, V; MODINA, S; GALBUSERA, C; FRANCIOSI, F; LUCIANO, AM; Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.740-749, 2007.

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

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

LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; BECCAGLIA, M. Embryo production in dogs: from *in vitro* fertilization to cloning. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.286-290, 2006.

MARTINS, L.R; PONCHIROLI, C.B; BEIER, S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C; LOPES, M.D. Analysis of nuclear maturation in *in vitro* matured oocytes from estrous and anestrous bitches. **Animal Reproduction**, v.3, p.49–54, 2006.

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

MATZUK, M.M; BURNS, K.H.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v.296, p.2178-2180, 2002.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, p.183-188, 2001.

MERMILLOD, P; TAMANEK, M; MARCHAL, R; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24h in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction Development**, v.55; p.8995, 2000.

MOTLIK, J; PAVLOK, A; KUBELKA, M; KALOUS, J; KALAB, P. Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.461-469, 1998.

NAITO, K.; HAWKINS, C.; YAMASHITA, M.; NAGAHAMA, Y.; AOKI, F.; KOHMOTO, K.; TOYODA, Y.; MOOR, R.M. Association of p34^{cdc2} and cyclin B1 during meiotic maturation in porcine oocytes. **Developmental Biology**, v.168, p.627-634, 1995.

NICKSON, D.A; BOYD, J.S.; ECKERSALL, P.D.; FERGUSON, J.M.; HARVEY, M.J.; RENTON, J.P.; Molecular biology methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, n.12, p.231-240,1993.

OLIVEIRA, K.S.; MACHADO, M.A.; RIBEIRO, A.P.C.; APPARICIO-FERREIRA,M.; TONIOLLO, G.H.; Avaliação do fator de crescimento IGF-I na maturação *in vitro* de oócitos caninos no meio TCM-199. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2. 2009.

OTOI, T., SHIN, T., KRAEMER, D.C., WESTHUSIN, M.E. Role of *cumulus* cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.184–189, 2007.

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

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

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

QUETGLAS,M.D. **Efeito do bloqueio meiótico na expressão, atividade e distribuição do fator promotor da meiose (MPF) e da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) em oócitos bovinos**. 2007. 90p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- Universidade de São Paulo.

REYNAUD, K.; VIARIS DE LESEGNO, C; CHEBROUT, M; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. Follicle population, *cumulus* mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. **Theriogenology**. v.72, p.1120-1331, 2009.

RIBEIRO, A.P.C; PIRES, E.A; APPARÍCIO, M; ALVES, A.E; CARARETO, R; VICENTE, W.R.R. Maturação *in vitro* de oócitos caninos: aspectos fisiológicos e sua relação com a evolução da técnica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.1, p.50-57, 2010.

RIBEIRO, A.P.C. **Influencia do estágio reprodutivo e suplementação do meio de cultivo com progesterona e/ou soro de cadela em estro, nas taxas de maturação *in vitro* de oócitos de fêmeas caninas**. 2007. 129p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

RODRIGUES, B.A.; SILVA, A.E.F.; RODRIGUEZ, P.; CAVALCANTE, L.F.; RODRIGUES, J.L. *Cumulus* cells features and nuclear chromatin configuration of *in vitro* matured canine COCs and the influence of the *in vitro* serum progesterone concentrations of ovary donors. **Zygote**, v.17, p.79-91, 2009.

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

ROMÃO, G.S.; ARAÚJO, M.C.P.M.; MELO, A.S.; NAVARRO, P.A.A.S.; FERRIANI, R.A.; REIS, R.M. . Oocyte diameter as a predictor of fertilization and embryo quality in assisted reproduction cycles. **Fertility and Sterility**, v.93, p.621-625, 2010.

ROTH, Z; HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v.129, p.235-244, 2005.

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

SCHRAMM, R.D., TENNIER, M.T., BOATMAN, D.E., BAVISTER, B.D. Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in non-stimulated rhesus monkeys. **Biology of Reproduction**, v. 48, p.349–356, 1993.

SHENG, J.; KUMAGAI, A.; DUNPHY, W.G.; VARSHAVSKY, A. Dissection of c-mos degenon. **The EMBO Journal**, v.21, p.6061-6071, 2002.

SILVA, L.D.M.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S; LIMA, A.K.F; SILVA, T.F.P. Biotécnicas aplicadas à reprodução de cães e gatos. In: GONSALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2008. p.190-191.

SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v.68, p.S71-S76, 2007. (Supl.).

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

SONGSASEN, N; WILDT, D.E. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, p.113-119, 2005.

SUZUKAMO, C; HOSHINA, M.; MORIYA, H.; HISHIYAMA, N.; NAKAMURA, S.; KAWAI, F.; SATO, H.; ARIGA, M.; ITO, J.; KASHIWAZAKI, N. Kinetics of nuclear status and kinase activities during *in vitro* maturation of canine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**. v.55, n.02, 2009.

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

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Minireview: Functions of the *cumulus* oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, n.03, p.414-424, 2002.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. v.63, p.1717-51, 2005.

VIARIS DE LESEGNO, C.V.; REYNAUD, K.; PECHOUX, C.; CHEBROUT, M.; MAILLARD, S.C. Ultrastructural evaluation of *in vitro*-matured canine oocytes. **Reproduction, fertility and Development**, v.20, p.626-639, 2008.

WIT, A.A.C.; WURTH, Y.A.; KRUIP, A.M. Effect of ovarian and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine *cumulus*-oocyte complex. **Journal. Animal Science**, v.78, p.1277-1283, 2000.

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.

ZUCCOTTI, M; ROSSI, P.G; MARTINEZ, A; GARAGNA, S; FORABOSCO, A; REDI, C.A. Meiotic and development competence of mouse antral oocytes. **Biology Reproduction**, v.58, p.700-704, 1998.

ANEXO