

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

**EFEITO DO ESTÁDIO DO CICLO ESTRAL E ADIÇÃO DE
HORMÔNIOS AO MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* SOBRE A
MORFOLOGIA DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO
CANINO**

Eliandra Antonia Pires Buttler
Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2010

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

**EFEITO DO ESTÁDIO DO CICLO ESTRAL E ADIÇÃO DE
HORMÔNIOS AO MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* SOBRE A
MORFOLOGIA DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO
CANINO**

Eliandra Antonia Pires Buttler

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2010

P667e Pires-Buttler, Eliandra Antonia
Efeito do estágio do ciclo estral e adição de hormônios ao meio de cultivo *in vitro* sobre a morfologia do complexo cumulus-oócito canino / Eliandra Antônia Pires Buttler. - - Jaboticabal, 2010.
CLXIV, 164f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Banca examinadora: Maria Denise Lopes, Ana Paula Coelho Ribeiro, Laura Satiko Okada Nakaghi, Idécio Luíz Sinhorini.

Bibliografia

1. Ultra-estrutura 2. Oócito canino 3. Maturação *in vitro* 4. Microscopia eletrônica 5. Hormônios I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.7

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ELIANDRA ANTONIA PIRES BUTTLER – Natural de Poços de Caldas – MG, nascida em 13 de junho de 1978, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Lavras - UFLA, no período de agosto de 1997 a julho de 2002. Em fevereiro de 2003, iniciou Aprimoramento na área de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, concluindo-o em fevereiro de 2005. Em março de 2005 iniciou curso de mestrado em Cirurgia Veterinária na mesma unidade universitária, concluindo-o em julho de 2006. Neste mesmo mês, ingressou no curso de Doutorado, pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, desta mesma Universidade, concluindo-o em junho de 2010.

*Há muito se diz que quem encontrou um amigo encontrou um tesouro precioso.
Há muito se diz que a amizade verdadeira dura para sempre.
Há muito se diz que não é possível viver sozinho.
A jornada é penosa e, sem amparo é difícil caminhar.
Juntos os pássaros voam com mais tranquilidade.
Juntas as gaivotas revezam a liderança para que nenhuma delas se canse demais.
Juntos homens e mulheres partilham momentos inesquecíveis
de uma natureza que não se cansa de surpreender.
Tenho poucos amigos
Impossível seria que fossem muitos
São poucos, mas são preciosos!*

Gabriel Chalita

DEDICO

Aos meus queridos e amados pais, Maria José e Olivardo, pelo imenso apoio, carinho,
amor e compreensão.

Vocês são à base da minha vida!

Ao meu querido e amado esposo, Alexandre

Grande companheiro e incentivador. Muito obrigada por todo gesto de amor e amizade.

É o maior presente em minha vida.

Te amo muito!

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora, por minha vida, minha família, amigos e pela minha vocação. Obrigada por tudo que tenho e sou.

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

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

Ao Alexandre, meu grande amor. É difícil definir em palavras a importância que tens em minha vida. É meu grande companheiro, amigo de todas as horas e momentos. É quem compartilhou comigo cada pedacinho deste projeto e quem me deu forças quando estava prestes a esmorecer. Muito obrigada pelo seu amor e sua presença marcante em minha vida. Este trabalho é seu também. Te amo muito!

À minha irmã Elisângela e ao meu cunhado Fábio, por toda amizade e carinho e em especial, por terem me acolhido tão bem em sua casa, no período em que estive

ausente do meu lar, devido ao trabalho. E muito obrigada pelas minhas maiores riquezas, Maria Luísa (Maluzinha) e João Guilherme (Gui). Amo todos vocês!

Ao meu orientador e amigo Wilter Ricardo Russiano Vicente, que sempre me incentivou em todos os momentos e quem me deu a oportunidade de chegar onde estou. Muito obrigada por todo gesto de carinho e amizade desde o início de minha caminhada na UNESP. Serei infinitamente grata por sua confiança em mim e em meu trabalho.

Ao Prof. Idércio Luiz Sinhorini, o qual bondade e generosidade são os termos que melhor o definem. Muito obrigada por ter me aberto as portas do seu laboratório, no momento em que estava me vendo sem saída, permitindo com que eu conseguisse concluir este trabalho. Estará sempre em meu coração!

À Prof. Laura Satiko Okada Nakaghi, por todas suas palavras de incentivo, ajuda, apoio e amizade.

À professora Maria Denise Lopes (UNESP - Botucatu), grande profissional, pessoa a quem tenho muito respeito e admiração. Obrigada por ser sempre tão atenciosa e generosa.

Aos queridos amigos do laboratório de MEV e MET da UNESP/Jaboticabal Marcos, Poliana, Ângela, Gilberto e Sérgio muito obrigada pela amizade, ajuda e pelos ótimos momentos de descontração.

Às minhas queridas amigas "Claudinhas", técnicas do Laboratório da MEV e MET da UNESP/Jaboticabal, com as quais dividi não somente todas as dificuldades enfrentadas no decorrer deste trabalho como também a felicidade em cada obstáculo ultrapassado. Serei infinitamente grata pela amizade, apoio e companheirismo.

À querida Shirley Meire, técnica do Laboratório de Microscopia do Departamento de Patologia da USP/São Paulo, pessoa que é exemplo de vida, não somente pela determinação como também pelo otimismo inabalável. Muito obrigada por tudo! Sem você as coisas teriam sido bem mais difíceis.

Às queridas amigas Tuca e Teresa, técnicas do Laboratório de Microscopia da Faculdade de Medicina da USP/Ribeirão Preto, muito obrigada pela ajuda na finalização deste trabalho.

À querida amiga Jacqueline Meirelles, companheira no laboratório de reprodução, nos horários de almoço e nas viagens para Jaboticabal. Muito obrigada por sua inestimável amizade.

À amiga Aline Costa de Lúcio (Dirce) agradeço sua amizade, ajuda e carinho, e pelos ótimos momentos de convivência que passamos juntas.

À amiga Ana Paula Coelho Ribeiro (Aninha), minha grande companheira. Muito obrigada por seu apoio incondicional. Você é o maior exemplo de que a distância e o tempo não atrapalham as grandes amizades.

À querida Luciana Padilha (Lu), pessoa de bondade imensurável. Muito obrigada pelo apoio e amizade.

A todos os amigos da obstetrícia, pessoas que fazem deste setor um verdadeiro lar, onde passamos momentos muito felizes e de descontração. Muito obrigada a todos, por toda ajuda não somente durante a realização do meu trabalho, mas durante todos estes anos de convivência. Ana Paula Coelho Ribeiro (Aninha), Luciana Padilha (Lu), Maricy Apparício (Má), Aracelle E. Alves (Ara), Carla R. F. Gadelha (Carlinha), Diogo José Cardilli (Zé), Giuliano Q. Mostachio (Giu), Denise Tavares (Dê), Gabriela J. Covizzi (Gaby), Danilo G. Martins (Puff), Guilherme Nascimento (Gui), Tathiana F. Motheo (Tathy), Michele G. Medeiros (Mi), Fabiana A. Voorwald (Fabi), Caio Tiosso, Valeska Rodrigues, Paulinha, Raquel, Beatrice, Izilda (Dona Izildinha), Arnildo e Anésia. Amo vocês!

A todos os enfermeiros e funcionários do hospital veterinário desta instituição que sempre me ajudaram durante todos estes anos.

Aos professores membros da comissão examinadora de qualificação, Vera F. M. H. Lima, Paulo Henrique Franceschini, Juliana Corrêa Borges da Silva e Laura Satiko Okada Nakaghi, agradeço a prestativa contribuição para a conclusão deste trabalho.

Aos professores membros da comissão examinadora de defesa, Ana Paula Coelho Ribeiro, Laura Satiko Okada Nakaghi, Maria Denise Lopes e Idércio Luiz

Sinhorini que tão gentilmente atenderam ao convite para compor a banca, deixando de lado os seus afazeres para colaborar com sugestões e críticas, proporcionando um rico intercâmbio de informações.

Aos colegas e funcionários do laboratório de reprodução animal, em especial a funcionária Isabel A. P. Natarelli (Bel), por sua pronta disponibilidade em ajudar sempre, e aos amigos Marcelo Bezerra, Michely Macedo, Naiara Zoccal, Roberta Vantini, Ana Paula Perini, Ivo Luis A. Junior e Edson Aguiar.

Um agradecimento muito especial a **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, que através da concessão da bolsa de estudo e da reserva técnica, proporcionou tranquilidade para que pudesse me dedicar exclusivamente à pesquisa.

A todos os proprietários que compreendendo a importância do nosso trabalho, carinhosamente abriram as portas de suas casas para nos ajudar. Mas agradeço principalmente a todas as cadelinhas (Pit, Poodle, Hanna, Nega, Shara, Luana, APA, Nina, Pequena, Duda, Dóris, Pietra, Granada, Odara, Catita, Mel, Minie, Bolinha, Vitória, Diana, Lila, Zara, Belinha, Tiririca, Nina2, Mel2, Mamãe, Sany, Amarelinha, Pretinha), a quem dedico todo o meu trabalho, pois sem vocês certamente nada disso seria possível.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xxii
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvi
1 . INTRODUÇÃO	01
2 . REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Fisiologia Reprodutiva da Cadela (<i>Canis familiaris</i>)	05
2.2. Maturação oocitária <i>in vivo</i>	07
2.3. Morfologia do complexo <i>cumulus</i> -oócito canino	08
2.4. Configuração da cromatina de oócitos caninos	11
2.5. Aspectos da maturação oocitária canina <i>in vitro</i>	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Local e Animais	20
3.2. Determinação da fase do ciclo estral	21
3.3. Obtenção e seleção de oócitos	23
3.4. Maturação <i>in vitro</i>	25
3.5. Avaliação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática	26
3.5.1. Classificação do estágio de maturação nuclear	27

3.5.2. Classificação do estágio de maturação citoplasmática.....	29
3.6. Avaliação morfológica	30
3.6.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	30
3.6.1.1. Análise das amostras da MET.....	34
3.6.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	36
3.6.2.1. Análise das amostras da MEV	38
3.7. Análise estatística	44
3.7.1. Experimento I - Análise da distribuição do diâmetro oocitário de acordo com o status reprodutivo de fêmeas caninas.....	44
3.7.2. Experimento II – Influência da condição reprodutiva (FO – Fase Folicular e AN – Anestro) sobre a morfologia do complexo <i>cumulus</i> -oócito.....	44
3.7.3. Experimento III – Avaliação das características morfológicas do complexo <i>cumulus</i> -oócito provenientes de fêmeas caninas em fase folicular e anestro após o processo de maturação <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultivo.....	45
3.7.4. EXPERIMENTO IV - Efeito da suplementação hormonal no meio de cultivo sobre a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de fêmeas caninas obtidos em diferentes fases do ciclo estral	46
4. RESULTADOS.....	47

4.1. EXPERIMENTO I - Análise da distribuição do diâmetro oocitário de acordo com o status reprodutivo de fêmeas caninas.....	48
4.2. EXPERIMENTO II - Influência do status reprodutivo de fêmeas caninas (FO-Fase folicular e AN-Anestro) sobre a morfologia do complexo <i>cumulus</i> -oócito.....	50
4.2.1. Avaliação da morfologia do complexo <i>cumulus</i> -oócito recém colhido, proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), por microscopia eletrônica de varredura.....	50
4.2.2. Avaliação da morfologia do complexo <i>cumulus</i> -oócito recém colhido, proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), por microscopia eletrônica de transmissão.....	59
4.3. EXPERIMENTO III - Avaliação das características morfológicas do complexo <i>cumulus</i> -oócito provenientes de fêmeas caninas em fase folicular e anestro após o processo de maturação <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultivo.....	70
4.3.1. Avaliação do complexo <i>cumulus</i> -oócito proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, após 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> em meio sem suplementação hormonal (Controle- meio A)..	71
4.3.2. Avaliação do complexo <i>cumulus</i> -oócito proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN) por microscopia eletrônica de varredura, após 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> em meio	

suplementado com P ₄ , E ₂ e LH (meio B).....	85
4.3.3. Avaliação do complexo <i>cumulus</i> -oócito proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, após 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> em meio sem suplementação hormonal (Controle- meio A)	98
4.3.4. Avaliação do complexo <i>cumulus</i> -oócito proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, após 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> em meio com suplementação hormonal (meio B).....	108
4.4. EXPERIMENTO IV - Efeito da suplementação hormonal no meio de cultivo sobre a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de fêmeas caninas obtidos em diferentes fases do ciclo estral.....	118
4.4.1. Efeito da suplementação hormonal no meio de cultivo sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas obtidos em diferentes fases do ciclo estral.....	119
4.4.2. Efeito da suplementação hormonal no meio de cultivo sobre a maturação citoplasmática de oócitos de fêmeas caninas obtidos em diferentes fases do ciclo estral.	123

5. DISCUSSÃO	127
6. CONCLUSÃO	144
7. REFERÊNCIAS	145
8. APENDICES	161

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Correlação entre a dosagem sérica de progesterona no plasma e a fase do ciclo estral	21
Quadro 2. Escala de intensidade de comunicação entre as células do <i>cumulus</i> do oócito canino – Jaboticabal, 2010.....	39
Quadro 3. Escala de intensidade de perda de células do <i>cumulus</i> da superfície do oócito canino – Jaboticabal, 2010	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dosagens séricas de progesterona das cadelas incluídas no grupo FO (Fase folicular) – Jaboticabal, 2010.....	22
Tabela 2. Dosagens séricas de progesterona das cadelas incluídas no grupo AN (anestro) – Jaboticabal, 2010.....	23
Tabela 3. Frequência absoluta e relativa (%) de COC's Grau I e com diâmetro igual ou superior a 110 μ m recuperados de 30 fêmeas caninas, sendo 15 na fase folicular e 15 em anestro e a média de oócito fornecido por cada fêmea – Jaboticabal, 2010.....	47
Tabela 4. Frequência absoluta e relativo (%) de COC's Grau I e com diâmetro < 110 μ m e > 110 μ m, obtidos de ovários de fêmeas caninas em fase folicular (FO) e anestro (AN)- Jaboticabal, 2010.....	48
Tabela 5. Média, desvio padrão e coeficiente de variação de COC's com diâmetro $\geq$ ou < que 110 μ m, recuperados de fêmeas caninas em fase folicular (FO) e anestro (AN) – Jaboticabal, 2010.....	49
Tabela 6. Frequência absoluta e relativa (%) de COC's recém colhidos provenientes de 15 fêmeas caninas em Fase Folicular (FO) e 15 em Anestro (AN), para avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura – Jaboticabal, 2010.....	51
Tabela 7. Complexos <i>cumulus</i> -oócitos canino, recém colhidos, pertencentes ao grupo FO (Fase Folicular), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do <i>cumulus</i> , bem como, processos	

longos e curtos emitidos entre estas células – Jaboticabal, 2010.....	52
Tabela 8. Complexos <i>cumulus</i> -oócitos canino, recém colhidos, pertencentes ao grupo AN (Anestro), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do <i>cumulus</i> , bem como, processos longos e curtos emitidos entre estas células – Jaboticabal, 2010.....	54
Tabela 9. Comparação entre os processos curtos e longos emitidos pelas células do <i>cumulus</i> de oócitos recém colhidos de cadelas em fase folicular (FO) e anestro (AN) – Jaboticabal, 2010.....	57
Tabela 10. Comparação entre as diferentes fases do ciclo estral (folicular x anestro) para os processos curtos e longos emitidos pelas células do <i>cumulus</i> de oócitos recém colhidos de cadelas – Jaboticabal, 2010.....	58
Tabela 11. Frequência absoluta e relativa (%) de COC's recém colhidos provenientes de 15 fêmeas caninas em Fase Folicular (FO) e 15 em Anestro (AN), para avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão – Jaboticabal, 2010.....	60
Tabela 12. Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes ao oócito com e sem a zona pelúcida e espessura da zona pelúcida de oócitos recém colhidos (OH) provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010.....	61
Tabela 13. Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes à camada de células do <i>cumulus</i> , núcleo e nucléolo de oócitos recém colhidos (OH) provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010.....	62

Tabela 14. Frequência absoluta e relativa (%) de COC's recém colhidos avaliados por microscopia eletrônica de transmissão pertencentes aos grupos FO (Fase folicular) e AN (Anestro), classificados quanto ao tipo de VG (VG _c , VG _p) antes do período de maturação (<i>in vivo</i>) – Jaboticabal, 2010.....	63
Tabela 15. Frequência absoluta e relativa (%) de COCs cultivados <i>in vitro</i> por 72 horas em meio sem suplementação hormonal (Meio A), obtidos do total de 30 fêmeas caninas, sendo 15 em fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN), para avaliação por microscopia eletrônica de varredura – Jaboticabal, 2010.....	71
Tabela 16. Complexos <i>cumulus</i> -oócitos canino, obtidos após 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> em meio sem suplementação hormonal (meio A), pertencentes ao grupo FO (Folicular), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do <i>cumulus</i> , processos longos e curtos emitidos entre estas células, bem como as características da zona pelúcida e intensidade de perda de células do <i>cumulus</i> – Jaboticabal, 2010.....	72
Tabela 17. Complexos <i>cumulus</i> -oócitos canino, obtidos após 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> em meio sem suplementação hormonal (meio A), pertencentes ao grupo AN (Anestro), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do <i>cumulus</i> , processos longos e curtos emitidos entre estas células, bem como as características da zona pelúcida e intensidade de perda de células do <i>cumulus</i> – Jaboticabal, 2010.....	75
Tabela 18. Comparação entre os processos curtos e longos emitidos pelas células do <i>cumulus</i> de oócitos de cadelas em fase folicular (FO) e anestro (AN) cultivados <i>in vitro</i> em meio sem suplementação hormonal (meio A) – Jaboticabal, 2010.....	82

Tabela 19. Comparação entre as diferentes fases do ciclo estral (folicular x anestro) para os processos curtos e longos emitidos pelas células do <i>cumulus</i> de oócitos de cadelas cultivados <i>in vitro</i> em meio sem suplementação hormonal (meio A) – Jaboticabal, 2010.....	82
Tabela 20. Frequência absoluta e relativa (%) de COCs cultivados <i>in vitro</i> por 72 horas em meio com suplementação hormonal, obtidos do total de 30 fêmeas caninas, sendo 15 em fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN), para avaliação por microscopia eletrônica de varredura – Jaboticabal, 2010.....	85
Tabela 21. Complexos <i>cumulus</i> -oócitos canino, obtidos após 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> em meio suplementado com P ₄ , E ₂ e LH (meio B), pertencentes ao grupo FO (Folicular), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do <i>cumulus</i> , processos longos e curtos emitidos entre estas células, bem como as características da zona pelúcida e intensidade de perda de células do <i>cumulus</i> – Jaboticabal, 2010.....	86
Tabela 22. Complexos <i>cumulus</i> -oócitos canino, obtidos após 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> em meio suplementado com P ₄ , E ₂ e LH (meio B), pertencentes ao grupo AN (Anestro), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do <i>cumulus</i> , processos longos e curtos emitidos entre estas células, bem como as características da zona pelúcida e intensidade de perda de células do <i>cumulus</i> – Jaboticabal, 2010.....	89
Tabela 23. Comparação entre os processos curtos e longos emitidos pelas células do <i>cumulus</i> de oócitos de cadelas em fase folicular (FO) e anestro (AN) cultivados <i>in vitro</i> em meio suplementado com P ₄ , E ₂ e LH (meio B) – Jaboticabal, 2010.....	95

Tabela 24. Comparação entre as diferentes fases do ciclo estral (folicular x anestro) para os processos curtos e longos emitidos pelas células do <i>cumulus</i> de oócitos de cadelas cultivados <i>in vitro</i> em meio suplementado com P ₄ , E ₂ e LH (meio B) - Jaboticabal, 2010.....	96
Tabela 25. Frequência absoluta e relativa (%) de COCs cultivados <i>in vitro</i> por 72 horas em meio Meio A, obtidos do total de 30 fêmeas caninas, sendo 15 em fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN), para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão – Jaboticabal, 2010.....	98
Tabela 26. Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes ao oócito com e sem a zona pelúcida e espessura da zona pelúcida de oócitos cultivados <i>in vitro</i> em meio A, provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010.....	99
Tabela 27. Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes à camada de células do <i>cumulus</i> , núcleo e nucléolo de oócitos cultivados <i>in vitro</i> em meio A, provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010	100
Tabela 28. Frequência absoluta e relativa (%) de COC's cultivado <i>in vitro</i> por 72h em meio A, avaliados na microscopia eletrônica de transmissão, pertencentes aos grupos FO (Fase folicular) e AN (Anestro), classificados em VG ₁ , VG ₂ , VG ₃ , MI e degenerado – Jaboticabal, 2010	101
Tabela 29. Frequência absoluta e relativa (%) de COCs cultivados <i>in vitro</i> por 72 horas em meio Meio B, obtidos do total de 30 fêmeas caninas, sendo 15 em fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN), para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão – Jaboticabal, 2010	108

Tabela 30. Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes ao oócito com e sem a zona pelúcida e espessura da zona pelúcida de oócitos cultivados <i>in vitro</i> em meio B, provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010	109
Tabela 31. Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes à camada de células do <i>cumulus</i> , núcleo e nucléolo de oócitos cultivados <i>in vitro</i> em meio B, provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010	110
Tabela 32. Frequência absoluta e relativa (%) de COC's cultivado <i>in vitro</i> por 72h em meio B, avaliados na microscopia eletrônica de transmissão, pertencentes aos grupos FO (Fase folicular) e AN (Anestro), classificados em VG ₁ , VG ₂ , VG ₃ , QVG, MI e degenerado – Jaboticabal, 2010	111
Tabela 33. Frequência absoluta e relativa (%) de COC's grau I recuperados de 15 fêmeas caninas em fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN) para avaliação da maturação nuclear e citoplasmática após o período de maturação <i>in vitro</i> em meio controle (A) e meio suplementado com P ₄ , E ₂ e LH (meio B) – Jaboticabal, 2010.	119
Tabela 34. Frequência absoluta e relativa (%) de oócitos obtidos de fêmeas caninas em fase folicular (FO) e anestro (AN), classificados de acordo com os diferentes graus de maturação nuclear (VG, QVG, MI, MII, retomada da meiose QVG-MII e degenerados) após o período de maturação <i>in vitro</i> em meio controle (A) e meio suplementado com P ₄ , E ₂ e LH (meio B) – Jaboticabal, 2010.	120
Tabela 35. Comparação entre os meios de cultivo A e B, dentro de cada fase do ciclo reprodutivo (fase folicular e anestro) para os estádios de maturação	

nuclear (VG, QVG, MI, MII, Retomada da meiose QVG-MII e Degenerados) – Jaboticabal, 2010.	121
--	-----

Tabela 36. Comparação dos meios de cultivo (meio A e meio B) entre as fases folicular e anestro para cada estágio de maturação nuclear (VG, QVG, MI, MII, Retomada da meiose QVG-MII e Degenerados) – Jaboticabal, 2010.....	122
---	-----

Tabela 37. Frequência absoluta e relativa (%) de oócitos obtidos de fêmeas caninas em fase folicular (FO) e anestro (AN), classificados de acordo com os diferentes graus de maturação citoplasmática (Imaturos, Transição e Maturos) após o período de maturação <i>in vitro</i> em meio controle (A) e meio suplementado com P ₄ , E ₂ e LH (meio B) – Jaboticabal, 2010	124
---	-----

Tabela 38. Comparação entre os meios de cultivo A e B, dentro de cada fase do ciclo reprodutivo (fase folicular e anestro) para os estágios de maturação citoplasmática (Imaturos, Transição e Maturos) – Jaboticabal, 2010.....	125
---	-----

Tabela 39. Comparação dos meios de cultivo (meio A e meio B) entre as fases folicular e anestro para cada estágio de maturação citoplasmática (Imaturos, Transição e Maturos) – Jaboticabal, 2010	125
--	-----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografia em estereomicroscópio (aumento 4X) de complexos *cumulus*-oócito (COCs) de diferentes graus. Seta 1 : COC grau 1 (selecionado para maturação), seta 2 e 3: COCs graus II e III respectivamente (não selecionados para maturação)..... 24
- Figura 2.** Fotografia em estereomicroscópio (aumento 4X) da mensuração do diâmetro oocitário por retículo milimetrado de medição (10mm/100partes)..... 24
- Figura 3.** Fotomicrografia de oócitos caninos em diferentes estádios de maturação nuclear após o cultivo *in vitro* por 72 horas. Coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342, comprimento de onda 330-385nm para avaliação e classificação da cromatina. Vesícula germinativa (A), Quebra de vesícula germinativa (B), Metáfase I (C), Metáfase II (D) e Degenerado (E)..... 28
- Figura 4.** Fotomicrografia de oócitos caninos em diferentes estádios de maturação citoplasmática após o cultivo *in vitro* por 72 horas. Coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342, comprimento de onda de 420-490nm para avaliação e classificação da dispersão dos grânulos corticais. A: Imaturidade citoplasmática. GC dispostos em “clusters” no interior do oócito (seta). B: Maturidade citoplasmática parcial. GC em transição do centro (seta branca) para a periferia (seta preta). C: Maturidade citoplasmática. GC concentrados na periferia formando um halo ao redor do oócito (seta)..... 29
- Figura 5.** A e B: Aparelho utilizado para realizar a trimagem do bloco. C: Pirâmide obtida após a trimagem. D: Aparelho ultramicrotomo Leica E: Bloco de resina sendo cortado pela navalha de diamante. F: Microscópio eletrônico de transmissão da marca JEOL e modelo 1010, instalado no *Câmpus* da

FCAV/UNESP, Jaboticabal.....	32
------------------------------	----

Figura 6. Seqüência de cortes semi-finos e ultra-finos, corados com azul de toluidina a 0,25% em solução aquosa de borato de sódio a 1%, desde as células do *cumulus* até a região do núcleo no interior do oócito de fêmeas caninas (Microscópio de luz, aumento 40X). A,B e C: Progressão dos cortes na região do *cumulus*. D: A seta indica a zona pelúcida, ou seja, a região das células do *cumulus* foi ultrapassada. E: Oócito canino, com células do *cumulus*, zona pelúcida ao redor do oócito (indicado pela seta) e o ooplasma. F: Oócito com material nuclear apontado pela seta.....

33

Figura 7. Esquema adaptado de VIARIS DE LESEGNO et al.(2008b) utilizado para classificar a VG de oócitos recém-colhidos e não maturados (A) e oócitos que permaneceram em VG após o processo de maturação *in vitro* (B). A: Antes da maturação *in vitro* a VG_c revela núcleo central arredondado com grande nucléolo reticulado. E VG_p apresenta núcleo ligeiramente achatado disposto na periferia do oócito e nucléolo em vários estádios de condensação da cromatina. B: Após a maturação *in vitro* a VG pode ser classificada em três diferentes padrões: VG₁ com grande núcleo arredondado e central. VG₂ núcleo periférico, ligeiramente achatado e nucléolo não se apresenta envolto por cromatina condensada. VG₃ núcleo periférico, achatado e nucléolo envolto por cromatina condensada.....

35

Figura 8. Etapas efetuadas durante a realização da técnica de microscopia eletrônica de varredura em oócitos de cadela. A: Desidratação dos oócitos executada em cápsulas de micropore. B: Secador de ponto crítico. C: Aparelho de metalização Denton Vacuum. D: Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 5410.....

37

Figura 9. Eletronmicrografia de varredura do complexo *cumulus*-oócito de

fêmea canina onde se observa: A – Células do *cumulus* dispostas regularmente ao redor do oócito (aumento 750 x). B - Células do *cumulus* dispostas irregularmente ao redor do oócito (aumento 750 x). C - Comunicação entre as células do *cumulus* através de longos processos emitidos entre estas células (seta) (aumento 5000 x). D - Comunicação entre as células do *cumulus* através de curtos processos emitidos entre estas células (seta) (3500 x). E – Forma arredondada das células do *cumulus* ao redor do oócito (7500 x)..... 40

Figura 10. Eletronmicrografia de varredura do complexo *cumulus*-oócito de fêmeas caninas demonstrando os parâmetros utilizados para se estabelecer a escala de intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*. A: Nenhum processo emitido entre as células do *cumulus* (-) (aumento 3500 x). B: Poucos processos emitidos entre as células do *cumulus* (+) (aumento 2000 x). C: Quantidade moderada de processos emitidos entre as células do *cumulus* (++) (aumento 2000 x). D: Intensa quantidade de processos emitidos entre as células do *cumulus* (+++) (aumento 2000 x). E: Quantidade muito intensa de processos emitidos entre as células do *cumulus* (+++++) (aumento 3500 x)..... 41

Figura 11. Eletronmicrografia de varredura de complexo *cumulus*-oócito de fêmeas caninas, demonstrando ausência de células do *cumulus* em partes do oócito, onde pode-se verificar diferentes características da zona pelúcida. A: Zona pelúcida com aspecto espongiiforme e poros estreitos (aumento 3500 x) B: Zona pelúcida com aspecto espongiiforme e numerosos e largos poros elípticos e esféricos (aumento 3500 x)..... 42

Figura 12. Eletronmicrografia de varredura de complexo *cumulus*-oócito de fêmeas caninas demonstrando os parâmetros utilizados para estabelecer a escala de intensidade de perda de células do *cumulus*. A: Perda de células do *cumulus* nula (-) (aumento 750 x). B: Baixa perda de células do *cumulus* (+) (aumento 750 x). C: Mediana perda de células do *cumulus* (++) (aumento 500

x). D: Intensa perda de células do *cumulus* (+++) (aumento 1000 x). E: Perda de células do *cumulus* de forma muito intensa, oócito quase desnudo por completo (+++++) (aumento 750 x)..... 43

Figura 13. Intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* estabelecida através de processos longos e curtos em oócitos recém colhidos (Oh) provenientes de cadelas em fase folicular e anestro - Jaboticabal, 2010..... 56

Figura 14. Eletronmicrografia de varredura de complexo *cumulus*-oócito recém colhido de fêmea canina demonstrando o arranjo e forma das células do *cumulus* bem como a intensidade de comunicação entre elas. A: Células do *cumulus* regularmente distribuídas ao redor do oócito (aumento 750 x). B: Células do *cumulus* arredondadas se comunicando de forma intensa através de processos curtos (seta) (aumento 3500 x)..... 59

Figura 15. Eletronmicrografia de transmissão oócito recém colhido de fêmea canina em anestro (VG_c). A: Grande núcleo arredondado (N) com nucléolo em posição periférica (seta), e presença de grandes gotas de lipídio (GL) (aumento 3000 x). B: Nucléolo reticular arredondado (aumento 12000 x). C: Mitocôndrias densamente concentradas próximo a zona pelúcida (ZP) e presença de “Cloud” mitocondrial (seta) (aumento 12000 x). D: “Cloud” mitocondrial (seta) (aumento 50000 x). E: Região próxima a zona pelúcida (ZP) apresentando Complexo de Golgi (CG) e mitocôndrias (seta) associadas a a junções do tipo GAP (GAPj) e moderada quantidade de microvilosidades (MV) (aumento 20000 x)..... 67

Figura 16. Eletronmicrografia de transmissão de oócito recém colhido de fêmea canina em fase folicular (VG_c). A: Núcleo central ligeiramente achatado (N) com nucléolo (seta branca) em posição periférica, e presença de gotas de lipídio (seta preta) em menor tamanho do que visualizado em VG_c do grupo do anestro (aumento 750 x). B: Nucléolo reticular arredondado (aumento 10000 x).

C: Nucléolo fibrilar denso (aumento 15000 x). D: Núcleo arredondado (N) (aumento 2000 x). E: Grânulos corticais (seta) alinhados próximos a zona pelúcida (aumento 2500 x). F: Complexo de Golgi presente próximo a zona pelúcida (ZP) (aumento 40000 x)..... 68

Figura 17. Eletronmicrografia de transmissão de oócito recém colhido de fêmea canina em fase folicular (VG_p). A: Núcleo (N) achatado localizado na periferia do oócito apresentando invaginações no envelope nuclear (seta) e nucléolo fibrilar denso (n) (aumento 2500 x). B: Nucléolo fibrilar denso (aumento 30000 x). C: Grânulos corticais (seta) alinhados entre a zona pelúcida (ZP) e núcleo (N) (aumento 12000 x). D: Região periférica do oócito apresentando Complexo de Golgi bem desenvolvido (CG) e microvilosidades (MV) (aumento 50000 x). E: Mitocôndrias (M) agrupadas no ooplasma entre gotas de lipídio (GL) (aumento 15000 x)..... 69

Figura 18. Distribuição do arranjo das células do *cumulus* ao redor de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72h em meio A – Jaboticabal, 2010..... 77

Figura 19. Intensidade de perda das células do *cumulus* de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72h em meio A – Jaboticabal, 2010..... 78

Figura 20. Frequência de poros estreitos e largos na zona pelúcida de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72h em meio A – Jaboticabal, 2010..... 79

Figura 21. Intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* estabelecida através de processos longos e curtos em oócitos provenientes de cadelas em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72 horas em meio sem

suplementação hormonal (meio A) - Jaboticabal, 2010.....	80
--	----

Figura 22. Eletronmicrografia de varredura de complexo <i>cumulus</i> -oócito de fêmea canina cultivado <i>in vitro</i> por 72h em meio A. A: COC's de fêmea em anestro apresentando-se íntegro e com arranjo regular (aumento 750 x). B: COC's de fêmea em fase folicular, se apresentado quase desnudo, devido à grande perda de células do <i>cumulus</i> (aumento 750 x). C: Zona pelúcida de COC's de fêmea em anestro apresentando largos poros elípticos (aumento 3500 x). D: Zona pelúcida de fêmea em fase folicular apresentando poros estreitos (aumento 2000 x). E: COC's de fêmea em fase folicular apresentando comunicação entre as células do <i>cumulus</i> através de processos longos e de intensidade moderada (aumento 3500 x).....	84
---	----

Figura 23. Distribuição do arranjo das células do <i>cumulus</i> ao redor de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados <i>in vitro</i> por 72h em meio B – Jaboticabal, 2010.....	91
--	----

Figura 24. Intensidade de perda das células do <i>cumulus</i> de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados <i>in vitro</i> por 72h em meio B – Jaboticabal, 2010.....	92
--	----

Figura 25. Frequência de poros estreitos e largos na zona pelúcida de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados <i>in vitro</i> por 72h em meio B– Jaboticabal, 2010.....	93
--	----

Figura 26. Intensidade de comunicação entre as células do <i>cumulus</i> estabelecida através de processos longos e curtos em oócitos provenientes de cadelas em fase folicular e anestro cultivados <i>in vitro</i> por 72 horas em meio com suplementação hormonal (meio B) - Jaboticabal, 2010.....	94
---	----

Figura 27. Eletronmicrografia de varredura de complexo <i>cumulus</i> -oócito de	
---	--

fêmea canina cultivado *in vitro* por 72h em meio B. A: COC's de fêmea em fase folicular apresentando-se íntegro e com arranjo regular (aumento 750 x). B: COC's de fêmea em anestro com baixa perda de células do *cumulus* (aumento 500 x). C: Zona pelúcida de COC's de fêmea em anestro apresentando largos poros elípticos (aumento 3500 x). D: COC's de fêmea canina em anestro, apresentando comunicação entre as células do *cumulus* através de intensos processos curtos (aumento 5000 x). E: COC's de fêmea canina em fase folicular, apresentando comunicação entre as células do *cumulus* através da emissão de processos longos de forma muito intensa (aumento 3500 x). F: COC's de fêmea canina em fase folicular, apresentando comunicação entre as células do *cumulus* através da emissão de curtos processos de forma muito intensa (aumento 3500 x).....

97

Figura 28. Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em anestro (VG₁) cultivado *in vitro* em meio A. A: Núcleo (N) contendo nucléolo reticulado (n) (aumento 6000 x). B: Mitocôndrias (M) concentradas na região periférica do oócito e grânulos corticais (GC) alinhados próximos a zona pelúcida (ZP) (aumento 20000 x). C: Complexo de Golgi (CG) e grânulos corticais(seta) presentes na periferia do oócito (25000 x). D: Região da zona pelúcida (ZP) apresentando junções GAP (GAPj) (aumento 10000 x).....

105

Figura 29. Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em anestro (VG₂) cultivado *in vitro* em meio A. A: Nucléolo reticulado contendo grandes vacúolos (V) (aumento 15000 x). B: Agrupamento de retículo endoplasmático rugoso (RER) entre o núcleo (N) e a zona pelúcida (ZP) (aumento 10000 x). C: Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) e mitocôndrias (seta) presentes próximos a zona pelúcida (ZP) (aumento 10000 x). D: Região periférica do oócito apresentando grande quantidade de complexo de golgi e mitocôndrias (M), além de grânulos corticais alinhados próximos a zona pelúcida (ZP) (aumento 15000 x).....

106

Figura 30. Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em fase folicular (VG₂) cultivado *in vitro* em meio A. A: Núcleo (N) apresentando invaginações no envelope nuclear (seta) (aumento 6000 x). B: Nucléolo reticulado contendo grande vacúolo (V) (aumento 10000 x). C: Região periférica do oócito apresentando microvilosidades (MV), grânulos corticais alinhados (seta preta) e mitocôndrias (seta branca) (aumento 30000 x). D: Mitocôndrias (seta) concentradas no ooplasma entre gotas de lipídio (GL) (aumento 30000 x).....

107

Figura 31. Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em fase folicular (VG₃) cultivado *in vitro* em meio B. A: Núcleo achatado (N) apresentando longas invaginações (seta) no envelope nuclear próximo a zona pelúcida (ZP) (aumento 5000 x). B: Invaginações (seta) no núcleo (N) (aumento 12000 x). C: Nucléolo (n) denso e condensado (aumento 10000 x). D: Grânulos corticais (GC) alinhados próximos a zona pelúcida (ZP) (aumento 30000 x). E: Região da zona pelúcida (ZP) apresentando microvilosidades (MV), junções do tipo GAP (GAPj) e escassas mitocôndrias (seta) (aumento 25000 x).....

116

Figura 32. Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em fase folicular (QVG) cultivado *in vitro* em meio B. A: Núcleo (N) apresentando dois pares de cromossomos (*) envoltos por envelope nuclear espesso (seta) (aumento 3000 x). B: Ruptura no envelope nuclear (seta) (aumento 12000 x). C: Grânulos corticais agrupados próximos ao núcleo (N) (aumento 5000 x).....

117

Figura 33. Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em fase folicular (MI) cultivado *in vitro* em meio B. A: Placa metafisária (PM) alinhada em paralelo com a membrana plasmática próxima a zona pelúcida (ZP) (aumento 2000 x). B: Placa metafisária (PM) apresentando cromossomos agregados (setas) (aumento 7500 x).....

117

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%.....	Porcentagem
χ^2	Teste estatístico Qui-quadrado
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
AN.....	Grupo experimental de cadelas em anestro
BSA.....	“Bovine serum albumine” (Albumina sérica bovina)
CC.....	Células do <i>cumulus</i>
CIV.....	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
COC.....	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
D/NI.....	Degenerado ou não passível de identificação
E ₂	Estradiol
FIV.....	Fertilização <i>in vitro</i>
FO.....	Grupo experimental de cadelas em fase folicular
FSH.....	Hormônio Folículo Estimulante
GC.....	Grânulos corticais
H.....	Horas
LH.....	Hormônio Luteotrófico

M.....	Molar
MET.....	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV.....	Microscopia eletrônica de varredura
mg.....	Miligrama
MI.....	Metáfase I
MII.....	Metáfase II
MIV.....	Maturação <i>in vitro</i>
NC.....	Nucléolo circundado por cromatina
nm.....	nanômetro
NNC.....	Nucléolo não circundado por cromatina
O ₂	Oxigênio
°C.....	Graus Celsius
OHE.....	Ovario-histerectomia
P ₄	Progesterona
PBS.....	“Phosphate buffered saline”
PI.....	Prófase I
PIV.....	Produção <i>in vitro</i>
QVB.....	Quebra de Vesícula Germinativa
SB.....	Solução de bloqueio
SFB.....	Soro Fetal Bovino
SFB.....	Soro fetal bovino
SOF.....	Fluido sintético do oviduto

TCM 199.....	Meio de cultura de tecidos 199
TE.....	Transferência de Embriões
VG.....	Vesícula Germinativa
ZP.....	Zona pelúcida

EFEITO DO ESTÁDIO DO CICLO ESTRAL E ADIÇÃO DE HORMÔNIOS AO MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* SOBRE A MORFOLOGIA DO COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO CANINO

RESUMO – Este estudo foi desenvolvido com o intuito de avaliar comparativamente o efeito do estágio do ciclo estral, bem como a adição de hormônios aos meios de cultivo *in vitro* sobre a morfologia do complexo *cumulus*-oócito canino. Os oócitos foram coletados de 30 cadelas híginas submetidas à ovariosalpingo-histerectomia, divididas em dois grupos de acordo com a condição reprodutiva (fase folicular e anestro). A avaliação foi feita por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, antes e após o período de cultivo *in vitro* por 72h em dois diferentes meios: meio controle - A (TCM199) e meio B: TCM199 adicionado de 10UI/mL de LH, 2µg/mL de progesterona (P₄) e 2µg/mL de Estradiol(E₂). Os resultados revelaram que o diâmetro oocitário não é influenciado pela fase reprodutiva, assim como a comunicação intercelular, e os aspectos morfológicos relacionados à forma e arranjo das células do *cumulus*, *in vivo*. A fase do ciclo estral exerceu influência sobre a morfologia do complexo *cumulus*-oócito, de tal forma que oócitos pertencentes ao grupo folicular apresentaram-se com maior grau de maturidade nuclear e citoplasmática do que oócitos do grupo do anestro. A suplementação hormonal afetou positivamente a maturação nuclear, mas não exerceu efeito sobre a maturação citoplasmática. Com relação à ultra-estrutura a presença de hormônios nos meios de cultivo foi benéfica tanto para a comunicação entre as células do *cumulus* como para a manutenção da integridade oocitária.

Palavras-chave: ultra-estrutura, oócito canino, maturação *in vitro*, microscopia eletrônica, hormônios.

EFFECT OF ESTROUS CYCLE STAGE AND HORMONAL SUPPLEMENTATION OF *IN VITRO* CULTURE MEDIUM ON THE MORPHOLOGY OF CANINE CUMULUS- OOCYTE COMPLEXES

ABSTRACT - This study was developed in order to comparatively evaluate the effects of stages of the estrous cycle, as well as the addition of hormones to culture media *in vitro* on the morphology of *cumulus*-oocyte complex canine. The oocytes were collected from 30 healthy bitches ovariosalpingo underwent hysterectomy were divided into two groups according to reproductive condition (follicular phase and anestrus). The evaluation was performed by scanning electron microscopy and transmission, before and after cultivation *in vitro* for 72h in two different media: control medium - A (TCM199) and medium B: TCM199 added 10IU/mL LH, 2µg / mL progesterone (P4) and 2µg/mL Estradiol (E2). The results revealed that the oocyte diameter is not influenced by reproductive stage, as well as intercellular communication, and morphological aspects related to the shape and arrangement of *cumulus* cells, *in vivo*. The estrous cycle phase influenced the morphology of *cumulus*-oocyte complex, such that follicular oocytes in the group presented with greater maturity than nuclear and cytoplasmic oocyte group of anestrus. The hormonal supplementation positively affected nuclear maturation, but had no effect on cytoplasmic maturation. Regarding the ultrastructural presence of hormones in culture media was beneficial both for communication between the *cumulus* cells as well as preserving the integrity of oocyte.

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

1 - INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o crescimento exponencial da população, o avanço das fronteiras agrícolas e a conseqüente destruição do meio ambiente contribuíram de maneira significativa para o aumento das espécies em extinção, como é o caso do cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), pertencentes à fauna silvestre brasileira. Dessa maneira, as técnicas de reprodução assistida, como a maturação e a fertilização *in vitro*, em canídeos, tornaram-se alvo de pesquisas com o intuito de maximizar o potencial de preservação do genoma das espécies ameaçadas. Para isto, tem-se utilizado o cão doméstico como modelo experimental no desenvolvimento destas técnicas, devido à similaridade da sua fisiologia reprodutiva e suas respostas a experimentos *in vitro* (DURRANT et al., 1998).

Entretanto, para a utilização satisfatória das técnicas de reprodução assistida é necessário conhecer os padrões endócrinos e mecanismos de controle do ciclo estral. Estes fatores podem ser considerados imperativos para a utilização rotineira das biotécnicas na espécie canina, já que o processo de maturação oocitária e fecundação são únicos devido às características peculiares da fisiologia do gameta canino (OTOI et al., 2000).

Deve-se ressaltar que a maturação *in vitro* em canídeos tem alcançado taxas limitadas de maturação variando de 0 a 58%, enquanto que, em bovinos, cerca de 90% dos oócitos completam a maturação (FARSTAD, 2000a).

Vários autores atribuem a baixa eficiência da maturação *in vitro* de oócitos caninos ao reduzido conhecimento sobre os eventos reprodutivos da cadela, bem como as suas particularidades como: o ambiente hormonal, morfologia oocitária e seu papel no processo de maturação, o reinício e progressão da meiose, ausência de meio de cultivo definido para esta espécie e o papel do oviduto sobre a maturação oocitária (MAHI e YANAGIMACHI, 1976; HEWITT E ENGLAND, 1998a, 1998b; OTOI et al., 1999; FARSTAD, 2000b, GOODROWE et al., 2000; BOGLIOLO et al., 2002; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003b ; SONGSASEN et al., 2002; WILLINGHAM-ROCHY et al., 2003; HAENISCH-WOEHL et al., 2003; FONTBONE et al., 2004; LUVONI et al., 2005).

Desta forma, novas pesquisas com o intuito de aprimorar a maturação *in vitro* estão sendo realizadas, visto que esta é uma etapa importante da reprodução assistida, uma vez que antecede alguns processos da biotecnologia que merecem destaque científico; tais como, a fecundação *in vitro* (FIV), cultivo e desenvolvimento embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de mórula ou blastocisto, quando poderão ser transferidos ou criopreservados.

Alguns pesquisadores como HAENISCH-WOEHL et al. (2003) e LUVONI et al.(2005), destacam a importância do estudo da morfologia oocitária canina para elucidar os motivos que levam a baixa eficiência da maturação *in vitro*. O fato de o oócito canino ser ovulado em estágio imaturo e as células do *cumulus* permanecerem aderidas durante o período de transporte e maturação dentro do oviduto, sugere que o estudo da relação entre estas estruturas poderá contribuir para esclarecer

questionamentos que envolve o processo de maturação e que dificultam a perfeita aplicação desta biotécnica nesta espécie (LUVONI et al., 2001). Assim, o conhecimento aprofundado sobre a morfologia oocitária e as características ultra-estruturais do oócito canino quando submetidos a condições artificiais de cultivo será um grande passo para o desenvolvimento de um meio de maturação específico para esta espécie. O sucesso na implementação da técnica de maturação poderá fazer parte de um programa adequado de reprodução assistida para canídeos ameaçados de extinção.

A partir do exposto, o presente trabalho teve como escopo estudar o efeito do estágio do ciclo estral e adição de hormônios ao meio de cultivo *in vitro* sobre a morfologia do complexo *cumulus*-oócito canino.

Para tanto, os objetivos foram:

- Correlacionar o diâmetro oocitário à fase do ciclo estral.
- Correlacionar à fase do ciclo estral e a morfologia do complexo *cumulus*-oócito (COC).
- Verificar a influência da suplementação hormonal (LH, progesterona e estradiol) sobre a competência meiótica e ultra-estrutura oocitária canina.

Dessa forma, o presente trabalho subdividiu-se nos seguintes experimentos:

EXPERIMENTO I

“Análise da distribuição do diâmetro oocitário de acordo com o “status” reprodutivo de fêmeas caninas”.

EXPERIMENTO II

“Influência da condição reprodutiva (FO- Fase folicular e AN- Anestro) sobre a morfologia do complexo cumulus-oócito”

EXPERIMENTO III

“Avaliação das características morfológicas do complexo cumulus-oócito provenientes de fêmeas caninas em fase folicular e anestro após o processo de maturação in vitro em diferentes meios de cultivo”

EXPERIMENTO IV

“Efeito da suplementação hormonal no meio de cultivo sobre a maturação nuclear a citoplasmática de oócitos de fêmeas caninas obtidos em diferentes fases do ciclo estral”

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Fisiologia Reprodutiva da Cadela (Canis familiaris)*

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

O ciclo estral da cadela apresenta fases distintas estabelecidas por alterações hormonais que induzem transformações de ordem morfológicas e clínicas sendo estas fases, o proestro, estro, diestro e anestro (JOCHLE e ANDERSEN, 1977).

O proestro que pode persistir por uma a três semanas está associado com a secreção do FSH (Hormônio Folículo Estimulante) que promove o crescimento folicular e aumento das concentrações de estrógeno produzido pelas células da granulosa (CONCANNON e DIGREGORIO, 1986), o qual atinge o pico máximo 24 a 48 horas antes do início do estro (ROTA et al., 2007). 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; REYNAUD et al., 2005). Ainda que tal fenômeno possa ser observado em outras espécies como suínos, primatas e roedores, em cadelas este processo é particularmente característico, visto que as células foliculares sofrem luteinização 60-70 horas antes da ovulação e o aumento pré-ovulatório da progesterona ocorre imediatamente antes, ou coincide, com o pico de LH (CONCANNON et al., 1977; MURPHY, 2000). Embora o papel fisiológico do aumento

pré-ovulatório da progesterona, assim como o fator responsável por esta indução ainda não tenha sido elucidado, estudos *in vitro* sugerem que a progesterona pode estar associada ao aumento nas taxas de reação acrosomal. Em contrapartida, a sua importância para o oócito, tanto em ambiente intrafolicular quanto oviductal, permanece desconhecida (REYNAUD et al., 2009).

A ovulação que é espontânea na cadela ocorre 48 horas após a onda de LH, e o oócito liberado ainda imaturo, em estágio de vesícula germinativa, completa a divisão meiótica no oviduto, aproximadamente de 54 a 72 horas após a ovulação (VIARIS DE LESEGNO et al., 2008a; REYNAUD et al., 2009). Ao final do estro o animal entra em uma fase lútea (diestro), dominada pelos efeitos de 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). Após o diestro inicia-se um longo período de inatividade ovariana, denominado anestro (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a). A duração desta fase varia consideravelmente de acordo com a raça e idade, sendo influenciada por fatores ambientais e genéticos (FELDMAN e NELSON, 1996). O aumento da secreção de LH sinaliza o fim do anestro e é o prelúdio para a retomada da atividade ovariana (VAN HAAFFTEN et al., 1994).

2.2. *Maturação oocitária in vivo*

A maturação *in vivo* é o período em que o oócito adquire capacidade para ser fecundado, sendo resultado de uma complexa interação entre células somáticas e germinativas; caso ocorram falhas neste processo poderão surgir anormalidades na fecundação e no desenvolvimento embrionário (MATTIOLI, 1989). BAKER (1982) afirma que a divisão celular, tanto mitótica quanto meiótica compreende quatro fases distintas: prófase, metáfase, anáfase e telófase. A meiose pode ocorrer em duas etapas, denominadas meiose I e II, e a prófase da meiose I é dividida em cinco estágios: leptóteno, zigóteno, diplóteno e diacinese (estágio de vesícula germinativa).

Na maioria dos mamíferos, a maturação é iniciada na vida pré-antral e passa por dois momentos de estagnação, na prófase I e metáfase II (MII). Os canídeos, devido, algumas particularidades referentes ao ciclo estral da espécie, sofrem um processo de maturação diferenciado (OTOI et al., 2000). Enquanto, a maioria das espécies, o oócito em fase de vesícula germinativa (VG) sofre meiose nas etapas finais da maturação folicular, sendo ovulado em MII (já com a extrusão do primeiro corpúsculo polar), em canídeos, os oócitos são liberados em estágio imaturo, no início da primeira divisão meiótica, ainda em VG. Assim, tanto a maturação completa quanto a fecundação ocorre dentro do oviduto e a aquisição de competência meiótica se dá em ambiente intra e extra-folicular (HOLST e PHEMISTER, 1971; TSUTSUI, 1975; FARSTAD et al., 1989; LUVONI et al., 2005).

Segundo SCRIBAN (1999) o crescimento oocitário intra-folicular é constituído por um conjunto de modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Dessa forma, a

maturação é caracterizada pela ocorrência de três eventos celulares: a finalização do processo da meiose com a transição do estágio de vesícula germinativa ao de metáfase II; a maturação citoplasmática, onde alterações moleculares e estruturais conferem ao oócito a capacidade de ser fecundado e a fase inicial do desenvolvimento embrionário; e a maturação de membrana, que permite à zona pelúcida do oócito reconhecer os espermatozóides de sua espécie (BEYERS et al., 1997; SCRIBAN, 1999). Algumas dessas alterações incluem a redistribuição de organelas celulares, visto que a sua localização muda continuamente dentro do citoplasma durante a progressão da meiose. As mitocôndrias migram da periferia para regiões mais centrais (STOJKOVIC et al., 2001). No momento da quebra de vesícula germinativa (QVG), gotas de lipídios dentro do citoplasma aumentam em número e tamanho, enquanto o complexo de Golgi diminui (HYTTEL et al., 1997). Com a progressão da meiose até o estágio de MII, as gotas de lipídio continuam a aumentar, o complexo de Golgi a regredir e as mitocôndrias se tornam mais associadas às gotas de lipídios dentro do citoplasma. Além disso, os microtúbulos se reorganizam e os grânulos corticais são redistribuídos e se tornam mais espaçados migrando para a periferia (HYTTEL et al., 1997; STOJKOVIC et al., 2001; MARTINS, 2008).

2.3. Morfologia do complexo cumulus-oócito canino

Com relação à morfologia do oócito canino, embora tenha sido ressaltada sua importância para elucidar os motivos que levam a baixa eficiência da maturação *in vitro*,

até o momento pouco se sabe a respeito deste assunto (HAENISCH-WOEHL et al., 2003; LUVONI et al., 2001; 2005).

Segundo TESORIERO (1982), o oócito canino, no início do seu desenvolvimento, embora apresente mudanças ultra-estruturais, que o assemelhem a outros mamíferos, possui diferenças significativas que o distinguem das outras espécies. Como a aquisição da competência meiótica, que ocorre tanto em ambiente intra quanto extra-folicular (ovidutal), e a grande quantidade de material lipídico, o que lhe confere uma coloração escurecida e homogênea.

Durante o crescimento intra-folicular, caracterizado por alta atividade transcricional, a íntima associação entre o oócito e as células do *cumulus* é um requisito para o crescimento folicular normal e a aquisição da competência meiótica (EPPIG, 1996; MATZUK et al., 2002).

As células do *cumulus* (CC) que são subtipo das células da granulosa possuem importante papel na maturação oocitária por manter o estado meiótico das células germinativas, induzirem o reinício da meiose e dar suporte para a maturação citoplasmática (WARRIACH e CHOCHAN, 2004).

O oócito e as CCs estão conectados funcional e fisicamente por meio de uma sofisticada rede de comunicação bidirecional mediada pelas junções GAP, através da qual ocorre a transferência de nutrientes, íons e pequenas moléculas como o cálcio e AMPc para os compartimentos internos (GANDOLFI et al., 2005). Além disso, esta comunicação tem sido reconhecida como fundamental para o início da maturação

oocitária em resposta a tratamentos com gonadotrofinas, tanto em animais domésticos quanto de laboratório (VOZZI et al., 2001; MARTINS, 2008).

Existem evidências de que a ligação entre as células somáticas e o oócito seja influenciada pelo estágio do ciclo estral. Segundo HAENISH-WOEHL et al. (2003), em estudo realizado com complexo *cumulus*-oócito de fêmeas caninas pré-puberes, as células do *cumulus* apresentam-se frouxamente arranjadas ao redor do oócito, emitindo poucos prolongamentos para a zona pelúcida. LUVONI et al. (2001) citam que 89% das junções GAP apresentam-se abertas em COC's de cadelas em proestro e 67% permanecem abertas após 24 horas de MIV. Em contrapartida, para o anestro não foi detectado permeabilidade em seus oócitos. VIARIS DE LESEGNO et al. (2008b) afirmam que momentos antes da ovulação, oócitos e células do *cumulus* mostram sinais evidentes de comunicação entre si, mas passados três dias da ovulação a comunicação se desfaz. Desta forma, tem sido proposto que a diminuição das junções GAP é um fato cronologicamente relacionado à maturação oocitária, assim, essas junções teriam importante papel na coordenação entre a maturação nuclear e citoplasmática (RODRIGUEZ e FARIN, 2004).

Segundo EBNER et al. (2006) a morfologia do oócito é vista como pré-requisito para o desenvolvimento de embriões. Assim, a integridade do fenótipo do complexo *cumulus*-oócito (COC) é considerada não apenas um indicador da sua viabilidade como também um potencial marcador da capacidade de transcrição de genes envolvidos na maturação e desenvolvimento embrionário inicial (RODRIGUES et al., 2009).

Por esta razão, na espécie canina, a seleção de oócitos para o cultivo *in vitro* se apóia a critérios morfológicos, com o propósito de obter oócitos de alta qualidade e viabilidade. Sendo a espessura da camada de CCs uma das características morfológicas avaliadas, visto que, somente oócitos com duas ou mais camadas de CCs continuam a se desenvolver *in vitro* (NICKSON et al., 1993). Outros parâmetros como a expansão das CCs e/ou mucificação *in vitro* tem sido interpretada como indicador de maturação oocitária, entretanto há divergências (TRUMPAN, 2001). Para RODRIGUES e RODRIGUES (2009), a expansão das CCs após a maturação *in vitro* talvez seja apenas um artefato imposto por um ambiente artificial, não estando correlacionado com a maturidade nuclear.

REYNAUD et al. (2009), estudando COCs durante o período periovulatório, observaram que a expansão ocorre dentro do folículo após o pico de LH. Entretanto, a capacidade de resposta a onda pré-ovulatória de LH somente é adquirida quando folículos atingem 50 a 60% do diâmetro ovulatório. Além disso, acrescentam que se o oócito canino, comportar-se de modo semelhante ao camundongo, no qual a expansão das CCs 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.

2.4. Configuração da cromatina de oócitos caninos

O oócito de mamíferos encontra-se estacionado em prófase I na subfase de diplóteno (vesícula germinativa - VG) durante todo desenvolvimento fetal até a

puberdade, quando a onda de LH estimula a retomada da meiose, com o oócito sendo ovulado em metáfase II (TAN et al., 2009). Contrariamente, em canídeos, os oócitos são ovulados imaturos (vesícula germinativa) e a completa divisão meiótica ocorre 54 a 72 horas no oviduto (VIARIS DE LESEGNO et al., 2008a; REYNAUD et al., 2009). Embora oócito canino possa retomar espontaneamente a meiose *in vitro* quando submetido a adaptações das técnicas utilizadas em outras espécies, às taxas de maturação são muito baixas e a porcentagem de oócitos que permanecem em VG independente das condições de cultivo é elevada, o que torna importante a caracterização da configuração da cromatina da VG em oócitos caninos (LEE et al., 2008).

De acordo com TAN et al. (2009), durante o desenvolvimento oocitário, a VG sofre modificação e remodelamento da cromatina que se manifesta por meio de alterações na configuração e posicionamento da cromatina, fato considerado imperativo para conferir ao oócito o desenvolvimento de competência meiótica.

Em canídeos há cinco configurações distintas de vesícula germinativa, sendo duas identificadas em oócitos *in vivo* (VG_c e VG_p) e as outras três após o cultivo *in vitro* (VG₁, VG₂ e VG₃). A VG_c é caracterizada por possuir grande núcleo arredondado central, nucléolo reticular esférico e excêntrico e poucos sinais de condensação da cromatina. Na VG_p o núcleo periférico pode apresentar-se arredondado ou achatado com nucléolo esférico contendo pequenos vacúolos e cromatina em diferentes estádios de condensação. A VG₁ apresenta características semelhantes à VG_c, com núcleo redondo e central, nucléolo reticulado esférico e poucos sinais de condensação da

cromatina. A VG₂ possui núcleo redondo ou ligeiramente achatado, envelope nuclear com pequenas invaginações próximas a zona pelúcida, nucléolo reticulado, mas não circundado por cromatina condensada. A VG₃ apresenta núcleo achatado com longas invaginações no envelope nuclear próxima a membrana plasmática, o nucléolo demonstra sinais de inativação e a condensação da cromatina é mais evidente em VG₃ do que nos demais grupos supracitados (VIARIS DE LESEGNO et al., 2008b).

O padrão VG_c e VG_p descritos em canídeos apresentam características similares, respectivamente, a configuração de nucléolo não circundado por cromatina (NNC) e circundado por cromatina (NC), citados em camundongos e humanos (REYNAUD et al., 2009). Nestas espécies, a configuração NNC, caracteriza oócito transcricionalmente ativo e NC representa oócito inativo, sendo que a transição de NNC para NC está associada a um aumento no potencial de desenvolvimento e coincide com o final do crescimento oocitário (DEBEY et al., 1993). Segundo GILCHRIST e THOMPSON (2007), o uso de oócitos transcricionalmente ativos na maturação *in vitro* (MIV) pode fazer com que a retomada da meiose ocorra precocemente, antes que o estoque de RNAm seja suficiente para sustentar o desenvolvimento embrionário. Tal fato sugere as baixas taxas de maturação *in vitro* na espécie canina possam ser ocasionadas pelo uso de oócitos em VG_c.

VIARIS DE LESEGNO et al. (2008b) avaliando a ultra-estrutura de oócitos caninos maturados *in vitro* observaram que oócitos que exibem padrão VG₁ e VG₂ são menos avançados em termos de maturação nuclear e citoplasmática quando comparados a VG_p (antes do cultivo *in vitro*). Sendo assim, sugerem que tanto VG₁

quanto VG_2 sejam originários de oócitos em VG_c enquanto os oócitos com padrão VG_3 , metáfase I, metáfase II e degenerados sejam provenientes de oócitos em VG_p .

2.5. Aspectos da maturação oocitária canina *in vitro*

Os oócitos caninos podem retomar espontaneamente a meiose *in vitro* quando submetido a adaptações das técnicas de maturação utilizadas para bovinos e suínos, embora com taxas bastante inferiores aos referidos para as espécies supracitadas (FARSTAD, 2000a).

A habilidade do oócito para iniciar a meiose em condições artificiais é definida como competência meiótica, e parece ser dependente do grau de crescimento atingido pelo oócito antes de ser liberado pelo folículo (HEWITT et al., 1998c). Essa competência é atingida pela coordenação de vários processos que envolvem mudanças morfológicas, ultra-estruturais e transcricionais nos compartimentos citoplasmático e nuclear (LUVONI et al., 2005).

DURRANT et al. (1998) citam que dentro de um folículo em crescimento, o oócito canino se desenvolve e aumenta de tamanho. Assim, durante esta fase, o oócito aumenta o seu diâmetro de $20\mu\text{m}$ para aproximadamente $120\mu\text{m}$, o que o torna, segundo esses autores, progressivamente competente e capaz de evoluir à MII.

Segundo OTOI et al. (2001), as melhores taxas de maturação de oócitos colhidos durante o proestro e estro, podem ser explicados como consequência do maior diâmetro oocitário encontrado nessas fases do ciclo reprodutivo, já que está

diretamente relacionado com a competência meiótica. Contrariamente, RIBEIRO (2007) cita que o diâmetro oocitário não é influenciado pelo estágio do ciclo estral, e que independente da fase reprodutiva canina a proporção de oócitos com diâmetro igual ou superior a 110 μ m é significativamente maior em ovários de fêmeas caninas.

HEWITT e ENGLAND (1998a) relatam que quanto maior o oócito, maior será a habilidade de se transpor à fase de quebra da vesícula germinativa para atingir as fases de metáfase I, anáfase I e metáfase II, sendo que o diâmetro superior a 120 μ m apresenta maior competência meiótica para os estádios finais de maturação, similar ao observado em outras espécies domésticas (MOTLIK, 1989; DURENZI et al., 1995; GILCHRIST et al., 1995; THEISS, 1997).

Com relação à influência do ciclo estral sobre a taxa de recuperação e frequência de maturação nuclear de oócitos encontram-se resultados muito controversos, de forma que essa questão continua a ser alvo de pesquisas. Para RODRIGUES & RODRIGUES (2003a), 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. Da mesma forma, HEWITT e ENGLAND (1997) citam que não há diferenças na taxa de maturação oocitária entre oócitos coletados de cadelas no período de anestro e diestro, no entanto, afirmam que a obtenção de oócitos no final do proestro e início de estro é mais adequada, pois, as concentrações de progesterona e estrógeno durante este período possuem efeito positivo sobre a maturação. Contrariamente, NICKSON et al. (1993) e YAMADA et al. (1993), afirmam que o número de oócitos coletados e a taxa de maturação *in vitro* são influenciados pela fase do ciclo estral.

Outro aspecto relevante é a idade das fêmeas doadoras. De acordo com ANDERSEN e SIMPSON (1973) e ratificado por DOLEZEL et al. (2004), os ovários de fêmeas caninas pré-púberes apresentam menor proporção de folículos em estádios avançados de desenvolvimento e maior taxa de folículos atrésicos, fato este, que pode ilustrar a aceleração atrésica durante os primeiros meses após o nascimento. Segundo HEWITT e ENGLAND (1998a), a habilidade de maturar *in vitro* fica comprometida em fêmeas com idade superior a sete anos, quando comparadas com animais mais jovens.

A respeito do período de cultivo, diversas pesquisas estabeleceram 72 horas como o período de maturação para cães (OTOI et al., 2000; RODRIGUES E RODRIGUES, 2003a; APPARÍCIO-FERREIRA, 2006), pois neste tempo há um equilíbrio entre a progressão da meiose até o estágio de metáfase II e a degeneração celular (NICKSON et al., 1993).

Sobre o meio de cultivo, vale ressaltar que as características bioquímicas dos oócitos das cadelas são distintas das observadas em outras espécies e tais diferenças determinam adaptações nas condições de cultivo *in vitro*. Em virtude disto, vários estudos têm sido realizados na tentativa de mimetizar as condições encontradas *in vivo*, com o intuito de melhorar as taxas de maturação nesta espécie. Normalmente, são utilizadas adaptações dos meios empregados em bovinos, visto que, ainda não há um meio pré-estabelecido para esta espécie (MARTINS, 2005).

Os meios mais comumente utilizados são o SOF (“Synthetic Oviduct Fluid”) (HEWITT e ENGLAND, 1997; 1998b; 1999; BOLAMBA et al., 2002) e, principalmente, o TCM 199 (Tissue Culture Medium 199) (NICKSON et al., 1993; HEWITT et al., 1998c;

FUJI et al., 2000; OTOI et al., 2001; SONGSASEN et al., 2001; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a), acrescidos de proteínas, hormônios, antioxidantes e fatores de crescimento, com o intuito de melhorar as taxas de maturação e reduzir a degeneração.

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

Sobre o TCM 199, além de modificado pode ser suplementado com hormônios e substâncias favoráveis ao desenvolvimento, como o SFB e BSA (NICKSON et al., 1993; HEWITT e ENGLAND, 1997; HEWITT et al., 1998c). Para CINONE et al. (1992), entre os meios complexos, o TCM 199 é o que fornece as melhores condições para o oócito canino completar a sua maturação até os estádios de metáfase II.

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

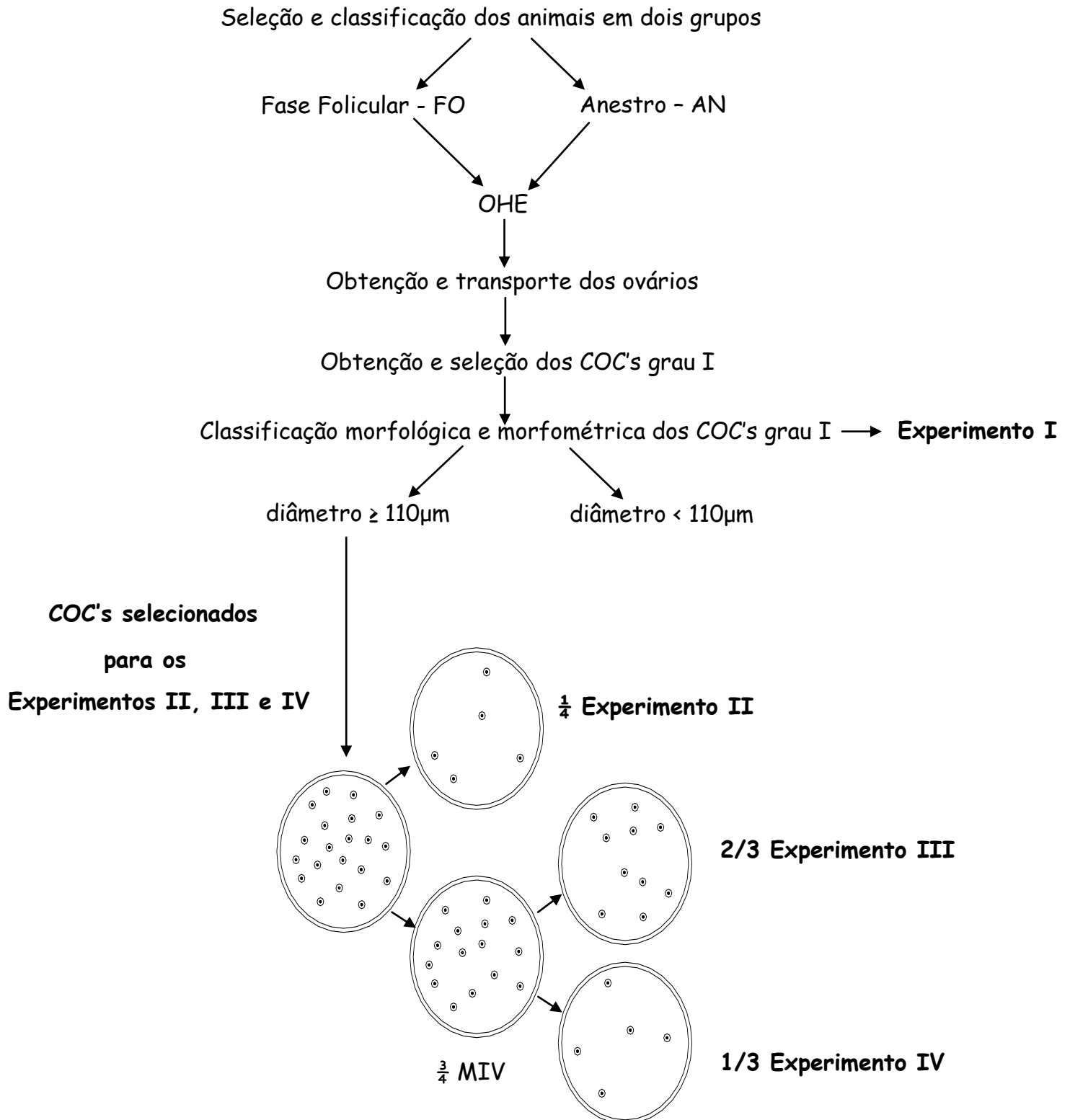
A suplementação com hormônios sexuais nos meios de cultivo é baseada no fato de que os oócitos caninos em fase de vesícula germinativa estão sujeitos, *in vivo*, a níveis decrescentes de estrógeno e crescentes de progesterona no folículo pré-ovulatório (HEWITT e ENGLAND, 1997; NICKSON et al., 1993).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

(2005), afirmam que a suplementação com progesterona e estradiol pode aumentar ou diminuir as taxas de maturação nuclear dos oócitos caninos, dependendo da sua concentração. Os autores relataram que a associação destes esteróides na concentração de 2µg/ml tem efeito positivo na maturação nuclear quando comparado com a mesma concentração isoladamente.

Já os hormônios gonadotróficos, desempenham papel fundamental no desenvolvimento dos folículos ovarianos e, indiretamente, no oócito em crescimento. A onda pré-ovulatória de LH induz a quebra da vesícula germinativa *in vivo*, pois reduz a comunicação existente entre as células do *cumulus* e o oócito, evitando o transporte de substâncias inibitórias da competência meiótica; e ainda, estimula a síntese de um sinal indutor para o início da meiose, possivelmente, representado pelo cálcio (EPPIG, 1993). A respeito do FSH, este hormônio possui participação primordial na expansão dos complexos *cumulus*-oócito, mediada, provavelmente, por AMPc (SALUSTRI et al., 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

FLUXOGRAMA



3.1 – Local e Animais

Neste estudo foram utilizadas 30 fêmeas caninas (15 animais em fase folicular – FO; e 15 animais em anestro – AN), de diversas raças, com idade entre um e sete anos, peso médio de 15Kg e consideradas híginas mediante ao exame físico e clínico. Os animais foram submetidos à ovario-histerectomia, junto ao Setor de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” e os procedimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Os oócitos foram avaliados quanto a sua morfologia através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV). Com relação à MET, o processamento das amostras até a etapa de inclusão em resina foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da FMVZ – USP São Paulo sob coordenação do Prof. Dr. Idércio Luíz Sinhorini e as etapas referentes aos cortes semi-finos, ultra-finos e observação no microscópio eletrônico de transmissão foram efetuadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal - UNESP. A respeito da MEV, o processamento das amostras, bem como a observação no microscópio eletrônico de varredura foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-UNESP.

3.2 - Determinação da fase do ciclo estral

As cadelas foram classificadas, nos seguintes grupos, de acordo com o “status” reprodutivo: FO – Fase Folicular e AN – Anestro.

A classificação foi feita através de anamnese, citologia vaginal (Apêndice 1) conjuntamente com a observação da presença ou ausência de folículos ou corpo lúteo na superfície ovariana. Ademais, coletou-se amostra de sangue de cada animal, a qual foi centrifugada a 955g por 10 minutos e dessorada. O soro foi enviado para o Centro de Análises e Pesquisas Clínicas Álvaro, na cidade de Cascavel/Paraná, onde se realizou a dosagem sérica de progesterona, pelo método de quimioluminescência, para confirmação da fase do ciclo estral, como mostra o quadro 1.

Quadro 1. Correlação entre a dosagem sérica de progesterona (P₄) no plasma e a fase do ciclo estral.

Concentração de P ₄ (ng/mL) no plasma	Fase do ciclo estral
Menor que 1,0	Anestro
Menor que 1,0 a 2,0	Proestro
1,0 a 20,0	Estro
4,0 a 10,0	Ovulação

Valores de referência para a espécie canina do Centro de Análises e Pesquisas Clínicas Álvaro

Dessa forma, seguindo os valores de referência do Centro de Análises e Pesquisas Clínicas Álvaro para determinar a fase do ciclo estral, segue abaixo (tabelas 1 e 2) as dosagens séricas de progesterona dos animais incluídos no experimento:

Tabela 1. Dosagens séricas de progesterona das cadelas incluídas no grupo FO (Fase folicular) – Jaboticabal, 2010.

Animal	Dosagem de P4 ng/mL
1	5,40
2	5,00
3	1,60
4	3,30
5	8,50
6	3,30
7	4,90
8	5,70
9	6,10
10	2,70
11	2,80
12	3,00
13	4,00
14	3,80
15	5,90

Tabela 2. Dosagens séricas de progesterona das cadelas incluídas no grupo AN (anestro) – Jaboticabal, 2010.

Animal	Dosagem de P4 ng/mL
1	0,54
2	0,86
3	0,70
4	0,40
5	0,52
6	0,60
7	0,90
8	0,90
9	0,60
10	0,74
11	0,67
12	0,50
13	0,80
14	0,90
15	0,40

3.3 – Obtenção e seleção de oócitos

Após o procedimento da ovario-histerectomia, os ovários foram colhidos assepticamente, imersos em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% aquecida a 38°C (Solução de Transporte) e, imediatamente transportados ao Laboratório de Reprodução da FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Em placa aquecida, os mesmos foram fatiados em solução de PBS adicionado de 10% de SFB a 38 °C para a liberação dos COC's, os quais foram classificados de acordo com o critério adotado por HEWITT e ENGLAND (1998a – Apêndice 2) (Figura 1). Os COC's grau I selecionados

tiveram seu diâmetro oocitário mensurado por um retículo milimetrado de medição para ocular de 10X do Estereomicroscópio (Figura 2). De acordo com a calibração, em aumento 4, o valor de cada milímetro da régua correspondia a 27,5 μm . Assim, os oócitos foram divididos em dois grupos. Sendo o primeiro grupo composto por oócitos com o diâmetro inferior a 110 μm e outro grupo de oócitos com diâmetro igual ou superior a 110 μm (Experimento I). Para os demais experimentos (II, III e IV) foram utilizados apenas os oócitos com diâmetro igual ou superior a 110 μm .

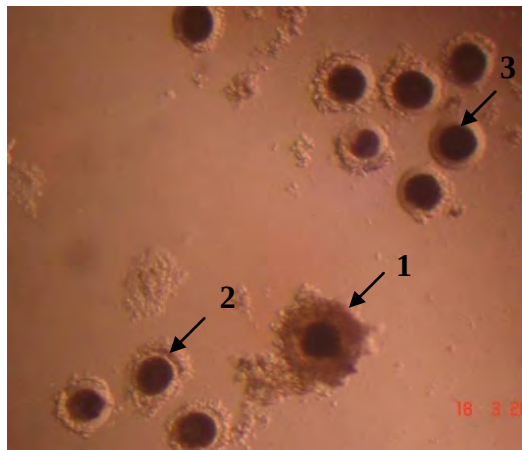


Figura 1. Fotografia em estereomicroscópio (aumento 4X) de complexos *cumulus*-oócito (COCs) de diferentes graus. Seta 1 : COC grau 1 (selecionado para maturação), seta 2 e 3: COCs graus II e III respectivamente (não selecionados para maturação).

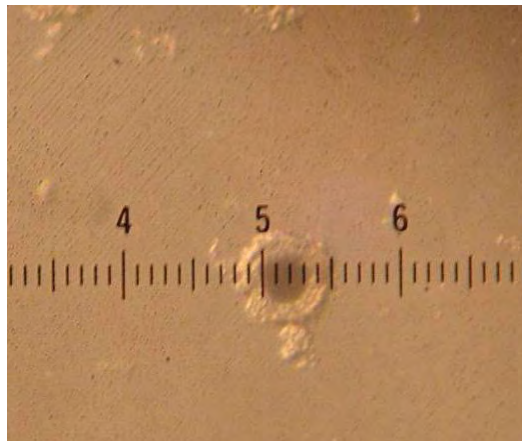


Figura 2. Fotografia em estereomicroscópio (aumento 4X) da mensuração do diâmetro oocitário por retículo milimetrado de medição (10mm/100partes).

3.4 – Maturação *in vitro*

Após a seleção, parte dos oócitos com diâmetro $\geq 110\mu\text{m}$ foi separada, e imediatamente fixada (fixação primária) e armazenada a 4°C até a realização dos métodos de microscopia eletrônica de varredura e transmissão para avaliação morfológica de oócitos recém colhidos e não maturados (Experimento II). Outra parte foi dividida em grupos de até 20 oócitos, os quais foram transferidos para placa tipo NUNC[®] contendo duas gotas de $500\mu\text{L}$ de meio de maturação específico para cada tratamento. Posteriormente a placa foi acondicionada em estufa 38°C em atmosfera de 5% de CO_2 por período de 72 horas, sendo que após 48 horas do início do cultivo realizou-se a retirada de $250\mu\text{L}$ de meio de cada poço com posterior reposição de mesma quantidade de meio, recém preparado. Cada poço continha meio específico para cada tratamento, porém todos com a mesma base de constituição (meio TCM199).

Assim, os meios de cultivos utilizados neste experimento foram:

- Meio A: TCM199 (controle – Apêndice 3)
- Meio B: TCM199 suplementado com 10UI/mL de hCG, $2\mu\text{g/mL}$ de progesterona (P_4) e $2\mu\text{g/mL}$ de estradiol (E_2) (PIRES, 2006, modificado).

Após 72 horas de cultivo, os oócitos foram divididos em três partes: sendo uma para avaliação do estágio de maturação nuclear (configuração da cromatina) e citoplasmática (distribuição dos grânulos corticais) pelo método de coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 (Experimento IV) e as outras duas para avaliação morfológica do complexo *cumulus*-oócito após a maturação *in vitro*, onde uma parte foi avaliada

pela técnica de microscopia eletrônica de varredura e a outra pela transmissão (Experimento III).

3.5 – Avaliação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática

Após o período de maturação *in vitro*, os oócitos foram submetidos à coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 de acordo com a metodologia descrita por CHERR et al. (1988) com algumas modificações, para avaliação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática. Sendo assim, os oócitos foram colocados em placas contendo 200µL de solução de hialuronidase 0,2% e aspirados repetidas vezes com a pipeta de 100µL para remoção completa das células do *cumulus*. Ato contínuo, foram transferidos para solução de PBS pH 2,5 onde permaneceram até que a zona pelúcida não fosse mais visualizada. Os oócitos foram então fixados em formaldeído 3% por 30 minutos à temperatura ambiente, e incubados "overnight" em solução de bloqueio (SB). No dia subsequente, foram tratados por 5 minutos a 38°C em solução de 0,1% de Triton X-100 para a permeabilização. Em seguida, foram incubados em 10µg/mL de *Lens culinaris* diluída em 500µL de SB por 15 minutos a 38°C, lavados três vezes em solução de bloqueio e transferidos para lâminas contendo uma gota de bisbenzímide (Hoechst 33342) em glicerol (0,001%), recobertos com lamínulas e examinados em microscópio de epifluorescência (330-385nm e 420-490nm) para avaliação dos grânulos corticais (maturação citoplasmática) e morfologia do DNA (maturação nuclear). (Experimento IV).

3.5.1. Classificação do estágio de maturação nuclear

A classificação do estágio de maturação nuclear foi realizada segundo os critérios adotados por HEWITT e ENGLAND (1997), baseado na morfologia do DNA por graus variados de condensação cromossômica (Figura 3).

A avaliação foi realizada em microscópio invertido FLUOVERT Leica, equipado com luz ultravioleta e filtro para comprimento de onda entre 365-420 de excitação/emissão. Assim, os graus avaliados foram:

1. Vesícula Germinativa (VG, estágio dictiato da prófase I): Presença de núcleo vesicular com cromossomos pouco condensados.
2. Quebra de Vesícula Germinativa (QVG): Cromossomos apresentam algum grau de condensação com dispersa distribuição, porém ainda com núcleo de aspecto vesicular.
3. Metáfase I (MI): Cromossomos atingem grau mais elevado de condensação não sendo possível a visualização individual dos mesmos.
4. Metáfase II (MII): Cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma e aparecimento do primeiro corpúsculo polar.
5. D/NI : degenerados ou não passíveis de identificação.

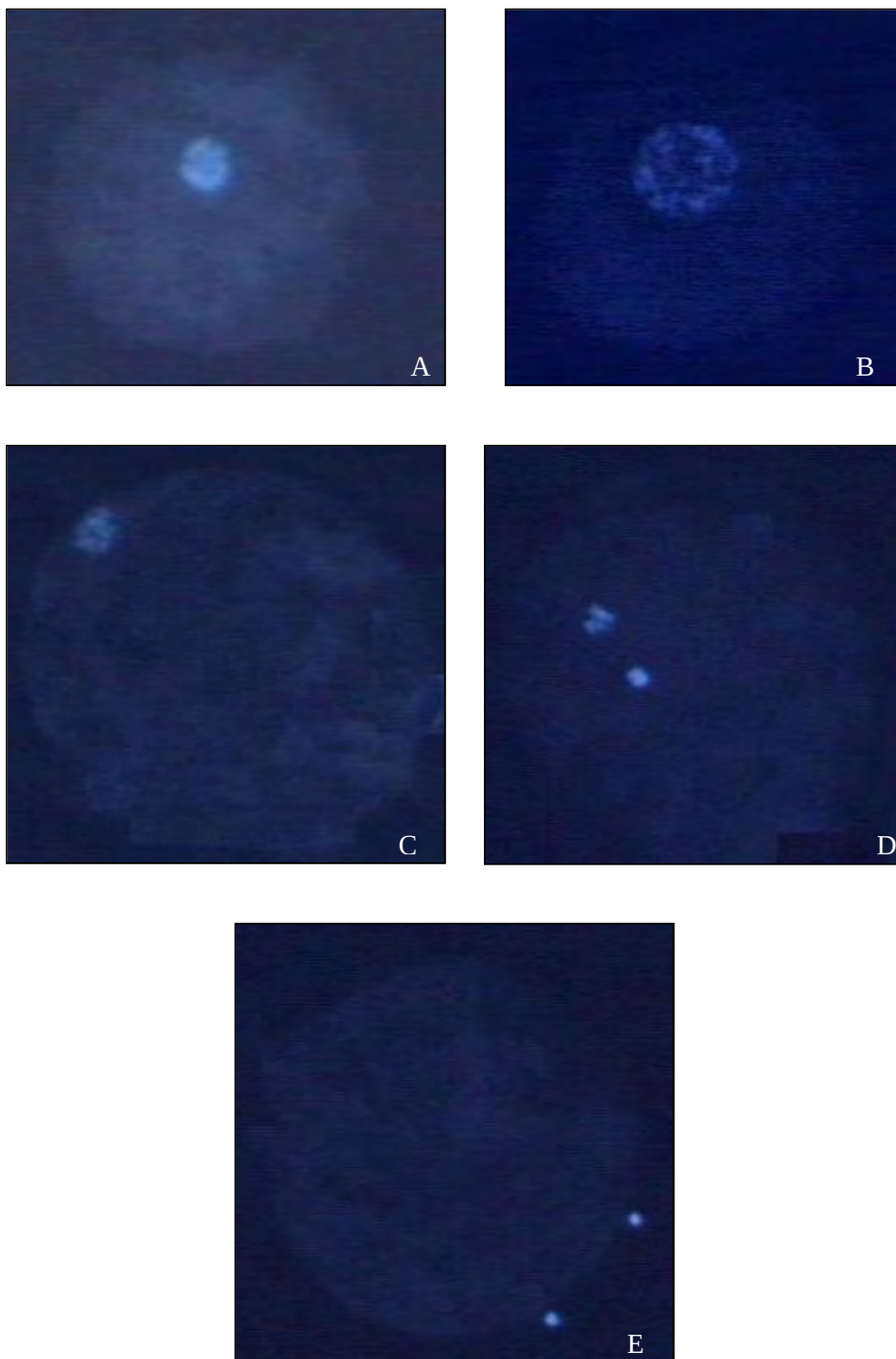


Figura 3: Fotomicrografia de oócitos caninos em diferentes estádios de maturação nuclear após o cultivo *in vitro* por 72 horas. Coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342, comprimento de onda 330-385nm para avaliação e classificação da cromatina. Vesícula germinativa (A), Quebra de vesícula germinativa (B), Metáfase I (C), Metáfase II (D) e Degenerado (E).

3.5.2. Classificação do estágio de maturação citoplasmática

A avaliação da maturação citoplasmática foi baseada na distribuição dos grânulos corticais no citoplasma (AVELINO, 2004) (Figura 4).

1. Imaturos: Grânulos corticais dispostos em “cluster” no citoplasma.
2. Parcialmente maduros (Transição): Grânulos corticais em transição do centro para periferia do oócito.
3. Maduros: Grânulos corticais concentrados na periferia do oócito.

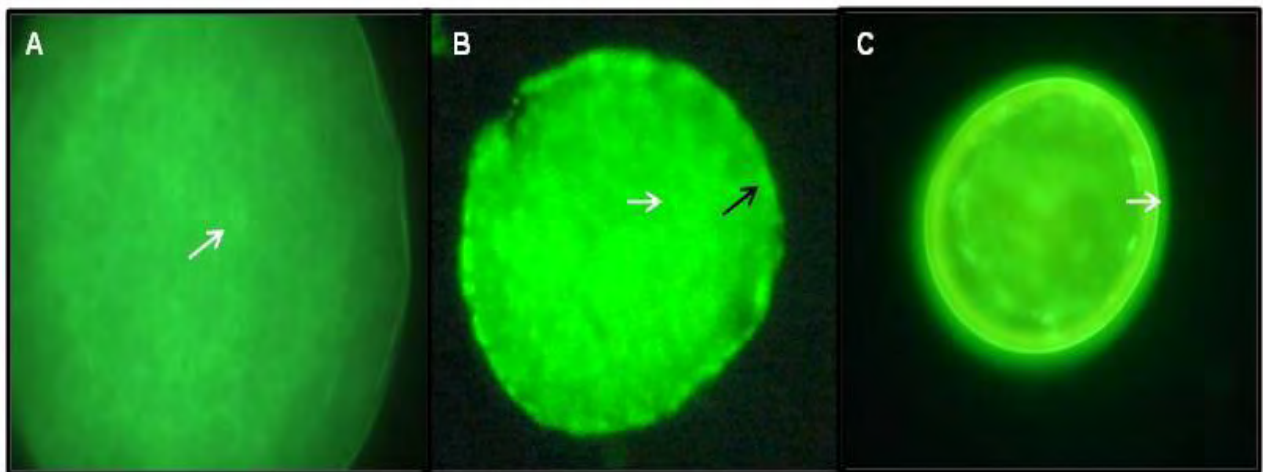


Figura 4. Fotomicrografia de oócitos caninos em diferentes estádios de maturação citoplasmática após o cultivo *in vitro* por 72 horas. Coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342, comprimento de onda de 420-490nm para avaliação e classificação da dispersão dos grânulos corticais. **A:** Imaturidade citoplasmática. GC dispostos em “clusters” no interior do oócito (seta). **B:** Maturidade citoplasmática parcial. GC em transição do centro (seta branca) para a periferia (seta preta). **C:** Maturidade citoplasmática. GC concentrados na periferia formando um halo ao redor do oócito (seta).

3.6 - Avaliação morfológica

3.6.1 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada de acordo com a metodologia descrita por VIARIS DE LESEGNO et al. (2008a) com algumas modificações.

Para a realização da análise ultra-estrutural os COC's foram fixados em glutaraldeído 2% em 0,1M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por 90 minutos a 38°C e estocado em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M/sucrose 0,2M a 4°C até o processamento das amostras. Na sequência, as amostras foram lavadas três vezes em solução salina 0,9% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 24 horas. Em seguida foram novamente lavadas em solução salina 0,9%, coradas em acetato de uranila 0,5% “overnight” e transferidas para uma gota contendo ágar. O material foi armazenado a 4°C até a formação do “pelet”, o qual foi recortado e novamente colocado em acetato de uranila 0,5% “overnight”. Ao término desta etapa as amostras foram desidratadas em uma série graduada de acetona Merck® (30-100%) e incluídas em Araldite 502. Após a inclusão, o material foi levado para estufa a 60°C onde permaneceram por 72 horas para polimerização da resina. Na sequência, os blocos foram removidos da forma de inclusão e trimados para a retirada do excesso de resina (Figura 5 A,B,C). Em seguida foram feitos cortes semi-finos e ultra-finos no ultramicrotomo (Figura 5 D e E). Os cortes semi-finos foram realizados com navalha de vidro a uma espessura de 500nm. A cada avanço de 5µm realizava-se

uma lâmina, corada com azul de toluidina a 0,25% em solução aquosa de borato de sódio a 1%, para verificação da região do corte. Assim que a região do *cumulus* era ultrapassada, a espessura do corte era reduzida para 200nm e a cada avanço de 2 μ m, os cortes eram colhidos e montados em lâmina de vidro, corados e observados para verificação da proximidade da região do núcleo (Figura 6). Quando a lâmina revelava a proximidade ou presença do núcleo, a espessura do corte era novamente reduzida para 100nm, trocava-se a navalha de vidro pela de diamante para realização de cortes ultrafinos (50 -70nm), os quais eram montados em grades de cobre oval 2x1, revestidas com parlódio (apêndice 4), e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo antes de serem analisadas no microscópio eletrônico de transmissão da marca JEOL e modelo 1010, instalado na FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal (Figura 5F).

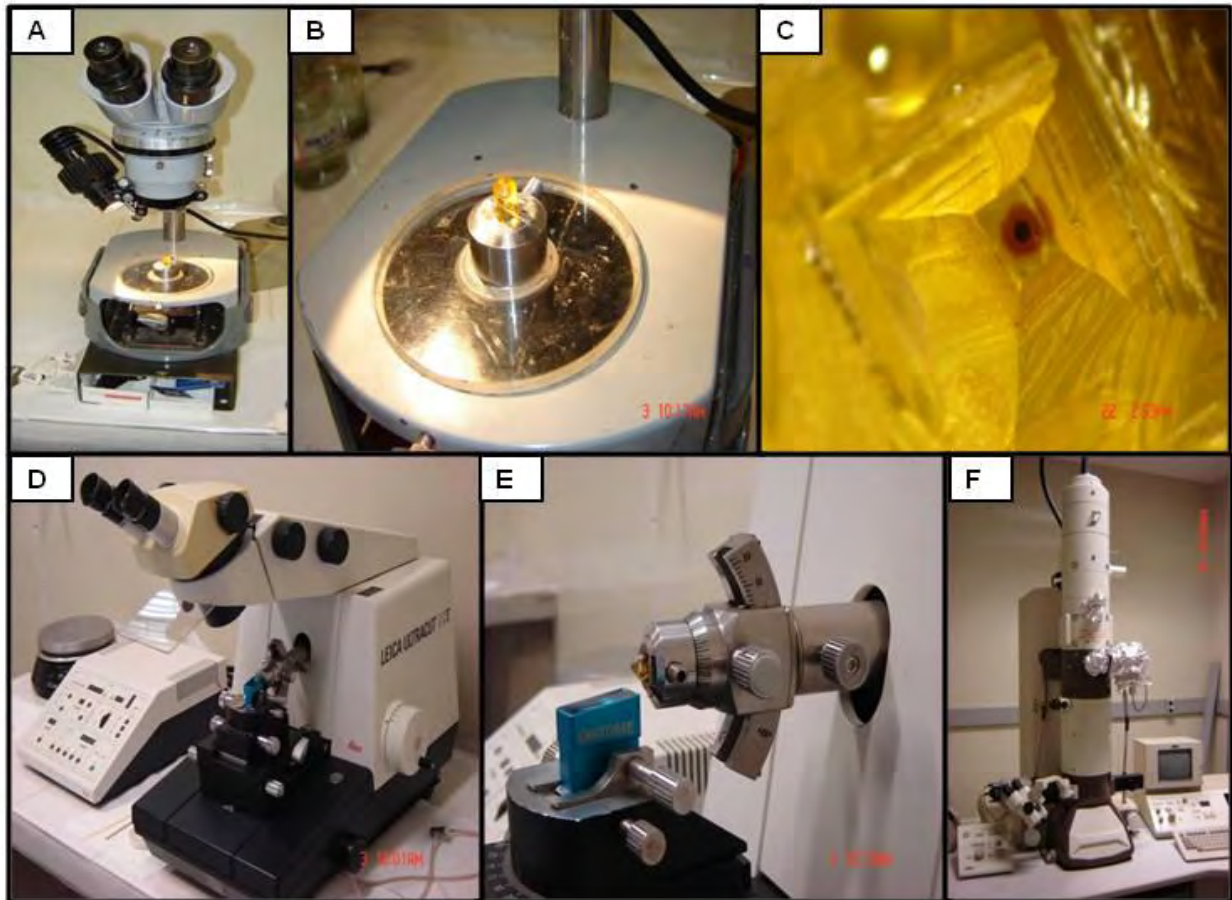


Figura 5. A e B: Aparelho utilizado para realizar a trimagem do bloco. C: Pirâmide obtida após a trimagem. D: Aparelho ultramicrotomo Leica E: Bloco de resina sendo cortado pela navalha de diamante. F: Microscópio eletrônico de transmissão da marca JEOL e modelo 1010, instalado no Câmpus da FCAV/UNESP, Jaboticabal.

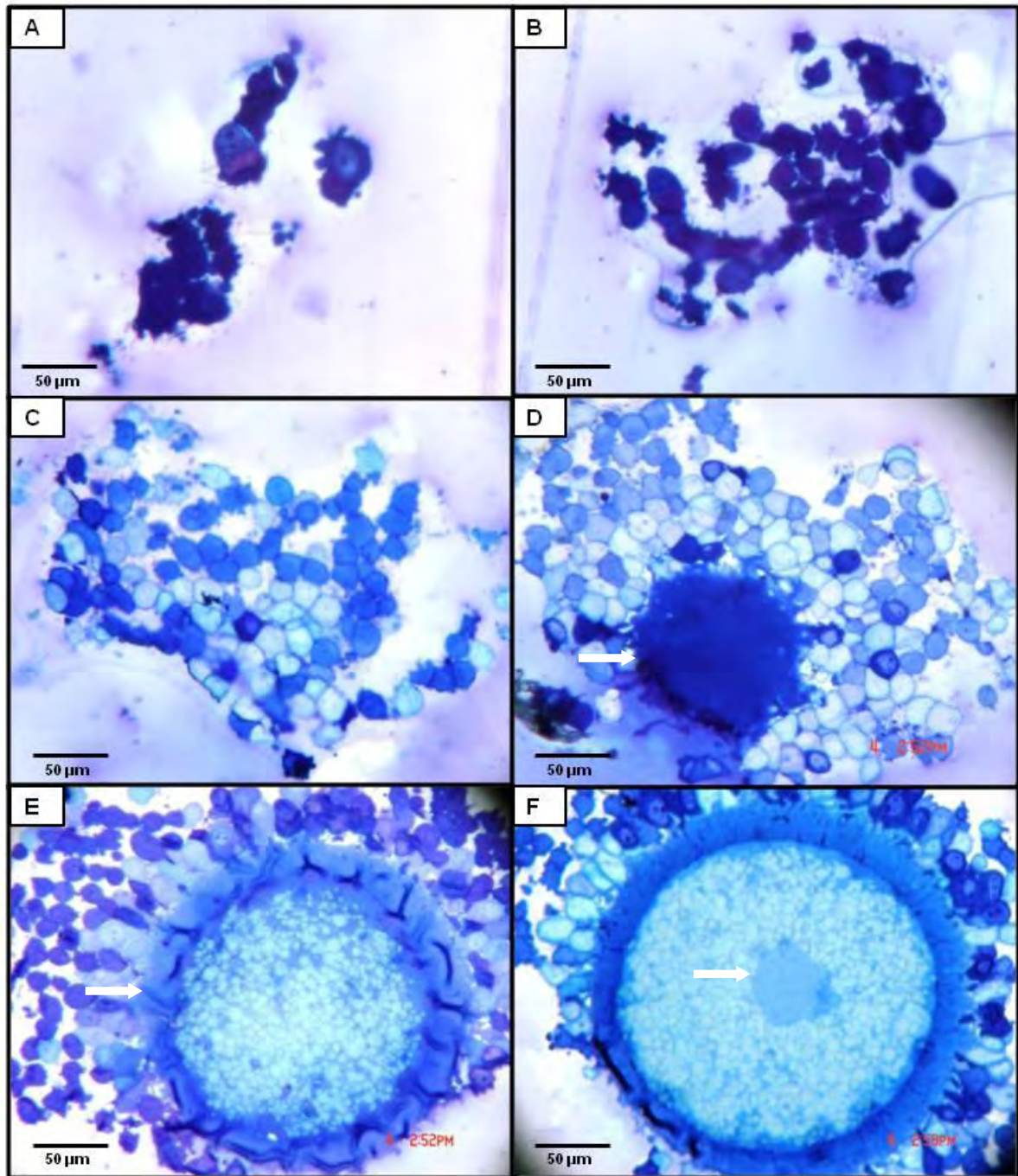


Figura 6. Seqüência de cortes semi-finos e ultra-finos, corados com azul de toluidina a 0,25% em solução aquosa de borato de sódio a 1%, desde as células do *cumulus* até a região do núcleo no interior do oócito de fêmeas caninas (Microscópio de luz, aumento 40X). **A,B e C:** Progressão dos cortes na região do *cumulus*. **D:** A seta indica a zona pelúcida, ou seja, a região das células do *cumulus* foi ultrapassada. **E:** Oócito canino, com células do *cumulus*, zona pelúcida ao redor do oócito (indicado pela seta) e o ooplasma. **F:** Oócito com material nuclear apontado pela seta.

3.6.1.1 – Análise das amostras da MET

A microscopia eletrônica de transmissão nos permite analisar características ultra-estruturais capazes de diferir oócitos não maduros de oócitos maduros *in vitro* (tanto para maturidade nuclear quanto para a citoplasmática).

Dessa forma, os oócitos separados aleatoriamente para análise através da MET foram avaliados quanto aos seguintes parâmetros segundo MARTINS (2008), VIARES DE LESEGNO et al. (2008b) e HYTTEL et al. (1986):

- Distribuição dos grânulos corticais e mitocôndrias
- Presença de junções do tipo GAP entre as células do *cumulus* e oócito
- Grau de involução do complexo de Golgi
- Presença de microvilosidades e gotas de lipídio
- Avaliação da maturidade nuclear através da análise da *configuração* nuclear (VG, QVG, MI, MII e Degenerados).
- Análise da posição nuclear no interior do citoplasma do oócito canino, conforme esquema mostrado na Figura 7.
- Análise dos diâmetros do oócito com e sem zona pelúcida, diâmetro do núcleo e nucléolo, diâmetro das camadas das células do *cumulus* e espessura da zona pelúcida. As medidas foram realizadas usando software Motic Images Plus versão 2.0.

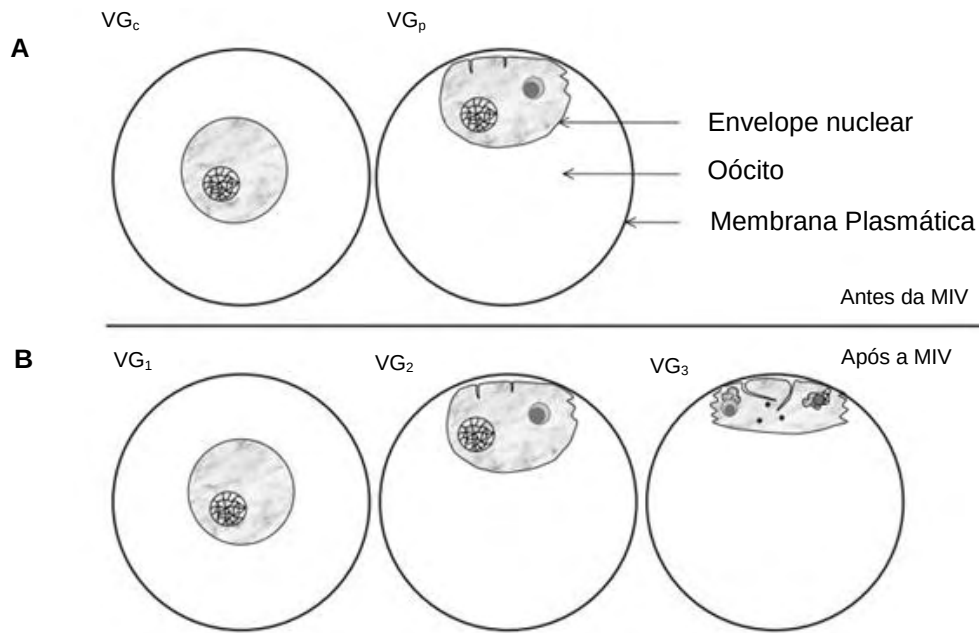


Figura 7: Esquema adaptado de VIARIS DE LESEGNO et al.(2008b) utilizado para classificar a VG de oócitos recém-colhidos e não maturados (A) e oócitos que permaneceram em VG após o processo de maturação *in vitro* (B). **A:** Antes da maturação *in vitro* a VG_c revela núcleo central arredondado com grande nucléolo reticulado. E VG_p apresenta núcleo ligeiramente achatado disposto na periferia do oócito e nucléolo em vários estágios de condensação da cromatina. **B:** Após a maturação *in vitro* a VG pode ser classificada em três diferentes padrões: VG₁ com grande núcleo arredondado e central. VG₂ núcleo periférico, ligeiramente achatado e nucléolo não se apresenta envolto por cromatina condensada. VG₃ núcleo periférico, achatado e nucléolo envolto por cromatina condensada.

3.6.2 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As etapas de processamento em microscopia eletrônica de varredura foram realizadas utilizando uma adaptação da técnica já utilizada no Laboratório da MEV da UNESP/Jaboticabal com algumas modificações.

Para a realização da análise ultra-estrutural os COC's foram fixados em glutaraldeído 2% em 0,1M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por 90 minutos a 38°C e estocado em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M/sucrose 0,2M a 4°C até o processamento das amostras. Na sequência, as amostras foram lavadas três vezes em solução salina 0,9% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 4 horas. Após esta etapa as amostras foram lavadas em solução salina 0,9%, desidratadas em uma série graduada de acetona Merck ® (30-100%) e secas em secador de ponto crítico. Em seguida foram montadas em “stubs”, e metalizadas em ouro, para posterior avaliação no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 5410, instalado no *Câmpus* da FCAV/UNESP, Jaboticabal (Figura 8).



Figura 8: Etapas efetuadas durante a realização da técnica de microscopia eletrônica de varredura em oócitos de cadela. **A:** Desidratação dos oócitos executada em cápsulas de micropore. **B:** Secador de ponto crítico. **C:** Aparelho de metalização Denton Vacuum. **D:** Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM 5410.

3.6.2.1 – Análise das amostras da MEV

Devido à escassez de estudos com microscopia eletrônica de varredura em oócitos caninos (HAENISCH-WOEHL et al., 2003), a metodologia utilizada para análise das amostras foi desenvolvida ao longo desta pesquisa. Sendo assim, os oócitos aleatoriamente separados para a MEV foram avaliados quanto aos seguintes parâmetros segundo HAENISCH-WOEHL et al. (2003):

1. Arranjo (Figura 9 A e B) e forma das células do *cumulus* (Figura 9 E).
2. Processos emitidos entre as células do *cumulus* e destas células para a zona pelúcida. Dentro deste item dividiu-se os processos em longos e curtos (Figura 9 C e D).
3. A intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* (Figura 10).
4. E quando possível, as características da zona pelúcida (Figura 11). Nesta etapa avaliou-se não somente a zona pelúcida como também as porcentagens de células do *cumulus* perdidas pelo oócito (Figura 12), visto que, a zona pelúcida somente pode ser avaliada quando o oócito apresentava-se parcial ou totalmente desnudo.

A avaliação foi qualitativa e quantitativa, para tal estipulou-se uma escala para estabelecer não somente a intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* como também a porcentagem de perda destas células (quadro 3). Posteriormente estes dados foram transformados em valores absolutos para se proceder a análise estatística, conforme mostra o (quadro 2).

OBS: A análise estatística da MEV foi feita exclusivamente para a intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*.

Quadro 2: Escala de intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* do oócito canino – Jaboticabal, 2010.

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

Quadro 3: Escala de intensidade de perda de células do *cumulus* da superfície do oócito canino – Jaboticabal, 2010.

Nula	-
Baixa	+
Média	++
Intensa	+++
Muito intensa	++++

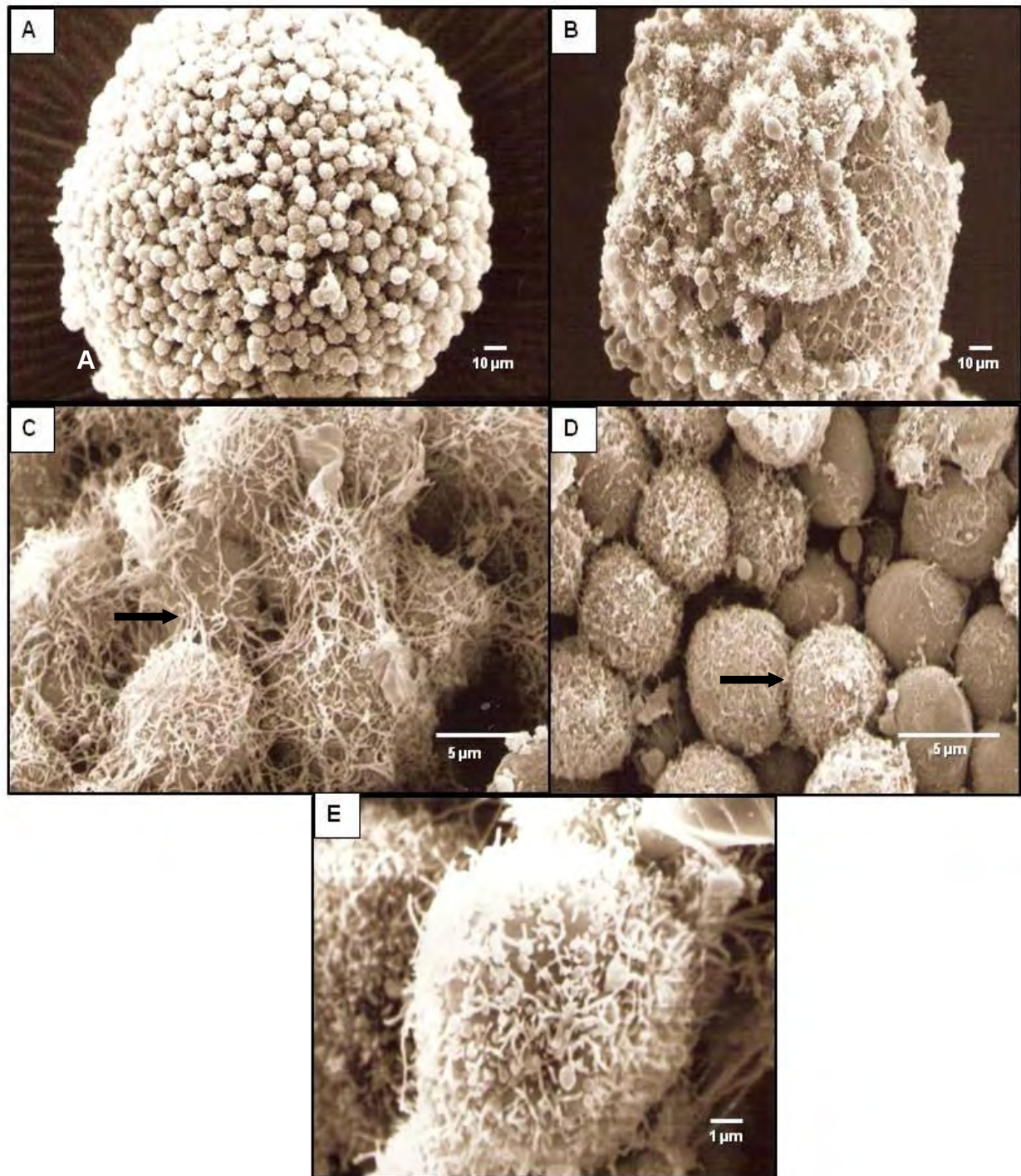


Figura 9: Eletronmicrografia de varredura do complexo *cumulus*-oócito de fêmea canina onde se observa: **A:** Células do *cumulus* dispostas regularmente ao redor do oócito (aumento 750 x). **B:** Células do *cumulus* dispostas irregularmente ao redor do oócito (aumento 750 x). **C:** Comunicação entre as células do *cumulus* através de longos processos emitidos entre estas células (seta) (aumento 5000 x). **D:** Comunicação entre as células do *cumulus* através de curtos processos emitidos entre estas células (seta) (3500 x). **E:** Forma arredondada das células do *cumulus* ao redor do oócito (7500 x).

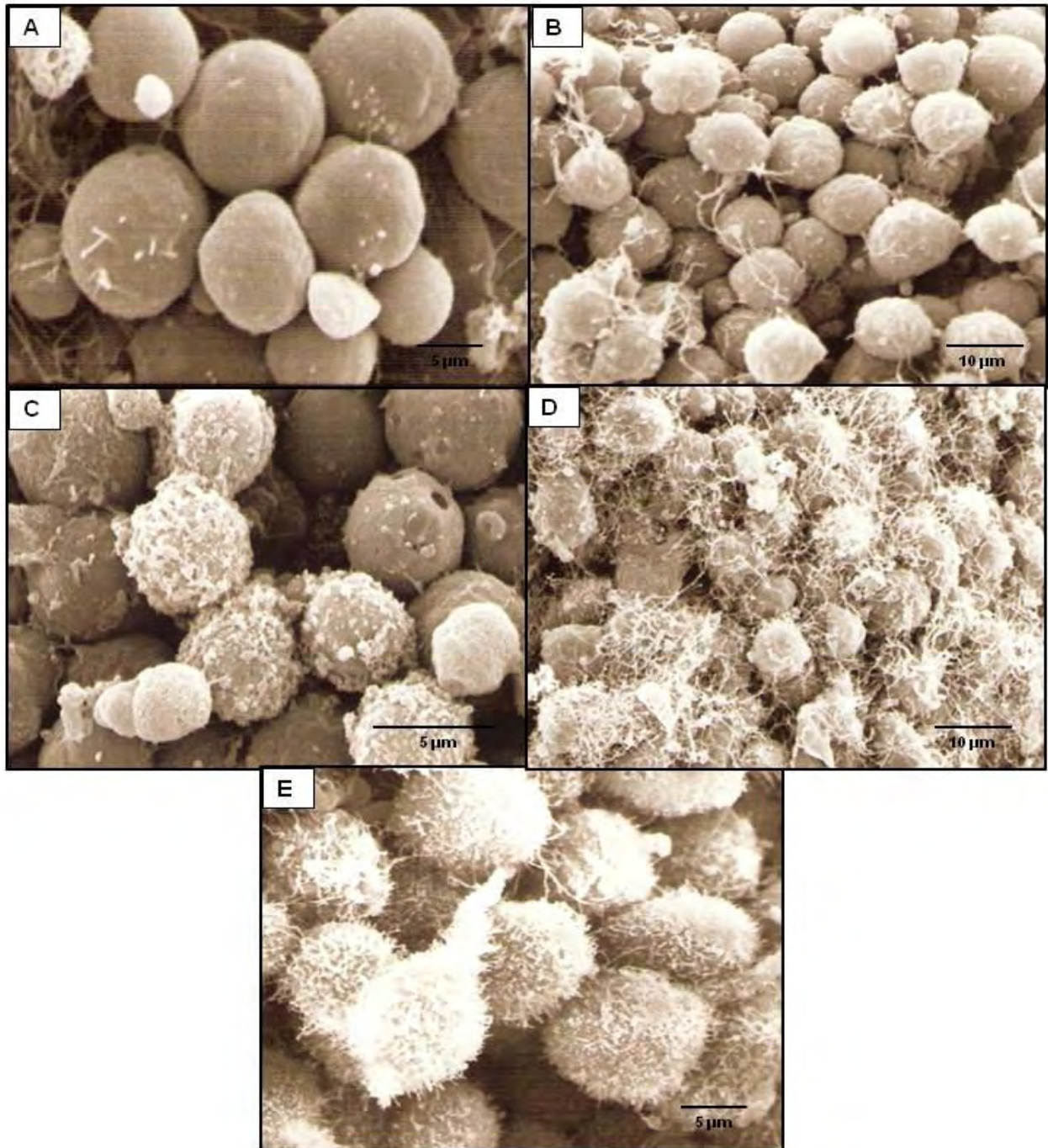


Figura 10: Eletronmicrografia de varredura do complexo *cumulus*-oócito de fêmeas caninas demonstrando os parâmetros utilizados para se estabelecer a escala de intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*. **A:** Nenhum processo emitido entre as células do *cumulus* (-) (aumento 3500 x). **B:** Poucos processos emitidos entre as células do *cumulus* (+) (aumento 2000 x). **C:** Quantidade moderada de processos emitidos entre as células do *cumulus* (++) (aumento 2000 x). **D:** Intensa quantidade de processos emitidos entre as células do *cumulus* (+++) (aumento 2000 x). **E:** Quantidade muito intensa de processos emitidos entre as células do *cumulus* (+++++) (aumento 3500 x).

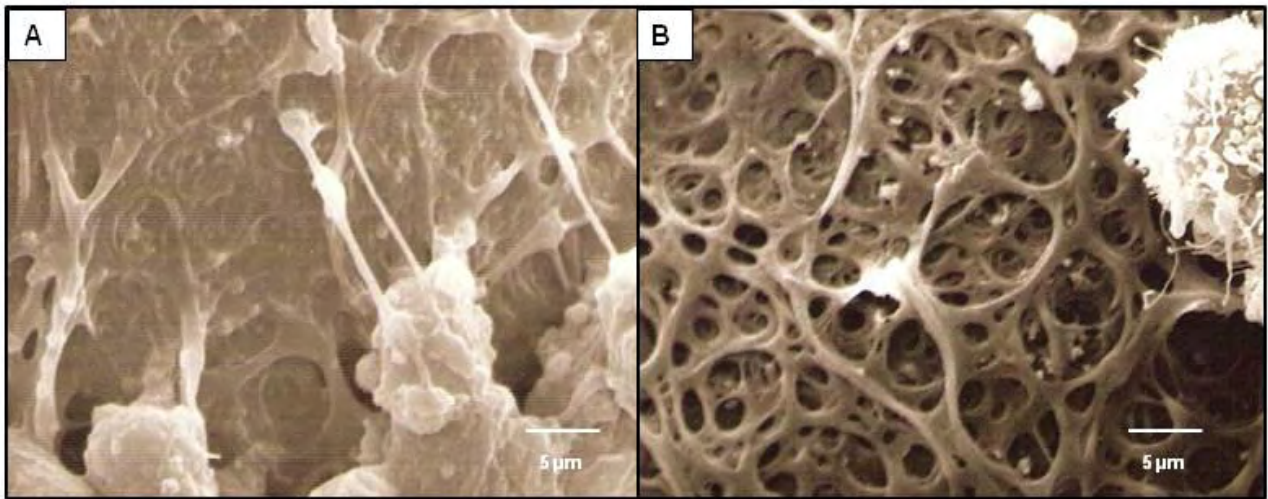


Figura 11: Eletronmicrografia de varredura de complexo *cumulus*-oócito de fêmeas caninas, demonstrando ausência de células do *cumulus* em partes do oócito, onde pode-se verificar diferentes características da zona pelúcida. **A:** Zona pelúcida com aspecto espongiforme e poros estreitos (aumento 3500 x) **B:** Zona pelúcida com aspecto espongiforme e numerosos e largos poros elípticos e esféricos (aumento 3500 x).

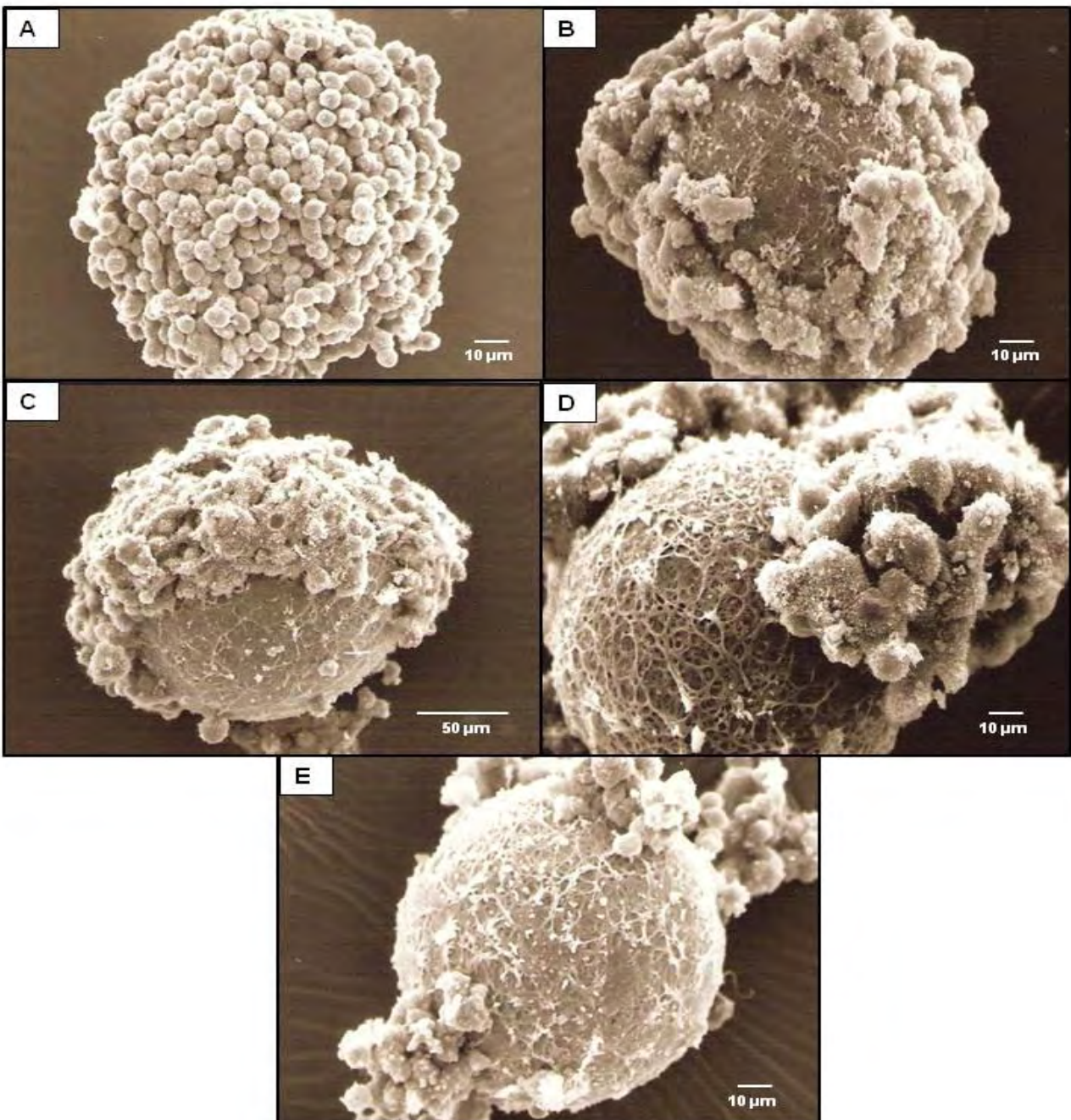


Figura 12: Eletronmicrografia de varredura de complexo *cumulus*-oócito de fêmeas caninas demonstrando os parâmetros utilizados para estabelecer a escala de intensidade de perda de células do *cumulus*. **A:** Perda de células do *cumulus* nula (-) (aumento 750 x). **B:** Baixa perda de células do *cumulus* (+) (aumento 750 x). **C:** Mediana perda de células do *cumulus* (++) (aumento 500 x). **D:** Intensa perda de células do *cumulus* (+++) (aumento 1000 x). **E:** Perda de células do *cumulus* de forma muito intensa, oócito quase desnudo por completo (++++) (aumento 750 x).

3.7 - Análise estatística

A análise estatística será apresentada separadamente para os experimentos I, II, III e IV.

3.7.1 – Experimento I - “Análise da distribuição do diâmetro oocitário de acordo com o status reprodutivo de fêmeas caninas”.

Para se evidenciar diferença nas proporções de oócitos com diâmetros maiores ou menores que 110µm, dentro de cada fase e entre elas, utilizou-se o teste T de Student. Para o emprego desse teste, verificou-se previamente que as amostras apresentavam distribuição normal através da Prova de Kolmogorov-Smirnov (K-S).

3.7.2 – Experimento II – “Influência da condição reprodutiva (FO- Fase Folicular e AN- Anestro) sobre a morfologia do complexo cumulus-oócito”.

- Análise dos dados obtidos por microscopia eletrônica de varredura

O Teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras vinculadas (uma só variável e duas amostras comparadas) foi utilizado na Comparação *in vivo* entre os processos curtos e longos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos para as fases folicular e anestro. O Teste não-paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes foi utilizado na comparação *in vivo* entre as diferentes fases do ciclo estral para os processos curtos e longos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos de cadelas.

Para ambos os testes, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

- Análise dos dados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão

O Teste t-Student foi utilizado para verificar se ocorreram diferenças significativas entre os diâmetros do oócito com e sem a zona pelúcida, diâmetro do núcleo e nucléolo, espessura da zona pelúcida e por fim diâmetro das células do *cumulus* nas diferentes fases do ciclo reprodutivo. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.7.3 – Experimento III – “Avaliação das características morfológicas do complexo cumulus-oócito provenientes de fêmeas caninas em fase folicular e anestro após o processo de maturação *in vitro* em diferentes meios de cultivo”.

- Análise dos dados obtidos por microscopia eletrônica de varredura

O Teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras vinculadas (uma só variável e duas amostras comparadas) foi utilizado na comparação entre os processos curtos e longos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos de cadelas em fase folicular (FO) e anestro (AN) cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal e meio suplementado com P_4 , E_2 e LH (meio B). O Teste não-paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes foi utilizado na comparação entre as diferentes fases do ciclo estral (folicular x anestro) para os processos curtos e longos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos de cadelas cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal e meio suplementado com P_4 , E_2 e LH (meio B).

Para ambos os testes, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

- Análise dos dados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão

O Teste t-Student foi utilizado para verificar se ocorreram diferenças significativas entre os diâmetros do oócito com e sem a zona pelúcida, diâmetro do núcleo e nucléolo, espessura da zona pelúcida e por fim diâmetro das células do *cumulus* comparando as diferentes fases e os diferentes meios de maturação. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.7.4 - EXPERIMENTO IV - *“Efeito da suplementação hormonal no meio de cultivo sobre a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de fêmeas caninas obtidos em diferentes fases do ciclo estral”*

O Teste não-paramétrico χ^2 (qui-quadrado) para amostras independentes foi utilizado nas seguintes situações:

- comparação entre os meios de cultivo A e B, dentro de cada fase do ciclo reprodutivo (fase folicular e anestro) para os estádios de maturação nuclear (VG, QVG, MI, MII, Retomada da meiose QVG-MII e Degenerados) e citoplasmática (Imaturos, Transição e Maturos)..
- comparação dos meios de cultivo (meio A e meio B) entre as fases folicular e anestro para cada estágio de maturação nuclear e citoplasmática.

4. RESULTADOS

No presente estudo foram utilizados ovários de 30 cadelas, sendo 15 na fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN). O número total de COC's grau I recuperados foi de 1106, sendo 878 oócitos $\geq 110\mu\text{m}$ e 228 $< 110\mu\text{m}$ de diâmetro. Para o experimento I foi utilizado o total de COC's recuperados, ou seja, 1106 oócitos, para análise da distribuição do diâmetro oocitário de acordo com o *status* reprodutivo das fêmeas caninas. Entretanto, para a realização dos demais experimentos (II, III e IV) foram utilizados apenas os COC's com diâmetro maior ou igual a $110\mu\text{m}$ (878 oócitos).

As freqüências absolutas e relativas (%) de COC's recuperados, bem como a média de oócito fornecido por cada fêmea pertencente aos grupos FO e AN encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Frequência absoluta e relativa (%) de COC's Grau I e com diâmetro igual ou superior a $110\mu\text{m}$ recuperados de 30 fêmeas caninas, sendo 15 na fase folicular e 15 em anestro e a média de oócito fornecido por cada fêmea – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Frequência Absoluta e Relativa (%)		
	Folicular (FO)	Anestro (AN)	Total
COC's grau I	584 (100)	522 (100)	1106 (100)
COC's grau I $\geq 110\mu\text{m}$	479 (82)	399 (76,4)	878 (79,38)
Média de COC's por fêmea	38,93	34,8	

A seguir são apresentados separadamente os resultados dos Experimentos I, II, III e IV.

4.1- EXPERIMENTO I - “Análise da distribuição do diâmetro oocitário de acordo com o status reprodutivo de fêmeas caninas”.

Na tabela 4 são apresentados os resultados da distribuição do diâmetro oocitário dentro de cada fase reprodutiva (fase folicular – FO e anestro – AN). E na tabela 5, os dados referentes às médias, desvio padrão e coeficiente de variação de COC's com diâmetro $\geq 110 \mu\text{m}$ e $< 110 \mu\text{m}$ provenientes de fêmeas na fase folicular e anestro.

Tabela 4. Frequência absoluta e relativa (%) de COC's Grau I e com diâmetro $< 110 \mu\text{m}$ e $> 110 \mu\text{m}$, obtidos de ovários de fêmeas caninas em fase folicular (FO) e anestro (AN)- Jaboticabal, 2010.

Estádios	nº COC's Grau I	nº COC's diâm.	nº COC's
reprodutivos		$\geq 110 \mu\text{m}$	diâm. $< 110 \mu\text{m}$
Folicular (FO)	584	479	105
Anestro (AN)	522	399	123
Total de oócitos	1106	878	228

Tabela 5. Média, desvio padrão e coeficiente de variação de COC's com diâmetro $\geq$ ou $<$ que 110 μ m, recuperados de fêmeas caninas em fase folicular (FO) e anestro (AN) – Jaboticabal, 2010.

Estádio Reprodutivo						
Diâmetro	Fase folicular (FO)			Anetro (AN)		
	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação
<110μm	0,18 ^a	0,11	54,74%	0,236 ^a	0,09	41,04%
$\geq$110μm	0,82 ^b	0,11	13,87%	0,764 ^b	0,09	12,14%

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$).

Os resultados demonstraram que as porcentagens de oócitos com diâmetro inferior a 110 μ m foram 18% e 23,6% e para diâmetro superior a 110 μ m foram 82% e 76,4%, respectivamente para fase folicular (FO) e anestro (AN). A análise dos dados revelou não haver diferença entre as condições reprodutivas quando se compara classe de oócitos de mesmo diâmetro. Porém, quando se analisa proporções de oócitos com diâmetros maiores e menores que 110 μ m dentro da mesma condição reprodutiva verificou-se diferença ($p < 0,05$).

4.2 - EXPERIMENTO II - “Influência do status reprodutivo de fêmeas caninas (FO-Fase folicular e AN-Anestro) sobre a morfologia do complexo cumulus-oócito”

O experimento II consistiu em analisar as características morfológicas dos complexos *cumulus*-oócitos recém colhidos de fêmeas caninas em diferentes estádios reprodutivos através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Assim, os resultados são apresentados separadamente de acordo com a técnica utilizada, de tal forma que os resultados da avaliação das características morfológicas dos complexos *cumulus*-oócitos recém colhidos de fêmeas caninas em fase folicular (FO) ou anestro (AN) por microscopia eletrônica de varredura estão dispostos no item 4.2.1 e por microscopia eletrônica de transmissão no item 4.2.2.

4.2.1 – Avaliação da morfologia do complexo cumulus-oócito recém colhido, proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), por microscopia eletrônica de varredura.

No total foram separados randomicamente 64 oócitos Grau I, advindos de animais em fase folicular (FO) e 55 oócitos Grau I de animais em anestro (AN), para serem avaliados pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (recém colhidos, ou seja zero hora). As frequências absolutas e relativas estão na tabela 6.

Tabela 6 - Frequência absoluta e relativa (%) de COC's recém colhidos provenientes de 15 fêmeas caninas em Fase Folicular (FO) e 15 em Anestro (AN), para avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Fase Folicular (FO)		Anestro (AN)	
	Frequência		Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)	Absoluta	Relativa (%)
COC Grau I	64	100	55	100
Avaliados	40	62,5	31	63,3
Perdidos	24	37,5	24	43,6

Como pode ser observado na tabela 6, do total de 64 oócitos separados para a MEV pertencentes ao grupo FO (Fase Folicular), 24 (37,5%) foram perdidos durante o procedimento, e 40 foram analisados. E do total de 55 oócitos pertencentes ao grupo AN (Anestro), 24 (43,6%) foram perdidos. As perdas ocorreram essencialmente durante a secagem do material no secador de ponto crítico e durante a metalização.

Nas tabelas 7 e 8 estão apresentados respectivamente, os parâmetros avaliados através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, de oócitos recém colhidos (zero hora) pertencentes ao grupo FO e AN.

Tabela 7 – Complexos *cumulus*-oócitos canino, recém colhidos, pertencentes ao grupo FO (Fase Folicular), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do *cumulus*, bem como, processos longos e curtos emitidos entre estas células – Jaboticabal, 2010.

COC's avaliados	Arranjo CC	Forma CC	Processos emitidos entre CC	
			Longos	Curtos
1	Regularmente	Arredondada	-	+++
2	Regularmente	Arredondada	-	+++
3	Regularmente	Arredondada	+	+++
4	Regularmente	Arredondada	+	+++
5	Regularmente	Arredondada	++	+++
6	Regularmente	Arredondada	++	+
7	Regularmente	Arredondada	++	++
8	Regularmente	Arredondada	+	+
9	Regularmente	Arredondada	++	++++
10	Regularmente	Arredondada	++	++++
11	Regularmente	Arredondada	+	+++
12	Regularmente	Arredondada	++	++
13	Regularmente	Arredondada	++	+++
14	Regularmente	Arredondada	++	+++
15	Regularmente	Arredondada	++	+++
16	Regularmente	Arredondada	+	+++
17	Regularmente	Arredondada	+	++

Continuação da tabela 7

18	Regularmente	Arredondada	++	+++
19	Regularmente	Arredondada	-	++
20	Regularmente	Arredondada	+	++
21	Regularmente	Arredondada	+	++
22	Regularmente	Arredondada	++	++
23	Regularmente	Arredondada	-	++
24	Regularmente	Arredondada	-	+++
25	Regularmente	Arredondada	-	+++
26	Regularmente	Arredondada	-	+
27	Regularmente	Arredondada	-	+
28	Regularmente	Arredondada	-	+
29	Regularmente	Arredondada	+	+++
30	Regularmente	Arredondada	+	+++
31	Regularmente	Arredondada	++	++
32	Regularmente	Arredondada	++	++
33	Regularmente	Arredondada	+	+
34	Regularmente	Arredondada	++	++
35	Regularmente	Arredondada	++	+++
36	Regularmente	Arredondada	-	-
37	Regularmente	Arredondada	++++	++++
38	Regularmente	Arredondada	++++	++++
39	Regularmente	Arredondada	+++	+++
40	Regularmente	Arredondada	+++	+++

Intensidade dos processos emitidos entre as células do *cumulus*: Nenhum (-); Pouco (+); Moderado (++); Intenso (+++); Muito intenso (++++).

Tabela 8 – Complexos *cumulus*-oócitos canino, recém colhidos, pertencentes ao grupo AN (Anestro), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do *cumulus*, bem como, processos longos e curtos emitidos entre estas células – Jaboticabal, 2010.

COC's avaliados	Arranjo CC	Forma CC	Processos emitidos entre CC	
			Longos	Curto
1	Regular	Arredondada	+++	++
2	Regular	Arredondada	+++	++
3	Regular	Arredondada	++	+++
4	Regular	Arredondada	+	++
5	Regular	Arredondada	+++	+++
6	Regular	Arredondada	++	+++
7	Regular	Arredondada	-	-
8	Regular	Arredondada	+	++
9	Regular	Arredondada	+	+++
10	Regular	Arredondada	+	+++
11	Regular	Arredondada	++	+++
12	Regular	Arredondada	++	++
13	Regular	Arredondada	+	++++
14	Regular	Arredondada	-	++
15	Regular	Arredondada	+	++
16	Regular	Arredondada	+	+++
17	Regular	Arredondada	++	++

Continuação da tabela 8

18	Regular	Arredondada	+	+++
19	Regular	Arredondada	+++	+++
20	Regular	Arredondada	+	+++
21	Regular	Arredondada	+++	+++
22	Regular	Arredondada	-	++
23	Regular	Arredondada	++	+++
24	Regular	Arredondada	+++	+
25	Regular	Arredondada	++	+
26	Regular	Arredondada	++	+
27	Regular	Arredondada	++++	++++
28	Regular	Arredondada	+++	++++
29	Regular	Arredondada	++	+++
30	Regular	Arredondada	+++	+++
31	Regular	Arredondada	+++	+++

Intensidade dos processos emitidos entre as células do *cumulus*: Nenhum (-); Pouco (+); Moderado (++); Intenso (+++); Muito intenso (++++)

Analisando as médias nas tabelas 7 e 8, verificou-se que independente da condição reprodutiva, as células do *cumulus* de oócitos recém colhidos apresentam forma arredondada e arranjo regular.

Com relação aos processos emitidos entre as células do *cumulus*, a Figura 13 mostra a distribuição de processos longos e curtos de oócitos recém colhidos provenientes de cadelas em fase folicular e anestro apresentadas nas tabelas 7 e 8.

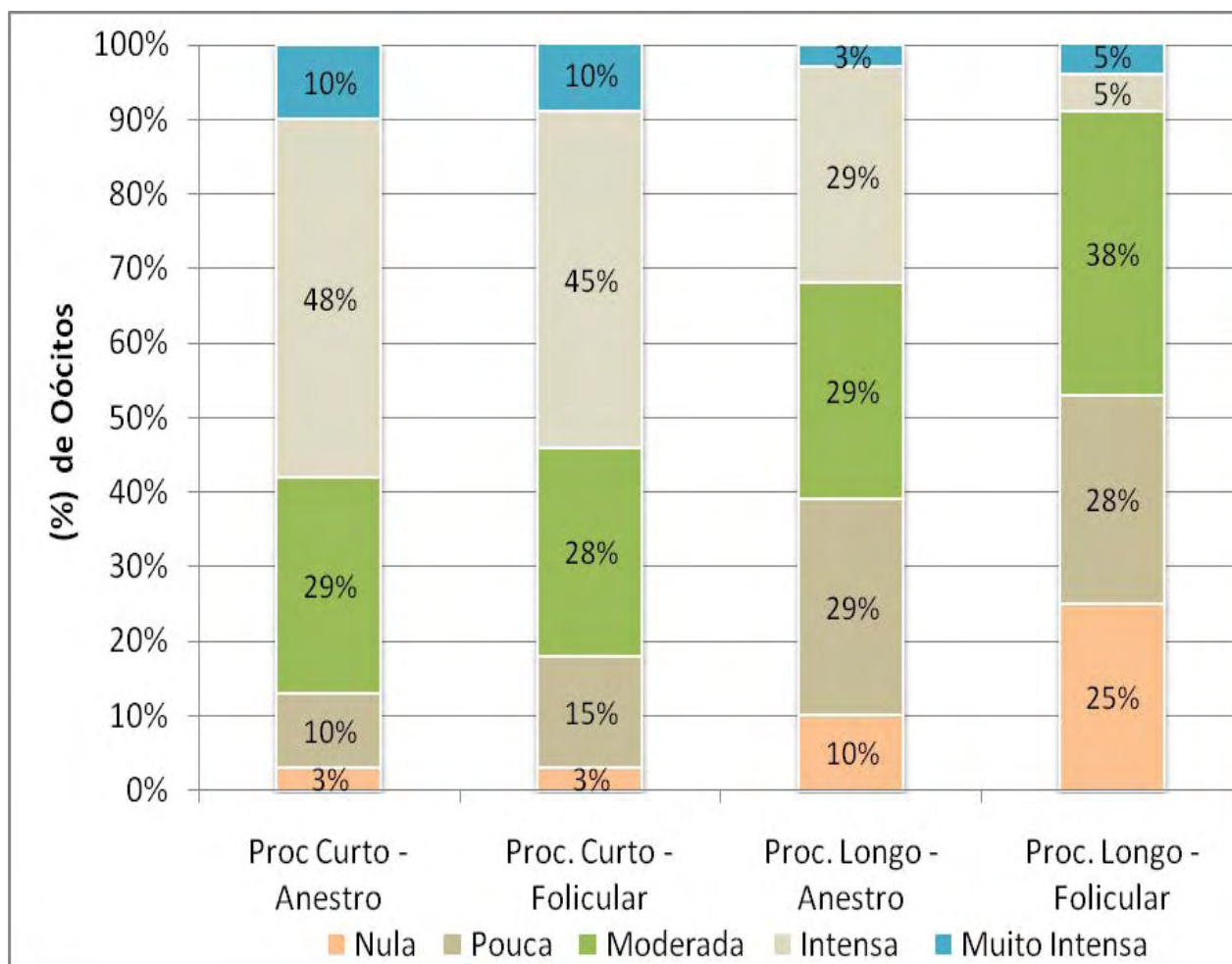


Figura 13 – Intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* estabelecida através de processos longos e curtos em oócitos recém colhidos (Oh) provenientes de cadelas em fase folicular e anestro - Jaboticabal, 2010.

Analisando-se a Figura 13, verificou-se que aproximadamente 50% dos oócitos provenientes de animais em fase folicular e anestro apresentaram processos curtos com grau intenso ou muito intenso de comunicação entre as células do *cumulus*. Sobre os processos longos, observa-se que cerca de 30% dos oócitos em ambas as fases do ciclo estral demonstraram pouco grau de comunicação. Com relação ao grau moderado de comunicação entre as células do *cumulus*, constatou-se distribuição praticamente

semelhante de oócitos da fase folicular e anestro, independentemente do tipo de processo (longo ou curto).

Na tabela 9 está apresentado o resultado da análise estatística comparando-se a intensidade de comunicação entre processos curtos e longos dentro de cada fase do ciclo estral para verificar se a comunicação em oócitos recém colhidos se faz predominantemente através de um determinado tipo de processo (longo ou curto). Na tabela 10 é apresentado o resultado da análise estatística comparando a intensidade de comunicação dos processos longos e curtos entre as fases do ciclo estral para verificar se as fases do ciclo se diferem quanto ao predomínio de um determinado tipo de comunicação.

Tabela 9 – Comparação entre os processos curtos e longos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos recém colhidos de cadelas em fase folicular (FO) e anestro (AN) – Jaboticabal, 2010.

Fases	Curtos X Longos
Folicular	Sim* (curtos > longos)
Anestro	Sim* (curtos > longos)

* As diferenças são consideradas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Wilcoxon (Teste não paramétrico – amostras vinculadas).

Tabela 10 - Comparação entre as diferentes fases do ciclo estral (folicular x anestro) para os processos curtos e longos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos recém colhidos de cadelas – Jaboticabal, 2010.

Processos emitidos pelas células do <i>cumulus</i>	Fase Folicular (FO) X Anestro(AN)
Curtos	Não houve diferença
Longos	Não houve diferença

* As diferenças são consideradas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Teste não paramétrico – amostras independentes).

Com base nos resultados apresentados nas tabelas 9 e 10, constatou-se que a comunicação de oócitos recém colhidos de cadelas, independente da condição reprodutiva, ocorre predominantemente através de processos curtos emitidos pelas células do *cumulus* ($p < 0,05$) (tabela 9). Comparando-se a intensidade de comunicação entre essas células através de processos longos e curtos nas diferentes fases do ciclo estral, podemos verificar que não há diferença entre as fases folicular e anestro ($p < 0,05$) (tabela 10). A partir do exposto, pode-se verificar que a comunicação entre as células do *cumulus* de oócitos recém colhidos, se estabelece de forma intensa através de processos curtos, independente da condição reprodutiva da cadela (FO ou AN), conforme mostra a Figura 14.

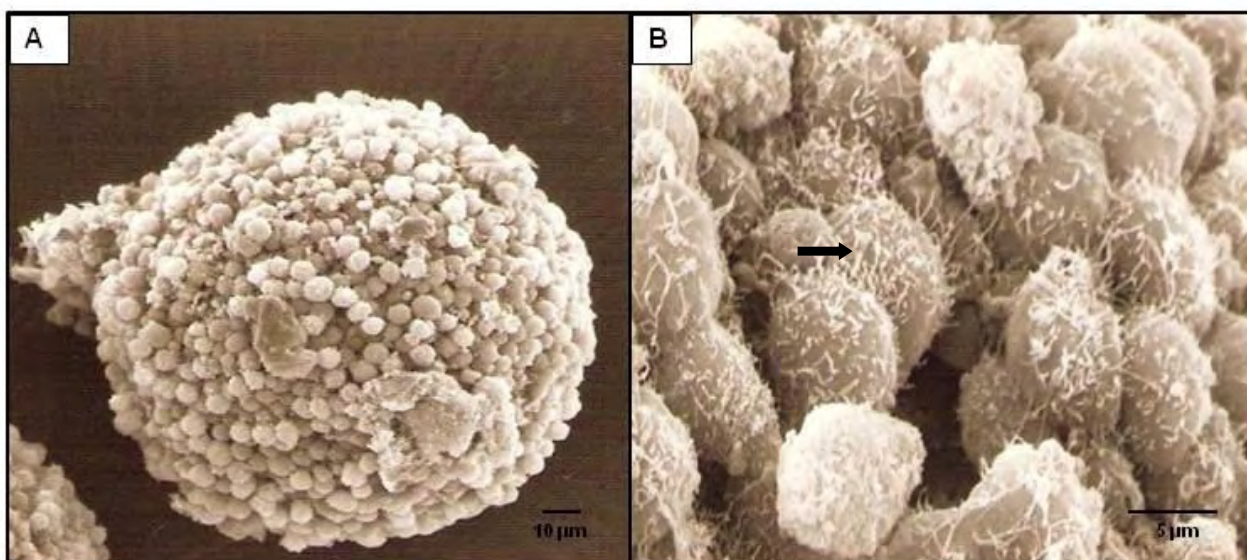


Figura 14: Eletronmicrografia de varredura de complexo *cumulus*-oócito recém colhido de fêmea canina demonstrando o arranjo e forma das células do *cumulus* bem como a intensidade de comunicação entre elas. **A:** Células do *cumulus* regularmente distribuídas ao redor do oócito (aumento 750 x). **B:** Células do *cumulus* arredondadas se comunicando de forma intensa através de processos curtos (seta) (aumento 3500 x).

4.2.2 - Avaliação da morfologia do complexo cumulus-oócito recém colhido, proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), por microscopia eletrônica de transmissão.

No total foram separados randomicamente 66 oócitos Grau I, advindos de animais em fase folicular (FO) e 53 oócitos Grau I de animais em anestro (AN), para serem avaliados pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (zero hora). As frequências absolutas e relativas estão na tabela 11.

Tabela 11 - Frequência absoluta e relativa (%) de COC's recém colhidos provenientes de 15 fêmeas caninas em Fase Folicular (FO) e 15 em Anestro (AN), para avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Fase Folicular (FO)		Anestro (AN)	
	Frequência		Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)	Absoluta	Relativa (%)
COC Grau I	66	100	53	100
Avaliados	13	19,7	15	28,3
Perdidos	53	80,3	38	71,7

Como pode ser observado na tabela 11, do total de 66 oócitos separados para a MET pertencentes ao grupo FO, 53 (80,3%) foram perdidos durante o processamento das amostras e 13(19,7%) foram avaliados. E do total de 53 oócitos pertencentes ao grupo AN, 38 (71,7%) foram perdidos e 15 (28,3%) foram avaliados. As perdas ocorreram durante o processamento das amostras nas etapas de inclusão, trimagem e ultramicrotomia.

Nas tabelas 12 e 13 estão apresentados, os dados referentes às médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes ao oócito com e sem a zona pelúcida, núcleo, nucléolo e camada das células do *cumulus* e espessura da zona pelúcida.

Tabela 12: Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes ao oócito com e sem a zona pelúcida e espessura da zona pelúcida de oócitos recém colhidos (0H) provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010.

0 HORA						
	Ø oócito sem zona pelúcida		Ø oócito com zona pelúcida		Ø zona pelúcida	
	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro
Ø médio (µm)	104,5	104,6	126,4	123,9	11,2	10,1
Ø máx. (µm)	123,9	119,4	141,0	140,8	15,5	12,3
Ø min. (µm)	80,6	86,6	107,3	102,4	8,0	8,0
Desvio padrão	13,4	9,1	11,4	10,6	2,3	1,2
CV (%)	12,8	8,7	9,0	8,6	21,0	11,8

Tabela 13: Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes à camada de células do *cumulus*, núcleo e nucléolo de oócitos recém colhidos (0H) provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010.

0 HORA						
	Ø células do <i>cumulus</i>		Ø núcleo		Ø nucléolo	
	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro
Ø médio (µm)	22,5	25,3	23,9	24,5	5,6	7,5
Ø máx. (µm)	45,6	40,8	34,3	29,0	8,1	11,4
Ø min. (µm)	13,1	17,3	11,6	16,8	2,3	3,3
Desvio padrão	8,8	7,2	5,9	4,3	2,5	2,2
CV (%)	39,3	28,7	24,7	17,6	45,0	29,1

A análise dos dados apresentados nas tabelas 12 e 13 permitem inferir que oócitos recém colhidos, provenientes de animais em fase folicular e anestro não diferem entre si quanto ao diâmetro do oócito com ou sem zona pelúcida, núcleo, nucléolo, camadas de células do *cumulus* e espessura da zona pelúcida.

Na tabela 14, os parâmetros avaliados através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, de oócitos recém colhidos (zero hora) pertencentes ao grupo FO e AN classificados quanto ao tipo VG (VG_c e VG_p).

Tabela 14 – Frequência absoluta e relativa (%) de COC's recém colhidos avaliados por microscopia eletrônica de transmissão pertencentes aos grupos FO (Fase folicular) e AN (Anestro), classificados quanto ao tipo de VG (VG_c, VG_p) antes do período de maturação (zero hora) – Jaboticabal, 2010.

Estádio reprodutivo	Parâmetros			
	VG _c	VG _p	Degenerado	Total
FO	8 (61,5)	5 (38,5)	0	13
AN	12 (80)	0	3 (20)	15

Analisando a tabela 14, pode-se observar que oócitos advindos de animais em anestro tendem a apresentar-se em menor grau de desenvolvimento nuclear e citoplasmático do que oócitos de animais em fase folicular. Tal fato pode ser confirmado, pelo alto índice de VG_c e ausência de oócitos em fase de VG_p. Com base nisto, segue as características ultra-estruturais de oócitos classificados em VG_c e VG_p pertencentes a animais em anestro e fase folicular.

Característica ultra-estrutural de oócito em VG_c pertencente ao grupo AN.

O oócito apresenta grande núcleo central (diâmetro) contendo grande nucléolo reticulado fibrilogramular, de forma arredondada, posicionado excentricamente e com escassos sinais de condensação de cromatina. Grandes gotas de lipídios presentes uniformemente no ooplasma. As mitocôndrias encontram-se densamente concentradas

na região cortical, embora possam ser visualizados pequenos agrupamentos no ooplasma. É comum a ocorrência de “*Cloud*” mitocondrial. Complexo de Golgi (CG) e retículo endoplasmático liso (REL) presentes em pequena quantidade localizam-se principalmente na região cortical ou perinuclear. Escassos grânulos corticais (GC) presentes em pequenos agrupamentos próximos a membrana plasmática ou isolados no ooplasma. A zona pelúcida com aparência homogênea apresenta-se infiltrada por grande quantidade de projeções emitidas pelas células do *cumulus* (GAPj), as quais terminam na membrana plasmática, formando um bulbo, os quais penetram no ooplasma. Raramente são visualizados GAPj com sinais de degeneração. É comum a visualização de organelas próximo a GAPj como retículo endoplasmático, complexo de golgi e grânulos corticais. Quantidade moderada de microvilosidade na membrana plasmática (Figura 15).

Característica ultra-estrutural de oócito em VG_c pertencente ao grupo FO.

Este grupo é bastante heterogêneo. O oócito apresenta grande núcleo central, podendo ser arredondado (1 oócito) ou ligeiramente achatado com pequenas ondulações no envelope nuclear (7 oócitos). O nucléolo pode apresentar-se com aspecto fibrilgranular reticulado (1 oócito), fibrilar denso com pequenos vacúolos (5 oócitos) ou fibrilar denso sem a presença de vacúolos (2 oócitos).

As gotas de lipídio estão presentes em grande quantidade, e geralmente são menores do que as observadas em oócitos VG_c do grupo em anestro. As organelas apresentam-se homogeneamente distribuídas pelo ooplasma. A quantidade de

mitocôndrias é bem variável. Alguns oócitos apresentam mitocôndrias em grande quantidade, organizadas em grupos no ooplasma, e menos concentradas na região cortical. Outros possuem mitocôndrias em menor quantidade, porém concentradas na região cortical. “Cloud” mitocondrial menos freqüentes do que em VG_c do grupo do anestro. CG e REL presentes em quantidade moderada na região cortical ou perinuclear. O REL, geralmente apresenta-se próximo a agrupamentos de mitocôndrias ou circundando gotas de lipídio. Os GC presentes em maior quantidade do que VG_c do grupo do anestro, podem ser visualizados alinhados próximo a membrana plasmática, ou agrupados no ooplasma. Zona pelúcida homogênea com grande quantidade de GAPj. Raramente são visualizados GAPj com sinais de degeneração. Presença de microvilosidades na membrana plasmática (Figura 16).

Característica ultra-estrutural de oócito em VG_p pertencente ao grupo FO.

Oócito apresentando núcleo ligeiramente achatado localizado na periferia contendo nucléolo reticulado fibrilogramular (2 oócitos) ou fibrilar denso com pequenos vacúolos (3 oócitos) e envelope nuclear com pequenas ondulações. Gotas de lipídios presentes uniformemente no ooplasma, e em menor tamanho do que as observadas VG_c de oócitos de animais em anestro. Oócito apresentando grande quantidade de mitocôndrias, geralmente organizadas em grandes agrupamentos no ooplasma e menos concentradas na região cortical. Não foi visualizado “Cloud” mitocondrial. A região cortical e perinuclear é rica em CG e REL. O CG, normalmente apresenta-se bem desenvolvido e o REL, geralmente está associado a agrupamentos de

mitocôndrias ou circundando gotas de lipídio. GC presentes em quantidade variável, podem ser visualizados alinhados, principalmente na região entre o núcleo e a membrana plasmática, ou agrupados no ooplasma. GAPj com sinais de degeneração são visualizadas com maior frequência e presença de microvilosidades na membrana plasmática. As células do *cumulus* apresentam-se com ligeira expansão do *cumulus* (Figura 17).

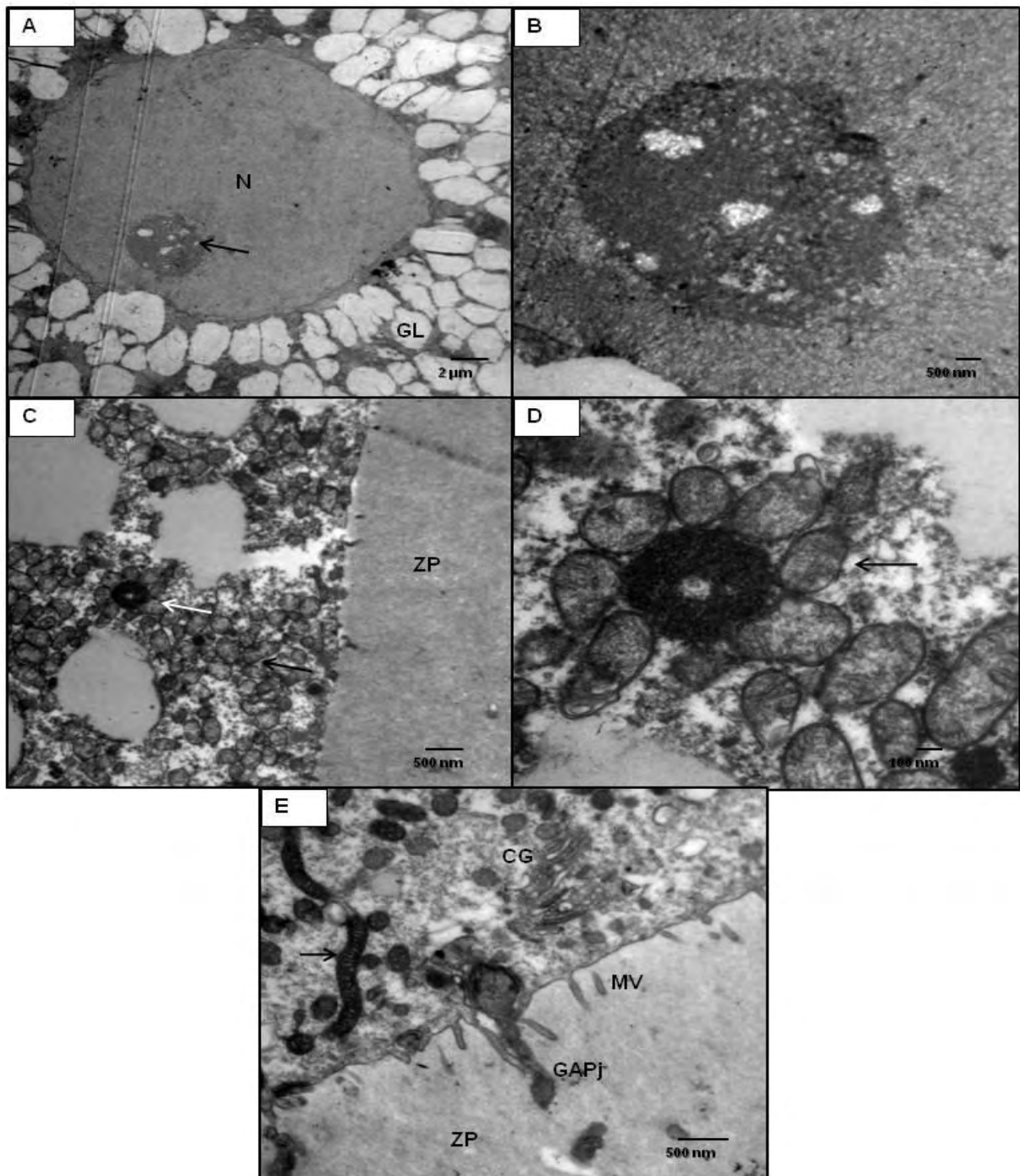


Figura 15: Eletromicrografia de transmissão oócito recém colhido de fêmea canina em anestro (VG_c). **A:** Grande núcleo arredondado (N) com nucléolo em posição periférica (seta), e presença de grandes gotas de lipídio (GL) (aumento 3000 x). **B:** Nucléolo reticular arredondado (aumento 12000 x). **C:** Mitocôndrias densamente concentradas próximo a zona pelúcida (ZP) e presença de “Cloud” mitocondrial (seta) (aumento 12000 x). **D:** “Cloud” mitocondrial (seta) (aumento 50000 x). **E:** Região próxima a zona pelúcida (ZP) apresentando Complexo de Golgi (CG) e mitocôndrias (seta) associadas a a junções do tipo GAP (GAPj) e moderada quantidade de microvilosidades (MV) (aumento 20000 x).

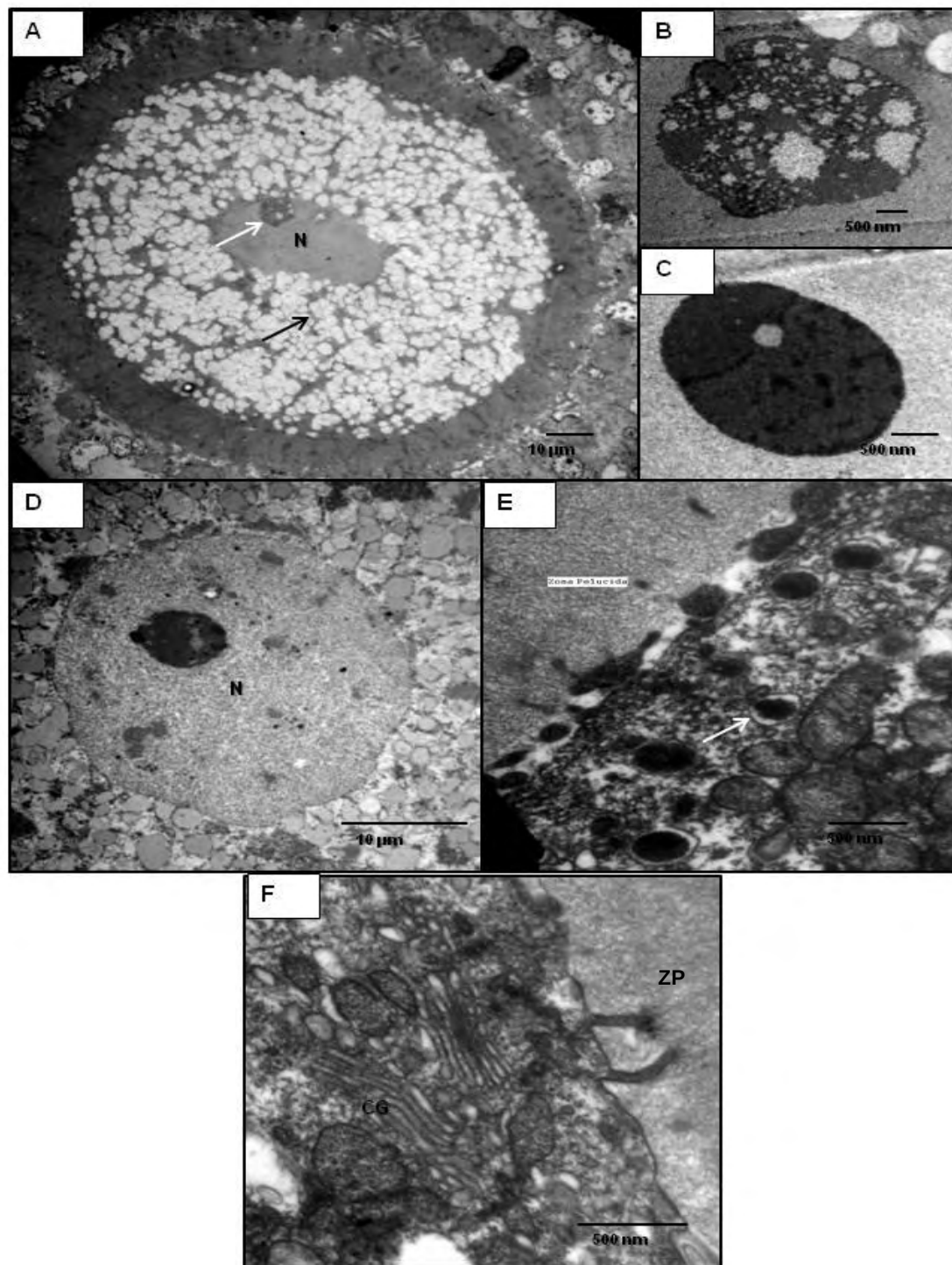


Figura 16: Eletromicrografia de transmissão de oócito recém colhido de fêmea canina em fase folicular (VG_c). **A:** Núcleo central ligeiramente achatado (N) com nucléolo (seta branca) em posição periférica, e presença de gotas de lipídio (seta preta) em menor tamanho do que visualizado em VG_c do grupo do anestro (aumento 750 x). **B:** Nucléolo reticular arredondado (aumento 10000 x). **C:** Nucléolo fibrilar denso (aumento 15000 x). **D:** Núcleo arredondado (N) (aumento 2000 x). **E:** Grânulos corticais (seta) alinhados próximos a zona pelúcida (aumento 2500 x). **F:** Complexo de Golgi presente próximo a zona pelúcida (ZP) (aumento 40000 x).

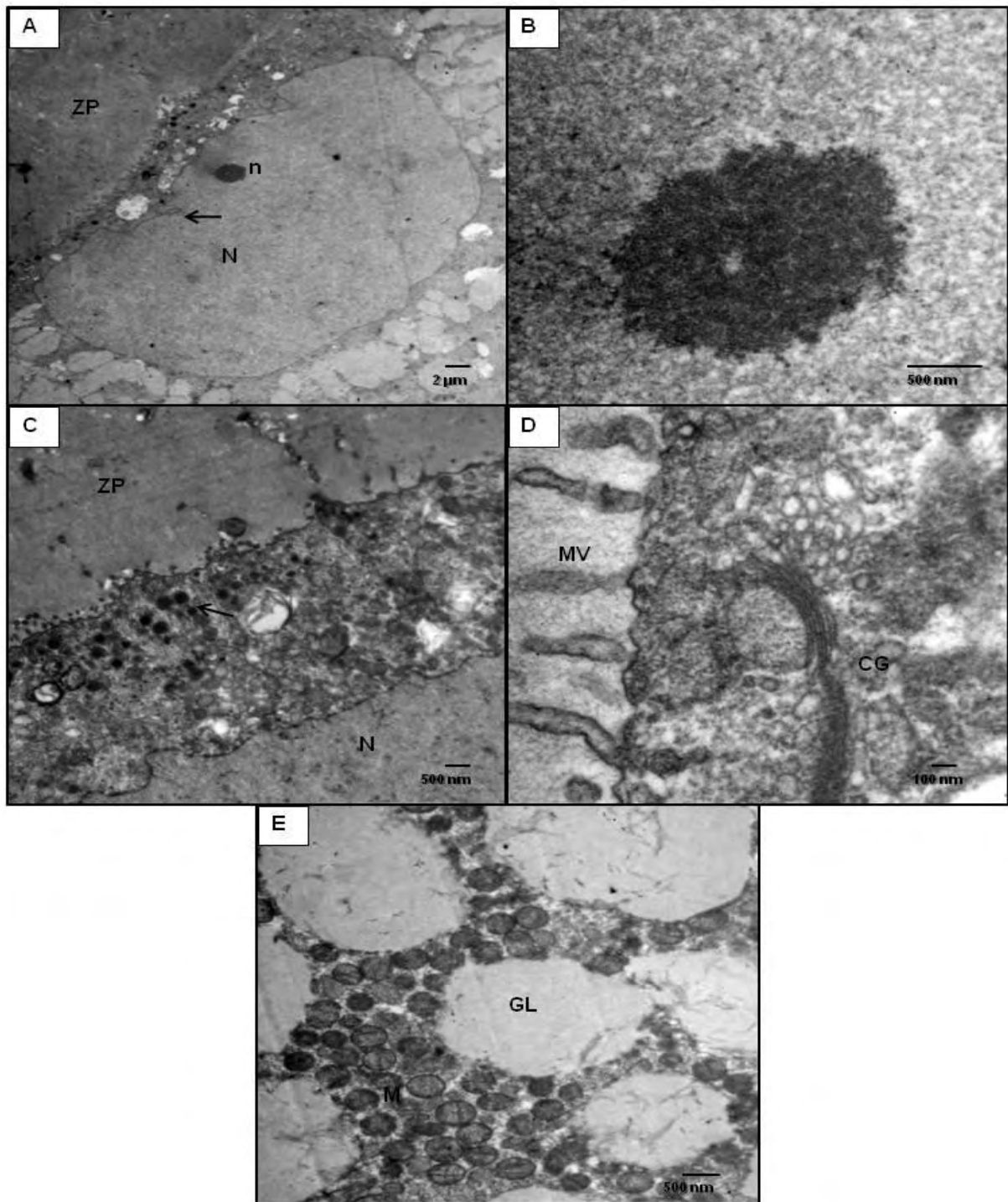


Figura 17: Eletromicrografia de transmissão de oócito recém colhido de fêmea canina em fase folicular (VG_p). **A:** Núcleo (N) achatado localizado na periferia do oócito apresentando invaginações no envelope nuclear (seta) e nucléolo fibrilar denso (n) (aumento 2500 x). **B:** Nucléolo fibrilar denso (aumento 30000 x). **C:** Grânulos corticais (seta) alinhados entre a zona pelúcida (ZP) e núcleo (N) (aumento 12000 x). **D:** Região periférica do oócito apresentando Complexo de Golgi bem desenvolvido (CG) e microvilosidades (MV) (aumento 50000 x). **E:** Mitocôndrias (M) agrupadas no ooplasma entre gotas de lipídio (GL) (aumento 15000 x).

4.3 - EXPERIMENTO III - “Avaliação das características morfológicas do complexo cumulus-oócito provenientes de fêmeas caninas em fase folicular e anestro após o processo de maturação *in vitro* em diferentes meios de cultivo”

O experimento III consistiu em analisar as características morfológicas dos complexos *cumulus*-oócitos de fêmeas caninas em diferentes estádios reprodutivos após a maturação *in vitro* em meio controle (sem suplementação) e suplementado com hormônios através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Assim, os resultados são apresentados separadamente de acordo com a técnica utilizada, de tal forma que os resultados da avaliação das características morfológicas dos complexos *cumulus*-oócitos de fêmeas caninas em fase folicular (FO) ou anestro (AN) maturados *in vitro* em meio controle e suplementado por microscopia eletrônica de varredura estão dispostos nos itens 4.3.1 e 4.3.2, respectivamente. E os dados analisados por microscopia eletrônica de transmissão de oócitos provenientes de fêmeas em fase folicular e anestro maturados *in vitro* em meio controle e suplementado estão apresentados nos itens 4.3.3 e 4.3.4, respectivamente.

4.3.1. Avaliação do complexo cumulus-oócito proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, após 72 horas de cultivo *in vitro* em meio sem suplementação hormonal (Controle- meio A).

No total foram separados aleatoriamente 55 oócitos Grau I, advindos de animais em fase folicular (FO) e 47 oócitos Grau I de animais em anestro (AN), para serem avaliados por microscopia eletrônica de varredura após o período de maturação *in vitro* em meio A (sem suplementação hormonal). As frequências absolutas e relativas estão apresentadas na tabela 15.

Tabela 15 - Frequência absoluta e relativa (%) de COCs cultivados *in vitro* por 72 horas em meio sem suplementação hormonal (Meio A), obtidos do total de 30 fêmeas caninas, sendo 15 em fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN), para avaliação por microscopia eletrônica de varredura – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Fase Folicular (FO)		Anestro (AN)	
	Frequência		Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)	Absoluta	Relativa (%)
COC Grau I	55	100	47	100
Avaliados	40	72,7	26	55,3
Perdidos	15	27,3	21	44,7

Como pode ser observado na tabela 15, do total de 55 oócitos separados para a MEV pertencentes ao FO (Fase Folicular), após o período de maturação *in vitro* em meio sem suplementação hormonal (meio A), 15 (27,3%) foram perdidos durante o procedimento, e 40 foram analisados. E do total de 47 oócitos pertencentes ao AN (Anestro), 21 (44,7%) foram perdidos. Estas perdas ocorreram essencialmente durante a secagem do material no secador de ponto crítico e durante a metalização.

Nas tabelas 16 e 17 estão apresentados, respectivamente, os resultados dos parâmetros avaliados por microscopia eletrônica de varredura, do complexo *cumulus*-oócito advindo de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN) cultivados *in vitro* por 72 horas em meio sem suplementação hormonal.

Tabela 16 – Complexos *cumulus*-oócitos caninos obtidos após 72 horas de cultivo *in vitro* em meio sem suplementação hormonal (Meio A), pertencentes ao grupo FO (Fase Folicular), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do *cumulus*, processos longos e curtos emitidos entre estas células, bem como as características da zona pelúcida e intensidade de perda das células do *cumulus* – Jaboticabal, 2010.

COC's avalia- dos	Arranjo CC	Forma CC	Processos emitidos entre CC		Característica da ZP
			Longos	Curto	
1	Irregular	Arredondada	-	+	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos.
2	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
3	Irregular	Arredondada	-	++	% perda CC: intensa Espongiforme

Continuação da tabela 16

					com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
4	Irregular	Arredondada	+	++	% perda CC: média Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
5	Regular	Arredondada	+	+++	% perda de CC: nula
6	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
7	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
8	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
9	Irregular	Arredondada	-	++	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
10	Regular	Arredondada	-	-	% perda de CC: nula
11	Irregular	Arredondada	+	-	% perda de CC: média. Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
12	Irregular	Arredondada	-	+	% perda de CC: intensa Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
13	Irregular	Arredondada	+	+	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
14	Regular	Arredondada	+	-	% perda de CC: nula
15	Regular	Arredondada	-	-	% perda de CC: nula
16	Irregular	Arredondada	+	-	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
17	Irregular	Arredondada	+	-	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
18	Irregular	Arredondada	+	-	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
19	Irregular	Arredondada	+	-	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e

Continuação da tabela 16

estreitos poros elípticos e esféricos					
20	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
21	Irregular	Arredondada	++	++	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
22	Irregular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: média Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
23	Regular	Arredondada	++	+	% perda de CC: nula
24	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
25	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
26	Irregular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
27	Irregular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: média Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
28	Regular	Arredondada	++	+++	% perda de CC: nula
29	Irregular	Arredondada	+++	+++	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
30	Regular	Arredondada	++	++	% perda de CC: nula
31	Irregular	Arredondada	++	++	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
32	Regular	Arredondada	-	+	% perda de CC: nula
33	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
34	Regular	Arredondada	+	-	% perda de CC: nula
35	Irregular	Arredondada	-	+	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
36	Irregular	Arredondada	++	+++	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos

Continuação da tabela 16

37	Irregular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: muito intensa. Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
38	Regular	Arredondada	++	+	% perda de CC: nula
39	Irregular	Arredondada	+	++	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e largo poros elípticos e esféricos
40	Irregular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e largo poros elípticos e esféricos

Intensidade dos processos emitidos entre as células do *cumulus*: Nenhum (-); Pouco (+); Moderado (++); Intenso (+++); Muito intenso (++++)

Tabela 17 – Complexos *cumulus*-oócitos caninos obtidos após 72 horas de cultivo *in vitro* em meio sem suplementação hormonal (Meio A), pertencentes ao grupo AN (Anestro), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do *cumulus*, processos longos e curtos emitidos entre estas células, bem como as características da zona pelúcida e intensidade de perda das células do *cumulus* – Jaboticabal, 2010.

COC's avalia- dos	Arranjo CC	Forma CC	Processos emitidos entre CC		Característica da ZP
			Longos	Curto	
1	Regular	Arredondada	++	+	% perda de CC: nula
2	Regular	Arredondada	++	+	% perda de CC: nula
3	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
4	Regular	Arredondada	++	++	% perda de CC: nula
5	Irregular	Arredondada	+	+	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos

Continuação da Tabela 17

6	Regular	Arredondada	+++	+++	% perda de CC: nula
7	Irregular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: média. Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
8	Regular	Arredondada	++	++	% perda de CC: nula
9	Irregular	Arredondada	-	+++	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
10	Irregular	Arredondada	++	++	% perda de CC: média. Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
11	Irregular	Arredondada	-	++	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
12	Regular	Arredondada	++	++	% perda de CC: nula
13	Irregular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
14	Regular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
15	Irregular	Arredondada	+	+	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
16	Regular	Arredondada	-	++	% perda de CC: nula
17	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
18	Regular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
19	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
20	Regular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
21	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula
22	Regular	Arredondada	++	+++	% perda de CC: nula
23	Regular	Arredondada	++	+	% perda de CC: nula
24	Regular	Arredondada	+++	+	% perda de CC: nula

Continuação da Tabela 17

25	Irregular	Arredondada	+	-	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
26	Regular	Arredondada	+	-	% perda de CC: nula

Intensidade dos processos emitidos entre as células do *cumulus*: Nenhum (-); Pouco (+); Moderado (++); Intenso (+++); Muito intenso (++++)

Os dados referentes à distribuição do arranjo das células do *cumulus*, a intensidade de perda destas células, os diferentes aspectos observados na zona pelúcida e a intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* estão apresentados nas Figuras 18, 19, 20 e 21 respectivamente.

A Figura 22 apresenta as características observadas por microscopia eletrônica de varredura, em oócitos caninos cultivados *in vitro* em meio A, provenientes de animais em fase folicular e anestro.

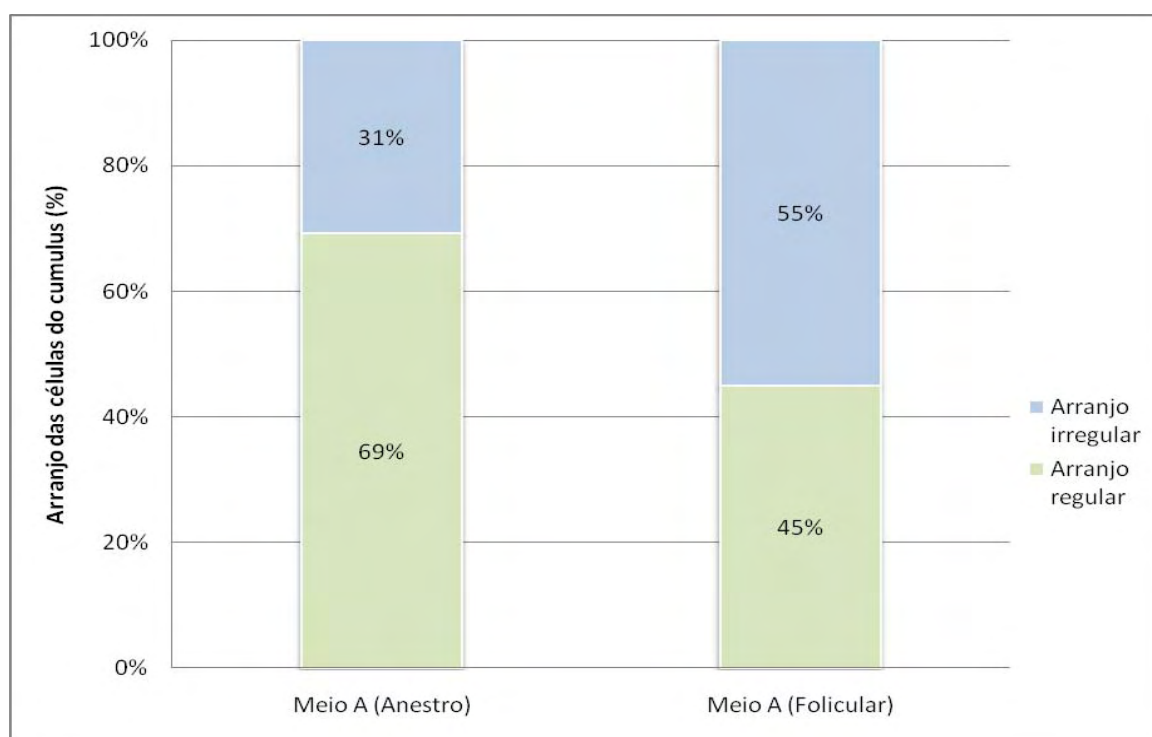


Figura 18: Distribuição do arranjo das células do *cumulus* ao redor de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72h em meio A – Jaboticabal, 2010.

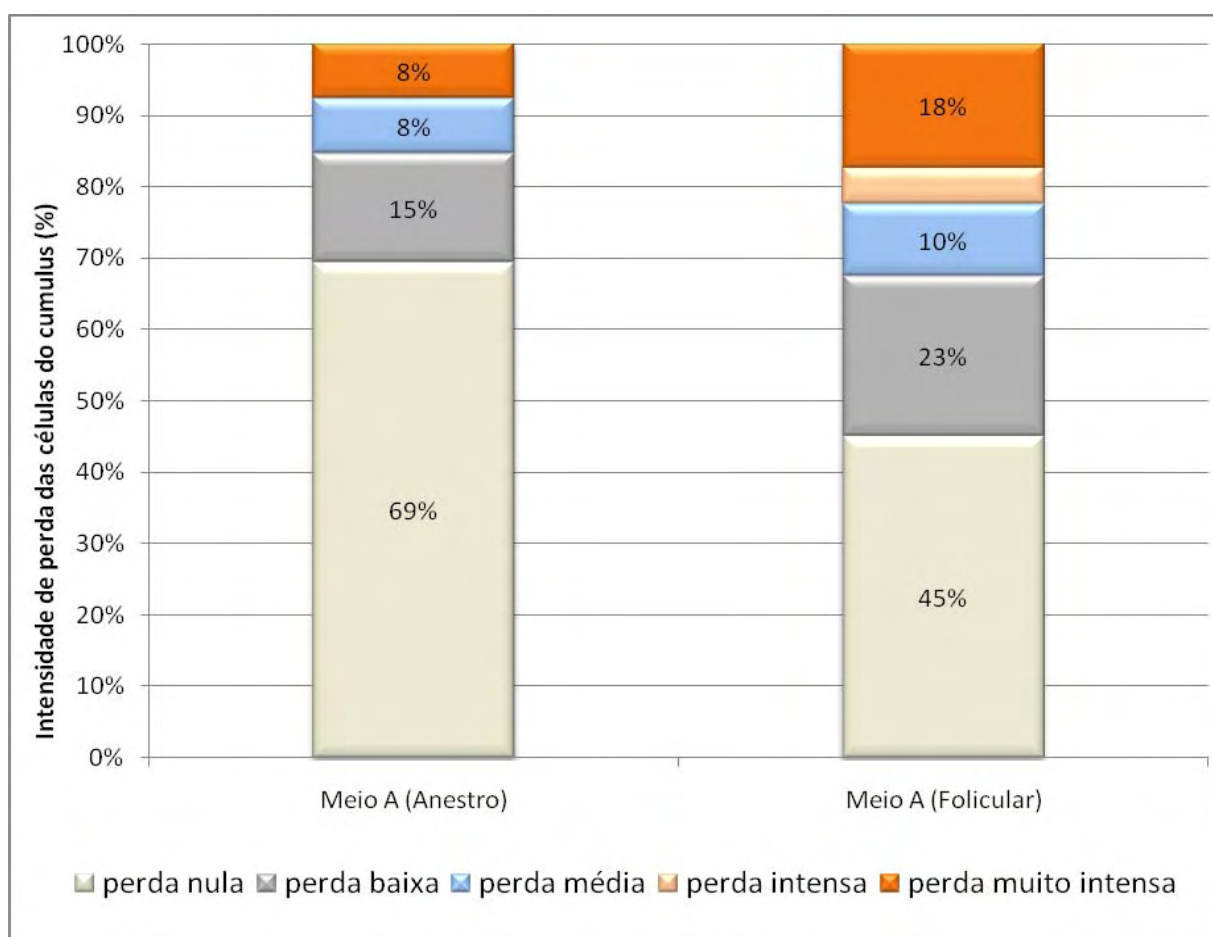


Figura 19: Intensidade de perda das células do *cumulus* de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72h em meio A – Jaboticabal, 2010.

Analisando as Figuras 18 e 19, pode-se observar que do total de COC's provenientes de animais em anestro, 70% mantiveram o arranjo regular observado antes do início do cultivo *in vitro* e 30% apresentaram perdas de células do *cumulus*, das quais 8% correspondem a perdas intensas. Por outro lado, no grupo da fase folicular, 45% dos COC's mantiveram o arranjo inicial e 55% apresentaram perdas das células do *cumulus*, das quais 23% correspondem a perdas intensas e muito intensas (ou seja, oócitos desnudos ou quase desnudos).

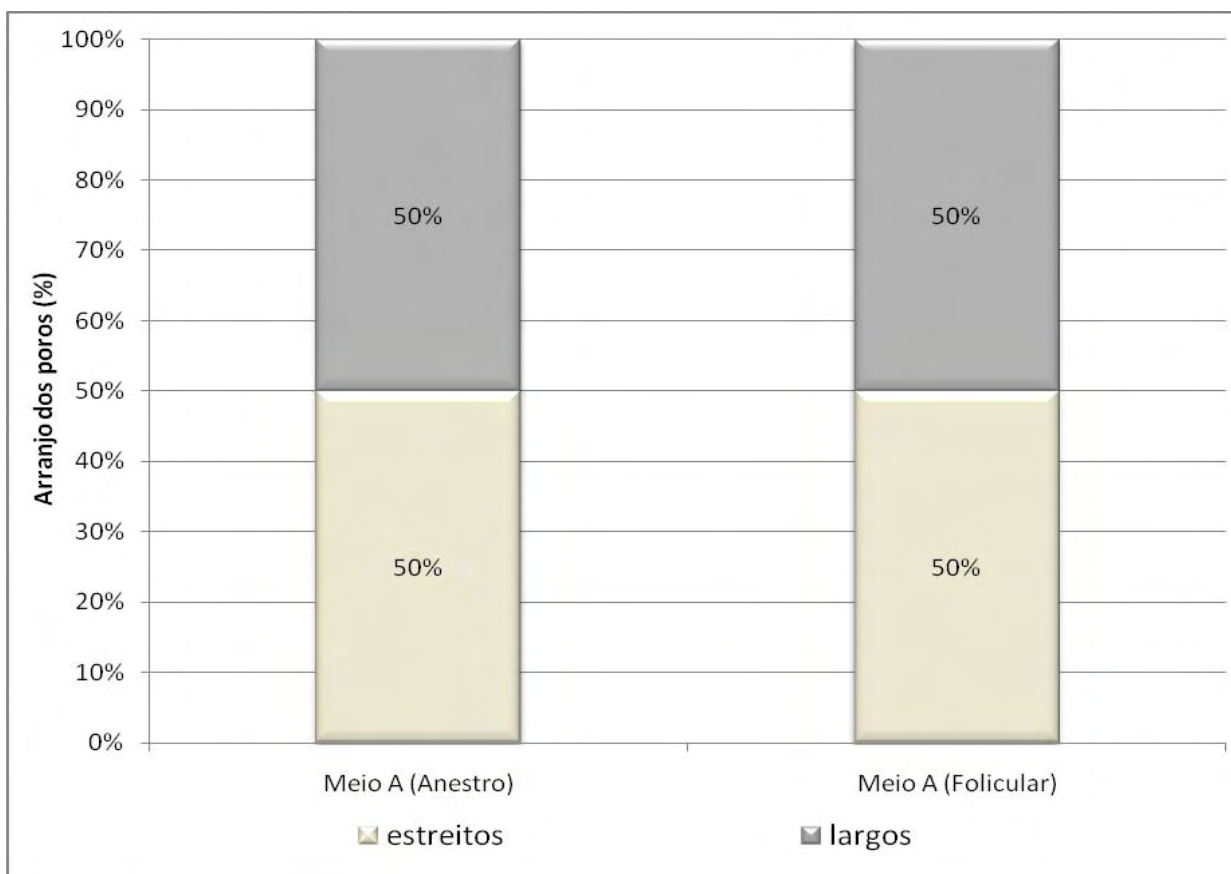


Figura 20: Frequência de poros estreitos e largos na zona pelúcida de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72h em meio A – Jaboticabal, 2010.

Observando a zona pelúcida de oócitos caninos, pode-se constatar que esta estrutura espongiiforme apresenta duas características distintas, que consistem em numerosos poros elípticos e esféricos, os quais podem ser largos ou estreitos. Analisando a frequência que estas características se apresentam em oócitos de animais em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* em meio A (Figura 20), observa-se que a distribuição ocorre igualmente para ambas as fases, com 50% dos oócitos apresentando zona pelúcida com largos poros elípticos e esféricos e a outra metade poros estreitos.

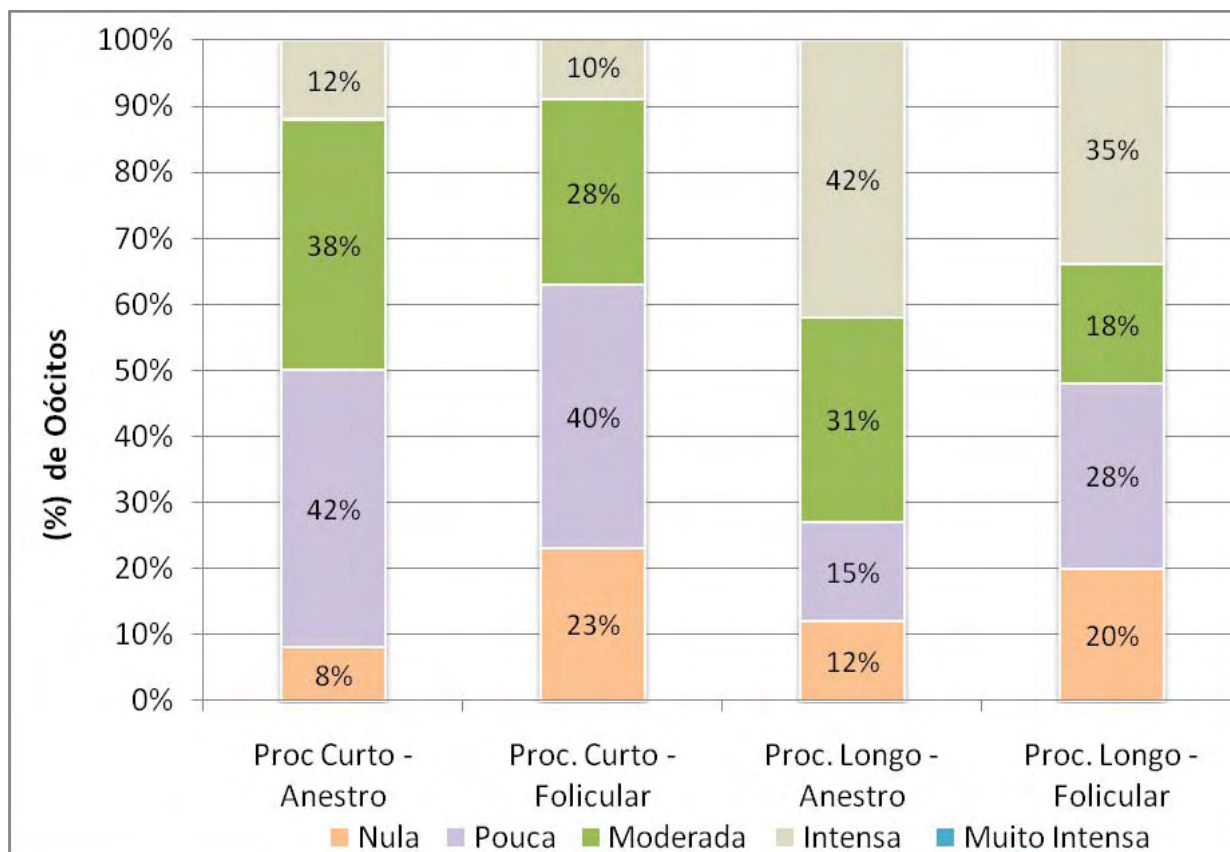


Figura 21– Intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* estabelecida através de processos longos e curtos em oócitos provenientes de cadela em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72 horas em meio sem suplementação hormonal (meio A) - Jaboticabal, 2010.

Analisando a Figura 21 pode-se constatar que cerca de 50% de oócitos provenientes de animais em fase folicular apresentaram pouco ou nenhum processo longo emitido entre as células do *cumulus* e mais de 60% continham pouco ou nenhum processo curto. Já para os animais em anestro, menos de 30% apresentaram pouco ou nenhum processo longo emitido entre as células do *cumulus* e 50% dos oócitos possuíam pouco ou nenhum processo curto. Estes dados permitem constatar que oócitos cultivados em meio sem suplementação hormonal tem sua comunicação intercelular diretamente afetada em ambas às fases do ciclo estral, pois embora as células do *cumulus* tenham apresentado comunicação de forma moderada ou intensa

através de processos longos para fase folicular (53%) e anestro (73%) uma elevada porcentagem de oócitos continha pouca ou nenhuma comunicação entre as células do *cumulus*. Somando-se a isto, a interpretação da distribuição da intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* apresentadas na Figura 21, permite verificar que oócitos provenientes de animais em anestro apresentam maiores porcentagens de intensidade de comunicação moderada e intensa tanto para processos longos quanto curtos (73% e 50%, respectivamente) quando comparados a oócitos advindos de animais em fase folicular (53% e 38%, respectivamente). Além disso, revelou menores taxas de oócitos com pouco ou nenhuma comunicação entre as células do *cumulus* (27% e 50% para processos longos e curtos, respectivamente), enquanto para oócitos de animais em fase folicular estes índices foram de 48% e 63% respectivamente. Tal fato permite constatar que oócitos provenientes de animais em anestro apresentam um desempenho relativamente melhor quando cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal do que oócitos de animais em fase folicular.

Na tabela 18 está apresentado o resultado da análise estatística comparando-se a intensidade de comunicação entre processos curtos e longos dentro de cada fase do ciclo estral para verificar se a comunicação em oócitos cultivados *in vitro* em meio A se faz predominantemente através de um determinado tipo de processo (longo ou curto). Na tabela 19 é apresentado o resultado da análise estatística comparando a intensidade de comunicação dos processos longos e curtos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos de cadelas em fase folicular (FO) e anestro (AN) cultivados *in vitro*

em meio A para verificar se diferem quanto ao predomínio de um determinado tipo de comunicação.

Tabela 18 – Comparação entre os processos curtos e longos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos de cadelas em fase folicular (FO) e anestro (AN) cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal (meio A) – Jaboticabal, 2010.

Fases	Curtos X Longos
Folicular	Sim* (longos > curtos)
Anestro	Sim* (longos > curtos)

* As diferenças são consideradas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Wilcoxon (teste não paramétrico – amostras vinculadas).

Tabela 19 - Comparação entre as diferentes fases do ciclo estral (folicular x anestro) para os processos curtos e longos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos de cadelas cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal (meio A) – Jaboticabal, 2010.

Processos emitidos pelas células do <i>cumulus</i>	Fase Folicular (FO) X Anestro(AN)
Curtos	Não
Longos	Não

* As diferenças são consideradas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Teste não paramétrico – amostras independentes).

Com base nos resultados apresentados nas tabelas 18 e 19, constata-se que a comunicação de oócitos de cadelas cultivados *in vitro* por 72 horas em meio sem suplementação hormonal (meio A), independente do estágio reprodutivo, ocorre predominantemente através de processos longos emitidos pelas células do *cumulus* ($p < 0,05$) (tabela 18). Comparando-se a intensidade de comunicação entre essas células através de processos longos e curtos nas diferentes fases do ciclo estral, verifica-se que não há diferença significativa entre as fases folicular e anestro ($p < 0,05$) (tabela 19). A partir do exposto, pode-se verificar que a intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* de oócitos cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal (meio A) se estabelece igualmente para animais em anestro e fase folicular, sendo que essa comunicação ocorre de forma moderada através de processos longos ($p < 0,05$), conforme mostra a Figura 22.

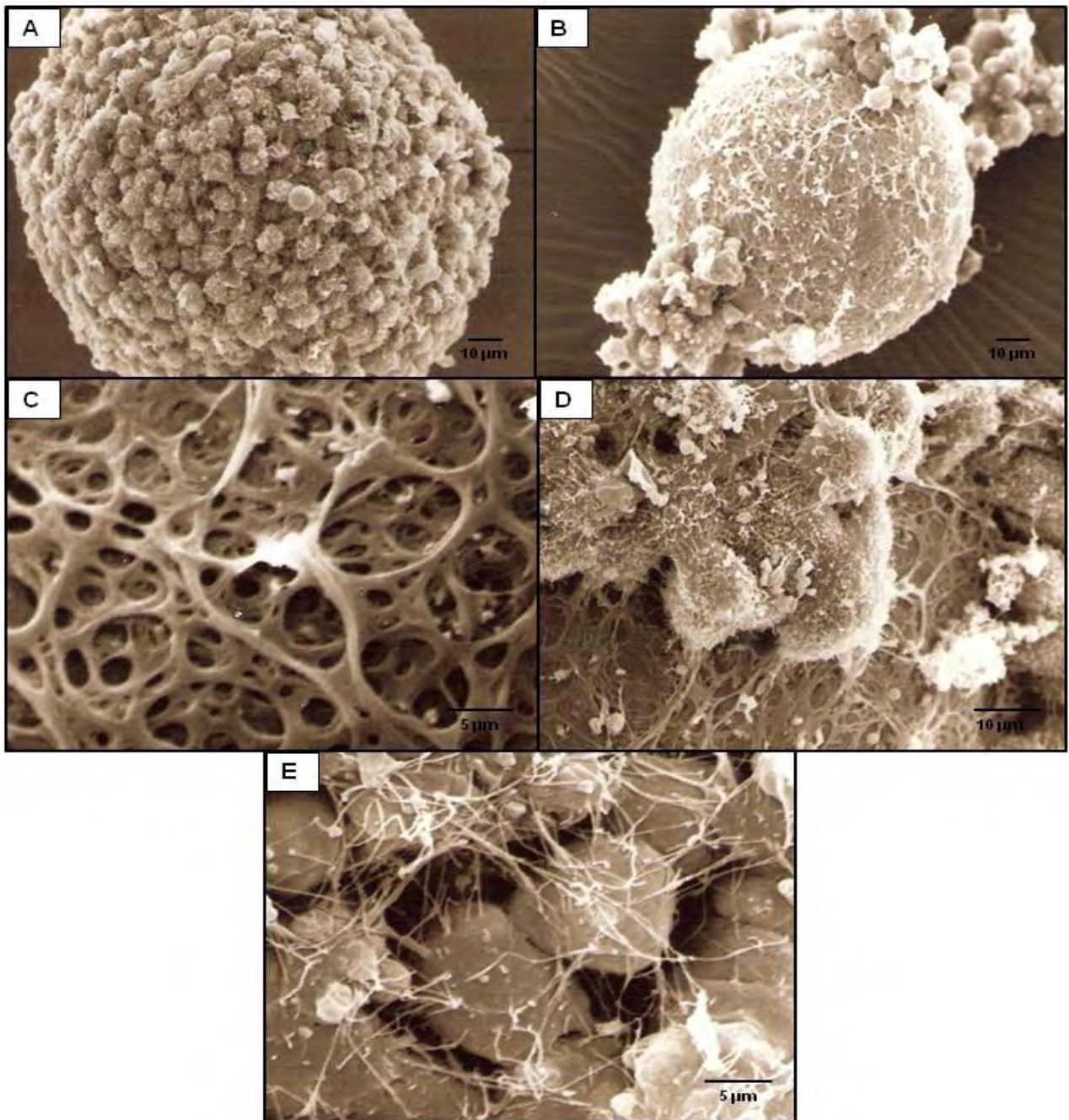


Figura 22: Eletronmicrografia de varredura de complexo *cumulus*-oócito de fêmea canina cultivado *in vitro* por 72h em meio A. **A:** COC's de fêmea em anestro apresentando-se íntegro e com arranjo regular (aumento 750 x). **B:** COC's de fêmea em fase folicular, se apresentado quase desnudo, devido à grande perda de células do *cumulus* (aumento 750 x). **C:** Zona pelúcida de COC's de fêmea em anestro apresentando largos poros elípticos (aumento 3500 x). **D:** Zona pelúcida de fêmea em fase folicular apresentando poros estreitos (aumento 2000 x). **E:** COC's de fêmea em fase folicular apresentando comunicação entre as células do *cumulus* através de processos longos e de intensidade moderada (aumento 3500 x).

4.3.2. Avaliação do complexo cumulus-oócito proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN) por microscopia eletrônica de varredura, após 72 horas de cultivo *in vitro* em meio suplementado com P_4 , E_2 e LH (meio B).

No total foram separados randomicamente 56 oócitos Grau I, advindos de animais em fase folicular (FO) e 48 oócitos Grau I de animais em anestro (AN), para serem avaliados por microscopia eletrônica de varredura após o período de maturação *in vitro* em meio B (com suplementação hormonal). As frequências absolutas e relativas estão na tabela 20.

Tabela 20 - Frequência absoluta e relativa (%) de COCs cultivados *in vitro* por 72 horas em meio com suplementação hormonal, obtidos do total de 30 fêmeas caninas, sendo 15 em fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN), para avaliação por microscopia eletrônica de varredura – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Fase Folicular (FO)		Anestro (AN)	
	Frequência		Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)	Absoluta	Relativa (%)
COC Grau I	56	100	48	100
Avaliados	47	83,9	27	56,3
Perdidos	9	16,1	21	43,7

Como pode ser observado na tabela 20, do total de 56 oócitos separados para a MEV pertencentes ao FO (Fase Folicular), após o período de maturação *in vitro* em

meio B (com suplementação hormonal), 9 (16,1%) foram perdidos durante o procedimento, e 47 foram analisados. E do total de 48 oócitos pertencentes ao AN (Anestro), 21 (43,7%) foram perdidos. Estas perdas ocorreram essencialmente durante a secagem do material no secador de ponto crítico e durante a metalização.

Nas tabelas 21 e 22 estão apresentados respectivamente, os resultados dos parâmetros avaliados por microscopia eletrônica de varredura, do complexo *cumulus*-oócito advindos de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), cultivados *in vitro* por 72 horas em meio suplementado com P₄, E₂ e LH.

Tabela 21 – Complexos *cumulus*-oócitos caninos obtidos após 72 horas de cultivo *in vitro* em meio suplementado com P₄, E₂, LH (Meio B), pertencentes ao grupo FO (Folicular), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do *cumulus*, processos longos e curtos emitidos entre estas células, bem como as características da zona pelúcida e intensidade de perda das células do *cumulus* – Jaboticabal, 2010.

COC's avalia- dos	Arranjo CC	Forma CC	Processos emitidos entre CC		Característica da ZP
			Longos	Curto	
1	Irregular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: baixa. Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos.
2	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
3	Regular	Arredondada	++	++	% perda de CC: nula
4	Irregular	Arredondada	+++	+++	% perda CC: baixa. Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
5	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula

Continuação da Tabela 21

6	Regular	Arredondada	++++	+++	% perda de CC: nula
7	Regular	Arredondada	++++	+++	% perda de CC: nula
8	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
9	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
10	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
11	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
12	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
13	Irregular	Arredondada	++	+++	% perda de CC: baixa. Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
14	Regular	Arredondada	+	+++	% perda de CC: nula
15	Irregular	Arredondada	++	+++	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
16	Regular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
17	Regular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
18	Regular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
19	Regular	Arredondada	+	++	% perda de CC: nula
20	Regular	Arredondada	+	++	% perda de CC: nula
21	Regular	Arredondada	+	++	% perda de CC: nula
22	Regular	Arredondada	+	++	% perda de CC: nula
23	Regular	Arredondada	+++	+++	% perda de CC: nula
24	Irregular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: média. Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
25	Irregular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: média. Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
26	Regular	arredondada	+++	+++	% perda de CC: nula

Continuação da Tabela 21

27	Regular	Arredondada	++++	+++	% perda de CC: nula
28	Regular	Arredondada	+++	+++	% perda de CC: nula
29	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
30	Regular	Arredondada	++	++++	% perda de CC: nula
31	Regular	Arredondada	+++	+++	% perda de CC: nula
32	Regular	Arredondada	+++	++++	% perda de CC: nula
33	Regular	Arredondada	+++	++++	% perda de CC: nula
34	Regular	Arredondada	+++	++++	% perda de CC: nula
35	Irregular	Arredondada	+++	++++	% perda de CC: baixa. Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
36	Regular	Arredondada	+++	++++	% perda de CC: nula
37	Irregular	Arredondada	+++	++++	% perda de CC: nula
38	Irregular	Arredondada	++	++	% perda de CC: nula
39	Regular	Arredondada	++++	+++	% perda de CC: nula
40	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
41	Regular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
42	Regular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
43	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
44	Regular	Arredondada	++++	+++	% perda de CC: nula
45	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
46	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
47	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula

Intensidade dos processos emitidos entre as células do *cumulus*: Nenhum (–); Pouco (+); Moderado (++); Intenso (+++); Muito intenso (++++)

Tabela 22 – Complexos *cumulus*-oócitos caninos obtidos após 72 horas de cultivo *in vitro* em meio suplementado com P₄, E₂, LH (Meio B), pertencentes ao grupo AN (Anestro), avaliados por microscopia eletrônica de varredura, quanto ao arranjo e forma das células do *cumulus*, processos longos e curtos emitidos entre estas células, bem como as características da zona pelúcida e intensidade de perda das células do *cumulus* – Jaboticabal, 2010.

COC's avalia- dos	Arranjo CC	Forma CC	Processos emitidos entre CC		Característica da ZP
			Longos	Curtos	
1	Regular	Arredondada	+	+++	% perda de CC: nula
2	Regular	Arredondada	+++	+++	% perda de CC: nula
3	Regular	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: nula
4	<i>Irregular</i>	Arredondada	++++	++++	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
5	Irregular	Arredondada	-	++	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
6	Regular	Arredondada	+++	+++	% perda de CC: nula
7	Regular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
8	Irregular	Arredondada	++	+++	% perda de CC: intensa Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
9	Irregular	Arredondada	-	+++	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
10	Regular	Arredondada	+	++	% perda de CC: nula
11	Regular	Arredondada	+	+++	% perda de CC: nula
12	Regular	Arredondada	++++	++	% perda de CC: nula
13	Regular	Arredondada	+++	++	% perda de CC: nula

Continuação da Tabela 22

14	Irregular	Arredondada	++	++	% perda de CC: média Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
15	Regular	Arredondada	+	+++	% perda de CC: nula
16	Regular	Arredondada	++	+++	% perda de CC: nula
17	Irregular	Arredondada	-	++++	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
18	Regular	Arredondada	++	++	% perda de CC: nula
19	Irregular	Arredondada	+	+	% perda de CC: baixa Espongiforme com numerosos e largos poros elípticos e esféricos
20	Regular	Arredondada	++	+++	% perda de CC: nula
21	Regular	Arredondada	++	++	% perda de CC: nula
22	Irregular	Arredondada	-	+	% perda de CC: muito intensa Espongiforme com numerosos e estreitos poros elípticos e esféricos
23	Regular	arredondada	+	+	% perda de CC: nula
24	Regular	arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
25	Regular	arredondada	+++	++	% perda de CC: nula
26	Regular	arredondada	++	++	% perda de CC: nula
27	Regular	arredondada	+++	++	% perda de CC: nula

Intensidade dos processos emitidos entre as células do *cumulus*: Nenhum (-); Pouco (+); Moderado (++); Intenso (+++); Muito intenso (++++)

Os dados referentes à distribuição do arranjo das células do *cumulus*, a intensidade de perda destas células, os diferentes aspectos observados na zona pelúcida e a intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* estão apresentados nas Figuras 23, 24, 25 e 26, respectivamente.

A Figura 27 apresenta as características observadas por microscopia eletrônica de varredura, em oócitos caninos cultivados *in vitro* em meio B, provenientes de animais em fase folicular e anestro.

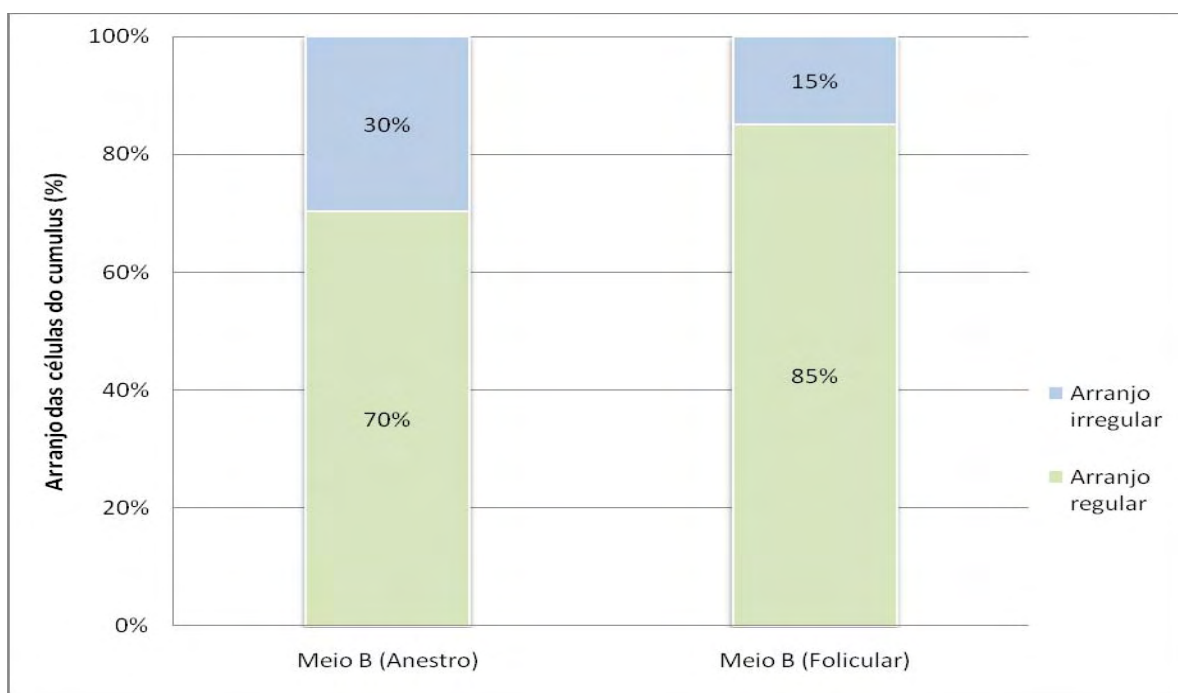


Figura 23: Distribuição do arranjo das células do *cumulus* ao redor de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72h em meio B – Jaboticabal, 2010.

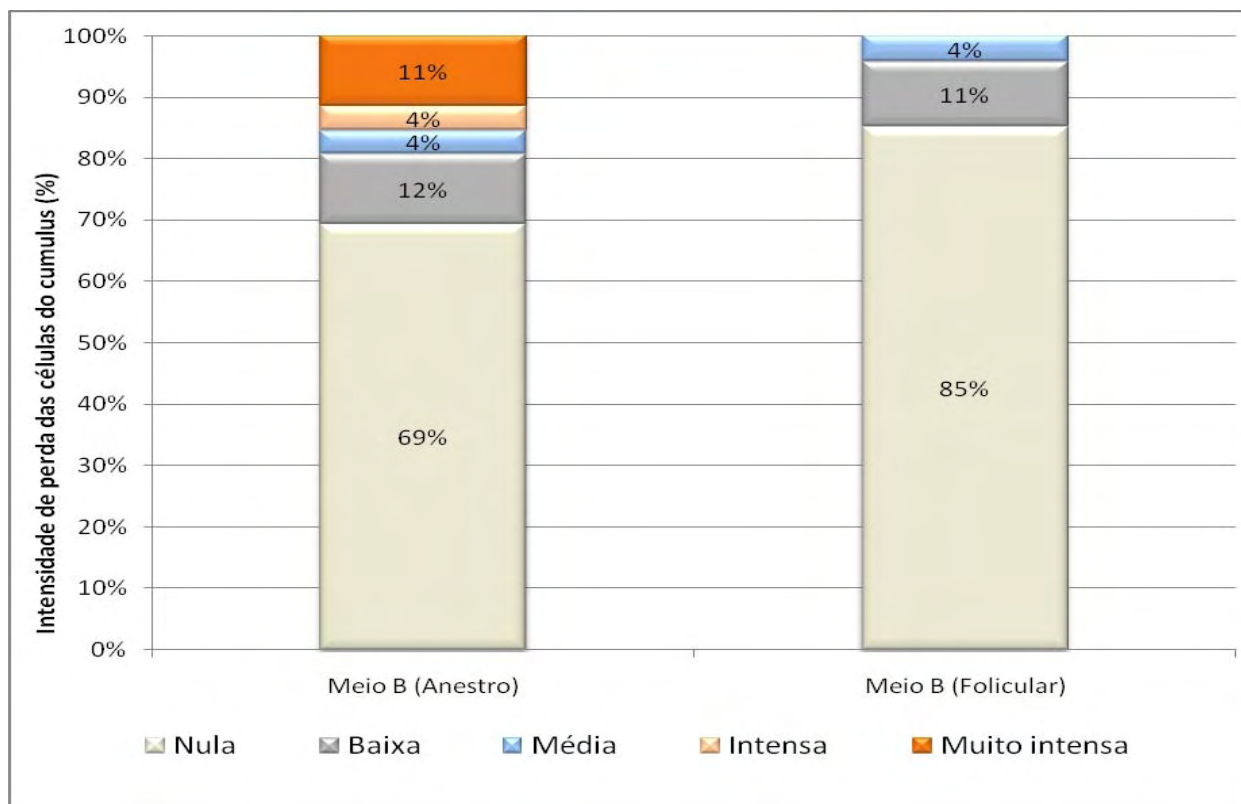


Figura 24: Intensidade de perda das células do *cumulus* de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72h em meio B – Jaboticabal, 2010.

Analisando as Figura 23 e 24, pode-se observar que do total de COC's oócitos provenientes de animais em fase folicular, 85% mantiveram o arranjo inicial observado antes do início do cultivo *in vitro* e 15% apresentaram baixas e médias perdas de células do *cumulus*. Por outro lado, o grupo do anestro apresentou 30% de perdas de células do *cumulus*, das quais 16% correspondem a perdas intensas e muito intensas.

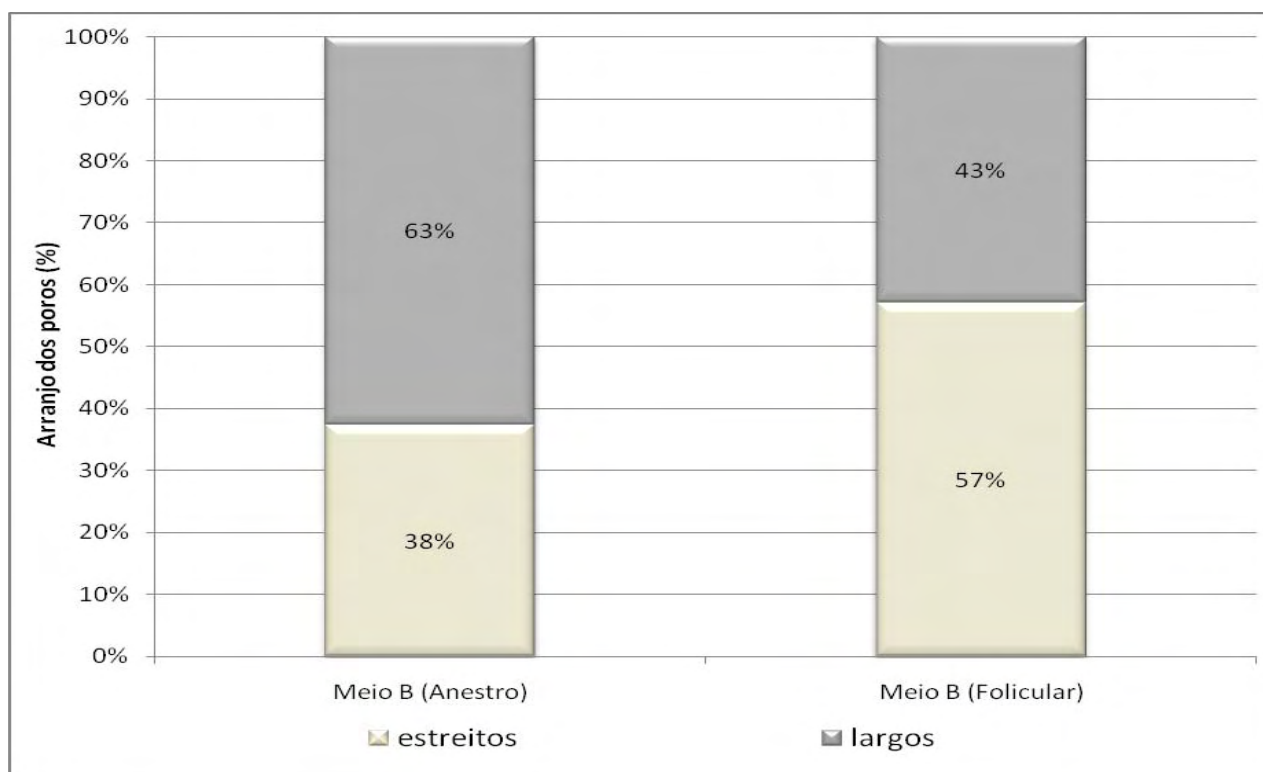


Figura 25: Frequência de poros estreitos e largos na zona pelúcida de oócitos de cadelas em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72h em meio B– Jaboticabal, 2010.

Observando a zona pelúcida de oócitos caninos, pode-se constatar que esta estrutura espongiiforme apresenta duas características distintas, que consistem em numerosos poros elípticos e esféricos, os quais podem ser largos ou estreitos. Analisando a frequência que estas características se apresentam em oócitos de animais em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* em meio B (Figura 25), observa-se que no grupo folicular há predomínio de zona pelúcida com poros estreitos (57%) enquanto no grupo do anestro predomina poros largos (63%).

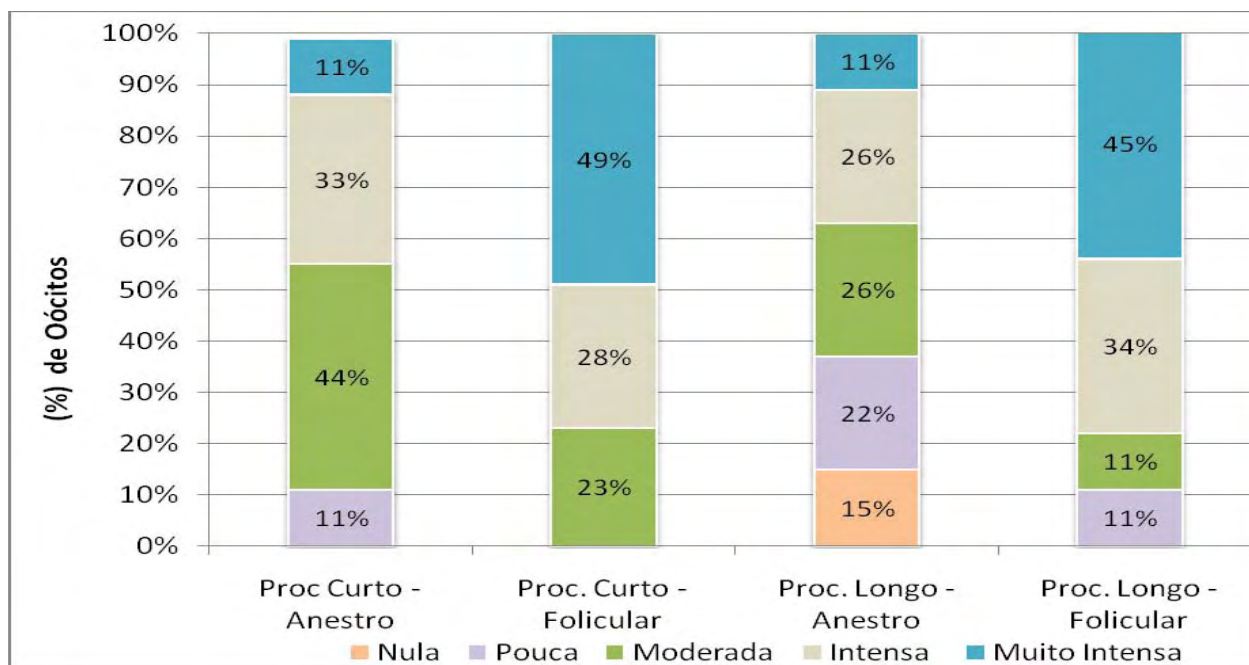


Figura 26 – Intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* estabelecida através de processos longos e curtos em oócitos provenientes de cadela em fase folicular e anestro cultivados *in vitro* por 72 horas em meio com suplementação hormonal (meio B) - Jaboticabal, 2010.

Analisando-se a Figura 26 constatou-se que do total de oócitos avaliados pela microscopia eletrônica de varredura, advindos de animais em fase folicular e cultivados *in vitro* em meio com suplementação hormonal, 79% apresentaram comunicação intensa ou muito intensa através de processos longos emitidos entre as células do *cumulus* e 77% demonstraram comunicação intensa ou muito intensa também através de processos curtos. Nos demais, a comunicação ocorreu através de poucos ou moderados processos longos (22%) e curtos (23%). Além disso, observou-se que todos oócitos analisados apresentaram algum grau de comunicação, pois em nenhum deles foi detectado ausência de processos emitidos entre as células do *cumulus*. Em contrapartida, 15% dos oócitos advindos de animais em anestro não apresentaram nenhum grau de comunicação através de processos longos e em cerca de 50% dos oócitos a comunicação foi estabelecida apenas através de poucos ou moderados

processos longos e curtos emitidos entre as células do *cumulus*. Nos demais, a comunicação ocorreu de forma intensa ou muito intensa através de processos longos (37%) e processos curtos (44%).

Na tabela 23 está apresentado o resultado da análise estatística comparando-se a intensidade de comunicação entre processos curtos e longos dentro de cada fase do ciclo estral para verificar se a comunicação em oócitos cultivados *in vitro* em meio B se faz predominantemente através de um determinado tipo de processo (longo ou curto). Na tabela 24 é apresentado o resultado da análise estatística comparando a intensidade de comunicação dos processos longos e curtos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos de cadelas em fase folicular (FO) e anestro (AN) cultivados *in vitro* em meio B, para verificar se diferem quanto ao predomínio de um determinado tipo de comunicação.

Tabela 23 – Comparação entre os processos curtos e longos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos de cadelas em fase folicular (FO) e anestro (AN) cultivados *in vitro* em meio suplementado com P₄, E₂ e LH (meio B) – Jaboticabal, 2010.

Fases	Curtos X Longos
Folicular	Não
Anestro	Sim* (curtos >longos)

As diferenças são consideradas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Wilcoxon (teste não paramétrico – amostras vinculadas).

Tabela 24 - Comparação entre as diferentes fases do ciclo estral (folicular x anestro) para os processos curtos e longos emitidos pelas células do *cumulus* de oócitos de cadelas cultivados *in vitro* em meio suplementado com P₄, E₂ e LH (meio B) - Jaboticabal, 2010.

Processos emitidos pelas células do <i>cumulus</i>	Fase Folicular (FO) X Anestro(AN)
Curtos	Sim* (folicular > anestro)
Longos	Sim* (folicular > anestro)

* As diferenças são consideradas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Teste não paramétrico – amostras independentes).

Com base nos resultados apresentados da tabela 23, pode-se constatar que a comunicação de oócitos de cadelas em fase folicular cultivados *in vitro* por 72 horas em meio com suplementação hormonal (meio B), ocorre de forma intensa a muito intensa tanto através de processos longos quanto processos curtos, não havendo diferença significativa entre eles ($p < 0,05$). Por outro lado, para oócitos advindos de animais em anestro a comunicação se estabelece de forma moderada a intensa, principalmente por meio de processos curtos ($p < 0,05$). Entretanto, quando se compara a intensidade de comunicação através de processos longos e curtos entre cada fase do ciclo estral (Tabela 24), verifica-se que a intensidade de comunicação independente se através de processos curtos ou longos foram significativamente maiores para oócitos provenientes de animais em fase folicular.

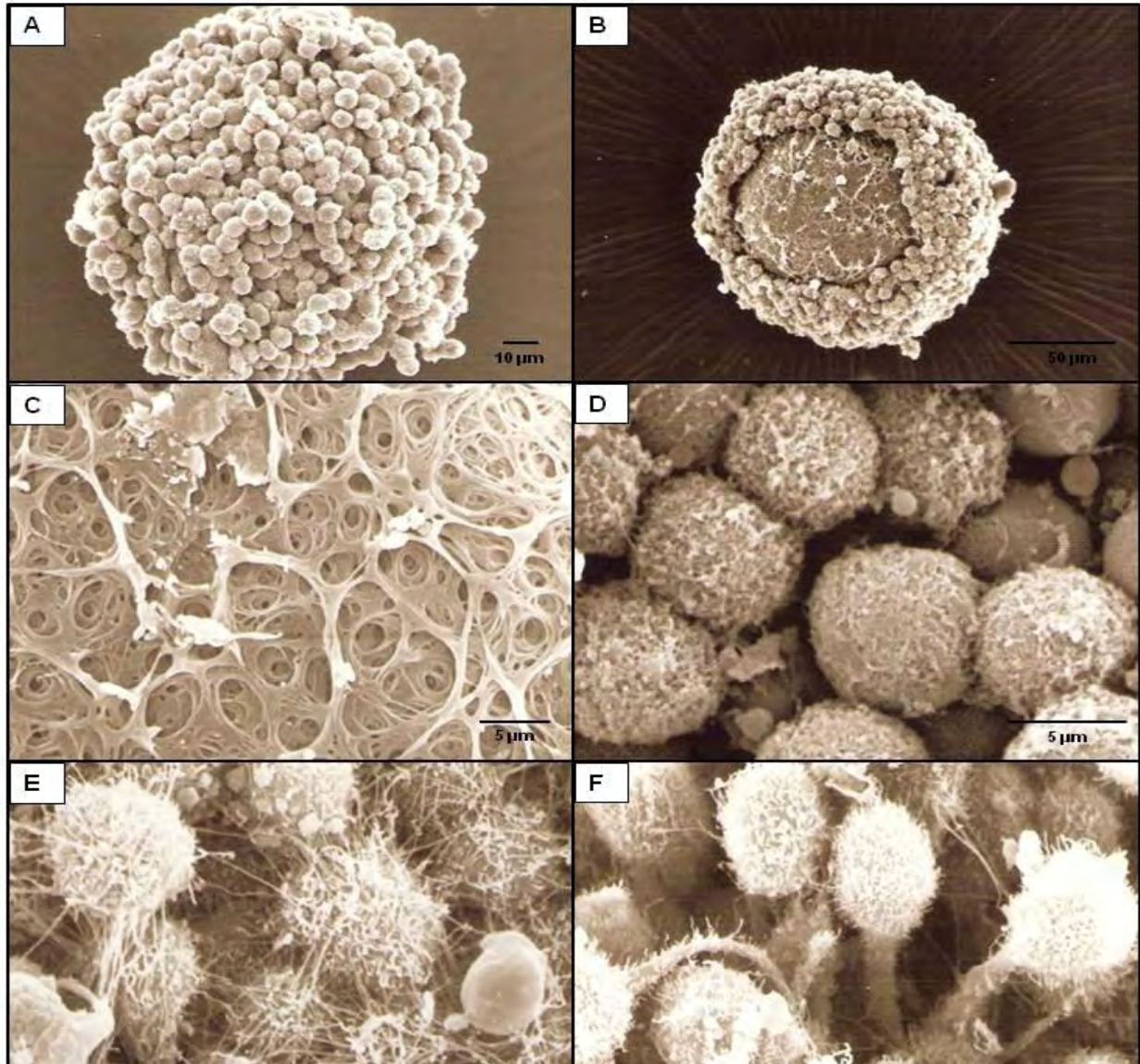


Figura 27: Eletromicrografia de varredura de complexo *cumulus*-oócito de fêmea canina cultivado *in vitro* por 72h em meio B. **A:** COC's de fêmea em fase folicular apresentando-se íntegro e com arranjo regular (aumento 750 x). **B:** COC's de fêmea em anestro com baixa perda de células do *cumulus* (aumento 500 x). **C:** Zona pelúcida de COC's de fêmea em anestro apresentando largos poros elípticos (aumento 3500 x). **D:** COC's de fêmea canina em anestro, apresentando comunicação entre as células do *cumulus* através de intensos processos curtos (aumento 5000 x). **E:** COC's de fêmea canina em fase folicular, apresentando comunicação entre as células do *cumulus* através da emissão de processos longos de forma muito intensa (aumento 3500 x). **F:** COC's de fêmea canina em fase folicular, apresentando comunicação entre as células do *cumulus* através da emissão de curtos processos de forma muito intensa (aumento 3500 x).

4.3.3 – Avaliação do complexo cumulus-oócito proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, após 72 horas de cultivo *in vitro* em meio sem suplementação hormonal (Controle- meio A).

No total foram separados randomicamente 78 oócitos Grau I, advindos de animais em fase folicular (FO) e 50 oócitos Grau I de animais em anestro (AN) cultivados *in vitro* em meio A, para serem avaliados pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão. As frequências absolutas e relativas estão na tabela 25.

Tabela 25 - Frequência absoluta e relativa (%) de COCs cultivados *in vitro* por 72 horas em meio A, obtidos do total de 30 fêmeas caninas, sendo 15 em fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN), para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Fase Folicular (FO)		Anestro (AN)	
	Frequência		Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)	Absoluta	Relativa (%)
COC Grau I	78	100	50	100
Avaliados	14	17,9	12	24
Perdidos	64	82,1	38	76

Como pode ser observado na tabela 25, do total de 78 oócitos separados para a MET pertencentes ao grupo FO (Fase Folicular), 64 (82,1%) foram perdidos durante o processamento das amostras e 14(17,9%) foram avaliados. E do total de 50 oócitos pertencentes ao grupo AN (Anestro), 38 (76%) foram perdidos e 12 (24%) foram avaliados. As perdas ocorreram durante o processamento das amostras nas etapas de inclusão, trimagem e ultramicrotomia.

Nas tabelas 26 e 27 estão apresentados os dados referentes às médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes ao oócito com e sem a zona pelúcida, núcleo, nucléolo, camada das células do *cumulus* e espessura da zona pelúcida.

Tabela 26: Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes ao oócito com e sem a zona pelúcida e espessura da zona pelúcida de oócitos cultivados *in vitro* em meio A, provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010.

	MEIO A					
	Ø oócito sem zona pelúcida		Ø oócito com zona pelúcida		Ø zona pelúcida	
	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro
Ø médio (µm)	102,3	99,2	124,5	117,8	10,4	10,3
Ø máx. (µm)	125,8	127,8	150,5	146,5	14,3	12,7
Ø min. (µm)	86,8	78,2	107,6	93,6	7,2	7,7
Desvio padrão	12,4	15,7	13,1	15,6	1,9	1,5
CV (%)	12,1	15,8	10,5	13,3	18,7	14,7

Tabela 27: Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes à camada de células do *cumulus*, núcleo e nucléolo de oócitos cultivados *in vitro* em meio A, provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010.

	MEIO A					
	Ø células do <i>cumulus</i>		Ø núcleo		Ø nucléolo	
	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro
Ø médio (µm)	22,5	24,6	19,4	21,1	4,7	5,7
Ø máx. (µm)	30,7	38,2	28,0	29,2	6,0	7,3
Ø min. (µm)	11,2	13,1	10,4	11,2	3,2	4,6
Desvio padrão	6,7	8,5	5,5	6,4	1,1	1,1
CV (%)	29,8	34,5	28,5	30,5	24,1	19,3

A análise dos dados apresentados nas tabelas 26 e 27 permitem inferir que oócitos cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal, provenientes de animais em fase folicular e anestro não diferem entre si quanto ao diâmetro do oócito com ou sem zona pelúcida, núcleo, nucléolo, camadas de células do *cumulus* e espessura da zona pelúcida.

Na tabela 28, estão apresentados os parâmetros avaliados através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, de oócitos cultivados *in vitro* por 72 horas em meio B, pertencentes ao grupo FO e AN classificados em VG₁, VG₂, VG₃, MI e degenerado.

Tabela 28 – Frequência absoluta e relativa (%) de COC's cultivado *in vitro* por 72h em meio A, avaliados na microscopia eletrônica de transmissão, pertencentes aos grupos FO (Fase folicular) e AN (Anestro), classificados em VG₁, VG₂, VG₃, MI e degenerado – Jaboticabal, 2010.

Estádio	Parâmetros					
	VG ₁	VG ₂	VG ₃	MI	degenerado	TOTAL
Reprodutivo						
FO	2 (14,3)	7 (50)	0	0	5 (35,7)	14
AN	6 (50)	2 (16,7)	0	0	4 (33,3)	12

Desta forma, são apresentadas as características ultra-estruturais de VG₁ e VG₂, encontradas em ambas as fases reprodutivas.

Característica ultra-estrutural de oócito em VG₁ anestro

O oócito em VG₁ apresenta algumas similaridades com VG_c, referentes não somente ao núcleo como também a distribuição das organelas no ooplasma. O oócito possui núcleo grande e central contendo nucléolo esférico, reticulado e com poucos sinais de condensação da cromatina. As mitocôndrias normalmente estão concentradas na região cortical, embora possam ser visualizados pequenos agrupamentos no ooplasma. Os GC encontram-se em maior quantidade do que em VG_c, e normalmente localizam-se próximos a membrana plasmática ou agrupados na região do núcleo. O CG e o REL apresentam-se densamente concentrados na região cortical e perinuclear.

Alguns oócitos exibem grandes agrupamentos de REL. As GAPj estão presentes em grande quantidade, e raramente encontra-se sinal de degeneração (Figura 28).

Característica ultra-estrutural de oócito em VG₁ do grupo Folicular

Como citado anteriormente, o oócito em VG₁ apresenta algumas similaridades com VG_c, referentes ao núcleo e a distribuição das organelas no ooplasma. O oócito em VG₁ do grupo FO, apresenta-se com núcleo ligeiramente achatado e com pequenas ondulações no envelope nuclear. Geralmente o nucléolo demonstra mais sinais de cromatina condensada. A quantidade de mitocôndria é bem variável. Alguns oócitos apresentam mitocôndrias em grande quantidade, organizadas em grupos no ooplasma, e menos concentradas na região cortical. Outros possuem mitocôndrias em menor quantidade, porém concentradas na região cortical. CG e REL presentes em quantidade moderada na região cortical ou perinuclear. O REL geralmente apresenta-se próximo a agrupamentos de mitocôndrias ou circundando gotas de lipídio, embora alguns oócitos revelem a presença de REL organizado em grandes agrupamentos na região cortical. Os GC presentes em maior quantidade do que VG_c, podem ser visualizados alinhados próximos a membrana plasmática, ou agrupados no ooplasma. Zona pelúcida homogênea com grande quantidade de GAPj. Raramente são visualizados GAPj com sinais de degeneração. Observa-se ainda a presença de moderada quantidade de microvilosidades na membrana plasmática.

Característica ultra-estrutural de oócito em VG₂ do anestro

O grupo do anestro apresentou dois oócitos em VG₂. Entretanto, as características visualizadas, com exceção do núcleo e nucléolo foram bem distintas. Ambas apresentavam núcleo arredondado ou levemente achatado, localizado na região periférica, envelope nuclear com invaginações próximas à zona pelúcida e nucléolo fibrilogramular contendo grandes vacúolos e áreas granulares. Com relação às organelas, um oócito em VG₂ continha numerosas mitocôndrias dispostas principalmente, em grandes agrupamentos próximos a membrana plasmática e GC presentes em maior quantidade do que VG₁ e alinhados nas proximidades da membrana plasmática. O CG e REL presentes em grandes quantidades e geralmente associados a retículo endoplasmático rugoso (RER). Em contrapartida, o outro oócito em VG₂ apresentava reduzido número de organelas (mitocôndrias, REL e CG), as quais se encontravam, principalmente, na região perinuclear. Além disso, neste oócito evidenciou-se a presença de um grande agrupamento de RER próximo ao núcleo (Figura 29).

Característica ultra-estrutural de oócito em VG₂ do grupo folicular

O oócito em VG₂ do grupo folicular apresenta núcleo ligeiramente achatado e com invaginações no envelope nuclear. O nucléolo fibrilogramular contém grandes vacúolos. As mitocôndrias estão presentes em maior quantidade do que em VG₁, porém com distribuição semelhante. Alguns oócitos apresentam mitocôndrias em grande quantidade, organizadas em grupos no ooplasma, e menos concentradas na região

cortical. Outros possuem mitocôndrias em menor quantidade, porém concentradas na região cortical. CG e REL presentes em grande quantidade na região cortical ou perinuclear e normalmente estão associados ao RER, o qual está densamente concentrado, principalmente na região cortical. Os GC presentes em maior quantidade do que VG_c , podem ser visualizados alinhados próximos a membrana plasmática, ou agrupados no ooplasma e na região perinuclear. As GAPj estão presentes em menores quantidades do que as observadas em VG_1 . Observa-se ainda a presença de moderada quantidade de microvilosidades na membrana plasmática (Figura 30).

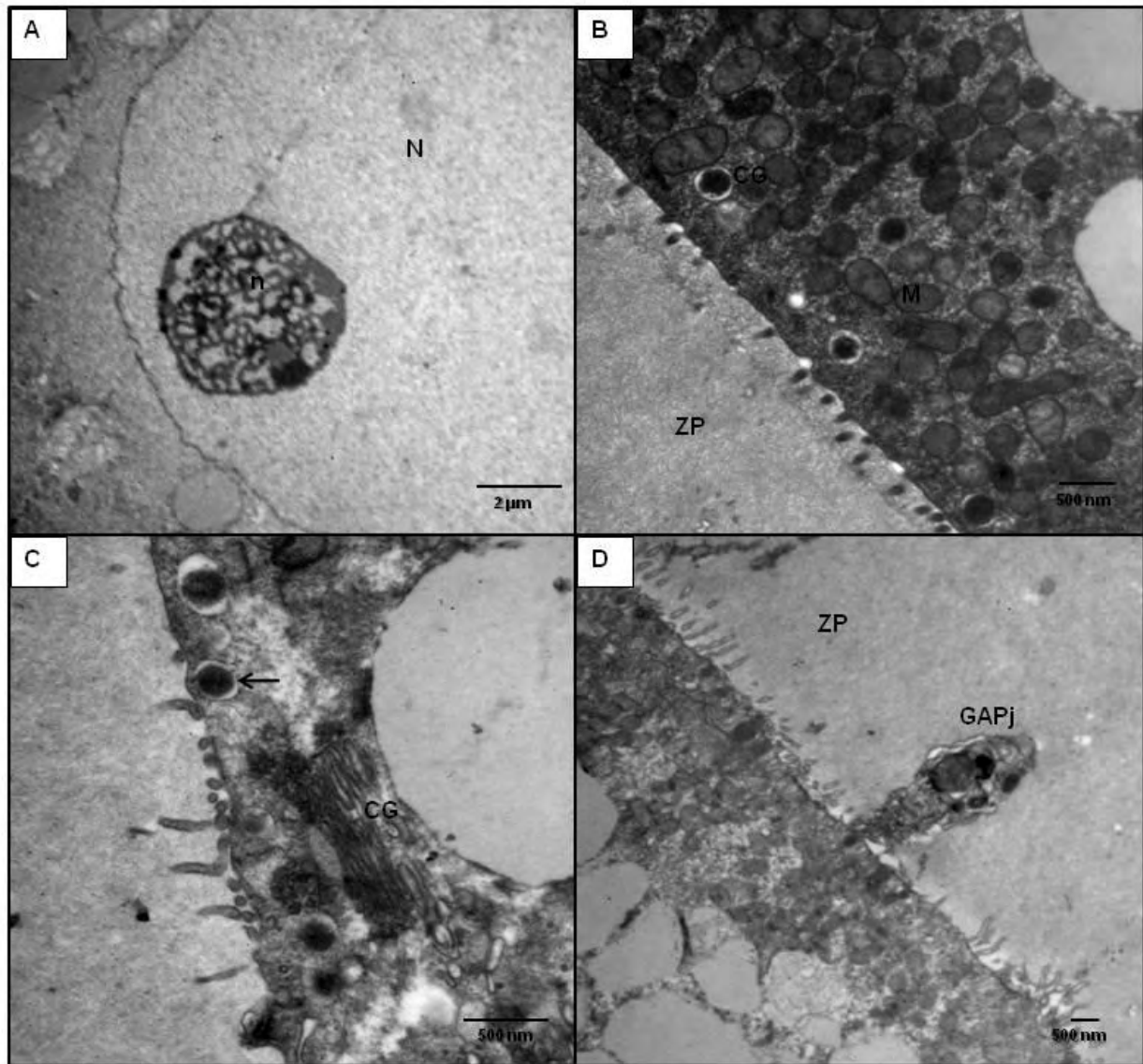


Figura 28: Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em anestro (VG₁) cultivado *in vitro* em meio A. **A:** Núcleo (N) contendo nucléolo reticulado (n) (aumento 6000 x). **B:** Mitocôndrias (M) concentradas na região periférica do oócito e grânulos corticais (GC) alinhados próximos a zona pelúcida (ZP) (aumento 20000 x). **C:** Complexo de Golgi (CG) e grânulos corticais (seta) presentes na periferia do oócito (25000 x). **D:** Região da zona pelúcida (ZP) apresentando junções GAP (GAPj) (aumento 10000 x).

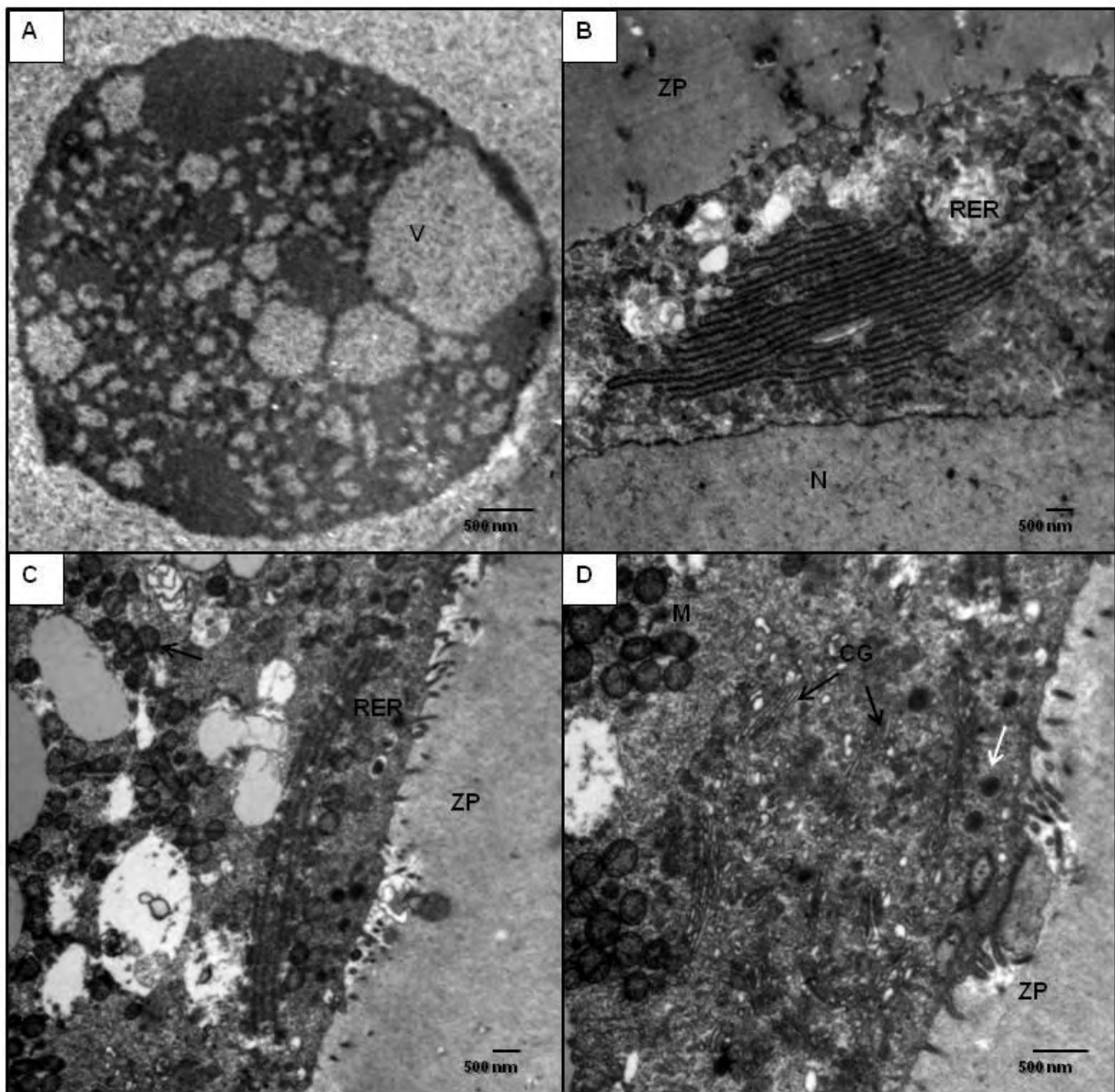


Figura 29: Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em anestro (VG₂) cultivado *in vitro* em meio A. **A:** Nucléolo reticulado contendo grandes vacúolos (V) (aumento 15000 x). **B:** Agrupamento de retículo endoplasmático rugoso (RER) entre o núcleo (N) e a zona pelúcida (ZP) (aumento 10000 x). **C:** Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) e mitocôndrias (seta) presentes próximos a zona pelúcida (ZP) (aumento 10000 x). **D:** Região periférica do oócito apresentando grande quantidade de complexo de golgi e mitocôndrias (M), além de grânulos corticais alinhados próximos a zona pelúcida (ZP) (aumento 15000 x).

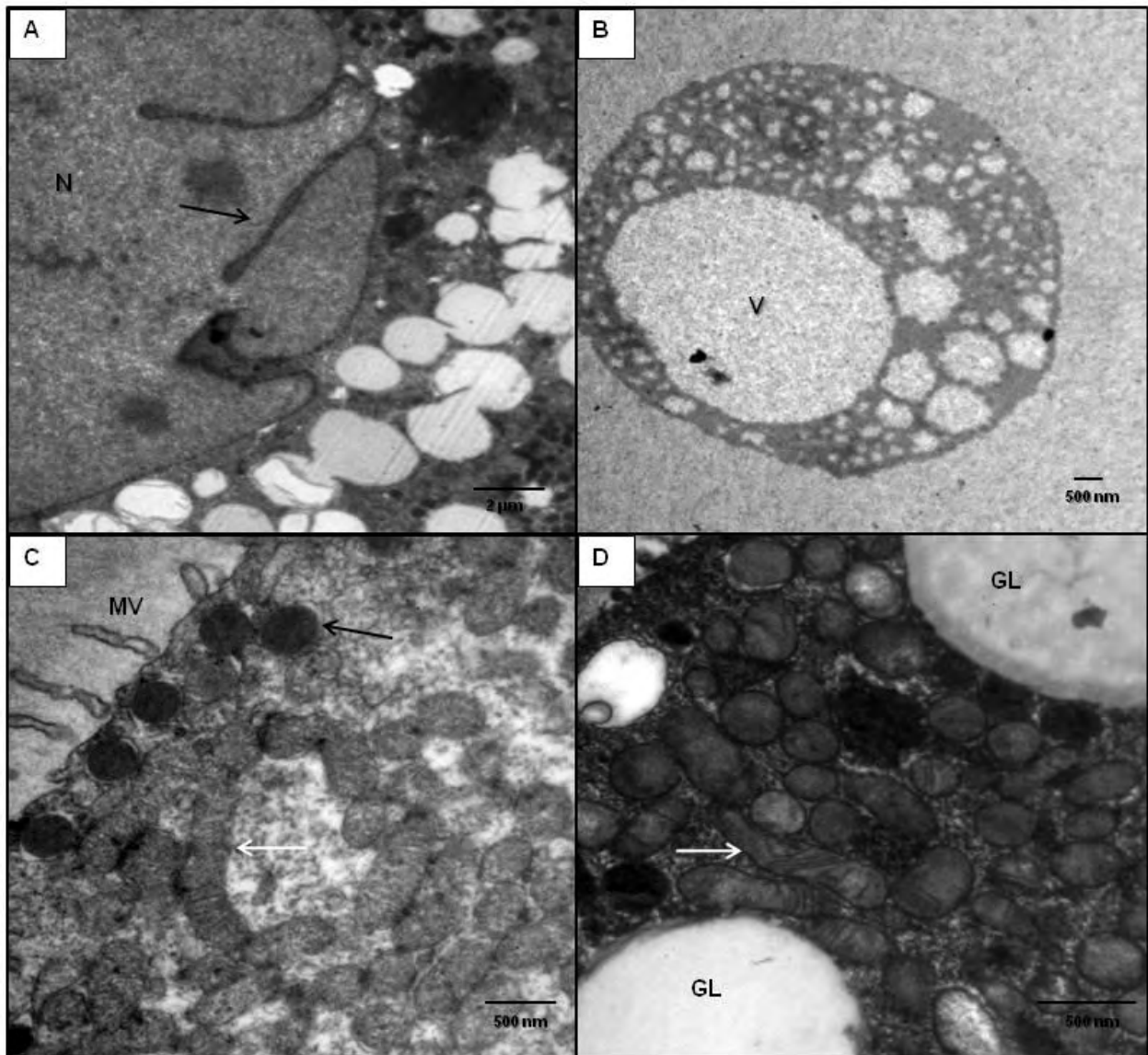


Figura 30: Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em fase folicular (VG_2) cultivado *in vitro* em meio A. **A:** Núcleo (N) apresentando invaginações no envelope nuclear (seta) (aumento 6000 x). **B:** Nucléolo reticulado contendo grande vacúolo (V) (aumento 10000 x). **C:** Região periférica do oócito apresentando microvilosidades (MV), grânulos corticais alinhados (seta preta) e mitocôndrias (seta branca) (aumento 30000 x). **D:** Mitocôndrias (seta) concentradas no ooplasma entre gotas de lipídio (GL) (aumento 30000 x).

4.3.4 – Avaliação do complexo cumulus-oócito proveniente de animais em fase folicular (FO) e anestro (AN), através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, após 72 horas de cultivo *in vitro* em meio com suplementação hormonal (meio B).

No total foram separados randomicamente 77 oócitos Grau I, advindos de animais em fase folicular (FO) e 49 oócitos Grau I de animais em anestro (AN) cultivados *in vitro* em meio B para serem avaliados pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão. As frequências absolutas e relativas estão na tabela 29.

Tabela 29- Frequência absoluta e relativa (%) de COCs cultivados *in vitro* por 72 horas em meio Meio B, obtidos do total de 30 fêmeas caninas, sendo 15 em fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN), para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Fase Folicular (FO)		Anestro (AN)	
	Frequência		Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)	Absoluta	Relativa (%)
COC Grau I	77	100	49	100
Avaliados	15	19,5	11	22,4
Perdidos	62	80,5	38	77,6

Como pode ser observado na tabela 29, do total de 77 oócitos separados para a MET pertencentes ao grupo FO (Fase Folicular), 62 (80,5%) foram perdidos durante o

processamento das amostras e 15(19,5%) foram avaliados. E do total de 49 oócitos pertencentes ao grupo AN (Anestro), 38 (77,6%) foram perdidos e 11 (22,4%) foram avaliados. As perdas ocorreram durante o processamento das amostras nas etapas de inclusão, trimagem e ultramicrotomia.

Nas tabelas 30 e 31 estão apresentados os dados referentes às médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes ao oócito com e sem a zona pelúcida, núcleo, nucléolo, camada das células do *cumulus* e espessura da zona pelúcida.

Tabela 30: Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes ao oócito com e sem a zona pelúcida e espessura da zona pelúcida de oócitos cultivados *in vitro* em meio B, provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010.

MEIO B						
	Ø oócito sem zona pelúcida		Ø oócito com zona pelúcida		Ø zona pelúcida	
	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro
Ø médio (µm)	100,3	102,0	121,6	122,8	10,8	11,0
Ø máx. (µm)	124,1	124,7	143,6	139,1	14,5	16,7
Ø min. (µm)	78,7	87,4	99,6	106,3	6,3	9,5
Desvio padrão	14,7	12,3	13,8	9,1	2,5	2,4
CV (%)	14,7	12,1	11,3	7,4	22,8	21,7

Tabela 31: Médias, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros referentes à camada de células do *cumulus*, núcleo e nucléolo de oócitos cultivados *in vitro* em meio B, provenientes de animais em fase folicular e anestro. Jaboticabal, 2010.

MEIO B						
	Ø células do <i>cumulus</i>		Ø núcleo		Ø nucléolo	
	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro	Folicular	Anestro
Ø médio (µm)	55,9	54,9	23,7	24,1	5,0	5,8
Ø máx. (µm)	141,0	102,9	34,2	29,4	9,9	8,6
Ø min. (µm)	14,8	24,9	16,0	19,4	1,6	4,0
Desvio padrão	37,1	24,8	5,2	2,5	2,5	1,5
CV (%)	66,4	45,3	22,1	10,5	50,3	26,0

Com base nos resultados apresentados nas tabelas 30 e 31, pode-se verificar que oócitos cultivados *in vitro* em meio suplementado, provenientes de animais em fase folicular e anestro não diferem entre si quanto ao diâmetro do oócito com ou sem zona pelúcida, núcleo, nucléolo, espessura da camada das células do *cumulus* e zona pelúcida.

Na tabela 32, estão apresentados os parâmetros avaliados através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, de oócitos cultivados *in vitro* por 72 horas em meio B, pertencentes ao grupo FO e AN classificados em VG₁, VG₂, VG₃, QVG, MI e degenerado.

Tabela 32 – Frequência absoluta e relativa (%) de COC's cultivado *in vitro* por 72h em meio B, avaliados na microscopia eletrônica de transmissão, pertencentes aos grupos FO (Fase folicular) e AN (Anestro), classificados em VG₁, VG₂, VG₃, QVG, MI e degenerado – Jaboticabal, 2010.

Estádio	Parâmetros						TOTAL
	VG ₁	VG ₂	VG ₃	QVG	MI	degenerado	
Reprodutivo							
FO	2 (13,3)	6 (40)	3 (20)	1 (6,7)	1 (6,7)	2 (13,3)	15
AN	3 (27,3)	5 (45,4)	0	0	0	3 (27,3)	11

Desta forma, são apresentadas as características ultra-estruturais de VG₁, VG₂, VG₃, QVG e MI encontradas nas fases reprodutivas.

Característica ultra-estrutural de oócito em VG₁ do grupo em anestro

O oócito em VG₁ do grupo em anestro cultivado *in vitro* em meio suplementado apresenta características semelhantes aos oócitos em VG₁ cultivados em meio sem suplementação hormonal. Sendo assim, o oócito possui núcleo grande e central

contendo nucléolo esférico, reticulado e com poucos sinais de condensação da cromatina. As mitocôndrias normalmente estão concentradas na região cortical, embora possam ser visualizados pequenos agrupamentos no ooplasma. Os GC encontram-se em maior quantidade do que em VG_c, e normalmente localizam-se próximos a membrana plasmática ou agrupados na região do núcleo. O CG e o REL apresentam-se densamente concentrados na região cortical e perinuclear. As GAPj estão presentes em grande quantidade, e raramente encontra-se sinal de degeneração.

Característica ultra-estrutural de oócito em VG₁ do grupo folicular

Da mesma forma que oócitos em VG₁ de animais em anestro, cultivados *in vitro*, em meio suplementado não diferem de oócitos em VG₁ cultivados em meio sem suplementação hormonal. Os oócitos em VG₁ do grupo em fase folicular, independente do meio de cultivo, também não diferiram. Sendo assim, o oócito em VG₁ do grupo FO cultivado em meio B, apresenta-se com núcleo ligeiramente achatado e com pequenas ondulações no envelope nuclear. Geralmente, o nucléolo demonstra sinais de cromatina condensada. Com relação à mitocôndria a quantidade é bem variável. Alguns oócitos apresentam mitocôndrias em grande quantidade, organizadas em grupos no ooplasma, e menos concentradas na região cortical. Outros possuem mitocôndrias em menor quantidade, porém concentradas na região cortical. O CG e REL estão presentes em quantidade moderada na região cortical e perinuclear. Normalmente, o REL está associado a agrupamentos de mitocôndrias ou circundando gotas de lipídio, entretanto, pode-se observar que alguns oócitos apresentavam grandes agrupamentos de REL na

região cortical. Os GC presentes em maior quantidade do que VG_c , podem ser visualizados alinhados próximos a membrana plasmática ou agrupados no ooplasma. Há muitas GAPj na membrana plasmática com poucos sinais de degeneração e presença moderada de microvilosidades.

Característica ultra-estrutural de oócito em VG_2 do anestro

Oócito em VG_2 do grupo do anestro possui núcleo levemente achatado, localizado na região periférica. O envelope nuclear apresenta invaginações localizadas na região próxima à zona pelúcida. O nucléolo fibrillogranular possui grandes vacúolos e áreas granulares, além de poucos sinais de condensação de cromatina. Numerosas mitocôndrias podem ser visualizadas dispostas principalmente, em grandes agrupamentos próximos a membrana plasmática. Os GC encontram-se em grande quantidade, e normalmente estão alinhados nas proximidades da membrana plasmática, raramente sendo visualizados no ooplasma. CG e REL presentes em grandes quantidades e geralmente associados ao RER. As GAPj quando presentes mostram sinais de degeneração. Microvilosidades podem ser visualizadas na superfície da membrana plasmática.

Característica ultra-estrutural de oócito em VG_2 do grupo folicular

O oócito em VG_2 do grupo folicular apresenta núcleo ligeiramente achatado com invaginações no envelope nuclear. Todos os oócitos apresentam nucléolo fibrilar denso

com pequenos vacúolos. Numerosas mitocôndrias estão distribuídas uniformemente pelo ooplasma. O CG apresenta-se em grande quantidade, normalmente concentrados próximos as GAPj e GC. Numerosos REL apresentam-se próximos a agrupamentos de mitocôndrias ou associados a gotas de lipídio. Os GC presentes em grandes quantidades apresentam-se dispostos em alinhamento ou em pequenos agrupamentos próximo a membrana plasmática.

Característica ultra-estrutural de oócito em VG₃

O núcleo em VG₃ apresenta-se mais achatado do que VG₂ e o envelope nuclear exhibe longas invaginações próximas a membrana plasmática. O nucléolo demonstra profundos sinais de inativação com marcada condensação da cromatina. O ooplasma do oócito em VG₃ apresenta-se bem homogêneo não demonstrando nenhum agrupamento de organelas. Os GC podem apresentar-se alinhados próximos a membrana plasmática ou em grandes agrupamentos nas regiões entre o núcleo e a membrana plasmática. As mitocôndrias, CG e REL estão presentes em pequenas quantidades. As GAPj são escassas e quando presentes normalmente são retraídas. Microvilosidades podem ser visualizadas na superfície da membrana plasmática (Figura 31).

Característica ultra-estrutural de oócito em QVG

O oócito em QVG apresenta dois pares de cromossomos separados por filamentos e envoltos por um envelope nuclear espesso e fragmentado. O material nuclear situa-se próximo a periferia do núcleo. As mitocôndrias estão homogeneamente distribuídas pelo ooplasma. Há escassos CG e numerosos GC agrupados próximos ao núcleo. O REL está presente em quantidade moderada. O número de GAPj é bem reduzido e as microvilosidades estão presentes principalmente próximas a região do núcleo. O oócito apresenta-se envolto pelas células do *cumulus* (Figura 32)

Característica ultra-estrutural de oócito em Metáfase I

O oócito em MI apresenta cromossomos distribuídos em pares alinhados paralelamente com a membrana plasmática, próximo a zona pelúcida. Apresenta numerosas mitocôndrias concentradas principalmente na região cortical, poucos GC alinhados próximos a membrana plasmática e grande quantidade de REL, homogeneamente distribuído pelo ooplasma. O número de GAPj é bem reduzido e as microvilosidades estão presentes, principalmente próximas a região do núcleo. O oócito apresenta-se envolto pelas células do *cumulus* (Figura 33).

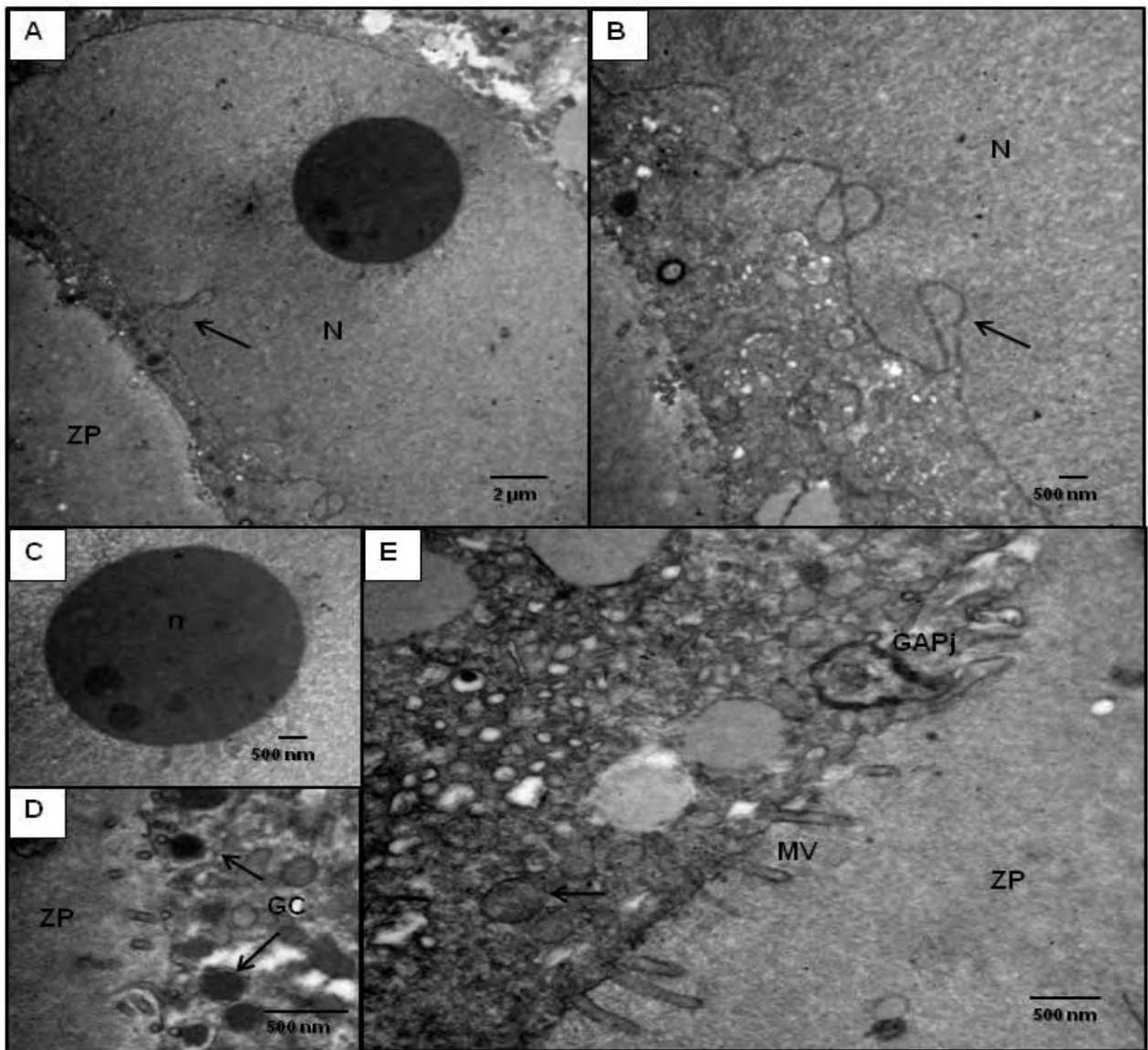


Figura 31: Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em fase folicular (VG_3) cultivado *in vitro* em meio B. **A:** Núcleo achatado (N) apresentando longas invaginações (seta) no envelope nuclear próximo a zona pelúcida (ZP) (aumento 5000 x). **B:** Invaginações (seta) no núcleo (N) (aumento 12000 x). **C:** Nucléolo (n) denso e condensado (aumento 10000 x). **D:** Grânulos corticais (GC) alinhados próximos a zona pelúcida (ZP) (aumento 30000 x). **E:** Região da zona pelúcida (ZP) apresentando microvilosidades (MV), junções do tipo GAP (GAPj) e escassas mitocôndrias (seta) (aumento 25000 x).

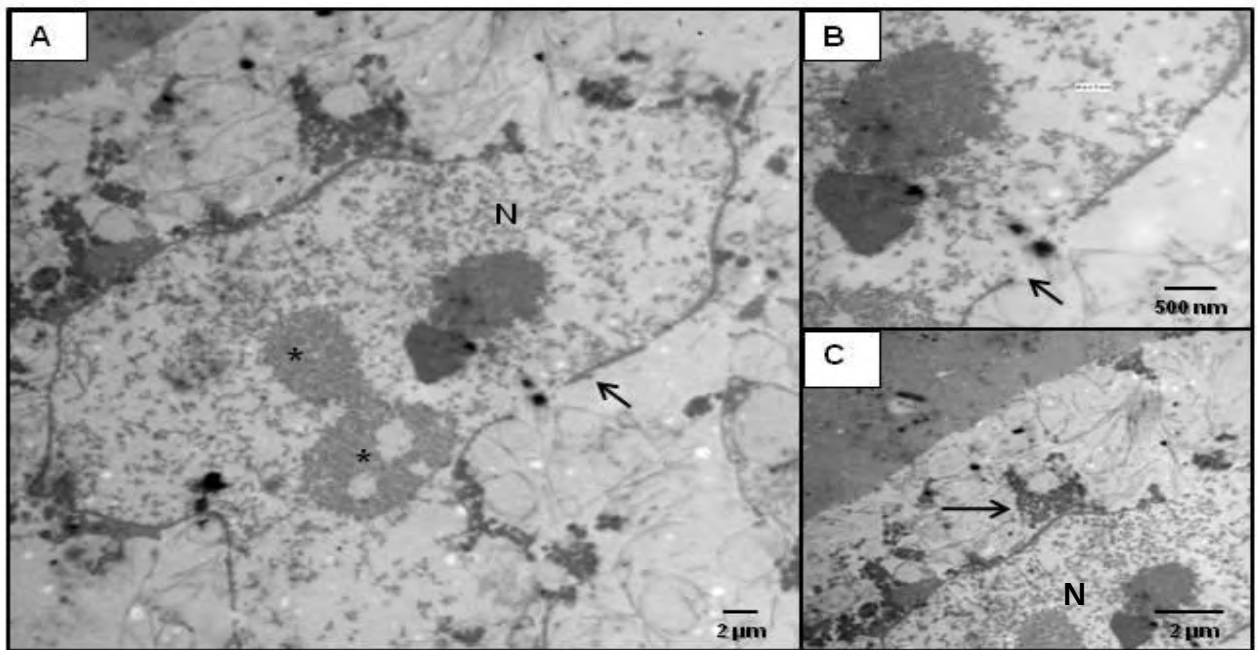


Figura 32: Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em fase folicular (QVG) cultivado *in vitro* em meio B. **A:** Núcleo (N) apresentando dois pares de cromossomos (*) envoltos por envelope nuclear espesso (seta) (aumento 3000 x). **B:** Ruptura no envelope nuclear (seta) (aumento 12000 x). **C:** Grânulos corticais agrupados próximos ao núcleo (N) (aumento 5000 x).

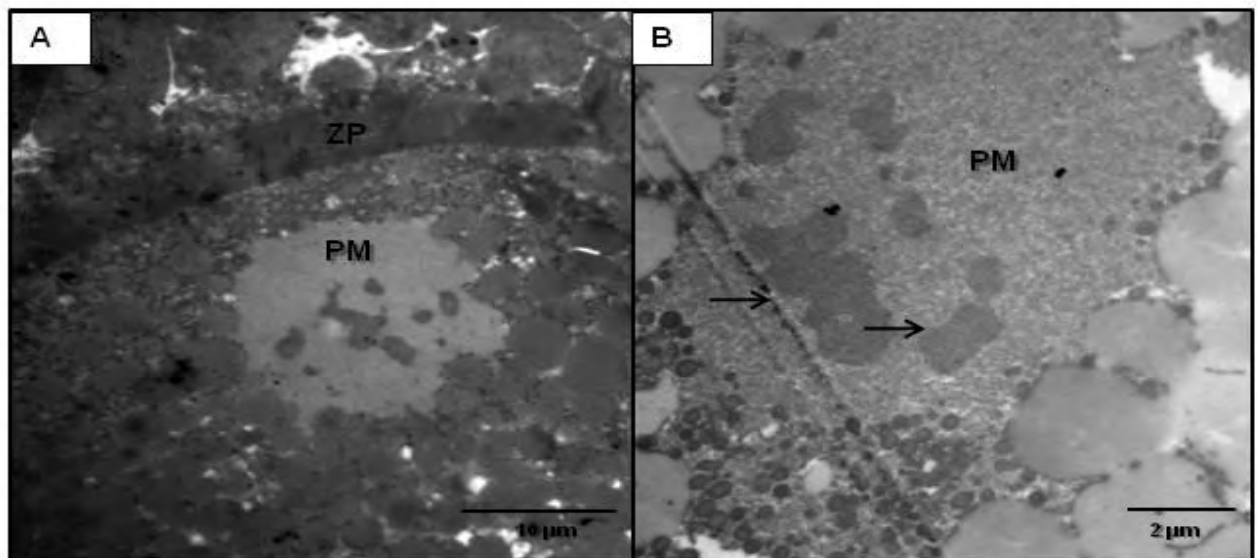


Figura 33: Eletronmicrografia de transmissão de oócito de fêmea canina em fase folicular (MI) cultivado *in vitro* em meio B. **A:** Placa metafisária (PM) alinhada em paralelo com a membrana plasmática próxima a zona pelúcida (ZP) (aumento 2000 x). **B:** Placa metafisária (PM) apresentando cromossomos agregados (setas) (aumento 7500 x).

4.4 - EXPERIMENTO IV - “Efeito da suplementação hormonal no meio de cultivo sobre a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de fêmeas caninas obtidos em diferentes fases do ciclo estral”

O experimento IV consistiu em analisar a maturação nuclear e citoplasmática dos complexos *cumulus*-oócitos de fêmeas caninas em diferentes condições reprodutivas após a maturação *in vitro* em meio A (sem suplementação hormonal) e meio B (com suplementação hormonal) através da coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 de acordo com a metodologia descrita por CHERR et al. (1988) com algumas modificações. Assim os resultados são apresentados separadamente, de tal forma que a avaliação da maturação nuclear dos complexos *cumulus*-oócitos de fêmeas caninas em fase folicular (FO) ou anestro (AN) maturados *in vitro* em meio controle e suplementado estão dispostos no item 4.4.1. e a avaliação da maturação citoplasmática no item 4.4.2.

No experimento IV, o número total de COC's Grau I separados aleatoriamente para avaliação da maturação nuclear e citoplasmática foi de 126 oócitos pertencentes ao grupo FO (Fase Folicular) e 97 para o grupo AN (Anestro). As frequências absolutas e relativas (%) de COC's recuperados encontram-se na tabela 33:

Tabela 33 – Frequência absoluta e relativa (%) de COC's grau I recuperados de 15 fêmeas caninas em fase folicular (FO) e 15 em anestro (AN) para avaliação da maturação nuclear e citoplasmática após o período de maturação *in vitro* em meio controle (A) e meio suplementado com P₄, E₂ e LH (meio B) – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Frequência Absoluta e Relativa (%)			
	Fase Folicular (FO)		Anestro (AN)	
	A	B	A	B
COC's Grau I	62 (100)	64 (100)	48 (100)	49 (100)
Avaliados	46 (74,2)	44 (68,7)	34 (70,8)	34 (69,4)
Perdas	16 (25,8)	20 (31,3)	14 (29,2)	15 (30,6)

4.4.1. -“Efeito da suplementação hormonal no meio de cultivo sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas obtidos em diferentes fases do ciclo estral”

Na tabela 34 estão apresentados dados da frequência absoluta e relativa de oócitos cultivados *in vitro* em meio A (meio sem suplementação hormonal) e meio B (meio com suplementação hormonal), obtidos de fêmeas caninas em diferentes condições reprodutivas, classificados de acordo com os diferentes graus de maturação nuclear (VG, QVG, MI, MII, retomada da meiose e degenerados).

Tabela 34 – Frequência absoluta e relativa (%) de oócitos obtidos de fêmeas caninas em fase folicular (FO) e anestro (AN), classificados de acordo com os diferentes graus de maturação nuclear (VG, QVG, MI, MII, retomada da meiose QVG-MII e degenerados) após o período de maturação *in vitro* em meio controle (A) e meio suplementado com P₄, E₂ e LH (meio B) – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Frequência absoluta e relativa (%)			
	Fase Folicular (FO)		Fase Anestro (AN)	
	Meio A	Meio B	Meio A	Meio B
VG	6 (13%)	2 (4,5%)	11 (32,3%)	6 (17,6%)
QVG	12(26,1%)	14 (32%)	9 (26,5%)	13 (38,2%)
MI	3 (6,5%)	5 (11,3%)	2 (5,9%)	4 (11,8%)
MI	3 (6,5%)	10 (22,7%)	2 (5,9%)	2 (6%)
Retomada da meiose (QVG-MII)	18 (39,1%)	29 (66%)	13 (38,3%)	19 (55,9%)
Degenerados	22 (47,8%)	13 (29,5%)	10 (29,4%)	9 (26,4%)
Avaliados	46 (100%)	44 (100%)	34 (100%)	34 (100%)

Analisando a tabela 34, observa-se que oócitos cultivados *in vitro* em meio controle (meio A) pertencentes a animais da fase de anestro apresentam os maiores índices de VG (32,3%). Além disso, verifica-se que a retomada da meiose (QVG-MII) no meio B, tanto para a fase folicular (66%) quanto para o anestro (55,9%), foram maiores quando comparadas a retomada da meiose de oócitos cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal. Entretanto, o que contribui para elevar este índice no grupo do anestro é à taxa de QVG (38,2%), já para oócitos pertencentes a animais da fase folicular é o índice de MII (22,7%). Com relação aos degenerados, observar-se que

oócitos pertencentes ao grupo folicular, cultivados em meio sem suplementação hormonal apresentaram os maiores índices (47,8%) .

Nas tabelas 35 e 36 são apresentados os resultados referentes à comparação dos diferentes meios, respectivamente, dentro de cada fase do ciclo reprodutiva (fase folicular e anestro) para cada estágio de maturação nuclear.

Tabela 35 – Comparação entre os meios de cultivo A e B, dentro de cada fase do ciclo reprodutivo (fase folicular e anestro) para os estádios de maturação nuclear (VG, QVG, MI, MII, Retomada da meiose QVG-MII e Degenerados) – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Comparação entre os diferentes meios	
	Fase Folicular	Fase Anestro
	Meio A x Meio B	Meio A x Meio B
Degeneração	Sim* (A > B)	Não
Vesícula Germinativa	Não	Sim* (A > B)
Quebra de vesícula	Não	Não
Metáfase I	Não	Não
Metáfase II	Sim* (B > A)	Não
Retomada de Meiose	Sim* (B > A)	Sim* (B > A)

- As diferenças são consideradas significativas ($p < 0,05$)

Tabela 36 - Comparação dos meios de cultivo (meio A e meio B) entre as fases folicular e anestro para cada estágio de maturação nuclear (VG, QVG, MI, MII, Retomada da meiose QVG-MII e Degenerados) – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Comparação entre as diferentes fases	
	Meio A	Meio B
	Folicular x Anestro	Folicular x Anestro
Degeneração	Sim* (Folicular > Anestro)	Não
Vesícula Germinativa	Sim* (Anestro > Folicular)	Sim* (Anestro > Folicular)
Quebra de vesícula	Não	Não
Metáfase I	Não	Não
Metáfase II	Não	Sim* (Folicular > Anestro)
Retomada de Meiose	Não	Não

* As diferenças são consideradas significativas ($p < 0,05$)

De acordo com os resultados apresentados na tabela 35 pode-se verificar que a suplementação hormonal no meio de cultivo favorece significativamente a maturação nuclear tanto para o estágio de MII (oócitos pertencentes ao grupo folicular) quanto para a retomada da meiose (oócitos pertencentes a ambas as fases reprodutivas). Em contrapartida a ausência de hormônios no meio de cultivo promove a degeneração oocitária no grupo folicular e a estagnação meiótica no grupo do anestro, visto que neste grupo, oócitos cultivados em meio sem suplementação hormonal apresentaram maiores índices de vesícula germinativa quando comparados a oócitos cultivados em meio suplementado ($p < 0,05$).

Na tabela 36, pode-se observar que independente do meio de cultivo, oócitos provenientes de animais em anestro demonstram menor progressão meiótica, visto que apresentam maiores índices de vesícula germinativa quando comparados ao grupo folicular ($p < 0,05$). Por outro lado, oócitos pertencentes ao grupo folicular, da mesma forma que respondem bem a presença hormonal no meio cultivo, fato verificado pelo elevado índice de MII, também sofrem com a falta de hormônios, o qual ocasiona altas taxas de degeneração oocitária.

4.4.2. -“Efeito da suplementação hormonal no meio de cultivo sobre a maturação citoplasmática de oócitos de fêmeas caninas obtidos em diferentes fases do ciclo estral”

Na tabela 37 estão apresentados dados da frequência absoluta e relativa de oócitos cultivados *in vitro* em meio A (meio sem suplementação hormonal) e meio B (meio com suplementação hormonal), obtidos de fêmeas caninas em diferentes condições reprodutivas, classificados de acordo com os diferentes graus de maturação citoplasmática (Imaturos, Transição e Maturos). Foram classificados quanto à maturação citoplasmática apenas oócitos VG, QVG, MI e MII os degenerados não foram avaliados.

Tabela 37 – Frequência absoluta e relativa (%) de oócitos obtidos de fêmeas caninas em fase folicular (FO) e anestro (AN), classificados de acordo com os diferentes graus de maturação citoplasmática (Imaturos, Transição e Maturos) após o período de maturação *in vitro* em meio controle (A) e meio suplementado com P₄, E₂ e LH (meio B) – Jaboticabal, 2010.

Parâmetros	Frequência absoluta e relativa (%)			
	Fase Folicular		Fase Anestro	
	Meio A	Meio B	Meio A	Meio B
Avaliados	24 (100%)	31 (100%)	24 (100%)	25 (100%)
Imaturos	10 (41,7%)	9 (29%)	19 (79,2%)	15 (60%)
Transição	14 (58,3%)	21 (67,8%)	5 (20,8%)	9 (36%)
Maturos	0	1(3,2%)	0	1 (4,0%)

Na tabela 37, verifica-se que oócitos de animais em anestro apresentam as maiores taxas de oócitos imaturos e menores em transição, independente do meio de cultivo quando comparados ao grupo folicular. Somando-se a isto, pode-se constatar um efeito positivo da suplementação hormonal no meio de cultivo tanto para o grupo folicular quanto para o anestro, nos quais foram observados os menores índices de oócitos imaturos, maiores em transição, além da presença de oócitos apresentando maturação citoplasmática completa.

Nas tabelas 38 e 39 são apresentados os resultados referentes à comparação dos diferentes meios, respectivamente, dentro de cada fase do ciclo reprodutiva (fase folicular e anestro) para cada estágio de maturação citoplasmática.

Tabela 38 – Comparação entre os meios de cultivo A e B, dentro de cada fase do ciclo reprodutivo (fase folicular e anestro) para os estádios de maturação citoplasmática (Imaturos, Transição e Maturos) – Jaboticabal, 2010.

Estádios	Comparação entre os diferentes meios	
	Fase Folicular	Fase Anestro
	Meio A x Meio B	Meio A x Meio B
Imaturo	Não	Sim (A>B)
Transição	Não	Não
Maturo	Não	Não

* As diferenças são consideradas significativas ($p < 0,05$)

Tabela 39 - Comparação dos meios de cultivo (meio A e meio B) entre as fases folicular e anestro para cada estágio de maturação citoplasmática (Imaturos, Transição e Maturos) – Jaboticabal, 2010.

Estádios	Comparação entre as diferentes fases	
	Meio A	Meio B
	Folicular x Anestro	Folicular x Anestro
Imaturo	Sim* (Anestro > Folicular)	Sim* (Anestro > Folicular)
Transição	Sim* (Folicular > Anestro)	Sim* (Folicular > Anestro)
Maturo	Não	Não

* As diferenças são consideradas significativas ($p < 0,05$)

Comparando-se os diferentes meios de maturação dentro de cada fase (tabela 38), observa-se que a ausência de hormônio no meio de maturação de oócitos advindos de animais em anestro, compromete diretamente o desenvolvimento da maturação citoplasmática, visto que, oócitos cultivados em meio A apresentam porcentagens significativamente maiores de oócitos imaturos do que oócitos cultivados em meio B pertencentes ao mesmo grupo ($p < 0,05$). Para a fase folicular, embora haja uma tendência a um melhor desempenho no grupo cultivado em meio suplementado, a qual pode ser evidenciada pela menor taxa de oócitos imaturos, maior índice de oócitos em transição e presença de oócitos apresentando maturação citoplasmática completa, estatisticamente a suplementação hormonal no meio de cultivo não interferiu sobre a maturação citoplasmática, com os meios demonstrando similaridade entre si ($p > 0,05$).

Comparando os estádios de maturação citoplasmática dentro de cada meio de cultivo entre as diferentes fases do ciclo estral (tabela 39), verifica-se que independente do meio de maturação, o grupo folicular demonstram melhor desempenho do que o grupo do anestro, visto que apresentam menores índices de oócitos imaturos e maiores taxas de oócitos em transição ($p < 0,05$). Com isso, pode-se inferir que a fase do ciclo estral interfere sobre a maturidade citoplasmática de oócitos caninos.

5. DISCUSSÃO

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

Embora seja uma técnica utilizada rotineiramente em muitas espécies (bovinos, suínos, camundongos e felinos), em canídeos, o sistema de maturação *in vitro* é considerado ineficiente. Esse fato é comprovado pelos baixos índices de metáfase, elevadas taxas de oócitos degenerados e por uma única prenhez obtida através da fertilização *in vitro* (LUVONI et al., 2006). A ineficiência do processo deve-se as peculiaridades da fisiologia reprodutiva da cadela, as quais têm dificultado a adaptação da técnica de MIV, não somente por esta espécie se distinguir em muitos aspectos da maioria dos outros mamíferos, como também por apresentar pontos importantes que precisam ser esclarecidos tais como: o papel do oviduto sobre a maturação oocitária, os fatores relacionados com o reinício e a progressão da meiose, a morfologia oocitária e o seu papel no processo de maturação, a importância da interação entre as células do *cumulus* e oócito após a ovulação e o real efeito do estágio do ciclo estral sobre a competência meiótica (MAHI e YANAGIMACHI, 1976; HEWITT E ENGLAND, 1998a, 1998b; OTOI et al., 1999; FARSTAD, 2000b, GOODROWE et al., 2000; BOGLIOLO et al., 2002; RODRIGUES e RODRIGUES, 2003b; SONGSASEN et al., 2002; WILLINGHAM-ROCHY et al., 2003; HAENISCH-WOEHL et al., 2003; FONTBONE et al., 2004; LUVONI et al., 2005).

Um dos objetivos do presente trabalho foi correlacionar à fase do ciclo estral à morfologia oocitária e verificar se há influência sobre a competência meiótica. Embora alguns estudos demonstrem que a idade da doadora (NICKSON et al., 1993; HEWITT and ENGLAND, 1998a), diâmetro oocitário (THEISS, 1997; OTOI et. al, 2001) e a qualidade morfológica do oócito exerçam influências sobre as taxas de MIV em cadelas, o efeito do estágio do ciclo estral ainda é bastante controverso. Enquanto alguns

pesquisadores indicam que não há associação (HEWITT and ENGLAND, 1997; OTOI et al., 2002; RODRIGUES and RODRIGUES, 2003a; SONGSASEN and WILDT, 2005; APPARÍCIO, 2010), outros demonstram que o *status* reprodutivo da cadela influencia a capacidade de desenvolvimento oocitário (YAMADA et al., 1993; LUVONI et al., 2001; OTOI et al., 2001; WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003; KIM et al., 2004). De tal forma que oócitos obtidos de folículos pré-ovulatórios e durante a fase folicular (proestro e estro) apresentam melhores índices de maturação do que oócitos recuperados de animais em outras fases reprodutivas (YAMADA et al., 1993; OTOI et al., 2001; KIM et al., 2004; SONGSASEN and WILDT, 2007).

As explicações para o efeito do estágio do ciclo estral sobre a competência meiótica são muitas. Segundo MARTINS et al. (2006), os elevados índices de progressão meiótica obtidos em oócitos recuperados durante o estro deve-se a maior exposição ao ambiente folicular, o qual é rico em hormônios, fatores de crescimento e outros compostos até então desconhecidos. Por outro lado, LUVONI et al. (2005), relatam que a influência do estágio do ciclo estral está relacionada com o *status* funcional das GAPjs entre o oócito e as células do *cumulus*. Assim, as baixas taxas de maturação durante o anestro seriam decorrentes da ausência de comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito. Há ainda, trabalhos que afirmam que, como a retomada da meiose ocorre durante o processo de crescimento oocitário, o qual se dá coordenadamente ao crescimento folicular, a influência da fase do ciclo estral sobre as taxas de maturação *in vitro* em cadelas estaria correlacionada ao diâmetro oocitário atingido dentro de cada fase reprodutiva. Com isso, as maiores taxas de maturação em oócitos provenientes de animais em fase folicular seriam decorrentes do maior crescimento oocitário atingido durante esta fase (HEWITT and ENGLAND, 1998a; OTOI et al., 2001).

Por este prisma, identificamos a importância de ao correlacionarmos a fase do ciclo estral à competência meiótica, considerarmos tanto o aspecto morfológico quanto o diâmetro oocitário. Com vistas nisto, no presente estudo, optamos não somente por utilizar apenas COC's grau I com diâmetro $\geq 110\mu\text{m}$ para as análises morfológicas antes

e após a MIV, como também verificar a correlação entre a fase reprodutiva e a ocorrência intraovariana de COC's grau I com diâmetro menor e maior ou igual a 110µm encontrados em ovários de fêmeas caninas em fase folicular e anestro.

Sobre a distribuição intraovariana do diâmetro oocitário, os resultados da tabela 5, mostram que independente da condição reprodutiva da cadela, a ocorrência de COC's grau I com diâmetro igual ou superior a 110µm (82% e 76,4%, respectivamente para fêmeas em fase folicular e anestro) é significativamente maior quando comparada a oócitos com diâmetro inferior a 110µm (18% e 23,6%, respectivamente para fêmeas em fase folicular e anestro). Embora esses dados não corroborem com OTOI et al. (2001), os quais relatam que ovários de cadelas em fase folicular (17,8%) apresentam significativamente menor porcentagem de oócitos com diâmetro inferior a 110µm quando comparados a cadelas em anestro (69,7%) e diestro (58,3%). Os resultados obtidos estão de acordo com RIBEIRO (2007), que reporta a maior ocorrência de oócitos com diâmetro superior a 110µm, e relata não haver diferenças ao se comparar as classes de oócitos de mesmo diâmetro em cadelas em anestro, estro natural e estro induzido. Assim, com base em nossos resultados, podemos inferir que ao selecionar COC's grau I, de acordo com os critérios morfológicos (número de camadas de células do *cumulus* e aspecto citoplasmático), naturalmente estará selecionando maior proporção de oócitos com diâmetro $\geq 110\mu\text{m}$, independente do status reprodutivo da fêmea canina.

Entretanto, não podemos desconsiderar que embora os estudos relatem que somente oócitos com diâmetro superior a 110µm sejam capazes de retomar a meiose (OTOI et al.,1997; 2001), este não deve ser o único fator limitante do sucesso na maturação *in vitro* na espécie canina, pois em média, apenas 20% dos oócitos com diâmetro $\geq 110\mu\text{m}$ atingem MII quando cultivados em diferentes meios de maturação (SONGSASEN & WILDT, 2007).

Esse fato ressalta a importância de aprofundar os conhecimentos sobre a morfologia do oócito utilizado atualmente na MIV de cadelas. Até o momento, poucas pesquisas tiveram a ultra-estrutura oocitária canina como principal foco de estudo

(HAENISCH-WOEHL et al., 2003; TESORIERO, 1981; LOPEZ et al., 2006; VIARIS DE LESEGNO et al., 2008a e b; DE LOS REYS et al., 2009; CHEBROUT et al., 2009), além disso, em nenhuma dessas pesquisas foi avaliada a comunicação entre as células do *cumulus*, bem como, a maturação nuclear e citoplasmática de complexo *cumulus*-oócito canino de animais em fase folicular e anestro, antes (zero hora) e após o cultivo *in vitro*, em diferentes meios de maturação utilizando tanto a microscopia eletrônica de varredura quanto a transmissão. Por este prisma, os resultados obtidos no presente estudo são considerados inéditos.

De acordo com a análise, efetuada através da MET, das características ultra-estruturais de oócitos caninos classificados em VG_c e VG_p antes do processo de maturação (0h), apresentados na tabela 14, pode-se observar que enquanto oócitos em VG_c pertencentes ao grupo do anestro apresentam claros sinais de imaturidade nuclear e citoplasmática como: nucléolo reticulado fibrillogranular com escassos sinais de condensação de cromatina, organelas distribuídas heterogeneamente pelo ooplasma, poucos grânulos corticais e associação de complexo de golgi a junções do tipo GAP. Oócitos em VG_c de animais em fase folicular apresentam tanto sinais de imaturidade quanto maturidade nuclear e citoplasmática. Com isso, os nossos resultados não corroboram com VIARIS DE LESEGNO et al. (2008b), os quais, com base em um estudo ultra-estrutural em oócitos de animais em anestro afirmam que apenas oócitos em VG_p apresentam sinais de maturidade.

No presente estudo, com exceção de apenas um oócito em VG_c do grupo folicular que se mostrou claramente imaturo (mitocôndrias em menor quantidade e concentrada na periferia do oócito e nucléolo fibrillogranular reticulado), os demais apresentaram alguns sinais de maturidade citoplasmática e inatividade transcricional, como a presença de nucléolo fibrilar denso, distribuição mais uniforme de organelas e maior quantidade de grânulos corticais quando comparados a oócitos em VG_c do grupo do anestro. Além disso, sete dos oito oócitos classificados em VG_c, não somente demonstraram pequenas ondulações no envelope nuclear, o que geralmente é descrito

apenas em oócitos em VG_p, como também possuíam o núcleo ligeiramente deslocado em direção a periferia, como pode ser observado na Figura 16A.

Segundo estudo realizado por VIARIS DE LESEGNO et al. (2008a), em que foi avaliado a ultra-estrutura do oócito canino durante o processo de maturação *in vivo*, os pesquisadores relatam que 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. Assim, de acordo com esses pesquisadores 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. Isso nos sugere que os oócitos do grupo folicular classificados em VG_c, mas com sinais de maturidade, provavelmente eram provenientes de animais que haviam sofrido a sinalização que induz a maturação, o que justifica não somente os sinais encontrados de maturidade citoplasmática como também o deslocamento do núcleo em direção a periferia e a ondulação no envelope nuclear. Entretanto, vale ressaltar que embora apresentem sinais de maturidade, esses oócitos são menos maduros do que os oócitos classificados em VG_p pertencentes ao mesmo grupo.

A respeito do VG_p, no presente estudo não foi identificado nenhum oócito com esta classificação no grupo de anestro, para possibilitar a comparação com as características encontradas com o VG_p do grupo folicular. Todavia, não podemos afirmar que cadelas em anestro não possuam oócitos maduros e transcricionalmente inativo (VG_p), visto que já foi previamente descrito na espécie por VIARIS DE LESEGNO et al. (2008b). Assim, a ausência de oócitos em VG_p no grupo do anestro, pode ser justificada pelo menor número de amostras avaliadas no presente estudo (15 amostras), quando comparado ao analisado por VIARIS DE LESEGNO et al. (2008b) (78 amostras). Fato esse que ocorreu em decorrência da elevada perda de material durante o processamento das amostras. Contudo, deve ser considerado que a ausência de VG_p quando a amostra avaliada é pequena, sugere que a proporção intraovariana

de oócitos imaturos (VG_c) em animais em anestro é superior a de oócitos maduros (VG_p).

Para VIARIS DE LESEGNO et al. (2008b) a presença de oócitos com sinais de maturidade citoplasmática em 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 o anestro. Entretanto, como a população de VG_p é inferior a VG_c durante este período, especula-se que a provável evolução destes oócitos seja a atresia e que oócitos pré-ovulatórios seriam provenientes da população de VG_c (VIARIS DE LESEGNO et al., 2008b).

Com relação aos oócitos em VG_p , de animais em fase folicular, estes apresentam maiores sinais de maturidade citoplasmática quando comparados aos oócitos em VG_c pertencentes ao grupo folicular e anestro, tais como mitocôndrias distribuídas de forma mais homogênea, maior número de grânulos corticais e a maior frequência de GAPj com sinais de degeneração. Além disso, possuem núcleo disposto na periferia do oócito contendo nucléolo fibrilar denso e envelope nuclear com pequenas ondulações. Características semelhantes às evidenciadas por VIARIS DE LESEGNO et al. (2008a) em oócitos coletados no período compreendido entre a onda de LH e a ovulação.

Em espécies como ovinos (MOOR et al., 1980), bovinos (KRUIP et al., 1983) e eqüinos (GRONDAHL et al., 1995) é descrito que a onda de LH induz a ruptura da comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito prevenindo a passagem de sinais inibitórios desencadeando a retomada da meiose. Entretanto, VIARIS DE LESEGNO et al. (2008a) afirmam que embora em canídeos, a ruptura da comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito possa estar relacionada com a retomada da meiose, visto que foi observado uma redução gradativa das GAPjs a medida que os oócitos se tornavam mais maduros nuclear e citoplasmaticamente com a completa interrupção da comunicação coincidindo com os primeiros sinais de reinício e progressão meiótica. É improvável que tal evento seja desencadeado pelo LH, uma vez que a completa interrupção somente foi evidenciada cerca de três dias após a ovulação em oócitos avaliados ultra-estruturalmente durante o processo de maturação *in vivo*. Com base em

tais afirmações, podemos inferir que em nosso estudo, a presença de GAPj com sinais de degeneração em oócitos em VG_p associados ao maior grau de maturidade nuclear e citoplasmática quando comparadas a VG_c do grupo folicular e anestro, pode ser indicativo de que estes oócitos possuem maior capacidade de maturar, uma vez que a degeneração da GAPj pode reduzir a passagem de sinais inibitórios da meiose ao oócito.

A partir do exposto, analisando os oócitos pertencentes ao grupo folicular, pode-se observar que nesta fase do ciclo estral a maturidade citoplasmática apresenta três padrões: VG_c imaturo e transcrionalmente ativo, VG_p maturo e transcrionalmente inativo e um padrão intermediário (VG_i), no qual o núcleo inicia o seu deslocamento em direção a periferia, apresentando alguns sinais de maturidade e inatividade transcrional.

A respeito dos resultados apresentados nas tabelas 12 e 13 sobre os diâmetros do oócito com e sem zona pelúcida, núcleo, nucléolo e espessura da zona pelúcida e camada das células do *cumulus*, pode-se verificar que não houve diferença significativa ao se comparar as médias de oócitos recém colhidos provenientes de animais em fase folicular e anestro. Dados que corroboram com LEE et al. (2008), que ao avaliar o diâmetro do oócito com e sem zona pelúcida e espessura da zona pelúcida em diferentes fases do ciclo reprodutivo (fase folicular, lútea, anestro e oócitos ovulados *in vivo* coletados da tuba uterina), observou que apenas oócitos ovulados *in vivo* possuíam diâmetros significativamente maiores quando comparado as demais fases. Contudo, em nosso estudo, observa-se que enquanto o diâmetro do oócito com e sem zona pelúcida apresentam coeficiente de variação (CV) menor que 15%, provavelmente devido à prévia mensuração do diâmetro oocitário durante o processo de seleção, o CV das demais estruturas foi muito elevado (superior a 15%), como consequência da grande diferença encontrada entre os diâmetros máximo e mínimo, o que certamente ocorreu devido ao reduzido tamanho da amostra avaliada (13 oócitos do grupo folicular e 15 do anestro).

Sobre a análise, através da MEV, das características ultra-estruturais de oócitos antes do processo de maturação (0h), observou-se, de acordo com os resultados apresentados nas tabelas 7 e 8, que tanto em oócitos provenientes do grupo folicular quanto do anestro, as células do *cumulus* apresentam arranjo regular e forma arredondada, o mesmo observado por HAENISCH-WOEHL et al. (2003) em oócitos de cadelas pré-púberes. Entretanto, com relação à intensidade de comunicação entre estas células, enquanto HAENISCH-WOEHL et al. (2003) verificaram que as células do *cumulus* de cadelas pré-púberes conectam-se frouxamente através de poucos processos curtos, denotando a reduzida capacidade de maturar destes oócitos, dado que a comunicação entre estas células é importante para o desenvolvimento oocitário (LUVONI et al. 2001). Os nossos resultados revelaram que a comunicação é estabelecida independente da condição reprodutiva, através de intensos processos curtos (tabelas 9 e 10 e figura 13). Com isto, podemos sugerir que oócitos provenientes de animais em fase folicular e anestro possuem maior capacidade de retomada da meiose do que oócitos pertencentes a fêmeas pré-púberes, porém apresentam a mesma capacidade de maturação independente da fase.

Ao analisar conjuntamente os resultados obtidos com a MET e MEV em oócitos antes do processo de maturação (0h), podemos inferir que, embora a MEV tenha revelado que a comunicação *in vivo* entre as células do *cumulus* e o oócito, ocorra igualmente independente do status reprodutivo, sugerindo que estes oócitos apresentam a mesma capacidade de retomada de meiose, os melhores índices de maturação *in vitro* alcançados em oócitos provenientes de animais em fase folicular quando comparados aos índices de animais em anestro, provavelmente decorram do maior grau de maturidade citoplasmática e nuclear obtido pelos oócitos durante esta fase reprodutiva.

A despeito da análise morfológica de oócitos provenientes de fêmeas caninas em fase folicular e anestro após o cultivo *in vitro*, o presente trabalho buscou avaliar o efeito da suplementação hormonal nos meios de cultivo sobre a ultra-estrutura oocitária

canina, bem como correlacionar estes dados aos obtidos com a técnica de coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 utilizada para avaliar o estado meiótico e citoplasmático.

Sabe-se que as condições de cultivo *in vitro* utilizadas atualmente em canídeos não favorecem a maturação nuclear nem a citoplasmática. Por esta razão, diversos meios de cultivo e suplementações vêm sendo testados com o intuito de incrementar os índices de maturação.

A adição de hormônios aos meios de cultivo proporciona ambiente mais apropriado e semelhante às condições *in vivo*, sendo utilizado em várias espécies (APPARÍCIO, 2010). Com vistas nisso, o presente estudo, definiu por suplementar os meios de cultivo com 10UI/mL de hCG e 2µg/mL de P₄ e E₂. A opção pela concentração do hCG deve-se aos resultados positivos obtidos por DE LOS REYS et al. (2005) ao avaliar o efeito do hCG sobre os índices de metáfase II (31,7%). As dosagens dos esteróides foram devido a KIM et al. (2005) afirmarem que a adição de E₂ e P₄ nos meios de cultivo podem aumentar ou diminuir as taxas de maturação dependendo da sua concentração e, que embora, o oócito em fase de vesícula germinativa estejam sujeitos, *in vivo*, a níveis decrescentes de estrógeno e crescentes de progesterona, a associação destes hormônios na concentração de 2µg/mL possuem efeito sinérgico sobre as taxas de maturação nuclear (16,6% MII) quando comparados com a mesma concentração isoladamente.

De acordo com VIARIS DE LESEGNO et al. (2008b), após a maturação *in vitro* a vesícula germinativa (VG) apresenta três padrões de maturidade nuclear e citoplasmática o VG₁, VG₂ e VG₃. Segundo estes pesquisadores, oócitos em VG₁ e VG₂ são menos avançados em termos de maturidade nuclear e citoplasmática quando comparados a VG_p (antes do cultivo *in vitro*), o que sugere que tanto VG₁ quanto VG₂ sejam derivados de oócitos em VG_c e oócitos com padrão VG₃, QVG, metáfase I, metáfase II e degenerados provenham de VG_p.

Neste sentido, considerando os resultados obtidos através da análise da MET de oócitos caninos cultivados *in vitro* em meio A (sem suplementação hormonal) e meio B (meio suplementado), apresentados nas tabelas 28 e 32 respectivamente, verifica-se

que a adição de hormônios ao meio de cultivo favorece o desenvolvimento oocitário. Visto que, quando oócitos pertencentes ao grupo folicular foram cultivados em meio suplementado, dos 38,5% em VG_p (antes da MIV - tabela 14), 20% evoluíram para VG₃, 6,7% para QVG e 6,7% para MI e do total de oócitos identificados em nosso estudo como VG_i, os quais corresponderam a 7 dos 8 oócitos em VG_c, acreditamos que parte evoluiu para VG₂ (40%) e parte degenerou (13,3%). Em contrapartida, quando foram cultivados em meio sem hormônios, além de não termos identificado nenhum oócito em VG₃, QVG, MI e MII, o índice de degenerados foi muito elevado ao se comparar os dois meios (13,3% x 35,7% em oócitos cultivados em meio com e sem suplementação, respectivamente). Assim acreditamos que no grupo folicular, quando privados de hormônios, oócitos mais maduros (VG_p) degeneram e os que apresentam um grau intermediário de desenvolvimento (VG_i) parte evoluem para VG₂ e parte degeneram.

Com relação aos oócitos provenientes de animais em anestro, também foi observado uma melhora no grau de maturidade quando cultivados em meio suplementado, pois embora não tenham apresentado oócitos em estágio mais avançado de desenvolvimento (VG₃, QVG e MI) como o grupo folicular, o que provavelmente ocorreu em decorrência do elevado índice de VG_c (80%) e ausência de VG_p em oócitos pertencentes ao grupo do anestro, antes do processo de maturação *in vitro* (tabela 14), houve um aumento no número de VG₂ e redução de VG₁ somado a uma pequena diminuição no índice de degenerados quando comparado ao mesmo grupo cultivado em meio não suplementado (45,4% x 16,7% de VG₂; 27,3% x 50% de VG₁ e 27,3% x 33,3% de degenerados, respectivamente em meio com e sem suplementação hormonal).

Tais evidências obtidas pela MET também puderam ser comprovadas pela análise dos resultados da maturação nuclear obtidas pela técnica de coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 (tabelas 34, 35 e 36), a qual revelou que a presença de hormônios no meio de cultivo de oócitos pertencentes ao grupo folicular não somente favorece significativamente a retomada da meiose e os índices de MII como também

contribui para a redução no número de oócitos degenerados. Da mesma forma, no grupo do anestro, observou-se uma melhora no desenvolvimento oocitário com redução dos índices de oócitos em VG e aumento na retomada da meiose ($p<0,05$). Entranto, vale ressaltar que embora a suplementação hormonal tenha favorecido a retomada da meiose em ambas as fases do ciclo reprodutivo, no grupo do anestro, o que contribuiu para elevar este índice foram às taxas de QVG (38,2%), já no grupo folicular foram as taxas de MII (22,7%). Com isso, verifica-se em nosso estudo, que tanto a suplementação hormonal como a fase do ciclo estral influenciam positivamente a maturação nuclear, pois apesar da suplementação favorecer o desenvolvimento oocitário em ambos os grupos, oócitos advindos de animais em fase folicular respondem melhor aos estímulos ocasionados pelos hormônios, apresentando não somente menor índice de VG como também maior taxa de MII quando comparados ao anestro ($p<0,05$). Somando-se a isto é importante ressaltar que a privação hormonal é muito mais danosa aos oócitos provenientes de animais em fase folicular quando comparados ao anestro, pois nestas condições de cultivo, observou-se no grupo folicular significativamente maior índice de degeneração e apenas estagnação meiótica no anestro. Fato este que pode ser explicado pela prévia sensibilização hormonal sofrida pelos oócitos do grupo folicular.

Com relação à maturação citoplasmática avaliada pela técnica de coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 (tabelas 37, 38 e 39) pode-se constatar que a ausência de hormônio no meio de maturação de oócitos advindos de animais em anestro, compromete diretamente o desenvolvimento da maturação citoplasmática, visto que, quando foram cultivados em meio não suplementado, apresentaram porcentagens significativamente maiores de oócitos imaturos comparativamente ao mesmo grupo cultivado em meio suplementado ($p<0,05$). Em contrapartida, para a fase folicular a suplementação hormonal no meio de cultivo não interfere sobre a maturação citoplasmática, pois não foram detectadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os meios para os estádios de maturação, demonstrando similaridade entre os tratamentos. Todavia, quando se compara a maturação citoplasmática entre as fases, verifica-se influência do status reprodutivo, uma vez que, independente do meio de cultivo, oócitos

pertencentes ao grupo folicular apresentaram os maiores índices de oócitos em transição e menores índices de imaturos.

Sobre a maturação citoplasmática avaliada pela MET pode-se verificar que há uma tendência a um assincronismo entre a maturação nuclear e citoplasmática, já que o único oócito identificado em QVG pertencente ao grupo folicular demonstrou sinais claros de maturidade citoplasmática, tais como, numerosos grânulos corticais e organelas distribuídas homoganeamente pelo ooplasma. Enquanto, o único oócito classificado como MI apresentou-se imaturo revelando escassos grânulos corticais e mitocôndrias concentradas na periferia do oócito. Tais dados corroboram com APPARÍCIO (2010), que ao avaliar a maturação citoplasmática através da técnica de coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 em oócitos de cadelas em fase folicular, lútea e anestro cultivados *in vitro* em meios seqüenciais também observou haver um assincronismo entre a distribuição dos grânulos corticais e o grau de condensação cromossômica após 72h de cultivo, independente da condição reprodutiva da cadela.

Com isso, somando os resultados obtidos pela técnica de coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 utilizada para avaliação e classificação da cromatina (maturação nuclear) e dispersão dos grânulos corticais (maturação citoplasmática) associadas à MET, pode-se inferir que embora as condições de cultivo utilizadas no presente estudo, tenham favorecido o desenvolvimento oocitário bem como a retomada da meiose até os índices de MI e MII, a suplementação hormonal no meio de cultivo não promoveu um sincronismo entre maturação nuclear e citoplasmática. Sugerindo que as taxas de MII e a retomada da meiose não são bons critérios para avaliar a qualidade global do sistema de maturação *in vitro* em canídeos, havendo, portanto, a necessidade de considerar a maturação nuclear e citoplasmática para verificar a eficiência das condições de cultivo empregada. Entretanto, como as técnicas de microscopia eletrônica não são adaptadas para avaliar um grande número de oócitos, uma boa alternativa seria o uso de microscopia confocal, embora esta permita avaliar apenas um número limitado de critérios.

A despeito dos resultados apresentados nas tabelas 26 e 27 sobre os diâmetros do oócito com e sem zona pelúcida, núcleo, nucléolo e espessura da zona pelúcida e camada das células do *cumulus* de oócitos cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal e nas tabelas 30 e 31 de oócitos cultivados em meio suplementado, pode-se verificar que não houve diferenças significativas ao se comparar o efeito do estágio do ciclo estral sobre as médias dos referidos diâmetros em oócitos cultivados em meio suplementado ou não com hormônios ($p>0,05$). Contudo, comparando-se o efeito do meio de cultivo sobre o diâmetro oocitário, verificou-se que independente da condição reprodutiva do animal, oócitos cultivados em meio suplementado apresentam maior diâmetro da camada de células do *cumulus* do que oócitos cultivados em meio não suplementado ($22,5\mu\text{m} \times 24,6\mu\text{m}$ fase folicular e anestro, respectivamente em meio sem suplementação; $55,9\mu\text{m} \times 54,9\mu\text{m}$ fase folicular e anestro, respectivamente em meio suplementado). Resultados estes, que não corroboram com LEE et al. (2007), que ao avaliar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de FSH e LH sobre a expansão das células do *cumulus* de oócitos provenientes de animais em diferentes fases do ciclo reprodutivo, observou que a expansão foi significativa apenas em oócitos cultivados em meio contendo FSH, o que segundo tais pesquisadores poderia ser devido ao maior número de receptores de FSH do que de LH nas células do *cumulus*. Todavia, como em nosso estudo utilizamos apenas o LH, não podemos fazer referências quanto a maior ação ou não do FSH sobre a expansão das células do *cumulus*, assim como em relação à presença de receptores destas gonadotrofinas. Entretanto, há de se considerar que embora tenhamos encontrado maior expansão das células do *cumulus* em oócitos cultivados em meio suplementado, o coeficiente de variação (CV) foi muito elevado, como consequência das diferenças obtidas entre os diâmetros máximos e mínimos, o que ocorreu em decorrência do reduzido tamanho da amostra. Desta forma, acreditamos que ao aumentar o tamanho da amostra, o real efeito do LH sobre a expansão das células do *cumulus* ficará mais evidenciado.

Com relação aos resultados obtidos através da análise ultra-estrutural da MEV de oócitos caninos cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal (tabelas

16 e 17) e meio suplementado (tabelas 21 e 22), pode-se verificar que independente do meio de cultivo e condição reprodutiva do animal, as células do *cumulus* apresentam formato arredondado.

Sobre o arranjo das células do *cumulus*, de acordo com os dados apresentados nas Figuras 18 e 19, observou-se que, quando os oócitos foram cultivados *in vitro* em meio sem suplementação hormonal, 70% dos oócitos provenientes de animais em anestro mantiveram o arranjo regular e 30% apresentaram perdas das células do *cumulus*, das quais 8% correspondiam a perdas intensas. No grupo folicular, 45% dos COC's mantiveram o arranjo regular e 55% apresentaram perdas destas células, das quais 23% correspondiam a perdas intensas e muito intensas. Por outro lado, quando foram cultivados em meio suplementado (Figuras 23 e 24), no grupo folicular 85% dos COC's mantiveram o arranjo regular e 15% apresentaram perdas das células do *cumulus*, as quais correspondiam a perdas de baixa a média intensidade. Já no grupo do anestro, os oócitos apresentaram o mesmo comportamento de oócitos pertencentes ao mesmo grupo cultivado em meio não suplementado, assim, 70% mantiveram o arranjo regular e 30% apresentaram perdas das células do *cumulus*, das quais 16% correspondiam a perdas intensas e muito intensas. Estes resultados denotam o efeito positivo da suplementação hormonal sobre a manutenção da integridade do arranjo celular, principalmente, em oócitos advindos de animais em fase folicular, os quais demonstraram uma considerável redução nas perdas de células do *cumulus* quando cultivados em meio suplementado. Além disso, um ponto importante de ser considerado é que embora o processamento das amostras para análise da MEV envolva grande manipulação dos oócitos, acreditamos que tais perdas não tenham sido ocasionadas por este fator, visto que oócitos recém colhidos (0h), submetidos ao mesmo processamento para a análise pela MEV não demonstraram perdas significativas das células do *cumulus*. Dessa forma, podemos inferir que em nosso estudo, a presença ou não de hormônios nos meios de cultivo foi um fator determinante para a manutenção do arranjo celular, especialmente, em oócitos do grupo folicular.

A respeito da ultra-estrutura da zona pelúcida, estudos demonstraram que em humanos, bovinos e camundongos, que esta sofre modificações relacionadas não somente com a maturação e degeneração como também com a idade do oócito e da fêmea doadora (FAMILIARI et al., 1988; SUZUKI et al., 1994; LONGO, 1981). Entretanto, em canídeos até o momento há poucas informações. Segundo HOLST et al. (2000), em estudo comparando a capacidade de penetração espermática com a ultra-estrutura da zona pelúcida em oócitos caninos, observaram que oócitos com reduzida capacidade de penetração provenientes de ovários congelados possuem zona pelúcida com aspecto espongiforme e malha fibrosa com largas fenestrações, o mesmo observado por HAENISCH-WOEHL et al. (2003) em oócitos de cadelas pré-púberes. Neste sentido, podemos sugerir, que em nosso estudo, oócitos pertencentes ao grupo folicular cultivados em meio suplementado demonstram maior capacidade de penetração espermática do que oócitos do grupo do anestro, pois apresentam menor porcentagem de oócitos contendo poros largos quando comparados ao anestro (43% x 63% fase folicular e anestro, respectivamente).

Com relação à comunicação entre as células do *cumulus*, em oócitos cultivados in vitro em meio A e meio B, apresentados nas Figuras 21 e 26 respectivamente, os resultados revelam que independente da condição reprodutiva, oócitos cultivados in vitro em meio não suplementado se comunicam através de moderados processos longos. Em contrapartida, quando cultivados em meio suplementado a comunicação no grupo folicular foi estabelecida de forma intensa a muito intensa tanto através de processos curtos quanto longos, não havendo diferença entre eles ($p > 0,05$). Por outro lado, no anestro a comunicação ocorreu de forma moderada à intensa através de processos longos. E ao comparar a intensidade de comunicação entre as fases pode-se verificar que independente do tipo de processo (curto ou longo) a intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* de oócitos provenientes de animais em fase folicular é significativamente maior do que no anestro, comprovando o efeito positivo da suplementação hormonal sobre a comunicação intercelular, principalmente, em oócitos pertencentes ao grupo folicular.

Dessa forma, os resultados obtidos com a análise pela MEV sobre o arranjo celular, aspecto da zona pelúcida e intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* ratificam os encontrados com a MET e coloração para avaliação da maturação nuclear e citoplasmática, onde também foi observado que oócitos do grupo folicular não somente respondem melhor aos estímulos hormonais presentes nos meios de cultivo, provavelmente, em decorrência da prévia sensibilização hormonal e maior grau de maturidade nuclear e citoplasmática como sofrem muito mais com a ausência de hormônios. Com isso, acreditamos que os baixos índices de maturação *in vitro* de oócitos caninos obtidos atualmente, em diferentes condições de cultivo, certamente decorram da marcada imaturidade dos oócitos utilizados na MIV, visto que, a maior fonte de oócitos provém de folículos antrais de animais em anestro.

Além disso, podemos inferir com relação ao efeito do estágio do ciclo estral sobre a competência meiótica que há diferenças entre as fases, de tal forma que oócitos provenientes de animais em fase folicular apresentam-se mais maduros do que oócitos provenientes de animais em anestro. Assim, as diferenças nos índices de maturação obtidos durante a fase folicular, as quais são responsáveis por alguns pesquisadores encontrarem efeito da fase do ciclo sobre a competência meiótica e outros não, certamente estão relacionados com o período de coleta dos oócitos, pois apesar do primeiro sinal que induz a maturação ocorrer antes da onda de LH, a obtenção de oócitos maduros (VG_p) ocorre somente entre a onda de LH e a ovulação.

A respeito das condições de cultivo utilizadas no presente estudo pode-se constatar que não foram ideais, visto que houve indícios de imaturidade citoplasmática em oócitos com maturação nuclear. Entretanto, vale ressaltar que adição de hormônios aos meios de maturação se mostrou necessária, pois embora não tenha favorecido a maturação citoplasmática, beneficiou significativamente a comunicação entre as células do *cumulus*, a retomada da meiose, a manutenção da integridade e reduziu a degeneração oocitária. Dessa forma, estudos futuros modificando as concentrações hormonais bem como os tempos de cultivo se fazem necessários.

E por fim, considerando que a maturação final *in vivo* ocorre em dois passos, com o primeiro em ambiente folicular (antes da onda de LH) e outro em ambiente oviductal (3 dias após a ovulação), há de se considerar a necessidade de realizar a MIV de canídeos também em dois passos, utilizando meios seqüenciais.

Com base no exposto, pode ser observado, que a maturação oocitária canina é um processo complexo, delicado, mas primordial, visto que é o primeiro passo para outras biotecnologias, como a fertilização *in vitro*, o cultivo e o desenvolvimento embrionário. Entretanto, necessita de mais estudos que visem não somente os meios de cultivo como também a morfologia oocitária para esclarecer pontos ainda desconhecidos da fisiologia reprodutiva canina, como os fatores relacionados com a retomada da meiose e o microambiente do oviduto. Dado que o aperfeiçoamento desta técnica permitirá o desenvolvimento de programas de preservação de material genético das espécies ameaçadas de extinção.

6. CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que:

- 1 - O diâmetro oocitário não foi influenciado pela fase reprodutiva.
- 2 - A fase do ciclo estral exerceu influência sobre a morfologia do complexo *cumulus*-oócito, de tal forma que oócitos pertencentes ao grupo folicular apresentaram-se com maior grau de maturidade nuclear e citoplasmática do que oócitos do grupo do anestro. Entretanto, a intensidade de comunicação entre as células do *cumulus* (*in vivo*) não foi influenciada pela fase do ciclo.
- 3 – A suplementação hormonal influenciou positivamente a maturação nuclear, mas não exerceu efeito sobre a maturação citoplasmática. Com relação à ultra-estrutura a presença de hormônios nos meios de cultivo foi benéfica tanto para a comunicação entre as células do *cumulus* como para a manutenção da integridade oocitária reduzindo as perdas de células do *cumulus*.

7. REFERENCIAS

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

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

APPARICIO-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. 73f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2010.

AVELINO, K.B. **Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutathione durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária**. 93f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2004.

BAKER, T.G. Oogenesis and ovulation. In: *germes cells and fertilization*. 2 ed. **Germes cells and fertilization** Cambridge, England, Cambridge University Press, p. 17-45, 1982.

BEYERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F.; Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.1322, 1997.

BOGLIOLO, L.; ZEDDA, M.T.; LEDDA, S.; LEONI, G.; NAITANA, S.; PAU, S. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction, nutrition and development**, v.42, n.3, p.265-273, 2002.

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

CHEBROUT, M.; VIARIS DE LESEGNO, C.; REYNAUD, K.; CHAT, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. Nuclear and cytoplasmic maturation of canine oocytes related to *in vitro* denudation. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, suppl. 2, p.243-246, 2009.

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

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

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

CONCANNON, P. W.; HANSEL, W.; MCENTEE, K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. **Biology of Reproduction**, v.17, p.604-613, 1977.

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

DEBEY, P.; SZOLLOSI, M.S.; SZOLLOSI, D.; VAUTIER, D.; GIROUSSE, A.; BESOMBES, D. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. **Molecular Reproduction and Development**, v.36, p.59-74, 1993.

DE LOS REYS, M.; LANGE, J.; MIRANDA, P.; PALOMINOS, J.; BARROS, C. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.64, n.1, p. 11-11, 2005.

DE LOS REYS, M.; HETZ, J.; PALOMINO, J. Ultrastructural study of the canine zona pellucida surface during *in vitro* maturation. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, suppl. 2, p.247-250, 2009.

DOLEZEL, R.; KYLIANKOVA, R.; KUMMER, V.; MASKOVA, J.; STARA, P.; VITASEK, R. Follicular Population and Oestrogen Receptor Alpha in Ovary of the Bitch. **ActaVeterinary BRNO**, n.73, p.37-43, 2004.

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

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

EBNER, T.; MOSER, M.; TEWS, G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? **Reproductive Biomedicine Online**, v.12, 507-512, 2006.

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

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

FAMILIARI, G.; NOTTOLA, S.A.; MICARA, G.; ARAGONA, C.; MOTTA, P.M. Is the sperm-binding capability of the zona pellucida linked to its surface structure? A scanning electron microscopic study of human *in vitro* fertilization. **Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer**, v.5, p.134-143, 1988.

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

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

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

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

FONTBONNE, A.; REYNAUD, K.; MARSELOO, N.; DUMASY, M.; CHASTANT-MAILLARD, S. In: Internation Symposium on Canine and Feline Reproduction, 5, 2004, São Paulo. Abstract. São Paulo, p. 144-146, 2004.

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

GANDOLFI, F.; BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for animal reproductive efficiency. **Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.**, v.24, p.413-423, 2005.

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

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

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

GRONDAHL, C.; HYTTEL, P.; GRONDAHL, M.L.; ERIKSEN, T.; GOTFREDSEN, P.; GREVE, T. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation *in vivo*. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p.94-105, 1995.

HAENISCH-WOEHL, A.; KOLLE, S.; NEUMULLER, C.; SINOWATZ, F.; BRAUN, J. Morphology of canine *cumulus*-oocyte complexes in pre-pubertal bitches. **Anatomy, Histology and Embryology**, n.32, p.373-377, 2003.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility** supplement, 51:83-91, 1997.

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

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

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

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

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

HOLST, P.A.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zone pellucida of stored canine oocytes. **Journal of reproduction and Fertility**, v.119, p.77-83, 2000.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *Journal Reproduction and Fertility*, v.76, p.645-656, 1986.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

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

JOCHLE, W.; ANDERSEN, A.C. The estrous cycle in the dog: a review. **Theriogenology**, v.7, n.3, p.113-140, 1977.

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

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 β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p. 1342-1353, 2005.

KRUIP, T.; CRAN, D.; VAN BENEDEN, T.; DIELEMAN, S. Structural changes in bovine oocytes. During final maturation *in vivo*. **Gamete Research**, v.8, p.29-47, 1983.

LEE, H-S.; SEO, Y-I.; YIN, X-J.; CHO, S-G.; LEE, S-S.; KIM, N-H.; CHO, S-K.; KONG, I-K. Effect of follicle stimulation hormone and luteinizing hormone on *cumulus* cell expansion and *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Reproduction and Domestic Animal**, v.42, p.561-565, 2007.

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.

LONGO, F.J. Changes in the zonae pellucidae and plasmalemmae of aging mouse eggs. **Biology of Reproduction**, v.25, p.399-411, 1981.

LOPES, G.; SOUSA, M.; OLIVEIRA, E.; LUVONI, G.C.; ROCHA, A. Ultrastructural characterization of canine diestrous Grade I *cumulus*-oocyte complexes. Proceedings of the 5th Biannual Congresso of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR) 7-9 de Abril, Budapeste, Hungria, p.306, 2006.

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

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

LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D. 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 Domestic Animal**, v. 41, p.286-290, 2006.

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

MARTINS, L.R. **Maturação nuclear de ovócitos de cadelas em estro e anestro submetidas à maturação *in vitro***. 74f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade Estadual Paulista, 2005.

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

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

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

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.

MOOR, R.M.; SMITH, M.W.; DAWSON, R.M. Measurement of intercellular coupling between oocytes and *cumulus* cells using intercellular markers. *Experimental Cell Research*, v.126, p.15-29, 1980.

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

MURPHY, B.D. Models of luteinization. **Biology of Reproduction**, v.63, p.2-11, 2000.

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

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, v.11, n.2, p. 387-390, 1999.

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

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

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

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

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.1120-1131, 2009.

RIBEIRO, A.P.C. **Influência do estágio reprodutivo e suplementação do meio de cultivo com progesterona e/ou soro de cadela em estro, nas taxas de maturação *in vitro* de oócitos de fêmeas caninas**. 144f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2007.

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

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, n.1, p.58-62, 2003b.

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.

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

ROTA, A.; VERONESI, M.C.; VOLPE, S.; RICCARDI, A.; BATTOCCHIO, M. Estradiol 17 β , progesterone and testosterone plasma concentrations during estrus in the bitch. *Veterinary Research Communications*, v.31, suppl.1, p.197-199, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology Reproduction**, v.64, p.904-909, 2001.

SUZUKI, H.; YANG, X.; FOOTE, R.H. Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation in vitro. **Molecular Reproduction and Fertility**, v.38, p.421-430, 1994.

TAN, J.H.; WANG, H.L.; SUN, X.S.; LIU, Y.; SUI, H.S.; ZHANG, J. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.1, p.1-9, 2009.

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

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

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

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

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

VAN HAAFTEN, B.; BEVERS, M. M.; VAN DEN BROM, W. E.; OKKENS, A. C.; SLUIJS, F. I.; WILLEMSE, A. H.; Increasing sensitivity of the pituitary to GNRH from early to late anoestrous in the beagle bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p. 221-225, 1994.

VIARIS DE LESEGNO. C.V.; REYNAUD, K.; PECHOUX, C.; THOUMIRE, S.; MAILLARD, S.C. Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.115-125, 2008a.

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, 2008b.

VOZZI, C.; FORMENTON, A.; CHANSON, A.; SENN, A.; SAHLI, R.; SHAW, P.; NICOD, P.; GERMOND, M.; HAEFLIGER, J.A. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocyte. **Reproduction**, v.122, p.619-628, 2001.

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

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

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

8. APÊNDICES

Apêndice 1: Classificação da fase do ciclo estral segundo Feldman & Nelson (2004).

Proestro

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

Estro

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

Anestro

Predomínio de células parabasais, intermediárias e restos celulares.

Apêndice 2 - Classificação do complexo *cumulus*/oócitos (COC) segundo Hewitt e England (1998).

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

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

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

Apêndice 3: Meio de maturação TCM 199

1- MEIO A

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

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

Meio de Maturação	5 mL
Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	5 mL
BSA	0,015g
Piruvato	10 μ L
Amicacina	25 μ L
Filtrar em membrana 0,22 μ m e deixar na estufa por uma hora para estabilizar	

2 – MEIO B

Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	5 mL
Água Milli-Q	5 mL

TCM 199	0,0475g
Bicarbonato de sódio (26mM)	0,011g
Esta solução deve ser mantida por 1 hora na estufa para estabilizar	
Meio de Maturação	5 mL
Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	5 mL
BSA	0,015g
Piruvato	10 μ L
Amicacina	25 μ L
Filtrar em membrana 0,22 μ m e deixar na estufa por uma hora para estabilizar	
LH	10 μ L (10 μ g/mL)
Estradiol 17 β	10 μ L (2 μ g/mL)
Progesterona	10 μ L

Apêndice 4 - Preparação das grades de cobre com parlódio

As grades de cobre utilizadas na microscopia eletrônica de transmissão foram tratadas previamente com acetona e parlódio.

1- Acetona:

As grades ficaram imersas em acetona PA por 5 minutos e secas em papel filtro em placa de petri, em seguida foram deixadas por 10 minutos em estufa.

2- Cobertura das telas com parlódio

Parlódio.....1g

Acetato de amila anidra.....50mL

Em uma bandeja foi colocado um pirex com água até a borda. Com uma pipeta Pasteur instilou uma gota do parlódio sobre a superfície da água formando uma película. As grades foram colocadas de 10 em 10 com o lado fosco em contato a película e cobertas com parafilm. Com auxílio de uma pinça o parafilm ficou imerso na água. Em seguida, teve suas bordas recortadas, retirado da água e colocado sobre papel filtro em placa de petri, onde permaneceu por 24 horas à temperatura ambiente para secar.