

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

**MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DE
OÓCITOS DE CADELAS COLHIDOS EM DIFERENTES
FASES DO CICLO ESTRAL E CULTIVADOS *IN VITRO*
EM MEIOS SEQUENCIAIS COM HORMÔNIOS E
ESPERMATOZÓIDES**

Maricy Apparício-Ferreira

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DE
OÓCITOS DE CADELAS COLHIDOS EM DIFERENTES
FASES DO CICLO ESTRAL E CULTIVADOS *IN VITRO*
EM MEIOS SEQUENCIAIS COM HORMÔNIOS E
ESPERMATOZÓIDES**

Maricy Apparício-Ferreira

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 a obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)

JABOTICABAL - SP

Fevereiro – 2010

A646m Apparício-Ferreira, Maricy
Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidos em diferentes fases do ciclo estral e cultivados *in vitro* em meios sequenciais com hormônios e espermatozóides/ Maricy Apparício-Ferreira. – – Jaboticabal, 2010
xx, 73 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente

Banca examinadora: Camila Infantsi Vannucchi, Maria Denise Lopes, Marion Burkhardt Koivisto, Lúcia Daniel Machado da Silva

Bibliografia

1.Oócitos. 2. Maturação. 3. Cadela. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.7

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



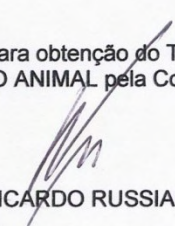
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

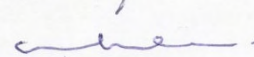
TÍTULO: MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPASMÁTICA DE OÓCITOS DE CADELAS COLHIDOS EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E CULTIVADOS *IN VITRO* EM MEIOS SEQUENCIAIS COM HORMÔNIOS E ESPERMATOZÓIDES.

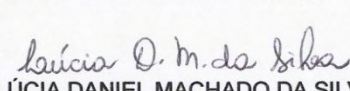
AUTORA: **MARICY APPARÍCIO FERREIRA**

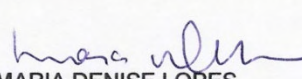
ORIENTADOR: **Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE**

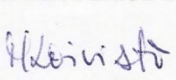
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

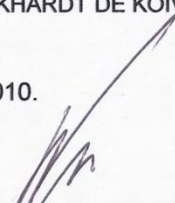

Dra. CAMILA INFANTOSI VANNUCCHI


Dra. LÚCIA DANIEL MACHADO DA SILVA


Dra. MARIA DENISE LOPES


Dra. MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

Data da realização: 26 de fevereiro de 2010.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARICY APPARICIO FERREIRA – Nascida aos 25 dias de fevereiro de 1977 em Campinas – SP. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Londrina – UEL, no período de fevereiro de 1996 a dezembro de 2001. No período de agosto a dezembro de 2001 realizou estágio curricular obrigatório no Département de Reproduction et Obstétrique des petits animaux, Universidade de Liège, Bélgica, sob supervisão do professor Dr. John Verstegen. Em fevereiro de 2002 ingressou no programa de aprimoramento profissional (residência médica veterinária) junto ao Setor de Reprodução e Obstetrícia Veterinária – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Em março de 2004 ingressou no programa de Mestrado em Cirurgia Veterinária também pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, concluindo-o em fevereiro 2006. No mês subsequente, iniciou o curso de doutorado pelo programa de medicina veterinária, área de Reprodução Animal, na mesma unidade universitária. Durante o ano de 2006 foi docente das disciplinas de Obstetrícia Veterinária e Fisiopatologia da Reprodução na Faculdade Anhanguera - Leme. De maio de 2008 a maio 2009 foi bolsista do programa de doutorado no país com estágio no exterior (PDEE-“doutorado sanduiche”), período em que realizou parte de seu experimento junto à Università degli Studi di Milano, Itália, no Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, sob supervisão da professora Dr. Gaia Cecilia Luvoni.

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os
desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor
da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de
encontrar um oásis no recôndito da sua alma.
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não".
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.
Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...
(Fernando Pessoa)

DEDICO

Aos meus queridos e amados pais, Ivan e Nilva

Por acreditarem que o bem maior da educação, seria a única herança que valeria a pena nos deixar. Este sonho, compartilhado hoje, é parte de vocês.

Ao meu mano, Thales

Por ter se tornado esse homem que tanto me enche de orgulho e admiração.

À minha vizinha, Nair

Pela pessoa inigualável que é.

Amo-os incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Se repetisse mil vezes “obrigada” ainda seria pouco pela enorme gratidão que tenho aos que passaram ou participaram ativamente da minha vida e deixaram tanto de si. Hoje, realizo o sonho de muitos e o privilégio de poucos que crescem em um país desigual e injusto como o nosso. Por isso, para mim, encerra-se um ciclo e inicia-se outro, marcando o que considero a etapa mais importante da minha vida até o presente momento. Assim, registro aqui meus mais estimados agradecimentos:

À Deus por não me permitir perecer frente aos desafios da vida e por ter me presenteado com essa família “buscapé” que tanto amo, e com amigos tão “loucos quanto poucos”.

Aos meus amados pais Nilva Lúcia Apparício Ferreira e Ivanildo Araújo Ferreira, por serem os maiores responsáveis pela concretização deste sonho. Agradeço vossa dedicação, sacrifício e incentivo em todos esses anos de estudo. E ainda, agradeço o amor que sempre nos deram, exemplificado aqui pelas cantigas antes de dormir e o acompanhamento das lições de casa mesmo após uma jornada exaustiva de trabalho. Vocês são grandes exemplos para nós e creio que levaria a vida inteira para retribuir tudo o que já fizeram, e ainda fazem, por nós.

Ao meu mano Thales Apparício Ferreira, pelas conversas, risadas, palhaçadas e por tudo o que já vivemos nesses anos que parecem ter voado. Agradeço também à sua “namorada” e quase xará Maracy Monteiro pelo carinho e amizade. À você, sou grata principalmente pelo ombro amigo em um momento difícil, mas decisivo na minha vida. Você é um grande exemplo para mim, de determinação, de obstinação; admiro-o muito pelo homem que é e por todas suas conquistas, as quais só me encham de orgulho. Pode dizer o que for, mas será sempre, na grandeza de seus 1,97m, meu irmãozinho mais novo. Amo você!

À minha vizinha Nair Thomazella Aparício, minha grande referência de ser humano, com toda sua delicadeza no pedir e sapiência no sugerir. Você é nosso esteio, nosso porto seguro, nossa rainha da lógica, da ponderação e da

educação. Obrigada por ser essa pessoa inigualável!

Ao meu tio Norival Aparício Júnior por ter estado sempre ao meu lado nos bons e nos maus momentos; pelas brincadeiras de criança, loucuras de adolescência e conversas na vida adulta.

À você, nano (Rodrigo de Mesquita Sacani), por ter arriscado e lutado tanto por um amor em que acreditou desde o começo, mesmo quando tudo parecia dizer o contrário. Por ter provado tanto, deixando tudo para trás para aventurar-se em um país estranho, dividindo todas as dificuldades comigo e aprendendo que amar, é muito mais do que momentos regados de carinho e chamegos, é compartilhar tristezas, fazer sacrifício, e doar-se plenamente. Seu tamanho em nada exemplifica a grandeza de seu coração. Por isso, meu amor, amo você com todo meu coração.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente. Nada do que realizei nesses anos de UNESP seria possível sem o senhor, sem seu apoio, sua mão amiga, suas palavras generosas e seu conhecimento inestimável. Esta tese representa oito anos de união, de trabalho em grupo e de amizade. Hoje encerramos um ciclo, o da pós-graduação, mas tenha certeza que, no que depender de mim, continuaremos a trilhar essa jornada juntos. Infinitamente obrigada por ser essa pessoa impar!

À minha amiga e eterna “desorientadora” Maria Isabel Mello Martins. Agradeço sua amizade, seus conselhos e a orientação nos primeiros passos da reprodução canina.

Aos meus amigos e irmãos de coração Sharon Lisauskas (Sha) e Robson Stellato (Binho) pelas lembranças da faculdade, pelo apoio nos momentos difíceis e acima de tudo, pela amizade sincera e verdadeira de tantos anos.

Agradeço também aos amigos que conquistei durante o período “sanduiche” desta tese. Primeiramente, à Prof^a. Dr^a. Gaia Cecília Luvoni pelo exemplo profissional de pesquisadora e mestra. Agradeço não somente seus ensinamentos sobre técnicas *in vitro* de canídeos e felídeos, mas acima de tudo, pelo seu “modo da fare”, de tornar-se uma ‘locomotiva’ que inspira todos a sua

volta. Agradeço também às amigas italianas Michela Beccaglia (Micky), Patrizia Anastasi (Paty) e Elena Ruggeri (Fofucha) pelos infindáveis momentos que pudemos compartilhar dentro e fora da Universidade. Aos estagiários do setor, professores e funcionários que foram sempre tão solícitos e atenciosos durante minha estadia em Milão e também aos profissionais que trabalhavam no canil municipal e que prontamente nos forneciam material biológico. E como não poderia deixar de ser, agradeço com todo meu coração à Damiano Giannatempo, Lena Fiano e Ilaria Giannatempo, por terem se tornado parte de nossa família e por todo o amparo, amor e devoção que tiveram conosco desde o início, sem esperar nada em troca. Agradeço ainda à Patricia Stamponi e Stefano pelos inúmeros momentos de alegria e descontração, e à Paty em especial, pela amiga sincera e leal que demonstrou ser.

Agradeço ainda a família Mesquita e Sacani, com a qual tive o imenso prazer de conviver e compartilhar momentos para lá de agradáveis. Aos tios, tias, primos e primas que adquiri com essa união, ao meu cunhado Silvio e minha cunhada Roberta, seu marido Alexandre, mas especialmente ao meu sogro e sogra: Silvio e Mariza, aos quais nutro o mais sincero sentimento de admiração, carinho e amor. Obrigada por terem me acolhido como a uma filha e por serem pessoas tão especiais.

À minha primuxa Daniela Burjailli Sevilhano pelas conversas francas, amizade sincera e pelos momentos hilários e memoráveis de nossa fase celibatária.

À grande família obstetrícia. Não tem como deixar de agradecer a cada um pela contribuição imensurável que tiveram para com esta tese. Vocês confirmaram uma coisa que há muito já sabia, somos realmente uma família. Dificilmente encontraremos tamanha união, companheirismo e amizade, seja aqui, ou em qualquer outro lugar. Agradeço não somente a contribuição para este trabalho, mas PRINCIPALMENTE pela ajuda com a Nina. Em que outro lugar uma equipe se revezaria durante 10 dias para dormir com uma cadela, desprovidos de qualquer interesse que não fosse o bem estar do animalzinho? Realmente, meus amigos, serei eternamente grata a cada um de vocês! Nominalmente: Tathiana Ferguson Motheo (Bits), Aracelle Elisane Alves (Arinha),

Giuliano Queiroz Mostachio (Giu), Luciana Padilha (Dory) e Paula Andressa ('Emp'). Agradeço ainda a Eliandra Antônia Pires (Eli) por sofrermos juntas os percalços da MIV de cadelas; e a toda trupe obstétrica: Diogo Cardilli (Didi), Fabiana Voorwald (Light), Valeska Rodrigues, Caio Tiossi, Beatrice Macente e Raquel Gonçalves (Ana Lucía). O que seria de nós sem o "aaaa" da Bits, o "é só chamar que eu vou" do Giu, o "quando você casar eu danço" da Ara, o "xi, esqueci" da Lu? e nossa dieta sem os quilos e mais quilos de guloseimas trazidos pela Paulinha? Agradeço também a "velha guarda", às amigas que já tomaram seus rumos, mas que deixaram uma imensa saudade: Ana Paula Coelho Ribeiro (Aninha), Carla Renata Figueiredo Gadelha (Bonequinha) e Gabriela Jayme Covizzi (Gaby). Aos funcionários do setor Arnildo, Anésia e Izilda pelo auxílio com os experimentos e pela presteza.

Faço um agradecimento especial aos integrantes do autodenominado "quarteto superfantástico", Arinha, Bits e Giu. Obrigada por toda a ajuda com os experimentos, pelos momentos de "desmarystressar", pelas conversas "acaloradas" e pelos risos que se desdobravam em gargalhadas. Vocês estarão para sempre guardados em meu coração. À você, Arinha, um agradecimento especial em homenagem aos quase 5 anos que moramos juntas e a nostalgia que me invade o peito quando me lembro de tudo o que já desfrutamos nesta amizade.

Aos amigos (egressos ou não) de Jaboticabal que me proporcionaram momentos inigualáveis: Simone Crestoni (Snow White), Érica C. Guirro (keka), Guilherme Godoy (tchetcha), Ester (pinga), Márcio Brunetto (Má), Lorivaldo Junior (Loro), Estevan hoppe (Capi), Ingrid, Patrícia Furuta e Tiago (Ti).

À todos os amigos e colegas do departamento de reprodução animal, em especial ao meu casal vinte Marcelo Bezerra e Michelly Macedo pelos infindáveis finais de semana compartilhado no laboratório e por todos sorrisos nos momentos de desespero; às queridas Naiara Zoccal Saraiva e Fernanda da Silva Gonçalves pela amizade e sempre prontidão para 'o que der e vier'. Aos funcionários do departamento: Roberta Vantini, Ivo Luís A. Júnior, Edson de Aguiar e à sempre pronta "multimídia" Isabel Aparecida Penariol Natarelli.

Aos membros da banca examinadora da tese pela preciosa contribuição com críticas e sugestões que nos auxiliaram na elaboração dos artigos científicos provenientes desta tese: Prof^a. Dr^a. Lúcia Daniel Machado da Silva, Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes, Prof^a. Dr^a. Camila Infantsi Vannucchi e Prof^a. Dr^a. Marion Burkhardt de Koivisto.

Aos membros da banca de qualificação: prof. Dr. César Roberto Esper, Prof^a. Dr^a. Vera Fernanda M. Hossepian de Lima, Prof^a. Dr^a. Marcia Rita Fernandes Machado e Prof^a. Dr^a. Juliana Correa Borges Silva pelas correções e valiosas sugestões.

À todos os estagiários que já passaram pelo setor de obstetrícia, bem como os enfermeiros e funcionários do hospital veterinário desta instituição que sempre me auxiliaram, desde os idos tempos da residência.

À todos os grandes mestres que já cruzaram meu caminho e me despertaram para a ciência, mostrando um outro prisma em relação à vida.

A coordenação do curso de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária desta instituição por esta oportunidade.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão da bolsa e do auxílio financeiro.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES- pela bolsa de doutorado sanduiche (Programa PDDE).

À esses seres especiais que são capazes de transmitir tanta doçura e amor com um simples olhar; em especial aos meus saudosos Sharllie e Diane (*in memorian*) e ao espoleta Pit, pelas alegrias que proporcionaram à minha vida com suas existências. À Nina, por ter-me feito perceber o valor da amizade, mesmo na presença da dor. Agradeço por fim àqueles que involuntariamente participam de projetos de pesquisas mundo afora, e que contribuem para o progresso da ciência.

Muito Obrigada a todos!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Particularidades da fisiologia reprodutiva das cadelas.....	5
2.2. Desenvolvimento e maturação oocitária <i>in vivo</i>	6
2.3. Maturação de oócitos <i>in vitro</i>	8
2.3.1. Obtenção dos oócitos.....	9
2.3.2. Fatores intrínsecos que influenciam a maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	9
2.3.3. Fatores extrínsecos envolvidos na MIV.....	13
2.3.4. Avaliação da maturação oocitária.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Animais e grupos experimentais.....	25
3.2. Identificação da fase do ciclo estral.....	25
3.3. Obtenção e classificação dos oócitos.....	27
3.4. Experimentos.....	28
3.5. Avaliação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática.....	30
3.6. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Recuperação de oócitos.....	36
4.2. Experimento I- Avaliação zero hora.....	37
4.3. Experimento II- Avaliação da maturação nuclear após 72 horas de cultivo.....	38

4.4. Experimento III	45
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Influência dos diferentes tipos de hormônios e concentrações empregadas na maturação <i>in vitro</i> de oócitos caninos. Jaboticabal, 2010.....	20
Tabela 2. Sistemas de cultivo empregados na maturação <i>in vitro</i> de oócitos de cadelas. Jaboticabal, 2010.....	29
Tabela 3. Número absoluto e (%) de complexos oócito- <i>cumulus</i> (COCs) grau I, II e III obtidos de 16 cadelas pertencentes ao grupo FOL (folicular), 16 pertencentes ao grupo LUT (luteal) e 17 do grupo ANE (anestro), classificadas antes do processo de maturação <i>in vitro</i> - Jaboticabal, 2010.....	36
Tabela 4. Relação entre a distribuição dos grânulos corticais e configuração de cromatina de COCs grau I avaliados antes do processo de maturação <i>in vitro</i> . Jaboticabal, 2010.....	37
Tabela 5. Número absoluto e relativo (%) de oócitos obtidos de cadelas na fase folicular, em diferentes graus de maturação nuclear após 72 horas de cultivo em diferentes sistemas de cultivo. Jaboticabal, 2010.....	39
Tabela 6. Número absoluto e relativo (%) de oócitos obtidos de cadelas na fase lútea, em diferentes graus de maturação nuclear após 72 horas de maturação em diferentes sistemas de cultivo. Jaboticabal, 2010.....	40

Tabela 7.	Número absoluto e relativo (%) de oócitos obtidos de cadelas na fase anestro, em diferentes graus de maturação nuclear após 72 horas de maturação em diferentes sistemas de cultivo. Jaboticabal, 2010.....	41
Tabela 8.	Relação entre a distribuição dos grânulos corticais (GC) e configuração de cromatina de COCs grau I avaliados após 72 horas de maturação <i>in vitro</i> . Jaboticabal, 2010.....	44
Tabela 9.	Status de oócitos caninos provenientes da fase folicular maturados por 72 nos diferentes protocolos experimentais e co-cultivados com espermatozóides. Jaboticabal, 2010.....	46
Tabela 10.	Status de oócitos caninos provenientes da fase lútea maturados por 72 nos diferentes protocolos experimentais e co-cultivados com espermatozóides, Jaboticabal, 2010.....	46
Tabela 11.	Status de oócitos caninos provenientes da fase anestro maturados por 72 nos diferentes protocolos experimentais e co-cultivados com espermatozóides. Jaboticabal, 2010.....	47
Tabela 12.	Status meiótico dos oócitos e percentual de penetração por espermatozóides após 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> . Jaboticabal, 2010.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo estral de cadelas e suas respectivas alterações hormonais.....	6
Figura 2a. Fotomicrografia de grupo de oócitos obtidos imediatamente após o fatiamento dos ovários em PBS.....	33
Figura 2b. Fotomicrografia dos complexos oócitos- <i>cumulus</i> (COCs): COC grau II e grau III, não selecionados para maturação.....	33
Figura 2c. Fotomicrografia de COC grau I selecionado para cultivo <i>in vitro</i>	33
Figura 3a. Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas em estágio de vesícula germinativa (VG).....	34
Figura 3b. Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas em estágio de quebra de vesícula germinativa (VG).....	34
Figura 3c. Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas em estágio de Metáfase I (MI), coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342.....	34
Figura 3d. Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas em estágio de Metáfase II (MII).....	34
Figura 4a. Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas com maturação citoplasmática incompleta.....	35
Figura 4b. Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas com maturação citoplasmática incompleta, em transição.....	35
Figura 4c. Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas com maturação citoplasmática completa.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%.....	Porcentagem
AI.....	Anáfase I
ANE.....	Grupo experimental de cadelas em anestro
BSA.....	Albumina sérica bovina
°C.....	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
COC.....	Complexo oócito- <i>cumulus</i>
CRML 1066.....	Meio 1066
D/NI.....	Oócitos degenerados ou não passíveis de identificação
E ₂	Estradiol
EGF.....	Fator de crescimento epidermal
FAPESP.....	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FITC.....	Conjugado isotiocianato de fluoresceína
FIV.....	Fertilização <i>in vitro</i>
FGF.....	Fator de crescimento de fibroblasto
FOL.....	Grupo experimental de cadelas na folicular
FSH.....	Hormônio folículo estimulante
GC.....	Grânulos corticais
GH.....	Hormônio do crescimento
GSH.....	Glutathione
h.....	Horas
hCG.....	Gonadotrofina coriônica humana
IA.....	Inseminação artificial
IGF-1.....	Fator de crescimento do tipo insulina 1
ITS.....	Insulina-transferrina-selênio
LH.....	Hormônio luteotrófico
LUT.....	Grupo experimental de cadelas na fase luteal
MB.....	Meio básico (TCM 199 suplementado)
MCC.....	Maturação citoplasmática completa
MCI.....	Maturação citoplasmática incompleta
MT.....	Maturação citoplasmática incompleta em transição
MIV.....	Maturação <i>in vitro</i>

µg.....	Micrograma
mg.....	Miligrama
mL.....	Mililitro
µL.....	Microlitro
µm.....	Micrômetro
MI.....	Metáfase I
MII.....	Metáfase II
ng.....	Nanograma
O ₂	Oxigênio
OSH.....	Ovariosalpingo-histerectomia
P.....	Probabilidade
P ₄	Progesterona
PBS.....	Tampão fosfato salino
PI.....	Prófase I
PIV.....	Produção <i>in vitro</i>
PVA.....	Álcool polivinil
QVB.....	Quebra de vesícula germinativa
RA.....	Reprodução Assistida
RIA.....	Radio-imuno ensaio
rpm.....	Rotações por minuto
SB.....	Solução de bloqueio
SOF.....	Fluido sintético do oviduto
SFB.....	Soro fetal bovino
TCM 199.....	Meio de cultura de tecidos 199
TE.....	Transferência de embriões
TGF-α.....	Fator de crescimento transformante alfa
UI.....	Unidade internacional
VG.....	Vesícula germinativa

MATURAÇÃO NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DE OÓCITOS DE CADELAS COLHIDOS EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL E CULTIVADOS *in vitro* EM MEIOS SEQUENCIAIS COM HORMÔNIOS E ESPERMATOZÓIDES

RESUMO – Este estudo foi realizado com o intuito de avaliar comparativamente os efeitos do emprego de meios seqüenciais com hormônios no desenvolvimento meiótico e citoplasmático de oócitos caninos durante o período de cultivo de 72 horas. Os oócitos foram coletados de 49 cadelas híginas submetidas à ovariosalpingo-histerectomia ou ovariectomia, divididas em três grupos de acordo com seu status reprodutivo (fase folicular, lútea e anestro). Os oócitos foram aleatoriamente distribuídos em quatro sistemas de cultivo diferentes sendo o meio básico (MB) o TCM 199 suplementado. Os demais consistiam: no sistema A (controle) os oócitos foram maturados por 72 horas no (MB) com 10 UI/mL de hCG, 1 µg/mL de progesterona (P4) e 1 µg/mL de estradiol (E2), ou seja, expostos de forma contínua à estes hormônios; no sistema seqüenciado B os oócitos foram maturados no meio base com hCG por 48 horas e nas 24 horas adicionais no MB com P4; no sistema seqüenciado C os oócitos foram maturados no MB com hCG, P4 e E2 por 48 horas e nas 24 horas adicionais no MB com P4; no sistema D (controle) os oócitos foram maturados no MB, sem hormônios. Nos meios B e C, os hormônios foram suplementados nas mesmas concentrações empregadas no sistema A. Os resultados evidenciaram efeito positivo dos meios seqüenciais na progressão da meiose e na maturação citoplasmática ($P < 0,05$). Não houve influência da condição reprodutiva das fêmeas doadoras nas taxas de maturação oocitária ($P > 0,05$). A presença de espermatozóides nos meios de cultivo não teve efeito benéfico sobre as taxas de MII; em contrapartida, a porcentagem de oócitos degenerados aumentou consideravelmente ($P > 0,05$).

Palavras-chave: Maturação nuclear, grânulos corticais, oócito canino, meios seqüenciais, hormônios.

***In vitro* NUCLEAR AND CYTOPLASMIC MATURATION OF OOCYTES
OBTAINED FROM BITCHES AT DIFFERENT STAGES OF THE ESTRUS
CYCLE AND CULTURED IN BI-PHASIC SYSTEMS WITH HORMONES AND
SPERMATOZOA**

SUMMARY – The aim of this work was to study the influence of different bi-phasic systems with gonadotrophins and steroids on meiotic and cytoplasmic development of canine oocytes cultured for 72 hours. Oocytes were collected after ovariohysterectomy or ovariectomy from 49 healthy bitches, divided into 3 groups according to their reproductive status (follicular, luteal and anestrus stages). Oocytes were randomly allocated in four different culture systems with the base medium (BM) consisting of TCM-199. The systems were as follows: in system A oocytes were matured for 72 h in BM with 10 UI/mL hCG, 1 µg/mL progesterone (P4), 1 µg/mL estradiol (E2); in bi-phasic system B oocytes were matured for 48 h in BM with hCG and for 24 h in BM with P4; in bi-phasic system C oocytes were matured for 48 h in BM with hCG, P4 and E2, and for 24 h in BM with P4. In system D (control), oocytes were cultured in BM without hormones. In systems B and C hormones were supplemented at the same doses as in system A. The results suggest that the use of bi-phasic systems was beneficial for oocyte meiosis and cytoplasmic maturation ($P < 0,05$). No difference was noticed with regards to the influence of reproductive status on maturation rates ($P > 0,05$). The addition of spermatozoa to the medium had no benefit on MII stage rates ($P > 0,05$); however, the percentage of degenerated oocytes has significantly increased.

Keywords: Nuclear maturation, cortical granules, canine oocytes, bi-phasic systems, hormones.

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP**, **processo 06/51943-9**.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, foi possível observar um aumento no número de animais de estimação que desfrutam de uma estreita ligação com seus donos, sendo considerados como parte integrante da família em alguns países da Europa e nos Estados por 30% da população (MARTHE, 2009). Este cenário, embora menos expressivo, também pode ser visto no Brasil, onde o número de bichos de estimação cresce a cada ano, chegando a 32 milhões de cães e 16 milhões de gatos (MARTHE, 2009). Esta transformação na interação homem-animal acarretou um aumento no interesse por produtos direcionados a eles, gerando faturamento anual próximo dos U\$ 2 bilhões (YABIKU, 2009). Neste segmento, a comercialização de animais tornou-se sinônimo de lucro (SOUZA et al., 2001) e observou-se um aumento na procura por acompanhamento reprodutivo. Técnicas de reprodução assistida (RA), tais como inseminação artificial (IA) e congelamento de sêmen canino, vêm sendo realizadas, proporcionando troca de material genético entre os países e motivando pesquisas para o aprimoramento das condições que mimetizam o ambiente *in vivo*.

Paralelamente, o crescimento exponencial da população, o avanço das fronteiras de reservas naturais e a conseqüente destruição do meio ambiente, aumentou o número de espécies animais ameaçadas de extinção, gerando preocupação com a preservação da biodiversidade e do genoma. Neste quesito, os conhecimentos científicos acerca da aplicação de biotécnicas na reprodução animal assistida vem ao encontro do objetivo de preservacionistas sendo que investigações sobre a utilização de procedimentos como a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos e a fertilização *in vitro* (FIV) nas espécies silvestres, permitirá o desenvolvimento de programas de conservação de gametas. Assim, devido à similitude da fisiologia reprodutiva e por constituir-se modelo experimental para os canídeos silvestre, é que estudos sobre RA em cães domésticos não contemplam unicamente esta espécie, mas favorecem o conhecimento em seus símiles silvestres, como é o caso do cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) na fauna silvestre brasileira.

Durante décadas, as informações referentes às biotécnicas estavam

restritas aos animais destinados à produção, principalmente os bovinos. Ainda assim, o primeiro relato de MIV e FIV nesta espécie ocorreu no final da década de 70 (IRITANI e NIWA, 1977), e o primeiro animal nascido deste procedimento somente 5 anos mais tarde (BRACKETT et. al., 1982). A partir daí, as pesquisas desenvolvidas avançaram exponencialmente objetivando a seleção e o ganho genético, resultados obtidos pela IA, produção *in vitro* (PIV) e transferência de embriões (TE). Em contraste, embora a primeira inseminação artificial em mamíferos tenha sido realizada em uma cadela em 1780 pelo abade italiano Lazzaro Spallanzani (JOHNSTON et. al., 2001) e a primeira descrição de um oócito de mamífero ter ocorrido também na espécie canina em 1827 por Karl Ernst Von Baer (FARSTAD, 2000), uma lacuna de dois séculos se deu entre estes relatos e as pesquisas posteriores acerca da reprodução nesta espécie.

Nos últimos quinze anos, investigações na área celular têm contribuído para o entendimento da fisiologia reprodutiva dos canídeos e, conseqüentemente, dos mecanismos envolvidos na fecundação, sejam eles facilitadores ou inibidores. Logo, a compreensão destes aspectos possibilitará tanto o aprimoramento das técnicas de PIV como o desenvolvimento de novos métodos de controle populacional de cães domésticos. Neste sentido, a MIV é o procedimento primordial para o desenvolvimento e aplicação de outras técnicas de PIV, precisando ser mais estudada.

Nos felídeos e bovídeos, a MIV está bem descrita e apresenta taxas de maturação aproximando-se de 60% (FARSTAD, 2000) e 90%, respectivamente (LONERGAN et al., 1994), enquanto que nos canídeos limita-se a escassos estudos com taxas variando de 0 a 58% para oócitos maturados até metáfase I, anáfase I e metáfase II em diferentes protocolos experimentais (FARSTAD, 2000b). Estes valores são considerados insatisfatórios e refletem a ineficiência da adaptação das técnicas empregadas em outras espécies, caracterizando a peculiar fisiologia reprodutiva das cadelas e demonstrando a necessidade de se considerar a dinâmica do folículo pré-ovulatório e o ambiente fisiológico do oviduto. Não obstante, a fase reprodutiva da fêmea doadora também deve ser considerada, visto ser um fator de variabilidade dos resultados até então obtidos para a espécie.

Da mesma forma, informações sobre a maturação citoplasmática dos

oócitos caninos ainda são escassas e pouco se sabe sobre o papel na fertilização que estes componentes citoplasmáticos possam desempenhar, uma vez que a deficiência na maturação citoplasmática interfere no desenvolvimento embrionário (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987). Estudos utilizando microscopia de transmissão (VIARIS DE LESEGNO et. al., 2008) e coloração dos grânulos corticais (APPARICIO-FERREIRA, 2006) reportaram dificuldade ainda maior de se atingir a maturação citoplasmática, quando comparada à nuclear, ratificando a limitação das condições de cultivo atualmente empregados para a espécie em questão.

Assim, esforços no intuito de aprimorar a MIV de oócitos caninos têm sido feitos, principalmente, no que concerne ao meio e tempo de cultivo apropriado e a competência meiótica, procurando ajustar da melhor maneira possível, todas as variáveis envolvidas no processo. Pesquisas envolvendo a suplementação dos meios de maturação com proteínas, antioxidantes e hormônios, associados ou não, têm demonstrado taxas discrepantes e insatisfatórias (NICKSON et al., 1993; HEWITT & ENGLAND, 1997).

A adição de hormônios (esteróides e gonadotrofinas) tem apresentado efeito variável e algumas vezes benéfico, dependendo da concentração hormonal empregada, da fase do ciclo estral e do tempo à que o oócito está exposto em condições de cultivo. A associação de estradiol e progesterona pode incrementar as taxas de maturação dependendo das concentrações hormonais empregadas (KIM et. al., 2005), quando suplementados em concentrações dez vezes superiores aos demais estudos (VANNUCCHI et. al., 2009) ou quando associados ao hCG (APPARICIO-FERREIRA, 2006). Por outro lado, a adição de gonadotrofina ao meio de cultivo parece não ter influência sobre as taxas de maturação quando esta é mantida por todo o período de cultivo. Entretanto, quando oócitos são mantidos em meio suplementado com hCG nas primeiras 48 horas e em sua ausência nas 48 horas posteriores, há um aumento significativo no número de oócitos que atingem MII (DE LOS REYES, 2005). Estes estudos reforçam a necessidade de se considerar o ambiente pré- e pós-ovulatório à que os oócitos estão expostos *in vivo*: pico de LH, concentrações crescentes de progesterona e decrescentes de estradiol.

Por esta razão é que formulamos a hipótese de que as condições dos

meios de maturação empregados para o cultivo de oócitos de cadelas devem ser baseadas nestes diferentes ambientes e no fato de que o requerimento para a maturação do oócito possa variar ao longo do tempo. Desta forma, o emprego de sistemas seqüenciais utilizando a associação de gonadotrofinas e esteróides pode ser uma das peças chaves que responderá aos anseios dos que trabalham com maturação na espécie canina, uma vez que reflete de forma mais análoga o ambiente fisiológico dentro do folículo pré-ovulatório e do oviduto. Ademais, aventou-se a hipótese de que a presença do espermatozóide exercesse um efeito positivo na retomada da meiose e na progressão até o estágio de metáfase II.

Em vista do exposto, o escopo geral deste trabalho foi avaliar se a utilização dos meios seqüenciais e co-cultivados com espermatozóides interfere ou não na maturação *in vitro* de oócitos de cadelas. Para tanto, os objetivos específicos deste trabalho foram: comparar a competência dos oócitos caninos maturados *in vitro* nos diferentes meios seqüenciais e co-cultivados com espermatozóides; comparar as taxas de maturação *in vitro* do meio seqüenciado com o mesmo acrescido de espermatozóides; cotejar as taxas de maturação *in vitro* dos oócitos no tempo zero e após 72 horas de cultivo; correlacionar a maturação nuclear com a citoplasmática e investigar as correlações entre as fases do ciclo estral e as taxas de maturação dos oócitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Particularidades da fisiologia reprodutiva das cadelas

Os canídeos são considerados monoéstricos não sazonais, ou seja, apresentam um ou dois ciclos estrais por ano, caracterizados por um extenso período de quiescência ovariana (CONCANNON et. al., 1989). Nas cadelas domésticas, esta fase varia de acordo com as raças e idades, sendo influenciada por fatores ambientais e genéticos (FELDMAN & NELSON, 2004). O ciclo reprodutivo da cadela, também denominado de ciclo estral, apresenta quatro fases bem distintas, denominadas: proestro, estro, metaestro/diestro e anestro (ANDERSEN, 1973). Estas se caracterizam por alterações hormonais que induzem transformações morfológicas, clínicas e citológicas nos diferentes segmentos do aparelho reprodutor feminino (RODRIGUES & RODRIGUES, 2002).

Em cadelas e raposas ocorre luteinização pré-ovulatória dos folículos, e a concentração plasmática de progesterona aumenta durante o proestro (CONCANNON et al., 1975; CONCANNON et al., 1989; SENGER, 2003 - Figura 1), diferentemente de outras espécies de mamíferos domésticos, nas quais o estrogênio predomina no ambiente folicular pré-ovulatório (FARSTAD, 2000a). A ovulação começa aproximadamente dois dias após o pico de LH (hormônio luteotrófico), no início do estro, e os oócitos liberados ainda estão imaturos, em prófase I (PI), sendo que noutras espécies os oócitos se encontram em metáfase II (MII). Desta forma, a maturação dos oócitos caninos se dá fora do ambiente folicular, no oviduto, onde também ocorre a fertilização e o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (LUVONI et al., 2005). Na maioria dos mamíferos, o tempo total em que os oócitos permanecem no oviduto varia de três a quatro dias, enquanto que nos oócitos caninos este período varia de 8,5 a 9 dias (HOLST & PHEMISTER, 1971).

No período subsequente ao estro, as concentrações séricas de progesterona são similares em fêmeas prenhes ou não (JEFFCOATE, 1998), não diferindo principalmente nos 40 dias posteriores ao pico de LH (RODRIGUES & RODRIGUES, 2003a).

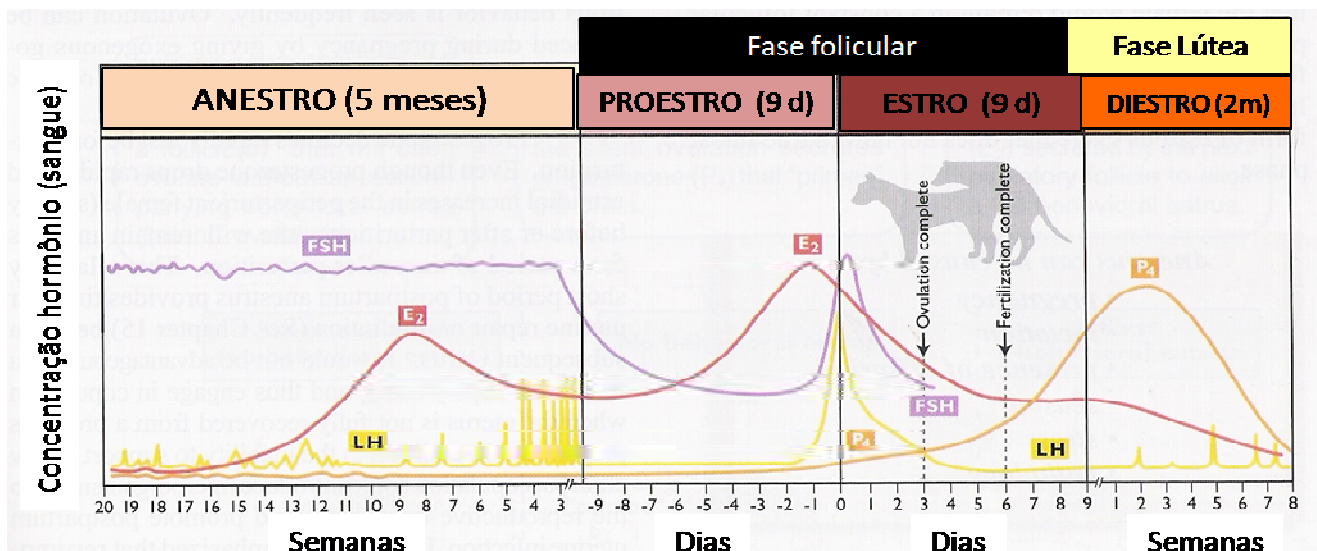


Figura 1. Ciclo estral da cadela e suas respectivas alterações hormonais. (Senger, P.L. Pathways to pregnancy and parturition, 2ª edição. Current conceptions Inc, p. 151, 2003).

2.2. Desenvolvimento e maturação oocitária *in vivo*

Oócitos são células haplóides derivadas das células germinativas primordiais, as quais se desenvolvem antes do nascimento (DEW, 2001). Estas células iniciam a mitose enquanto migram do saco vitelínico embrionário para o local de desenvolvimento gonadal (ovário primitivo), onde são denominadas oogônias (WASSARMAN & ALBERTINI, 1994). Quando cessa a divisão mitótica, as oogônias são denominadas oócitos, e tem início a meiose (DEW, 2001), que pode ocorrer antes do nascimento (humanos, eqüinos e ruminantes), logo após o nascimento (suínos e felinos) e nas primeiras semanas subseqüentes, como é o caso dos canídeos (ANDERSEN, 1970).

A divisão celular, tanto mitótica quanto meiótica, compreende quatro fases distintas: prófase, metáfase, anáfase e telófase (BAKER, 1982). 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, paquíteno, diplóteno e diacinese (estágio de vesícula germinativa) (BAKER, 1982).

Na maioria dos mamíferos, o processo de desenvolvimento oocitário perpassa por dois momentos de estagnação, na prófase I e na metáfase II (DULCIBELLA, 1998). A primeira estagnação é cessada com o processo de

crescimento folicular quando ocorre transição do estágio de vesícula germinativa à metáfase II (maturação oocitária). Quando em MII, os oócitos são ovulados e quando são fecundados ocorre interrupção da segunda estagnação (DEW, 2001). Sendo assim, nestes animais a maturação ocorre dentro do folículo ovariano e a ovulação dos oócitos, quando estes atingem MII (oócito secundário) e já se encontram prontos para a fertilização dentro do oviduto (WASSARMAN & ALBERTINI, 1994).

Os canídeos, por sua vez, ovulam oócitos ainda imaturos que estão no começo da primeira divisão meiótica (VG) e que necessitam de dois a cinco dias para a completa maturação (HOLST & PHEMISTER, 1971; TSUTSUI, 1975). Desta forma, o oviduto é o local onde o oócito permanece desde sua imaturidade, sofre o processo de maturação e de fertilização até o desenvolvimento à blastocisto (HOLST & PHEMISTER, 1971; FARSTAD et al., 1989; TSUTSUI, 1989). Estudo sobre maturação e fertilização *in vivo* demonstrou que oócitos caninos em metáfase II são observados a partir de 50 horas e embriões no estágio de pronúcleo decorridas 90 horas da ovulação (KEYNAUD et. al., 2005)

A maturação do oócito é, portanto caracterizada pela transição do estágio de vesícula germinativa (VG) ao de MII, passando por mudanças que preparam o oócito para ser fecundado e estar apto para se desenvolver como embrião. Estas alterações ocorrem não somente no núcleo, como também no citoplasma, de maneira independente, mas de modo coordenado para garantir a competência no desenvolvimento celular (DEW, 2001; RODRIGUES, 2003).

No início da maturação nuclear ocorre condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana celular, processo denominado quebra de vesícula germinativa (QVG) (KUBELKA et al., 1998). Posteriormente, os cromossomos se encontram mais condensados e dispostos no plano central do eixo metafásico, caracterizando o estágio de MI, evoluindo para MII quando ocorre compactação dos cromossomos e extrusão do primeiro corpúsculo polar (HEWITT & ENGLAND, 1997).

A avaliação da maturação nuclear de óocitos tem sido alvo de vários estudos em canídeos e, contrariamente, pouco se sabe sobre a maturação citoplasmática nesta família. Em outras espécies, estudos mostram a importância dos componentes citoplasmáticos na ativação oocitária durante a

fertilização, com liberação dos grânulos corticais para bloquear a poliespermia, reinício do ciclo celular, formação do pronúcleo e síntese protéica (DULCIBELLA, 1998).

A maturação citoplasmática pode ser descrita como as alterações estruturais e biológicas que permitem que o oócito seja fecundado e se desenvolva como embrião (AVELINO, 2004). Estas mudanças incluem a redistribuição de organelas citoplasmáticas, como os grânulos corticais (GC), as mitocôndrias, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (DULCIBELLA et al., 1990). Nos mamíferos, a maturação citoplasmática acontece quando o oócito se aproxima do estágio de MII e os grânulos corticais já agrupados, se dispersam e migram para a periferia do oócito (DAMIANI et al., 1996; DEW, 2001). Esta característica celular tem sido utilizada para avaliar a maturação citoplasmática do oócito em várias espécies de mamíferos (DAMIANI et al., 1996) e recentemente foi descrita pela primeira vez em canídeos (APPARÍCIO-FERREIRA, 2006).

Em estudo sobre as modificações ultra-estruturais ocorridas nos oócitos caninos durante a maturação *in vivo*, observou-se que as primeiras modificações estruturais significativas são notadas após o pico de LH (VIARIS DE LESEGNO et. al., 2008). Os autores concluíram que nesta espécie são necessários dois sinais para que a maturação ocorra: um antes do pico de LH (para induzir a maturação) e outro aproximadamente três dias após a ovulação (para induzir a retomada da meiose).

2.3. Maturação de oócitos *in vitro*

Os oócitos caninos podem retomar a meiose espontaneamente *in vitro* usando adaptações das técnicas de maturação utilizadas em outras espécies domésticas, embora com índices e eficiência mais baixos. Em canídeos, a taxa de maturação *in vitro* tem demonstrado um sucesso limitado variando de 0 a 58% para oócitos maturados até anáfase I e metáfase II (MAHI e YANAMACHI, 1976; ROBERTSON et al., 1992; YAMADA et al., 1992; YAMADA et al., 1993; NICKSON et al., 1993; HEWITT & ENGLAND, 1997; HEWITT & ENGLAND, 1998; HEWITT et. al., 1998; HEWITT & ENGLAND, 1999a; METCALFE, 1999; BOLAMBA et al., 2002). Não obstante, os experimentos realizados até o presente momento nesta espécie têm evidenciado similaridade com os eventos

in vivo (RODRIGUES, 2003), demonstrando a necessidade de um período de cultivo ao redor de 48 à 72 horas (FULTON et al., 1998).

2.3.1. Obtenção dos oócitos

Os principais métodos utilizados para a obtenção de oócitos em mamíferos são: aspiração dos folículos e fatiamento dos ovários ou “slicing”. Embora a aspiração seja uma técnica simples, não é muito utilizada em canídeos pela dificuldade de se visualizar os folículos no tecido ovariano, uma vez que os ovários destes animais são pequenos (LUVONI et al., 2005) e os folículos se localizam no córtex ovariano, tornando-se aparentes pouco antes da ovulação (HEWITT et. al., 1998; OTOL et al., 2000).

Por estas razões, a técnica mais utilizada para a obtenção de oócitos nas cadelas tem sido o “slicing” que consiste em fatiar o ovário utilizando uma lâmina de bisturi ao longo de seu comprimento e largura (NICKSON et. al., 1993; HEWITT & ENGLAND, 1997). No entanto, ao mesmo tempo em que esta técnica permite uma recuperação maior de oócitos quando comparado com a aspiração (NICKSON et.al., 1993), pode também ser a responsável pela baixa obtenção de oócitos de boa qualidade (HEWITT et. al., 1998; FUJII et al., 2000).

Outro método utilizado para obtenção de oócitos caninos é a “digestão ovariana”, técnica em que os ovários são colocados em solução enzimática (colagenase e DNase) a 37°C, por uma hora, quando então o produto da digestão é filtrado e colocado em solução para lavagem (DURRANT et al., 1998; BOLAMBA et al., 2002). Este método, segundo DURRANT et al. (1998), quando seguido de refrigeração “overnight”, reduz a porcentagem de oócitos degenerados, embora ocasione danos às camadas das células da granulosa.

2.3.2. Fatores intrínsecos que influenciam a maturação *in vitro* (MIV)

Estudos têm demonstrado que alguns fatores exercem influência sobre as taxas de MIV em cadelas; entre eles, a idade do animal (NICKSON et al., 1993; HEWITT & ENGLAND, 1998), o tamanho do oócito (HEWITT & ENGLAND, 1998; SRSEN et al., 1998) e a morfologia nuclear e do *cumulus* (NICKSON et al., 1993). Outros, tais como a fase do ciclo estral das doadoras, ainda são controversos.

-Morfologia dos oócitos

A morfologia nuclear e das células do *cumulus*, assim como o diâmetro oocitário são os critérios mais utilizados para selecionar oócitos aptos à maturação *in vitro* (LUVONI et al., 2005).

Experimentos evidenciaram que somente oócitos com duas ou mais camadas de células do *cumulus* continuam a se desenvolver em cultivo, enquanto oócitos com somente uma camada se degeneram após 48 horas de cultura (NICKSON et al., 1993). Este fato descreve a importância das células do *cumulus* na manutenção oocitária, uma vez que são responsáveis não somente pela transferência de nutrientes da granulosa para o oócito durante seu crescimento, como também por permanecerem, na espécie canina, após a fecundação até o estágio de mórula (RENTON et al., 1991; NICKSON et al., 1993).

No entanto, este critério não deve ser analisado isoladamente, mas sim, associado à avaliação do aspecto citoplasmático do oócito, o qual deve ser escuro e homogêneo (HEWITT & ENGLAND, 1997), caracterizando a grande quantidade de lipídio em seu interior. Sendo assim, tem sido proposta a classificação dos complexos oócito-*cumulus* (COCs) em três graus, levando em consideração esses dois aspectos morfológicos: grau I → pigmentação escura com uma ou mais camadas de células do *cumulus*; grau II → pigmentação clara com camadas incompletas de células do *cumulus*; grau III → pigmentação pálida, sem formato definido e sem células do *cumulus* aderidas, sendo considerados degenerados (HEWITT & ENGLAND, 1997). Para o processo de maturação *in vitro*, somente COCs grau I devem ser selecionados.

Pesquisas mostraram que o tamanho do oócito também influencia a competência meiótica, ou seja, a habilidade do oócito em recomeçar a meiose *in vitro*. A primeira evidência dos possíveis efeitos do diâmetro oocitário na competência meiótica foi relatada por THEISS (1997) que demonstrou que oócitos grandes (com diâmetro maior que 110 µm) apresentaram maior taxa de maturação em relação aos que possuíam diâmetros inferiores a 110 µm. Posteriormente, HEWITT & ENGLAND (1998) destacaram que a aquisição da competência meiótica do oócito, indicado pelo aumento do tamanho, é importante para sua habilidade de maturar *in vitro* e, só é adquirida, quando os

oócitos atingem 120 μm de diâmetro. Em estudo sobre diâmetro oocitário e competência meiótica, OTOI et al. (2000) ratificaram a idéia de selecionar oócitos competentes pelo tamanho; quando oócitos foram divididos em quatro grupos de acordo com seu diâmetro ($<100\mu\text{m}$; $100-110\mu\text{m}$; $110-120\mu\text{m}$; $\geq 120\mu\text{m}$), apenas aqueles com mais de $110\mu\text{m}$ de diâmetro progrediram do estágio de MI para MII, e as maiores taxas de MII (21,5%) foram observadas nos oócitos com diâmetro igual ou superior a 120 μm . Em hamster, camundongos, humanos e macacos o mesmo fenômeno foi observado (IWAMATSU, 1975; SORENSEN, 1976; MOTLIK, 1989; DURINZI, 1995; GILCHRIST, 1995).

-Fêmeas doadoras

A idade da cadela doadora também influencia o número total de oócitos recuperados e as taxas de maturação. STROM-HOLST et. al. (2001) estudaram o número de oócitos recuperados e sua relação com a idade da doadora e observaram que em cadelas com idades entre 1 e 6 anos o número de oócitos recuperados foi significativamente maior que os obtidos de cadelas com idade entre 7 e 13 anos (54.2 ± 35.1 X 26.4 ± 29 oócitos), concluindo que a taxa média de recuperação diminui cerca de 4,7 complexo oócito-*cumulus* (COC's) por ano. De forma similar, LOPES et. al. (2007) reportaram que tanto o número como a qualidade morfológica dos oócitos recuperados é influenciado pela idade do animal, mas não pela fase do ciclo estral (anestro ou diestro). Neste estudo, animais jovens produziram um número significativamente maior de oócitos de boa qualidade do que fêmeas com idade superior a quatro anos. NICKSON et. al., (1993), por sua vez, observaram que ovários de cadelas pré-púberes possuem menos oócitos, sendo os mesmos pequenos e com camada incompleta de células do *cumulus*. Ainda segundo os referidos autores, animais idosos (com mais de 7 anos), apresentam menor taxa de maturação comparada aos mais jovens, ou seja, a habilidade de maturar *in vitro* fica comprometida em fêmeas com idade superior a sete anos, resultado compartilhado por HEWITT & ENGLAND (1998).

O número de partos de uma cadela também foi descrito como um parâmetro adicional de avaliação do potencial de recuperação oocitária. HOSSEIN et. al. (2007) descreveram que as taxas de recuperação de oócitos

foi maior em múltíparas quando comparadas com nulíparas (94% x 86%) e sugeriram que este parâmetro pode ser usado para a seleção de doadoras.

Estudos têm demonstrado que a higidez das fêmeas doadoras não influencia as taxas de maturação. Oócitos oriundos de cadelas com piometra atingiram MII em taxas similares aos de outras fases reprodutivas (folicular, anestro, diestro e gestação) (RODRIGUES & RODRIGUES, 2003). Da mesma forma, HISHINUMA et.al., 2004 observaram que nem a severidade dos sinais clínicos apresentados pelas fêmeas com piometra parece interferir no número de oócitos recuperados. Estes estudos demonstraram ser possível utilizar oócitos de fêmeas enfermas para maturação *in vitro* desde que os mesmos atendam os pré-requisitos de qualidade oocitária descritos previamente.

A raça do animal, por sua vez, parece não exercer influência sobre o número total de oócitos recuperados utilizando a técnica de fatiamento (RODRIGUES & RODRIGUES, 2003a). No entanto, na técnica de “digestão do ovário”, DURRANT et al. (1998) encontraram um número significativamente maior de folículos em animais mestiços quando cotejados aos de raça pura.

-Fase do ciclo estral

A influência da fase do ciclo estral das cadelas e, conseqüentemente, dos eventos endócrinos pertinentes a cada período, sobre a taxa de recuperação de oócitos e os índices de maturação ainda é controversa, visto que, os poucos trabalhos publicados apresentam dados contrapostos.

Alguns pesquisadores afirmam que o número de oócitos viáveis colhidos e a taxa de maturação em oócitos cultivados *in vitro* parecem ser afetados pelo ciclo estral (NICKSON et al. 1993; YAMADA et al., 1993), enquanto outros, não encontraram influência da fase do ciclo estral sobre as taxas de maturação (RODRIGUES & RODRIGUES, 2003a) ou diferenças na frequência de maturação oocitária entre os oócitos coletados de cadelas no período de anestro e diestro (HEWITT & ENGLAND, 1997).

YAMADA et al. (1993) demonstraram que uma alta proporção de oócitos dos folículos pré-ovulatórios de cadelas estimulados com gonadotrofinas atingiram MII comparados com os de folículos obtidos de cadelas sem estímulo, sugerindo que a maturação pré-ovulatória do oócito é importante para a aquisição da competência meiótica e conseqüentemente, de sua maturação

in vitro. De modo similar, HEWITT & ENGLAND (1997) sugeriram que a coleta de oócitos no fim do proestro, início de estro, é mais adequada, pois as concentrações de progesterona e estrogênio durante esses estágios do ciclo têm um efeito positivo sobre a maturação. MARTINS (2005) em estudo comparando as taxas de maturação de oócitos até o estágio de MI de cadelas em anestro e estro observou uma porcentagem maior de MI em oócitos de cadelas em estro (25% x 58%).

Em outro estudo sobre o efeito da fase do ciclo estral na MIV de oócitos cultivados em meios utilizando diferentes concentrações de progesterona (0, 20, 200, 2000 ng/mL), WILLINGHAM-ROCKY et al. (2003) encontraram taxas similares de MII nas cadelas em estro e diestro, porém, superiores as das cadelas que estavam em anestro e proestro. APPARÍCIO-FERREIRA (2006), por sua vez, não encontrou diferença significativa nas taxas de maturação entre as fases folicular, lútea e anestro quando foi avaliada a maturação nuclear, mas esta era significativa quando se avaliava a maturação citoplasmática.

Esta contradição entre os diversos estudos reitera a importância e necessidade de novas pesquisas que enfoquem a maturação *in vivo*, as modificações ocorridas no oócito no ambiente pré e pós-ovulatório e sua influência quando sob cultivo *in vitro*.

2.3.3. Fatores extrínsecos envolvidos na MIV

-Condições do cultivo

A maturação de oócitos em gotas de meio de cultivo recobertas por óleo mineral é, assim como em outras espécies, o método mais utilizado em canídeos (LUVONI et al., 2005). Embora cada estudo apresente uma proporção oócito : volume do meio, somente um experimento avaliou o efeito da densidade oocitária na competência meiótica (OTOI et. al., 2002). Neste, os autores observaram que há influência da densidade oocitária sobre as taxas de maturação, mas esta difere de acordo com a fase do ciclo estral e, neste caso, 10 COCs de cadelas em anestro cultivados em 100 µL de meio de maturação apresentaram maior porcentagem de MII quando comparados a 5, 15 e 20

oócitos para mesma quantidade de meio.

O tempo de cultivo também é um fator importante na maturação *in vitro* de oócitos caninos. Experimentos sobre MIV em cadelas reportam períodos de incubação que variam de 24 a 120 horas (LUVONI et al., 2005), sendo que este período varia não somente com os diferentes protocolos, mas também com as taxas de progressão e maturação oocitária. O que se sabe é que quanto maior for o tempo de cultivo (dentro dos períodos utilizados para a espécie), maior será a progressão para o estágio de QVG – MII assim como a degeneração celular, embora todos os oócitos hábeis a maturarem apresentem a extrusão do primeiro corpúsculo polar somente após 24 horas de cultivo (NICKSON et al., 1993). Portanto, o ideal é que se consiga um equilíbrio entre o meio de cultivo utilizado e o período de incubação de forma a se obter melhores taxas de maturação com níveis de degeneração reduzidos.

A temperatura de cultivo não influencia as taxas de maturação ou a competência meiótica. Pesquisas utilizando diferentes temperaturas, tais como 37°C (MAHI & YANAGIMACHI, 1976), 37,5°C (OTOI et al., 2000), 38°C (FULTON et al., 1998; SRSEN et al., 1998) e 39°C (HEWITT & ENGLAND, 1997) na incubação de oócitos caninos, apresentaram resultados similares. Somente um trabalho comparando duas temperaturas na maturação de oócitos foi realizado (RODRIGUES & RODRIGUES, 2004). Nesse, foi confirmado que não há diferença na taxa de maturação de oócitos incubados a 37°C e 39°C, mas sim no tempo de cultivo, sendo que o período de 72 e 96 horas respectivamente, apresentaram maior proporção de oócitos maturados.

A concentração de oxigênio também tem sido alvo de estudos que tem procurado comparar baixas tensões de O₂ (5%) com tensões encontradas na atmosfera (20%) (SILVA et. al., 2009). Esta baixa tensão de O₂ se justifica como tentativa de mimetizar as concentrações de oxigênio (2-6%) encontradas no trato reprodutivo de alguns mamíferos (FISCHER e BAVISTER, 1993) e também com o intuito de prevenir a formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (SILVA et. al., 2009). Alguns autores relataram que a tensão de oxigênio de 5% e 20% nos meios TCM 199 e CRML 1066 promoveram taxas de maturação similares para oócitos caninos (SONGSASEN et al., 2001), diferindo de estudos com bovinos e camundongos em que a tensão gasosa de 5% de O₂ garantiu um aumento na competência meiótica dos oócitos cultivados (LUVONI

et al., 2005). De forma similar, SILVA et. al. (2009) não encontraram diferença nas taxas de maturação quando oócitos eram cultivados tanto sob 5% de O₂ como em 20%, utilizando meio rico em glicose (5.5. mM).

Na tentativa de mimetizar as condições encontradas *in vivo*, alguns pesquisadores têm estudado meios e suplementos para o cultivo de oócitos de cadelas, com o intuito de melhorar as taxas de maturação nesta espécie. Na maioria dos casos são utilizadas adaptações dos meios empregados em bovinos, tanto os simples (soluções salinas acrescidas de lactato, piruvato e glicose) como os complexos (acrescidos de aminoácidos, vitaminas e outros componentes) (GARDNER & LANE, 2000).

Os meios mais comumente utilizados em estudos de MIV de oócitos caninos são SOF (HEWITT & ENGLAND, 1997, HEWITT & ENGLAND 1998; HEWITT & ENGLAND 1999b; BOLAMBA et al., 2002), Krebs-Ringer Bicarbonato Modificado (TYH) (YAMADA et al., 1992) e, principalmente, o TCM 199 (NICKSON et al., 1993; HEWITT et. al., 1998; FUJI et al., 2000; OTOI et al., 2000; OTOI et al., 2001; SONGSASEN et al., 2001; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003a; WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003; RODRIGUES & RODRIGUES, 2004).

Esses meios vêm sendo empregados na MIV canina acrescidos de algumas substâncias, tais como fontes protéicas, hormônios, antioxidantes e fatores de crescimento, com o intuito de aumentar a sobrevivência dos oócitos em cultura.

-Fontes protéicas

A suplementação dos meios com fontes protéicas vem sendo feita com a adição de soro fetal bovino (SFB), albumina sérica bovina (BSA) e soro de cadela em estro. Em bovinos, o uso dessas substâncias está comprovadamente relacionado ao aumento das taxas de sobrevivência e maturação dos oócitos (RIBEIRO, 2007), enquanto que em cadelas o incremento das taxas de maturação é distinto entre grupos de pesquisa.

HEWITT et. al. (1998) utilizando o meio TCM 199 demonstraram que a suplementação com 0,3% de BSA aumentou as taxas de maturação até MI, AI e MII às 48 horas de cultivo, assim como a suplementação com 20% de soro fetal bovino (SFB) às 96 horas. Similarmente, RODRIGUES & RODRIGUES

(2003b) demonstraram que a adição de 0,4% de BSA no meio TCM 199 promoveu altas taxas de maturação até o estágio de MI, embora não tenha havido progressão na mesma proporção até MII.

Enquanto esses estudos utilizando fontes protéicas no meio TCM 199 demonstraram um efeito positivo na taxa de maturação, essa suplementação no meio SOF parece não alterá-la de forma significativa, como evidenciam os trabalhos de HEWITT & ENGLAND (1999) e BOLAMBA et al. (2002). Os primeiros referem um aumento na progressão da maturação somente quando o meio SOF foi suplementado com 4% de BSA e maturado por 96 horas, ao passo que os outros autores não observaram diferença entre o meio acrescido de fontes protéicas e o sem suplementação. SONGSASEN et. al. (2002) demonstraram que oócitos maturados em meio sem suplementação protéica atingiram MII em taxas similares (20%) às de estudos que utilizaram a suplementação.

A adição de soro como fonte protéica também vem sendo utilizada nos meios de maturação com resultados bem variados. BOLAMBA et. al. (2002) observaram que a adição de BSA em meio que continham soro teve efeito benéfico, diminuindo as taxas de oócitos degenerados comparadas àqueles cultivados em meio contendo somente soro. Segundo OTOI et al. (1999) a adição de soro de cadelas em estro na concentração de 10% promove um aumento na porcentagem de oócitos maturados até os estágios de MI e MII, uma vez que o soro de animais nesta fase do ciclo possui, além de componentes protéicos, uma concentração maior de estrógeno e progesterona. RIBEIRO (2007), por sua vez, não encontrou diferença nas taxas de maturação dos oócitos cultivados em meio com suplementação de soro de cadelas em estro, mas sim nos índices de retomada da meiose. O resultado positivo obtido nas taxas de QVG-MII utilizando soro de animais em estro também foi observado em alguns estudos que empregaram suplementação com hormônios considerados protagonistas do processo de maturação *in vivo*.

-Hormônios

A suplementação com hormônios nos meios de maturação também apresenta resultados não conclusivos sobre seu efeito benéfico. O consenso é que o desenvolvimento da competência do oócito em iniciar o processo de maturação implica numa ação coordenada de estímulos hormonais, caso contrário, o desenvolvimento não ocorre (LUVONI et.al., 2005).

O primeiro passo para entender e até justificar o emprego de hormônios nos meios de maturação é considerar as particularidades do ciclo estral de cadelas e seus eventos endócrinos. É durante o final do proestro/início do estro que a concentração de estradiol atinge pico de 50-110pg/mL, vindo a decair aproximadamente dois dias antes do pico de LH. Neste período, os níveis de LH começam a aumentar (de 8 para 50ng/mL), juntamente com os níveis de progesterona que passa de 0,8 ng/mL no início do proestro para valores superiores a 1 ng/mL durante a onda pré-ovulatória de LH (CONCANNON, 1991). Após o pico de LH (quando a concentração sérica de P4 é maior que 7 ng/mL), as concentrações de E2 e de P4 no folículo ovulatório são de aproximadamente 14,5 ng/mL e 7700 ng/mL, respectivamente (METCALFE, 1999 citado por KIM et. al., 2005). Deste modo, como mencionado anteriormente, a cadela é a única que apresenta uma luteinização pré-ovulatória dos folículos, expondo os oócitos às altas concentrações de progesterona. Por outro lado, embora se saiba que a maturação dos oócitos caninos ocorra no oviduto, até o presente momento não há uma única descrição das concentrações de esteróides neste fluido.

YAMADA et al. (1993) foram os primeiros a estudar o efeito dos hormônios sobre as taxas de maturação de oócitos de cadelas em estro e anestro induzidas por gonadotrofinas (superovulação), demonstrando que os oócitos expostos a estes hormônios *in vivo* maturaram em número significativamente maior que os do controle. HEWITT & ENGLAND (1997) estudando a suplementação com 1 µg/mL de progesterona e 1µg/mL de estradiol, isolados ou associados, e posteriormente (1999), a adição de 1 µg/mL de FSH, 1 µg/mL de LH ou 1µg/mL de FSH e de LH, não encontraram benefícios destas suplementações nas taxas de maturação oocitária e sugeriram que a adição de quantidades superiores às fisiológicas possa incrementar esses índices.

Neste sentido, VANNUCCHI et. al. (2009) estudaram o efeito de altas concentrações (20µg/mL) de estradiol e/ou progesterona em associação com gonadotrofinas (FSH e LH) sobre as taxas de maturação oocitária, sendo os grupos distribuídos em E2 (somente estradiol), P4 (somente progesterona) e E2+P4 (estradiol em associação com progesterona). Os autores relataram que não houve influência da suplementação de altas doses de estradiol no meio de cultivo; diferenças significativas foram observadas somente quando estradiol estava associado à progesterona (E2+P4) ou quando esta estava presente isoladamente (grupo P4) e mesmo assim, sobre as taxas de quebra de vesícula germinativa. Achado semelhante foi descrito por WILLINGHAM-ROCKY et al. (2003) que acrescentaram diferentes concentrações de progesterona (0, 20, 200, 2000 ng/mL) aos meios de maturação sem que se observasse incremento na taxa de oócitos em MII. Em contrapartida, KIM et al. (2005) relataram que uma porcentagem maior de oócitos maturados em meios acrescidos de 2 µg/mL de E2 e de 2,0 µg/mL P4 atingiram MII (16,6%) quando comparados àqueles em meio contendo somente E2 (10,4%). No entanto, curiosamente, essa associação na concentração de 2 µg/mL de E2 e 0,5 µg/mL de P4 diminuiu a competência meiótica (3,4% de MII). Desta forma, estes autores concluíram que a suplementação com a associação de estradiol e progesterona pode tanto aumentar como diminuir a competência meiótica, dependendo da concentração de progesterona utilizada.

Os resultados das pesquisas apresentados até agora evidenciaram a dificuldade em se encontrar a concentração e o tipo certo de hormônio necessário ao oócito canino para que retome a meiose *in vitro* e consiga atingir MII. Vale ressaltar que todos os trabalhos acima descritos referem-se à suplementação hormonal de forma contínua, ou seja, os oócitos foram expostos à mesma concentração e tipo de hormônio do início ao fim do cultivo. Em 2003, SONGSASEN et. al. descreveram pela primeira vez o emprego de sistemas seqüenciados de cultivo utilizando diferentes períodos de exposição ao eCG (0-240 minutos em TCM+ECG e o restante do período em TCM). Estes autores observaram que 30-44% dos oócitos que foram expostos ao eCG por 60 ou 240 minutos atingiram MI-MII e destacaram a dispensabilidade de se manter as gonadotrofinas por todo o período de cultivo. Da mesma forma, DE LOS REYES et al. (2005) estudaram o efeito do hCG sobre a maturação

oocitária em diferentes grupos (com hCG, sem hCG e com hCG somente por 48 horas) e períodos de cultivo e demonstraram que o meio que continha 10 UI/mL de hCG apresentou maior porcentagem de COCs em MII às 72 e 96 horas de cultivo quando comparado com o meio sem suplementação, no mesmo período de tempo. No entanto, ao maturarem os oócitos em meio contendo 10 UI/mL de hCG por 48 horas e transferi-los para outro meio sem suplementação por adicionais 24 ou 48 horas, observaram a maior taxa de maturação (43,4%) após 96 horas de cultivo. Recentemente, pesquisadores demonstraram que o sistema seqüenciado contendo 2 ng/mL de E2 e 10 UI/mL de eCG nas primeiras 48 horas e nas 48 subseqüentes nenhuma suplementação hormonal inibiu significativamente a competência meiótica dos oócitos, mantendo-os em estágio de vesícula germinativa (HANNA et. al., 2008).

Tabela 1. Influência dos diferentes tipos de hormônios e concentrações empregadas na maturação *in vitro* de oócitos caninos. Jaboticabal, 2010.

TIPO HORMONIO EMPREGADO	CONCENTRAÇÃO	RESULTADO OBTIDO	REFERENCIA
FSH e/ou LH	1 µg/ml	Sem efeito	Hewitt e England, 1999
FSH e/ou LH	0, 0.5, 5 ou 50µg/mL	Efeito positivo quando 0.5 µg/mL FSH	Lee et. al., 2007
hCG seqüencial	10 UI/mL	Efeito positivo quando mantido somente nas primeiras 48h de cultivo	De los Reyes et al., 2005
hCG e/ou eCG	10 UI/mL	Efeito positivo quando associados	Kim et. al, 2008
hCG seqüencial e com adição de fatores de crescimento	De 5 UI a 20 UI/mL	Efeito positivo	Alhaider et al, 2009
E2 e/ou P4	0, 1 µg/mL	Sem efeito	Hewitt e England, 1997
P4	Exp.1 2000,4000,8000 ng/mL Exp2. 0, 20, 200, 2000 ng/mL	Sem efeito	Willingham-rocky et. al., 2003
E2 e/ou P4	0, 0.5, 1.0, 2.0 µg/mL	-Efeito positivo quando hormônio sozinho (2µg/mL). -Efeito variável (qdo associados) dependendo da concentração de P4	Kim et. al, 2005
E2 e/ou P4 em meio com FSH e LH	20 µg/mL	Efeito positivo nas taxas de QVG	Vannucchi et. al., 2009
hCG + P4 +E2	10 UI + 1µg + 1µg/mL, respectivamente	Efeito positivo nas taxas MI	Apparício-Ferreira, 2006

- Co-cultivo com células da tuba uterina e no oviduto isolado

Assim como os hormônios, o emprego do co-cultivo em células da tuba uterina nos meios de maturação tem sido justificado pela similaridade com os eventos *in vivo*. Em estudo de BOGLIOLO et al. (2002) observou-se efeito positivo na maturação de oócitos quando utilizado o co-cultivo de células da tuba uterina obtidos de fêmeas em estro, enquanto que no conduzido por VANNUCCHI et. al. (2006) não houve influência significativa do co-cultivo de células da tuba uterina de fêmeas em anestro. De forma similar, não foi observado incremento nas taxas de QVG, MI ou MII de oócitos cultivados por 48 horas em meio contendo células epiteliais do oviduto; o aumento das taxas de maturação só foi observado quando o co-cultivo se estendeu por mais de 96 horas (HEWITT & ENGLAND, 1999).

O cultivo de oócitos em ovidutos isolados também foi objeto de investigação (LUVONI et. al., 2003). Nesta, a proporção de oócitos que retomaram a meiose (QVG-MII) foi de aproximadamente 60-70% após 30 horas, porcentagem considerada alta, embora os autores tenham destacado que o prolongamento do período de cultivo para 48 horas acarretou aumento na degeneração dos oócitos e nas células do oviduto.

- Antioxidantes e Fatores de crescimento

Durante o processo de maturação *in vitro* ocorre formação de ROS como resultado do metabolismo oxidativo (DEW, 2001). Uma forma de minimizar os efeitos deletérios da formação de radicais livres é a suplementação de antioxidantes no meio de cultivo, tais como, β -mercaptoetanol (BME), cisteína, cistina, cisteamina, ácido ascórbico, alfa-tocoferol e, recentemente, água de coco (SILVA, 2010).

KIM et al. (2004) investigaram o efeito da suplementação de β -mercaptoetanol (0, 25, 50 e 100 μ M) sobre a progressão meiótica de oócitos obtidos em diferentes fases do ciclo estral e reportaram que este antioxidante na dose de 50 μ M aumentou a proporção de oócitos em MII (20%) comparados às demais concentrações ou aos cultivados sem suplementação; efeito observado somente para oócitos oriundos da fase folicular. No entanto, ROTA & CABIANCA (2004) demonstraram que nem a suplementação com ITS (10 μ g/mL de insulina, 5,5 μ g/mL de transferrina e 5 μ g/mL de selênio), nem a

adição de 50µg/mL de EGF aumentou significativamente as taxas de maturação. Da mesma forma, PIRES (2006) relatou que a suplementação com cisteína (0,1 mM) ou cisteamina (100µM) isoladas ou em associação não exerceu efeito positivo sobre as taxas de maturação.

BOLAMBA et al. (2006) pesquisaram o efeito da suplementação de hormônios e fator de crescimento epidermal utilizando 50 ng/mL de EGF associado ou não aos hormônios E2 (1µg/mL), FSH (0,5µg/mL) e LH (0,5µg/mL) na expansão das células do *cumulus* e na progressão da meiose e observaram aumento na proporção de oócitos que retomaram meiose e que completaram maturação quando estes foram maturados no meio contendo EGF+FSH+LH+E2. De forma similar, KIM et al. (2004) observaram uma porcentagem maior de oócitos atingindo MII quando suplementados com 20 ng/mL de EGF (13%).

Estes estudos demonstram um efeito positivo da suplementação com EGF, mas foi empregando uma combinação de fatores de crescimento que os resultados foram ainda mais animadores (ALHAIDER & WATSON, 2009). Na mencionada investigação, os autores utilizaram em associação 100Nm de cada um dos seguintes fatores de crescimento: IGF-1, GH humano, TGF- α , FGF e observaram que esta combinação foi significativamente benéfica para a competência meiótica, resultando em 49% de oócitos em MII, a maior taxa de maturação já registrada.

A água de coco em pó (ACP) também foi recentemente testada como suplementação do meio de cultivo por possuir alta concentração de ácido ascórbico e este ser considerado um dos mais importantes seqüestradores de oxigênio intracelular, protegendo os oócitos contra o estresse oxidativo (SILVA, 2010). O referido autor testou a suplementação do meio de cultivo com duas concentrações de água de coco (5% e 10%) e não observou diferença nas taxas de progressão da meiose, concluindo ser possível a suplementação com este elemento, mas que o mesmo deve ser objeto de outros estudos.

2.3.4. Avaliação da maturação oocitária

Os oócitos caninos possuem alta densidade e o ooplasma rico em lipídeos, características que tornam difícil a visualização do núcleo e do citoplasma, bem como, a avaliação da maturação *in vitro*. Por esta razão, os

métodos descritos para avaliar o ooplasma preconizam a retirada mecânica do material lipídico (centrifugação) ou a utilização de marcadores nucleares fluorescentes que permitem identificar o ooplasma sem a necessidade de se retirar o material lipídico (HEWITT et. al., 1998).

Uma das técnicas usadas para coloração dos oócitos é a aceto-orceína com prévia fixação em ácido e álcool (MAHI & YANGIMACHI, 1976; YAMADA et al., 1992; HEWITT & ENGLAND, 1997; DURRANT et al., 1998; HEWITT & ENGLAND, 1998; HEWITT & ENGLAND, 1999a) e fixação adicional em citrato de sódio por 10 minutos para tornar mais claro e visualizar melhor o ooplasma (HEWITT et. al., 1998). A visualização da morfologia nuclear deve ser realizada em microscopia de interferência ou contraste de fase.

Métodos fluorescentes como o HOESCHT 33342 também vem sendo utilizado para avaliar a maturação nuclear em microscópio invertido e lâmpada UV (HEWITT & ENGLAND, 1997). Esta técnica permite a visualização do material nuclear, mas não distingue individualmente os cromossomos como ocorre com a coloração de aceto-orceína. Ademais, a coloração de HOESCHT 33342 é um método muito mais rápido e não causa morte celular como pode ocorrer quando se utiliza a aceto-orceína (DEW, 2001). Os oócitos analisados são classificados de acordo com a fase de divisão meiótica, como proposto por HEWITT et. al. (1998).

A maturação citoplasmática do oócito também pode ser avaliada utilizando alguns métodos, dentre os quais: a observação da presença (número e localização) de grânulos corticais, a cinética dos índices de maturação meiótica (extrusão do primeiro corpúsculo polar) e a mensuração de glutathione (GSH) no oócito (IZADYAR et al., 1996). A avaliação da ultraestrutura do oócito é também um método a ser considerado principalmente porque permite avaliar várias estruturas em um único oócito, no entanto, tem uma aplicação limitada quando se pretende avaliar um grande número de oócitos (VIARIS DE LESEGNO et. al., 2008).

O método de coloração FITC-Lecitina-Hoesch 33342 permite avaliar a distribuição dos grânulos corticais no citoplasma do oócito, fornecendo parâmetros sobre a maturação citoplasmática do mesmo e, conseqüentemente, sobre a eficiência do meio de cultivo. Esta coloração foi empregada com sucesso pela primeira vez em oócitos canídeos para avaliar a distribuição dos

grânulos corticais e sua relação com a maturação nuclear (APPARICIO-FERREIRA, 2006). Neste estudo, demonstrou-se que as maiores taxas de MII e grânulos corticais distribuídos na periferia (caracterizando maturação citoplasmática completa) foram observadas às 72 horas de cultivo, sendo que oócitos oriundos de cadelas na fase folicular apresentaram estatisticamente maior taxa de maturação citoplasmática do que as demais.

Recentemente, avaliando a ultraestrutura de oócitos maturados *in vitro*, pesquisadores observaram que mesmo aqueles oócitos em estágio de MII apresentavam uma maturação citoplasmática deficiente, ou algumas vezes, inexistente (VIARIS DE LESEGNO et. al., 2008).

Os dados dos trabalhos supracitados nos evidenciam a ineficiência dos meios de cultivo utilizados para a espécie em questão e também a dificuldade de se atingir a maturação citoplasmática (por envolver um maior número de variáveis) quando comparada à nuclear, o que possivelmente é uma das responsáveis pelos baixos índices de embriões pós FIV. Sendo assim, fica evidente a importância de se considerar tanto a avaliação nuclear quanto a citoplasmática nos estudos de maturação *in vitro* nesta espécie.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas 49 cadelas em diferentes fases reprodutivas (folicular, lútea e anestro), de diversas raças e com idades entre um e sete anos, selecionadas somente após serem consideradas híginas mediante exame clínico que consistiu de aferição de temperatura, auscultação cardíaca e respiratória, palpação transabdominal e exame do trato genitourinário. Vinte e oito animais foram submetidos à ovariosalpingo-histerectomia ou ovariectomia, 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 da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp - Câmpus de Jaboticabal. Os demais (vinte e um) foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos e laboratoriais junto à Università degli Studi di Milano-Itália.

Os animais selecionados para este experimento foram então distribuídos em três grupos experimentais, de acordo com a fase do ciclo estral, assim denominados: FOL – folicular, LUT – lútea e ANE – anestro. Das 49 fêmeas selecionadas, 16 integraram o grupo FOL, 16 o grupo LUT e 17 o grupo ANE.

3.2. Identificação da fase do ciclo estral

Para classificar a fase do ciclo estral realizou-se anamnese detalhada, exame colpocitológico (citologia vaginal), vaginoscopia e pela 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 3200 rpm por 5 minutos e dessorada. O soro foi congelado a -20°C para posterior mensuração da concentração de progesterona e, portanto, confirmação da fase do ciclo estral, como mostra o quadro 1.

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

Concentração P4 no plasma (ng/mL)	Fase do ciclo estral
Menor que 1,0	Anestro ou início proestro
2,0-10,0	Estro
Maior que 25	Diestro

Adaptado de Feldman & Nelson, 2004.

A citologia vaginal foi realizada introduzindo-se um “swab” na vagina, o qual foi delicadamente rotacionado para que as células ficassem aderidas a ele. Ato contínuo, foi rolando sobre duas lâminas de microscopia, para que fossem coradas, pelo kit panótico (Bio-cor 1,2 e 3[®]; Bioshop) e a outra, pelo método de Harris-Shorr (Apêndice 1) .

Os esfregaços foram visualizados sob microscópio óptico de luz em objetivas de 400X e 200X, os tipos celulares foram identificados e a fase do ciclo estral classificada, de acordo com JOHNSTON et al. (2001):

Proestro – Predomínio de eritrócitos. No início do proestro podem ser encontradas células parabasais e intermediárias, as quais diminuem em número à medida que o estro se aproxima. No final do proestro há predomínio de células superficiais.

Estro – Predomínio de células superficiais nucleadas e anucleadas (90%).

Diestro – Predomínio de células parabasais, intermediárias e neutrófilos. Também podem ser encontradas células de metaestro (células epiteliais que contêm um neutrófilo dentro de seu citoplasma).

Anestro – Predomínio de células parabasais, intermediárias e restos celulares.

3.3. Obtenção e seleção dos oócitos

Os ovários foram coletados assepticamente durante o procedimento de ovariosalpingo-histerectomia ou ovariectomia, transferidos para tubos Falcon de 50 mL contendo solução PBS-PVA mantida à temperatura ambiente e imediatamente levados ao laboratório. Foram então colocados em placas de cultivo (60X40mm, TPP) contendo 3 mL de PBS (WHITTINGAN, 1971)

suplementado com 5% SFB mantido à temperatura ambiente, onde foram seccionados com lâminas de bisturi (“slicing”) ao longo de seu comprimento e largura, para que houvesse liberação dos complexos oócito-*cumulus* (COC). As placas foram colocadas em estereomicroscópio para que os oócitos fossem localizados e classificados baseado na homogeneidade do citoplasma e no número de células do *cumulus oophorus*, como proposto por HEWITT & ENGLAND, 1997 (Figura 2):

COC grau I - complexo oócito-*cumulus* 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*.

Foram selecionados para cultura apenas COCs grau 1 e com diâmetro superior a 110µm, determinado por meio de retículo milimetrado de medição (10mm/100partes) para ocular de 10x de microscópio estereoscópio. Os oócitos selecionados foram então lavados três vezes em meio TCM 199 sem hormônios (meio básico-MB, Apêndice 2) a 38,5°C antes de serem incubados para a maturação.

3.4. Experimentos

Experimento I

Os oócitos de cada grupo experimental (FOL, LUT, ANE) obtidos após seleção baseada na morfologia do citoplasma e células do *cumulus* e que possuíam diâmetro superior a 110µm foram submetidos à avaliação do grau de maturação nuclear (configuração de cromatina) e citoplasmática (distribuição dos grânulos corticais) antes do processo de maturação, ou seja, tempo zero. A avaliação destas características foi realizada através da coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 (APPARICIO-FERREIRA, 2006).

Experimento II

Depois de terem sido lavados, os COCs de cada grupo experimental (FOL, LUT e ANE) foram colocados em placas de cultivo de quatro poços

(NUNC®, NUCLEON) contendo 500µL de meio de maturação. As placas foram acondicionadas em estufa a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar por um período de 72 horas, sendo que após o período de 48 horas, os oócitos eram transferidos para uma nova placa de cultivo que continha outros meios previamente preparados. Cada poço da placa de cultivo continha meio específico para um protocolo experimental, porém todos com a mesma base de constituição (Meio básico = MB → TCM 199 suplementado com piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino e antibióticos), conforme descrito no Apêndice 2.

Assim, os quatro protocolos experimentais empregados neste estudo consistiam: no sistema A os oócitos foram maturados por 72 horas no meio básico com 10 UI/mL de hCG, 1µg/mL progesterona (P4) e 1µg/mL estradiol (E2), ou seja, expostos de forma contínua à estes hormônios; no sistema seqüenciado B os oócitos foram maturados no meio básico com hCG por 48 horas e nas 24 horas adicionais no MB com P4; no sistema seqüenciado C os oócitos foram maturados no MB com hCG, P4 e E2 por 48 horas e nas 24 horas adicionais no MB com P4; no sistema D (controle) os oócitos foram maturados no meio básico por 72 horas, desprovido de hormônios. Nos sistemas seqüenciais B e C os hormônios foram suplementados nas mesmas concentrações empregadas no sistema A. A tabela 2 exemplifica os diferentes sistemas experimentais de cultivo.

Tabela 2. Sistemas de cultivo empregados na maturação *in vitro* de oócitos de cadelas. Jaboticabal-SP, 2010.

SISTEMAS DE CULTIVO	TEMPO (h)	
	0-48	48-72
A	TCM 199+HCG+P4 +E2	TCM 199+HCG+P4+E2
B	TCM 199 + hCG	TCM 199 + P4
C	TCM 199 + hCG + P4 + E2	TCM 199 + P4
D (controle)	TCM 199	TCM 199

10 UI/mL hCG= gonadotrofina coriônica humana; 1 µg/mL P4=progesterona; 1µg/mL E2= estradiol. TCM 199: foi suplementado com piruvato de sódio, 10% soro fetal bovino e antibióticos.

Após 72 horas do início do cultivo, os COCs foram avaliados quanto à maturação citoplasmática e nuclear através da coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 (APPARICIO-FERREIRA, 2006).

Experimento III

A) Coleta e Preparação do sêmen

Para realização deste experimento foi utilizado um cão macho de 2 anos de idade da raça boxer, considerado hígido após exame físico, laboratorial (hemograma e bioquímico) e exame andrológico. O sêmen foi colhido por estimulação manual, com separação das três frações, selecionando-se apenas a segunda fração (fração espermática). Somente amostras com mais de 80% de motilidade foram usadas nesta pesquisa. O sêmen foi lavado em meio HF-10 (Apêndice 4) e centrifugado a 500xg por 5 minutos para remoção do plasma seminal. Descartado o sobrenadante, o “pellet” foi diluído novamente em HF-10 e os espermatozóides móveis e imóveis foram separados pelo método de ‘swim-up’ por 30 minutos. Os espermatozóides móveis foram diluídos em meio HF-10 na concentração de 2×10^7 espermatozóides/mL, sendo então incubados a 38°C por 4 horas (‘solução espermatozóide’) para que ocorresse a capacitação espermática. Esta solução era preparada no mesmo dia em que se realizava a troca dos meios após 48 horas de cultivo.

B) Cultivo oócitos-espermatozóides

Depois de terem sido lavados, os COC’s de cada grupo experimental foram transferidos para placas de cultivo de quatro poços (NUNC®, NUCLEON) contendo 500µL dos meios de cultivo empregados nos sistemas descritos no experimento II,.

Após as primeiras 48 horas de cultivo era realizada a troca dos meios de maturação. Os oócitos permaneceram sozinhos nestes por 4 horas (mesmo tempo em que os espermatozóides ficavam na incubadora), e decorrido este período, acrescentava-se 50µL da ‘solução espermatozóide’, para se atingir concentração de 5×10^6 espermatozóides por mL. A partir daí iniciava-se o co-cultivo por 24 horas a 38°C e em atmosfera de 5% CO₂.

Decorrido este período, os oócitos foram pipetados no próprio meio de cultivo para livrá-los das células adjacentes, transferidos para gota de PBS-PVA onde permaneciam até serem corados utilizando-se mesma técnica dos experimentos I e II. Terminado o procedimento de coloração, foram avaliados quanto ao estágio meiótico, distribuição dos grânulos corticais e penetração da cabeça do espermatozóide.

3.5. Avaliação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática

Os oócitos provenientes do experimento I e àqueles submetidos à maturação por 72 horas (experimento II e III) foram corados pela metodologia previamente descrita por APPARICIO-FERREIRA (2006). Os oócitos foram colocados em placas de cultivo (60 X 40mm, TPP) contendo 200 µL de solução de hialuronidase 0,2% por 5 minutos. Ato contínuo, foram transferidos para outra placa contendo PBS-PVA onde foram aspirados repetidamente com pipeta de 100 µL para retirada completa das células do *cumulus*. Na sequência, foram transferidos para gotas contendo 70µL de solução de pronase 0,5% por aproximadamente 5 minutos ou até que a zona pelúcida não fosse mais visualizada. Os oócitos foram então fixados em formaldeído 3% durante 30 minutos em temperatura ambiente e incubados a 4°C “overnight” em solução de bloqueio (SB). No dia subsequente, os oócitos foram retirados e transferidos para outra placa de cultivo (60 X 40mm, TPP) contendo 10 µg/mL de *Lens culinaris* (esta lecitina se liga especificamente a α -Dmanose presente nos grânulos corticais) diluída em 500µL de SB por 15 minutos a 38°C. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em SB, e transferidos para lâmina de microscopia contendo uma gota de bisbenzímide (Hoeschst 33342) diluído em glicerol, sendo recobertos por lamínula, selados com esmalte e colocados em caixa de lâminas para que fossem examinados em microscópio invertido equipado com luz ultravioleta no dia subsequente. O comprimento de onda utilizada no microscópio de fluorescência para leitura com o Hoeschst e com a lecitina foi 330-385 nm e 420-490 nm, respectivamente.

Todas as soluções utilizadas no procedimento supracitado constam nos Apêndices 5 a 9.

Classificação dos estádios de maturação nuclear

A classificação dos estádios de maturação nuclear foi avaliada segundo HEWITT & ENGLAND (1997b), baseada na morfologia do DNA, por graus variados de condensação dos cromossomos (Figura 3), como segue:

→Vesícula germinativa (VG, estágio dictioto da prófase I) – Presença de núcleo vesicular, envelope nuclear e cromossomos apresentando-se pouco condensados;

→Quebra da Vesícula Germinativa (QVG) – Cromossomos apresentavam pequeno grau de condensação com dispersa distribuição, porém ainda com núcleo de aspecto vesicular, mas sem a presença do envelope nuclear;

→Metáfase I (MI) – Cromossomos apresentavam grau mais avançado de condensação, não sendo possível a visualização individual dos cromossomos;

→Metáfase II (MII) – Cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma e aparecimento do primeiro corpúsculo polar;

→Degenerados/Não passíveis de determinação (D/NI) – Oócitos cujo estágio de desenvolvimento nuclear não era passível de determinação ou não apresentavam cromatina evidente.

Classificação dos estádios de maturação citoplasmática

A classificação da maturação citoplasmática foi avaliada baseada na distribuição dos grânulos corticais no citoplasma do oócito, como segue:

→Maturação citoplasmática incompleta (MCI) – Grânulos corticais distribuídos uniformemente por todo o citoplasma.

→Maturação citoplasmática incompleta, mas em estágio transicional de maturação (MT) – Grânulos corticais dispersos no citoplasma e também na região periférica do oócito, próximos à membrana plasmática.

→Maturação citoplasmática completa (MCC) – Grânulos corticais dispersos somente na periferia do oócito, próximos à membrana plasmática;

A figura 4 representa os diferentes graus de maturação citoplasmática supracitados.

3.6. Análise estatística

Cada cadela representou uma repetição na qual oócitos em diferentes estágios de maturação nuclear e citoplasmática foram contados. Um total de 1390 oócitos representando 12 repetições por grupo foi analisado. A proporção de oócitos atingindo cada fase da maturação nuclear e citoplasmática em cada grupo durante o período de cultivo de 72 horas foi analisado submetendo os dados à transformação arco seno e as comparações foram feitas através da análise de variância (ANOVA). O modelo incluiu os efeitos do meio de cultivo, estágio do ciclo estral e sua interação com cada estágio de maturação nuclear e citoplasmática.

O grau de significância utilizado para rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%, ou seja, foram consideradas estatisticamente significativas proporções menores que 0,05.

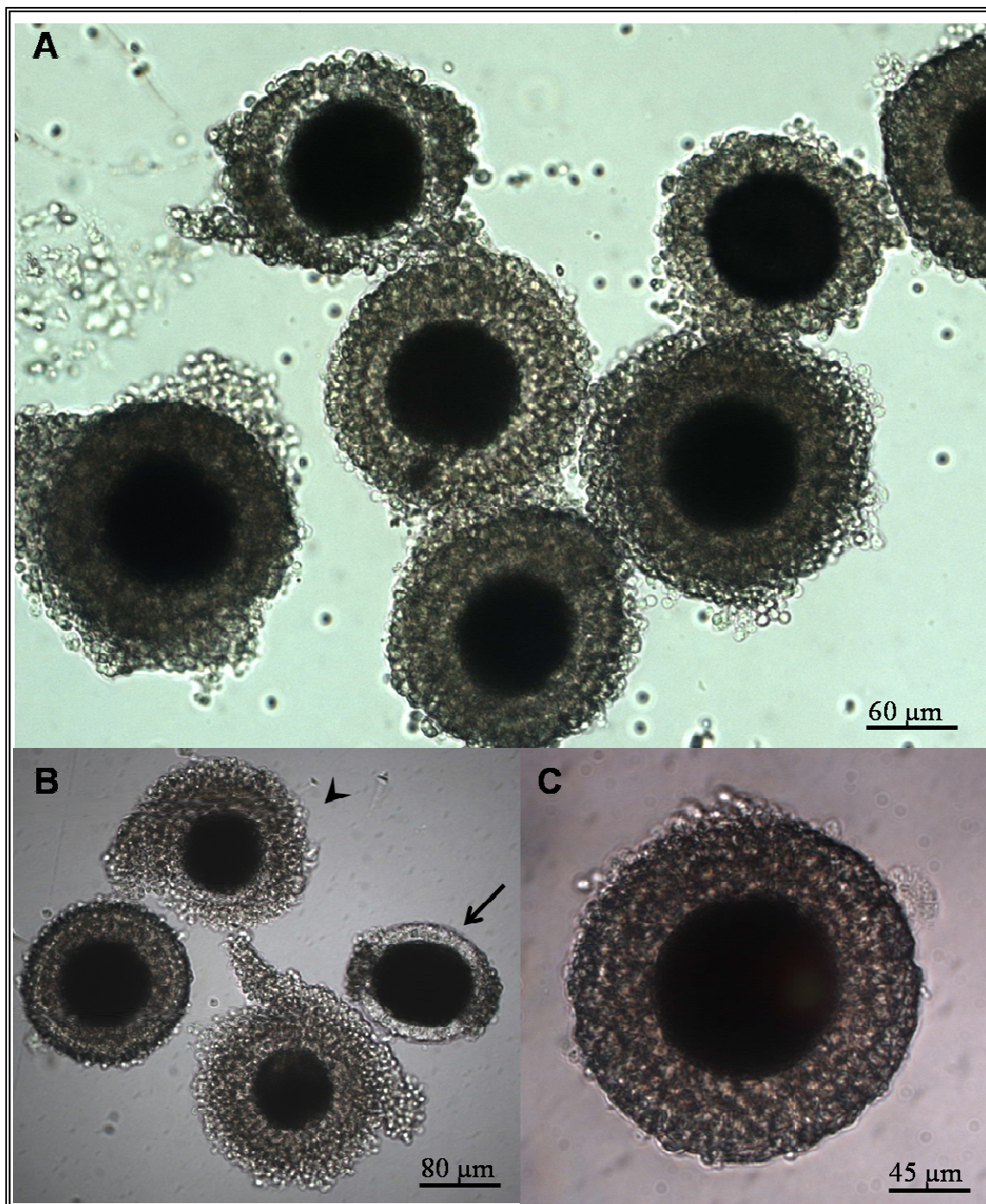


Figura 2. Fotomicrografias digitais de oócitos de cadelas antes de serem submetidos ao processo de maturação *in vitro*. **A.** Grupo de oócitos obtidos imediatamente após o fatiamento dos ovários em PBS. **B.** Classificação dos complexos oócitos-*cumulus* (COCs): COC grau II (cabeça da seta) e grau III (seta), não selecionados para maturação. **C.** COC grau I selecionado para cultivo *in vitro*.

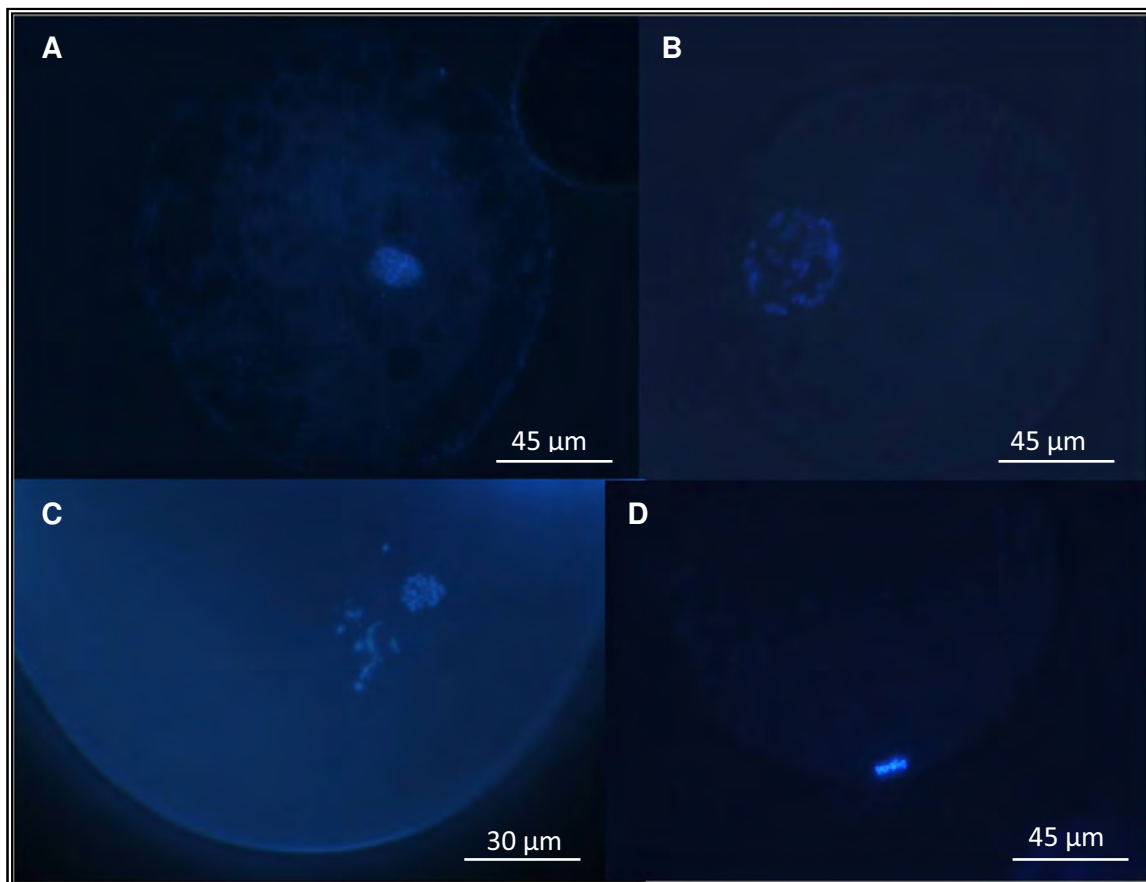


Figura 3. Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas em diferentes estádios de maturação nuclear após cultivo *in vitro*. Coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342, comprimento de onda 330-385 para avaliação e classificação da cromatina. **A.** Vesícula germinativa (VG). **B.** Quebra de vesícula germinativa (QVG). **C.** Metáfase I (MI). **D.** Metáfase II (MII).

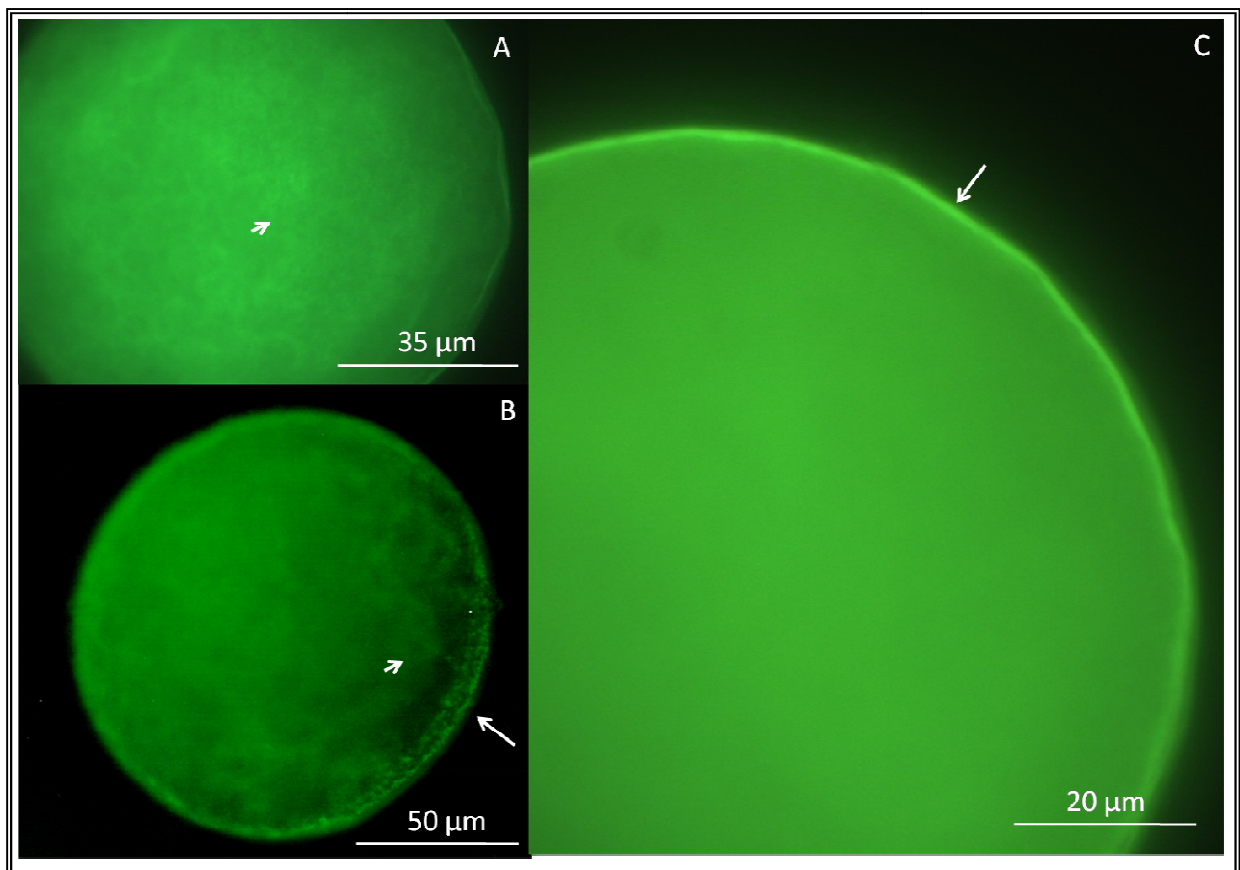


Figura 4. Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas em diferentes estádios de maturação citoplasmática após cultivo *in vitro*. Coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342, comprimento de onda de 420-490 nm para avaliação e caracterização da dispersão dos grânulos corticais. **A.** Maturação citoplasmática incompleta. Dispersão dos grânulos corticais por todo o citoplasma (seta). **B.** Maturação citoplasmática incompleta, estágio de transição. Seta pequena mostra grânulos corticais dispersos no citoplasma. Seta grande aponta para grânulos corticais distribuídos na periferia do oócito. **C.** Maturação citoplasmática completa. Grânulos corticais dispersos na periferia do oócito (seta).

4. RESULTADOS

4.1. Recuperação de oócitos

O número total de oócitos recuperados das 49 fêmeas estudadas foi 2331, dos quais 1862 foram classificados como grau I. Sendo assim, cada fêmea forneceu uma média de 38 COCs grau I. No entanto, foram considerados nesta pesquisa 1390 oócitos; os demais foram perdidos durante o procedimento de maturação ou coloração. Os dados relativos ao número absoluto e porcentagem de COCs recuperados por grupo encontram-se na tabelas 3.

Observa-se que o número de oócitos recuperados e classificados de acordo com o aspecto morfológico em grau I, II e III na fase folicular foi expressivamente superior aos demais ($P < 0,02$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos LUT e ANE em nenhum dos graus de qualidade oocitária.

Tabela 3. Número absoluto e (%) de complexos oócito-*cumulus* (COCs) grau I, II e III obtidos de 16 cadelas pertencentes ao grupo FOL (folicular), 16 pertencentes ao grupo LUT (luteal) e 17 do grupo ANE (anestro), classificadas antes do processo de maturação *in vitro* - Jaboticabal, 2010.

Fase do ciclo estral	Nº. Absoluto e (%) de oócitos colhidos nas diferentes fases do ciclo estral			
	GRAU I	GRAU II	GRAU III	TOTAL
FOLICULAR	760 ^a	142 ^a	37 ^a	939
	(81)	(15)	(4)	(100)
LÚTEO	450 ^b	69 ^b	82 ^b	601
	(74,9)	(11,5)	(13,6)	(100)
ANESTRO	610 ^b	75 ^b	108 ^b	793
	(77)	(9,5)	(13,5)	(100)

Letras diferentes dentro da mesma coluna evidenciam diferença significativa, $p < 0,05$.

4.2. Experimento I - Avaliação zero hora

Das 49 fêmeas incluídas neste estudo, sete foram selecionadas para a obtenção dos oócitos a serem avaliados antes do processo de maturação. Destas, três integraram o grupo anestro, duas o grupo lúteo e duas o folicular. Foram obtidos 66 COC grau I no grupo folicular, 42 no grupo lúteo e 43 no grupo em anestro.

Como é possível observar na tabela 6, os oócitos colhidos e não submetidos à maturação *in vitro* apresentavam-se ou em fase de vesícula germinativa ou em quebra de vesícula germinativa. O grupo FOL foi o que apresentou o maior número de oócito com citoplasma caracterizado como em estágio transicional de maturação (7,6%), mas diferença estatística foi observada nos grupos FOL e LUT em relação ao grupo ANE no número de oócitos com citoplasma imaturo ($P < 0,05$). Nenhum oócito dos grupos estudados apresentou maturação citoplasmática completa.

Tabela 4. Relação entre a distribuição dos grânulos corticais e configuração de cromatina de COCs grau I avaliados antes do processo de maturação *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2010

GRUPO	Número total de oócitos avaliados	Nº e (%) oócitos com diferentes padrões* de distribuição de grânulos corticais								
		MCI			MT			MCC		
		VG	QVG	Total	VG	QVG	Total	VG	QVG	Total
FOL	66	46 ^a (69,7)	15 ^a (22,7)	61 (92,4)	2 (3,1)	3 ^a (4,5)	5 (7,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
LUT	42	36 ^a (85,7)	5 ^a (11,9)	41 (97,6)	0 (0)	1 ^a (2,4)	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ANE	43	40 ^b (93)	3 ^b (7)	43 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Letras diferentes dentro da mesma coluna evidenciam diferença significativa, $p < 0,05$.

*MCI: Imaturo-GC distribuídos por todo o citoplasma. MT: em transição. GC distribuídos no citoplasma e também na periferia do oócito. MCC: Maturos- GC distribuídos na periferia do oócito, próximo à membrana plasmática. Vesícula Germinativa (VG); quebra de vesícula germinativa (QVG).

4.3. Experimento II

- Avaliação da maturação nuclear após 72 horas de cultivo

Neste experimento foram incluídas 36 fêmeas divididas, de acordo com a fase do ciclo estral, nos três grupos experimentais (12 por grupo experimental). Um total de 1119 oócitos submetidos à MIV foi avaliado quanto ao grau de maturação nuclear após 72 horas de cultivo. Os resultados foram agrupados por fase do ciclo estral e posteriormente comparados entre si.

Grupo FOL (fase folicular)

As maiores porcentagens de oócitos em VG foram observadas nos sistemas de cultivo não sequenciados (protocolo D=38,7; protocolo A=17,4), $p<0,01$. O número de oócitos que se mantiveram em estágio de vesícula germinativa não diferiu estatisticamente entre os sistemas de cultivo seqüenciados.

Ao se analisar as porcentagens de QVG entre os protocolos experimentais têm-se que os sistemas A, B e C apresentaram índices semelhantes entre si e estatisticamente diversos do protocolo D ($p<0,02$). Comparando-se as taxas de MI-AI entre os protocolos, nota-se que o protocolo B foi o que apresentou as porcentagens mais altas (29,5%) em relação aos demais, no entanto, foi significativamente diferente somente em relação ao protocolo D (5,3%). Embora o número de oócitos em MI-AI tenha sido maior nos sistemas seqüenciados ($>27\%$), não houve diferença estatística entre estes e o meio suplementado com hormônios de forma contínua (protocolo A $\rightarrow$ 16,4%).

Em relação às taxas de MII, embora as maiores taxas tenham sido observadas em oócitos cultivados no sistema B (20%) e C (14,7%), somente o sistema seqüencial B apresentou taxa significativamente mais alta do que os cultivados no protocolo A (5%) e D (0%), $p<0,01$. Não houve diferença entre os protocolos B e C.

As porcentagens de oócitos degenerados foram mais baixas nos protocolos B (4,2%) e C (6,8%) quando comparado com os demais, no entanto,

as porcentagens de oócitos degenerados no protocolo A (15,1%) não diferiu estatisticamente do C (6,8%).

Tabela 5. Número absoluto e relativo (%) de oócitos obtidos de cadelas na fase folicular, em diferentes graus de maturação nuclear após 72 horas de maturação em diferentes sistemas de cultivo. Jaboticabal, 2010.

Sistema de cultivo	Nº oócitos	VG	QVG	MI-AI	MII	D/NI
A	86	15 ^a (17,4)	39 ^a (45,3)	14 ^a (16,4)	5 ^a (5,8)	13 ^a (15,1)
B	95	5 ^b (5,3)	40 ^a (42,1)	27 ^a (28,4)	19 ^{b,c} (20)	4 ^{b,d} (4,2)
C	88	6 ^b (6,8)	39 ^a (44,3)	24 ^a (27,3)	13 ^{a,b,c} (14,7)	6 ^{a,d} (6,8)
D	75	29 ^c (38,7)	19 ^b (25,3)	4 ^b (5,3)	0 ^{a,d}	23 ^c (30,7)

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas (a,b,c,d) na mesma coluna, diferem entre si.

VG=Vesícula germinativa; QVG=Quebra de vesícula germinativa; MI=Metáfase I; MII=Metáfase II; D/NI=Degenerados ou não-passíveis de identificação

Sistemas de cultivo: A=Meio básico(MB) + hCG + P4 + E2, em exposição contínua;

B (Sistema seqüencial)= MB + hCG nas primeiras 48 horas e MB + P4 nas 24h adicionais;

C (Sistema seqüencial) = MB + hCG + P4 + E2 nas primeiras 48 h e MB + P4 nas 24 horas adicionais;

D=MB sem adição de hormônios.

Grupo LUT (Fase lútea)

Analisando as porcentagens de VG e QVG observa-se que não há diferença entre os meios que foram acrescidos de hormônios (protocolo A, B e C), mas estes são significativamente distintos em relação ao protocolo D, $P < 0,01$.

Em relação às freqüências de MI-AI percebe-se uma superioridade do protocolo seqüenciado C (29,2%) em relação ao protocolo A (14,9%) e D (3%), mas este não diferiu estatisticamente do protocolo B (26,7%). Diferentemente, as porcentagens de MII foram maiores no protocolo B (15,6%) em relação ao protocolo A (4,1%) e D (0%), mas não diferiu do protocolo C (12,4%). Desta

forma, observa-se que não há diferença estatística entre os protocolos seqüenciados B e C em relação a competência meiótica.

As taxas de oócitos classificados como degenerados ou não passíveis de identificação foram evidentemente superiores no protocolo D (50%), meio desprovido de suplementação hormonal. $P < 0,01$.

Tabela 6. Número absoluto e relativo (%) de oócitos obtidos de cadelas na fase lútea, em diferentes graus de maturação nuclear após 72 horas de maturação em diferentes sistemas de cultivo. Jaboticabal, 2010.

Protocolo	Nº oócitos	VG	QVG	MI-AI	MII	D/NI
A	74	9 ^a	30 ^a	11 ^a	3 ^a	21 ^a
		(12,2)	(40,5)	(14,9)	(4,1)	(28,4)
B	90	6 ^a	37 ^a	24 ^{a,b}	14 ^b	9 ^b
		(6,7)	(41,1)	(26,7)	(15,6)	(9,9)
C	89	4 ^a	34 ^a	26 ^b	11 ^{a,b}	14 ^{a,b}
		(4,5)	(38,2)	(29,2)	(12,4)	(15,7)
D	68	22 ^b	10 ^b	2 ^c	0 ^{a,c}	34 ^c
		(32,3)	(14,7)	(3,0)		(50)

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas (a,b,c,d) na mesma coluna, diferem entre si.

VG=Vesícula germinativa; QVG=Quebra de vesícula germinativa; MI=Metáfase I; MII=Metáfase II; D/NI=Degenerados ou não-passíveis de identificação

Sistemas de cultivo: A=Meio básico(MB) + hCG + P4 + E2, em exposição contínua;

B (Sistema seqüencial)= MB + hCG nas primeiras 48 horas e MB + P4 nas 24h adicionais;

C (Sistema seqüencial) = MB + hCG + P4 + E2 nas primeiras 48 h e MB + P4 nas 24 horas adicionais;

D=MB sem adição de hormônios.

Grupo ANE (Fase anestro)

Comparando-se as porcentagens de oócitos classificados como VG entre os diferentes protocolos experimentais, tem-se que a porcentagem significativamente mais alta (33,6%) foi observada no protocolo D, seguido pelo protocolo A (19,8%). Não houve diferença significativa nas taxas de VG entre os protocolos seqüenciais B e C.

Em relação aos índices de QVG, nota-se que a porcentagem de oócitos no protocolo D foi significativamente inferior aos demais (15,1%). O mesmo

pode ser observado em relação às taxas de AI-MI que foram significativamente superiores ($p<0,02$) em oócitos cultivados nos sistemas seqüenciais B (27,5%) e C (29%) quando comparado aos outros.

Analisando as taxas de MII, observou-se que nenhum oócito do protocolo D e apenas três do protocolo A (3,3%) atingiram MII enquanto porcentagens significativamente mais altas de oócitos cultivados nos sistemas seqüenciais B (11,7%) e C (13,7%) atingiram MII. Não houve diferença estatística entre os dois sistemas seqüenciais.

A porcentagem de oócitos degenerados foi significativamente mais baixa no protocolo C (4%) comparado com os demais.

Tabela 7. Número absoluto e relativo (%) de oócitos obtidos de cadelas em anestro, em diferentes graus de maturação nuclear após 72 horas de maturação em diferentes sistemas de cultivo. Jaboticabal, 2010.

Protocolo	Nº oócitos	VG	QVG	AI-MI	MI	D/NI
A	91	18 ^a	40 ^a	12 ^a	3 ^a	18 ^a
		(19,8)	(43,9)	(13,2)	(3,3)	(19,8)
B	120	8 ^b	50 ^a	33 ^b	14 ^b	15 ^a
		(6,7)	(41,7)	(27,5)	(11,7)	(12,5)
C	124	9 ^b	57 ^a	36 ^b	17 ^b	5 ^b
		(7,3)	(46)	(29)	(13,7)	(4)
D	119	40 ^c	18 ^b	3 ^c	0 ^a	58 ^c
		(33,6)	(15,1)	(2,5)		(48,7)

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas (a,b,c,d) na mesma coluna, diferem entre si.

VG=Vesícula germinativa; QVG=Quebra de vesícula germinativa; MI=Metáfase I; MII=Metáfase II; D/NI=Degenerados ou não-passíveis de identificação. Sistemas de cultivo: A=Meio básico(MB) + hCG + P4 + E2, em exposição contínua;

B (Sistema seqüencial)= MB + hCG nas primeiras 48 horas e MB + P4 nas 24h adicionais;

C (Sistema seqüencial) = MB + hCG + P4 + E2 nas primeiras 48 h e MB + P4 nas 24 horas adicionais;

D=MB sem adição de hormônios.

-Comparação entre os as fases do ciclo e as taxas de maturação nuclear

Comparando-se estatisticamente os dados presentes nas tabelas 5-7 para cada sistema de cultivo, nota-se que as taxas de maturação (VG-MII) foram muito similares entre os grupos, embora com tendência a uma discreta superioridade dos oócitos provenientes do grupo FOL, sem diferença estatística. A única diferença estatística foi notada em relação aos oócitos classificados como degenerados ou não passíveis de identificação, e será comentado mais adiante.

Em relação as porcentagem de oócitos em estágio de vesícula germinativa, observa-se que nos grupos FOL e ANE, o protocolo B e C (com resultados semelhantes entre si) diferiram estatisticamente dos demais, enquanto que no grupo LUT, não foi encontrada diferença entre os protocolos A,B ou C, mas estes foram distintos do sistema D.

Analisando o estágio de QVG, nota-se que a resposta dos oócitos presentes nos três grupos aos sistemas de cultivo foi igual: $A=B=C \neq D$, evidenciando que neste estágio de retomada da meiose, os protocolos seqüenciais não promoveram taxas de maturação superiores aos do sistema onde os oócitos foram expostos aos hormônios de forma contínua.

Com relação ao estágio de MI, observou-se que no grupo ANE, houve diferença estatística entre os protocolo A e B, enquanto que no grupo FOL, o protocolo A foi igual ao C. Por outro lado, em todos os grupos observou-se baixas taxas de maturação nos oócitos cultivados no sistema D.

Comparando-se os três grupos nas porcentagens de MII, nota-se que o sistema B foi significativamente superior aos protocolos A e D nos três grupos, enquanto que o sistema C diferiu do sistema A somente no grupo ANE. Novamente, os protocolos B e C apresentaram taxas semelhantes em todos os grupos.

Embora se tenha observado diferenças numéricas e percentuais entre os diferentes estádios de maturação nuclear para cada sistema de cultivo entre os grupos experimentais, estas foram significativamente distintas somente em relação às porcentagens de oócitos degenerados. Em relação a estes, oócitos oriundos da fase folicular degeneraram numa taxa significativamente mais baixa do que àqueles oriundos da fase lútea ou de fêmeas em anestro, exceto

em relação ao sistema C em que 4% dos oócitos do grupo ANE e 6,8% dos do grupo FOL estavam degenerados.

No protocolo A, o número de degenerados no grupo FOL foi significativamente inferior aos do grupo LUT, mas semelhante aos do ANE. No protocolo D, o grupo FOL apresentou as menores taxas de degenerados ($P < 0,02$). No protocolo B, não houve diferença entre os grupos FOL e LUT, mas o número de degenerados nestes grupos foi significativamente inferior comparado ao grupo ANE. Por outro lado, quando o protocolo C foi comparado entre os grupos, a porcentagem de oócitos degenerados foi significativamente inferior no grupo ANE.

-Avaliação da maturação citoplasmática

Após 72 horas de cultivo, os oócitos foram também avaliados quanto ao padrão de distribuição dos grânulos corticais. Somente oócitos com núcleo em VG-MII foram avaliados para maturação citoplasmática; oócitos degenerados ou não passíveis de identificação foram excluídos.

Ao se avaliar a maturação citoplasmática, observou-se uma influência positiva dos sistemas de cultivo B e C. Nestes, foram observadas as maiores taxas de maturação citoplasmática completa comparada ao protocolo A e D (Tabela 8).

A maior parte dos oócitos classificados como QVG nos sistemas B e C apresentou grânulos corticais distribuídos, tanto no citoplasma, como na periferia do oócito, caracterizando um estágio transicional de maturação (MT). Ainda, uma porcentagem significativamente maior de oócitos em MII apresentou grânulos corticais distribuídos na periferia do oócito, evidenciando a maturação citoplasmática e somente nestes meios oócitos em MI apresentaram maturação citoplasmática completa. Os dados estão evidenciados em vermelho para maturação citoplasmática completa e azul para citoplasma em transição.

Não foi encontrada diferença entre as fases do ciclo em relação à maturação citoplasmática dos oócitos de cada grupo, mesmo com o grupo ANE apresentando menos oócitos com citoplasma em transição que os demais.

Tabela 8. Relação entre a distribuição dos grânulos corticais (GC) e configuração de cromatina de COCs grau I avaliados após 72 horas de maturação *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2010.

Sistema de cultivo	Nº de oócitos avaliados por grupo	Nº e (%) de oócitos com diferentes padrões* de distribuição dos GC									
		MCI					MT				
		VG	QVG	MI	MII	TOTAL	VG	QVG	MI	MII	TOTAL
A	FOL (73)	12 (16,4)	29 (39,7)	11 (15,2)	2 (2,7)	54 (74)	3 (4,1)	10 (13,6)	3 (4,1)	2 (2,7)	18 (24,5)
	LUT	7 (9,6)	25 (33,3)	4 (5,3)	1 (1,3)	37 (49,8)	2 (2,6)	5 (6,6)	7 (9,2)	0 (0)	14 (18,4)
	ANE	14 (18,9)	36 (47,4)	11 (14,5)	0 (0)	61 (81,2)	4 (5,3)	4 (5,3)	1 (1,3)	2 (2,6)	11 (14,5)
	(73)	(19,1)	(49,3)	(15,1)	(0)	(83,5)	(5,5)	(5,5)	(1,4)	(2,6)	(15)
B	FOL (91)	3 (3,3)	17 (18,7)	4 (4,4)	0 (0)	24 (26,4)	2 (2,2)	23 (25,3)	18 (19,7)	3 (3,3)	46 (50,5)
	LUT	5 (6,2)	28 (34,6)	5 (6,2)	0 (0)	38 (47)	1 (1,2)	9 (11,1)	14 (17,2)	4 (4,9)	28 (34,4)
	ANE	6 (7,7)	22 (27,7)	5 (6,2)	0 (0)	33 (41,1)	2 (2,5)	28 (35,4)	25 (31,1)	5 (6,2)	60 (74,5)
	(105)	(5,7)	(21)	(4,7)	(0)	(31,4)	(2)	(26,7)	(23,8)	(4,7)	(57,2)
C	FOL (82)	2 (2,4)	13 (15,8)	3 (3,6)	0 (0)	18 (21,8)	4 (4,9)	26 (31,7)	17 (20,7)	2 (2,4)	49 (59,8)
	LUT	2 (2,4)	7 (8,5)	5 (6,1)	0 (0)	14 (17,1)	2 (2,5)	27 (33,6)	20 (24,7)	1 (1,2)	50 (61,7)
	ANE	3 (3,7)	28 (34,6)	6 (7,3)	0 (0)	37 (45,4)	6 (7,3)	29 (35,4)	28 (34,6)	3 (3,7)	66 (80,9)
	(119)	(2,5)	(23,5)	(5)	(0)	(31,1)	(5)	(24,4)	(23,5)	(2,5)	(55,5)
D	FOL (52)	26 (50)	11 (21,2)	2 (3,8)	0 (0)	39 (75)	3 (5,7)	8 (15,5)	2 (3,8)	0 (0)	13 (25)
	LUT	20 (38,5)	7 (13,3)	0 (0)	0 (0)	27 (51,8)	2 (3,7)	3 (5,6)	2 (3,7)	0 (0)	7 (13,3)
	ANE	39 (74,5)	10 (19,2)	2 (3,8)	0 (0)	51 (97,3)	1 (1,9)	8 (15,3)	1 (1,9)	0 (0)	10 (19,2)
	(61)	(63,9)	(16,4)	(3,3)	(0)	(83,6)	(1,6)	(13,2)	(1,6)	(0)	(16,4)

*MCI: Imaturo-GC distribuídos por todo o citoplasma. MT: em transição. GC distribuídos na citoplasma e também na periferia do oócito. MCC: Maturados-GC distribuídos na periferia do oócito, próximo a membrana plasmática. Vesícula Germinal (VG); quebra de vesícula germinativa (QVG). P<0,05.

4.4. Experimento III

Neste experimento foram incluídas 6 cadelas, sendo que 2 integraram o grupo folicular, 2 o grupo luteal e 2 o grupo anestro. Um total de 121 oócitos foi avaliado neste experimento. Destes, 35 oriundos da fase folicular, 42 da lútea e 44 de fêmeas em anestro. Os resultados encontram-se nas tabelas 9-12.

Pode-se observar no grupo FOL que um percentual maior de oócitos atingiu AI-MI e MII nos meios B e C em relação aos demais. Já no grupo LUT, observou-se taxas maiores de oócitos em quebra de vesícula germinativa, independente do protocolo experimental empregado. Fenômeno semelhante foi observado no grupo ANE. Ademais, nota-se que houve um aumento no número de oócitos degenerados ou não passíveis de identificação em todos os grupos quando comparado aos resultados obtidos no experimento II. Isso pode ser atribuído a dificuldade em se avaliar o estágio de desenvolvimento meiótico quando há presença de muitas cabeças de espermatozóides. Somente em um oócito, dos incluídos neste estudo, observou-se a formação de pronúcleo masculino, no protocolo B. Não houve diferença estatística entre os meios de cultivo (A,B,C,D) ou entre as fases do ciclo estral.

Observou-se que mesmo oócitos imaturos (em estágio de vesícula germinativa) foram penetrados pelos espermatozóides, embora oócitos maduros tenham sido penetrados numa taxa maior (tabela 12). Não houve influência dos meios sobre as taxas de penetração do oócito. Da mesma forma, não houve incremento no número de oócitos que apresentaram maturação citoplasmática completa.

Tabela 9. Status de oócitos caninos provenientes da fase folicular maturados por 72 nos diferentes protocolos experimentais e co-cultivados com espermatozóides. Jaboticabal, 2010.

Sistemas de cultivo	Nº oócitos	VG	QVG	AI-MI	MII	D/NI	Pronúcleo
A	8	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	0	5 (62,5)	0
B	9	1 (11)	1 (11)	2 (22)	2 (22)	2 (22)	1 (11)
C	10	1 (10)	1 (10)	2 (20)	2 (20)	4 (40)	0
D	8	3 (37,5)	2 (25)	1 (12,5)	0	2 (25)	0

Não houve diferença entre os meios, nas variáveis avaliadas. $P < 0,05$

VG=Vesícula germinativa; QVG=Quebra de vesícula germinativa; MI=Metáfase I; MII=Metáfase II; D/NI=Degenerados ou não-passíveis de identificação. **Sistemas de cultivo:** A=Meio básico(MB) + hCG + P4 + E2, em exposição contínua;

B (Sistema seqüencial)= MB + hCG nas primeiras 48 horas e MB + P4 nas 24h adicionais;

C (Sistema seqüencial) = MB + hCG + P4 + E2 nas primeiras 48 h e MB + P4 nas 24 horas adicionais;

D=MB sem adição de hormônios.

Tabela 10. Status de oócitos caninos provenientes da fase lútea maturados por 72 nos diferentes protocolos experimentais e co-cultivados com espermatozóides. Jaboticabal, 2010.

Sistemas de cultivo	Nº oócitos	VG	QVG	AI-MI	MII	D/NI	Pronúcleo
A	11	2 (18,2)	3 (27,3)	1 (9)	1 (9)	4 (36,4)	0
B	10	1 (10)	4 (40)	2 (20)	2 (20)	1 (10)	0
C	11	0	4 (36)	2 (18,2)	2 (18,2)	3 (27,3)	0
D	10	5 (50)	1 (10)	1 (10)	0	4 (40)	0

Não houve diferença entre os meios, nas variáveis avaliadas. $P < 0,05$

VG=Vesícula germinativa; QVG=Quebra de vesícula germinativa; MI=Metáfase I; MII=Metáfase II; D/NI=Degenerados ou não-passíveis de identificação. **Sistemas de cultivo:** A=Meio básico(MB) + hCG + P4 + E2, em exposição contínua;

B (Sistema seqüencial)= MB + hCG nas primeiras 48 horas e MB + P4 nas 24h adicionais;

C (Sistema seqüencial) = MB + hCG + P4 + E2 nas primeiras 48 h e MB + P4 nas 24 horas adicionais;

D=MB sem adição de hormônios.

Tabela 11. Status de oócitos caninos provenientes da fase anestro maturados por 72 nos diferentes protocolos experimentais e co-cultivados com espermatozóides. Jaboticabal, 2010.

Sistemas de cultivo	Nº oócitos	VG	QVG	AI-MI	MII	D/NI	Pronúcleo
A	10	1 (10)	4 (40)	1 (10)	1 (10)	3 (30)	0
B	11	1 (9)	3 (27,3)	2 (18,2)	2 (18,2)	3 (27,3)	0
C	12	2 (16,7)	4 (33)	3 (25)	1 (8)	2 (16,7)	0
D	11	4 (36,4)	2 (18,2)	1 (9)	1 (9)	3 (27,3)	0

Não houve diferença entre os meios, nas variáveis avaliadas. $P < 0,05$

VG=Vesícula germinativa; QVG=Quebra de vesícula germinativa; MI=Metáfase I; MII=Metáfase II; D/NI=Degenerados ou não-passíveis de identificação. Sistemas de cultivo: A=Meio básico(MB) + hCG + P4 + E2, em exposição contínua; B (Sistema seqüencial)= MB + hCG nas primeiras 48 horas e MB + P4 nas 24h adicionais; C (Sistema seqüencial) = MB + hCG + P4 + E2 nas primeiras 48 h e MB + P4 nas 24 horas adicionais; D=MB sem adição de hormônios.

Em relação ao número de oócitos penetrados após 72 horas de cultivo nota-se que mesmo oócitos imaturos são penetrados, embora em percentuais significativamente inferiores aos maduros. Não houve diferença estatística entre os percentuais de penetração entre oócitos em MI e MII.

Tabela 12. Status meiótico dos oócitos e percentual de penetração por espermatozóides após 72 horas de cultivo *in vitro*. Jaboticabal, 2010.

Status meiótico	Número de oócitos avaliados	Número de oócitos e % de penetrados
VG	22	5 ^a (22,7)
QVG	30	7 ^a (23,3)
MI	19	7 ^{a,b} (36,8)
MII	14	9 ^b (68,3)

5. DISCUSSÃO

A fisiologia reprodutiva da cadela é distinta da maioria dos outros mamíferos. É sabido que nestes, oócitos são liberados do folículo pré-ovulatório já maduros, prontos para serem fecundados no oviduto. Nos canídeos, os oócitos são liberados sem estarem aptos para serem fecundados (ainda imaturos) e, portanto, sua maturação deve ocorrer no oviduto. Essa característica somada às outras peculiaridades referentes aos eventos endócrinos de cada fase do ciclo são fatores que tem contribuído com as limitações da técnica de maturação *in vitro* nesta espécie. Por esta razão, tem-se tentado identificar os fatores relacionados à retomada e progressão da meiose *in vivo* para que possam ser feitas adaptações no ambiente laboratorial e assim, se consiga alcançar o aperfeiçoamento das condições de cultivo.

Dentro deste contexto, a presente pesquisa buscou identificar o status meiótico e citoplasmático encontrado em oócitos não submetidos à MIV (zero hora) e colhidos de fêmeas caninas em diferentes condições reprodutivas. Foi possível observar que existe retomada da meiose em oócitos imediatamente após a colheita, independente da condição reprodutiva. Em todos os grupos, observou-se oócitos em QVG, embora esta tenha sido mais evidente naqueles oriundos da fase folicular (25/66), diferindo significativamente somente dos obtidos de fêmeas em anestro (3/40).

Esses resultados corroboram com os de RIBEIRO (2007) e BOLAMBA et. al. (2002) que também reportaram uma porcentagem superior a 18% de oócitos em QVG imediatamente após a colheita. Segundo BOLAMBA et al. (2002), essas altas taxas de QVG encontradas em oócitos imediatamente após a colheita, deve-se ao fato destes serem provenientes de folículos pré-antrais avançados. Essa afirmação explicaria, em parte, as diferenças encontradas entre nossos grupos experimentais (percentual de QVG de FOL>ANE). De forma similar, MARTINS (2005) reportou taxas de QVG de 20,71% para oócitos obtidos de fêmeas em anestro e 43,56% para as de estro, e neste grupo, também 15,34% de oócitos em MI, constatando a influência positiva da fase do estro sobre as taxas de maturação nuclear dos oócitos não submetidos ao cultivo *in vitro*. Em nosso estudo não foi observado oócitos em MI, em nenhum dos grupos avaliados.

HEWITT & ENGLAND (1998) relataram que as fêmeas em proestro e estro apresentaram, respectivamente, 8% e 7,5% de oócitos em QVG, embora as fêmeas em anestro tenham apresentado 100% de VG. Em contraposição, YAMADA et al. (1993) encontraram 100% de VG, tanto nas fêmeas em anestro, quanto naquelas submetidas à protocolo de superovulação. Nossos resultados são distintos dos apresentados pelos referidos autores uma vez que tanto oócitos de fêmeas em anestro como nos obtidos na fase lútea foi observado quebra de vesícula germinativa.

Durante o processo de maturação ocorrem modificações não somente no núcleo, mas também no citoplasma do oócito. À medida que o oócito retoma a meiose, a cromatina vai iniciando sua condensação, sendo praticamente impossível distinguir os cromossomos individualmente quando o oócito está em metáfase II. Da mesma forma, modificações nas organelas citoplasmáticas são necessárias para que o oócito torne-se maduro e esteja pronto para ser fecundado. A avaliação destes parâmetros durante a maturação *in vitro* tem permitido verificar a eficiência das condições de cultivo, principalmente em relação à maturação nuclear. A maturação citoplasmática, por sua vez, ainda é objeto de poucas investigações, sendo a avaliação dos grânulos corticais, um dos parâmetros possíveis de serem avaliados.

Em anos precedentes, avaliamos pela primeira vez a distribuição dos grânulos corticais e sua relação com a competência meiótica de oócitos cultivados em quatro períodos distintos: 24, 48, 72 e 96 horas (APPARICIO-FERREIRA, 2006). Na ocasião, observamos haver uma relação entre o tempo de cultivo, a distribuição dos grânulos corticais e o status meiótico do oócito. À medida que transcorria o período de cultivo, um maior número de oócitos apresentava grânulos corticais distribuídos na periferia e no citoplasma, os quais caracterizamos como em estágio transicional de maturação. No entanto, as observações acerca do padrão de distribuição dos GC partiam das 24 horas (período que iniciava nosso cultivo) e, portanto, era difícil saber se a distribuição observada era efeito do cultivo ou de fatores inerentes ao oócito. Por esta razão é que se buscou avaliar neste estudo o estágio de maturação citoplasmática nos oócitos não submetidos à MIV.

Nossos resultados evidenciaram que oócitos em estágio de vesícula germinativa oriundos da fase folicular e lútea apresentaram grânulos corticais

distribuídos no padrão que classificamos como transicional (MT), enquanto que os obtidos de fêmeas em anestro só apresentaram GC no padrão de distribuição que classificamos como maturação citoplasmática incompleta (MCI). Nenhum dos oócitos avaliados à zero hora apresentou maturação citoplasmática completa, a qual, como será discutida posteriormente, só foi observada nos oócitos em MI e MII.

Esta é primeira vez que a distribuição dos grânulos corticais e sua relação com o status meiótico de oócitos não submetidos à MIV foi avaliada. Estudo utilizando metodologia semelhante a nossa para avaliação dos grânulos corticais de oócitos antes do processo de maturação já havia sido publicado por DE LOS REYES et. al. (2007), no entanto, os autores empregaram a técnica para verificar a viabilidade dos oócitos a serem cultivados. Como mencionado por esses autores, a sonda fluorescente pode ser um indicador sensível da integridade oocitária por conta do diacetato de fluoresceína. Este, é incorporado para dentro do oócito e no citoplasma é convertido por esterases não-específicas à fluoresceína, a qual fica retida e cora as células vivas (BARROS et. al., 1982). Assim, a fluorescência exibida pelos oócitos é dependente de esterases citoplasmáticas para que possa haver a conversão.

Por esse prisma, todos os oócitos utilizados no nosso estudo estavam aptos para maturar uma vez que apresentavam uma intensa fluorescência. No entanto, embora DE LOS REYES (2007) cite a intensidade da coloração como um indicativo de viabilidade e, neste caso, oócitos opacos em fluorescência seriam inviáveis, nós não compartilhamos desta opinião. Em nosso estudo anterior (APPARICIO-FERREIRA, 2006) observamos ser necessário a completa remoção da zona pelúcida em solução de pronase 0,5% para que ocorra penetração da quantidade adequada de lecitina. Se somente parte da zona pelúcida for removida, a lecitina não se liga corretamente à α -D-manose presente nos grânulos corticais, o que confere ao oócito um aspecto turvo, não expressando a fluorescência na intensidade desejada. Esse fator pode, porventura, conduzir a uma avaliação falsa de viabilidade do oócito.

Diversos meios de cultivo e suplementações vêm sendo utilizados com o intuito de incrementar as insatisfatórias taxas de maturação dos oócitos caninos cultivados *in vitro*. A adição de hormônios aos meios de maturação proporciona ambiente mais apropriado e semelhante às condições *in vivo*,

sendo utilizado em várias espécies. No entanto, para que a maturação de oócitos caninos progrida a níveis satisfatórios, é necessário considerar o ambiente pré- e pós-ovulatório à que os oócitos estão expostos *in vivo*: pico de LH, concentrações crescentes de progesterona e decrescentes de estradiol.

Pesquisas anteriores verificaram o efeito de variações na suplementação dos meios de cultivo ao longo do período de maturação, os denominados meios seqüenciados ou bifásicos. DE LOS REYES et. al., (2005) reportaram que oócitos cultivados por 48 horas em meio contendo hCG e nas 24 ou 48 horas subseqüentes em meio sem este hormônio apresentaram maiores porcentagens de MII (43,4%). Em concordância, HANNA et. al. (2008) observaram as maiores taxas de MI-MII (51,3%) quando oócitos foram maturados inicialmente em meio contendo bloqueador da meiose (roscovitina) e posteriormente estradiol e eCG. ALHAIDER & WATSON (2009), por sua vez, empregaram meio bifásico com concentrações decrescentes de hCG em meio contendo combinação de fatores de crescimento e relataram que as taxas de maturação foram inferiores (12%) comparadas àquelas de oócitos maturados somente em meio com fatores de crescimento (49%).

A despeito destas informações, buscou-se avaliar a utilização, ainda inédita, de meios seqüenciais com gonadotrofina (hCG) e esteróides (E2, P4) na maturação de oócitos caninos cultivados por 72 horas. De uma forma geral, oócitos cultivados nos meios seqüenciais B e C apresentaram taxas de maturação superiores aos meios A e D. Curiosamente, somente no grupo FOL, não houve diferença entre os sistemas seqüenciais B, C e meio A considerando-se as taxas de QVG e MI; diferenças significativas foram notadas em relação ao meio controle D ($A=B=C \neq D$). Este resultado não foi observado nos outros grupos considerando-se as duas variáveis em questão (QVG e MI). Uma possível explicação para este resultado seja a exposição prévia dos oócitos aos eventos hormonais *in vivo*. Os animais incluídos no grupo folicular, como mencionado anteriormente, estavam na fase de proestro ou estro, ou seja, estavam sujeitos às alterações hormonais que ocorrem neste período do ciclo. Nos outros grupos (LUT e ANE) observaram-se taxas de maturação semelhantes entre os meios A, B e C somente em oócitos classificados como QVG. Assim, como o “padrão” $A=B=C$ foi observado em todos os grupos em relação às taxas de QVG, é possível inferir que para que o oócito retome a

meiose não há necessidade de suplementos hormonais específicos, podendo ocorrer de forma espontânea, na presença de pouco estímulo hormonal. Destarte, pode-se aventar que estádios mais avançados de desenvolvimento (MI e MII) necessitam de outros fatores que sustentem esta progressão. Assim, os meios seqüenciais seriam mais propícios para o desenvolvimento meiótico dos oócitos, como pôde ser verificado pela porcentagem de oócitos que atingiu MI e MII quando cultivados nos meio B e C.

Um fator interessante de ser analisado são as taxas de maturação obtidas no protocolo A (hormônios suplementados de forma contínua). Os hormônios empregados neste meio são exatamente os mesmos de nosso estudo anterior (APPARICIO-FERREIRA, 2006), porém as taxas de maturação foram inferiores (máximo 5,8% MII) às obtidas previamente (10% MII). Esta diferença pode ter ocorrido pela mudança na concentração do hormônio hCG (de 25 UI/mL para 10UI/mL). A opção pela mudança na concentração deste hormônio deveu-se aos resultados positivos obtido por DE LOS REYES et. al. (2005) utilizando a concentração empregada neste estudo. Por outro lado, vale ressaltar, que o número total de oócitos avaliados neste estudo em fase de MII foi muito superior ao anterior, fator que também pode ter sido responsável por esta distinção.

Diferentes concentrações hormonais já foram utilizadas nos cultivos *in vitro*, com resultados discrepantes. KIM et. al., (2005) avaliaram o efeito da adição de P4 e E2 ao meio de cultivo na concentração de 2µg/mL e verificaram efeito positivo desta suplementação (16,6% a MII) quando comparada aos meios que continham somente um destes hormônios. VANNUCCHI et. al.(2009) suplementaram o meio de cultivo com altas doses de P4 e E2 (20µg/mL) e observaram diferenças significativas no grupo E2+P4 em relação às taxas de quebra de vesícula germinativa. No presente estudo, as concentrações de esteróides empregadas foram às mesmas de nosso outro estudo (1µg/mL, APPARICIO-FERREIRA, 2006), embora a suplementação dos hormônios tenha sido feita distintamente nos meios B e C, de forma a mimetizar o ambiente *in vivo*. As taxas de maturação (MI-MII) obtidas nos meios seqüenciados foram consistentes com as reportadas na literatura, embora estejam aquém do esperado.

Em relação à distribuição dos grânulos corticais e sua relação com a

maturação nuclear também se verificou efeito positivo dos meios seqüenciais B e C. Embora a maior parte dos oócitos em QVG e MI tenha apresentado grânulos corticais distribuídos tanto no citoplasma como na periferia do oócito (MT), alguns em MI apresentaram grânulos corticais distribuídos na periferia do oócito, caracterizando a maturação citoplasmática completa; padrão de distribuição observado somente nos oócitos maturados em meios seqüenciais. Esta é a primeira vez que observamos oócitos em MI com este tipo de distribuição. Na pesquisa anterior (APPARICIO-FERREIRA, 2006), somente oócitos em MII apresentaram maturação citoplasmática completa. Embora o número de MII avaliado em 2006 tenha sido ínfimo perto do de agora, acreditamos que este resultado ratifique o efeito benéfico dos sistemas seqüenciados empregados neste estudo. Destarte, estudos futuros empregando a microscopia confocal (que é uma técnica mais acurada para a visualização dos grânulos corticais no citoplasma escuro dos oócitos caninos) contribuiriam para que a distribuição dos grânulos corticais fosse minuciosamente avaliada.

Dentro deste contexto, fica evidente que qualquer alteração realizada nos meios de cultivo em relação à suplementação e suas concentrações, pode ser benéfica ou deletéria ao desenvolvimento meiótico do oócito. Portanto, é patente a necessidade de se estudar diferentes concentrações e associações de hormônios, assim como variações no tempo de exposição do oócito à estes. Ademais, nossos resultados ratificam a necessidade de se considerar a maturação nuclear e a citoplasmática para se avaliar a eficiência dos meios de cultivo.

A influência da fase do ciclo estral de cadelas nas taxas de maturação ainda é uma questão muito controversa e tem sido alvo de alguns estudos. YAMADA et al. (1993) relataram que oócitos obtidos de fêmeas estimuladas por gonadotrofinas exógenas atingiram MII em maior proporção que àqueles obtidos de cadelas em anestro. LUVONI et al. (2001), por sua vez, referiram que oócitos recuperados de fêmeas em proestro apresentaram taxas de maturação superiores às de oócitos de fêmeas em anestro. De forma distinta, HEWITT & ENGLAND (1997) e RODRIGUES & RODRIGUES (2003a) evidenciaram que o ambiente hormonal *in vivo* não afetava a subsequente maturação *in vitro*.

No presente estudo, nós esperávamos que a condição reprodutiva influenciasse as taxas de maturação e que os oócitos se comportassem diferentemente em relação aos quatro meios de cultivo. No entanto, as taxas de maturação foram muito similares entre os grupos, não havendo diferença significativa. Resultado semelhante foi por nós obtido anteriormente (APPARICIO-FERREIRA, 2006). No entanto, neste estudo, diferenças significativas foram verificadas somente em relação às porcentagens de oócitos degenerados: oócitos oriundos da fase folicular degeneraram numa taxa muito mais baixa do que àqueles do grupo LUT ou ANE. Assim, nossos dados evidenciam que a condição reprodutiva da fêmea doadora não é o fator principal do potencial meiótico do oócito e pode estar mais associado à distribuição do tamanho dos folículos, como sugerido por SONGSASEN et. al. (2005). Estes autores demonstraram que 80% dos oócitos provenientes de folículos com diâmetro superior a 2 mm completam a meiose *in vitro* comparado com 16-38% dos oriundos de folículos menores (0,5 a < 2mm). Ainda, ovários de cadelas em estro contêm mais folículos grandes, embora também possua folículos menores. Contudo, quando os autores compararam os dados baseado na condição reprodutiva da fêmea doadora, nenhuma diferença entre as taxas de maturação foi notada entre os grupos. Este fato poderia explicar, parcialmente, porque não encontramos diferença nas taxas de maturação entre os grupos já que os oócitos foram recuperados pelo método do fatiamento, onde, segundo LUVONI et. al. (2005), é quase inevitável não obter uma população heterogênea, mesmo após criteriosa seleção.

Por fim, partindo da hipótese de que a presença dos espermatozóides poderia ser um dos fatores desencadeadores da retomada da meiose, nós realizamos o co-cultivo com espermatozóides nas 24 horas finais do período de maturação. Observou-se que a presença dos espermatozóides não incrementou as taxas de maturação, mas aumentou o número de oócitos degenerados. Acreditamos que essa elevação no número de oócitos degenerados seja decorrente de dois fatores. Primeiro, neste estudo nós agrupamos oócitos degenerados e aqueles cujas características nucleares não eram evidentes. Segundo, a dificuldade de se identificar a cromatina quando há presença de muitas cabeças de espermatozóides no citoplasma, em região

próxima ao núcleo. Esses fatores somados podem ter contribuído para estas taxas altas.

Outro evento observado foi a penetração de um grande número de oócitos, independente do estágio de maturação nuclear. Verificou-se que 22,7% dos oócitos em VG e 23,3% dos oócitos em QVG foram penetrados. De forma similar, mas significativamente superiores, 36,8% dos oócitos em MI e 68,3% em MII também foram penetrados. Embora a taxa de penetração em MII tenha sido relativamente alta, somente em um oócito foi possível ver a formação de pronúcleo masculino. Essas altas taxas de penetração nos levam a crer que o período de co-cultivo empregado neste estudo foi válido por permitir que o espermatozóide atravessasse a zona pelúcida, porém pode não ter sido suficiente para permitir o início do desenvolvimento embrionário, embora alguns autores tenham referido um percentual considerável de formação de pronúcleo masculino 12 horas após a FIV (YAMADA et. al., 1992). De qualquer forma, os resultados do presente estudo são consistentes com os da literatura (MAHI & YANAGIMACHI, 1976; TSUTSUI et. al., 1975; YAMADA et. al., 1992; DE LOS REYES et. al., 2009), mas ainda insuficientes para esboçar uma conclusão acerca da influência ou não do co-cultivo com espermatozoides.

Como pode ser observado, a maturação *in vitro* dos oócitos caninos é um processo que ainda precisa de ajustes, principalmente por representar o primeiro passo para o desenvolvimento de outras biotécnicas relacionadas ao desenvolvimento embrionário e celular. O aperfeiçoamento deste procedimento permitirá aos cientistas esclarecer pontos ainda desconhecidos da fisiologia reprodutiva nesta espécie, dentre os quais, os fatores que engatilham a retomada da meiose, o microambiente do oviduto e a interdependência ou não da maturação citoplasmática e nuclear.

6. CONCLUSÃO

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

1. A utilização de sistemas seqüenciais utilizando hCG, progesterona e estradiol foi benéfica para a competência meiótica e distribuição dos grânulos corticais;
2. A presença de espermatozóides não foi um fator positivo para a competência meiótica dos oócitos maturados nos diferentes sistemas de cultivo;
3. Verificou-se que existe retomada da meiose e distribuição de grânulos corticais em oócitos imediatamente após a colheita, independente da condição reprodutiva;
4. Verificou-se haver um assincronismo entre a distribuição dos grânulos corticais e o grau de condensação cromossômica após 72 horas de cultivo, independente da condição reprodutiva;
5. A fase do ciclo estral não exerceu influência nas taxas de maturação nuclear e citoplasmática, embora oócitos provenientes da fase folicular tenham degenerado em taxas significativamente inferiores.

REFERENCIAS

ANDERSEN, A.C. Reproductive System. B/Female In: Andersen, AC, Good, LS. (ed): **The Beagle as an experimental dog**. Iowa: Iowa State University Press, 1970. p. 321-326.

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, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos de cadelas (*canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2006.

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

BAKER, T.G. *Germes cells and fertilization*. 2 ed. In: **Reproduction in mammals**. Cambridge, England, Cambridge University Press, p 17-45, 1982.

BARROS, C.; QUINN, P.; WHITTINGHAM, D. Relationship between sperm-oocytes fusion and fluorescein diacetate staining of hamster oocytes recovered from dead females. **Archivos biologia y medicina experimental**, v. 15, p. 49-52, 1982.

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., RUSS, K.D., OLSON, M.A.; SANDLER, J.L.; DURRANT, B.S. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**, v.581, p. 1689-1703, 2002.

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

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, n.1, 147-158, 1982.

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.

CONCANNON, P.W., HANSEL, W., VISEK, W.J., The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 13, p.112-121, 1975.

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

DAMIANI, P.; FISSORE, R.A.; CILELLI, J.B.; LONG, C.R.; BALISE, J.J.; ROBL, J.M.; DUBY, R.T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 521-34, 1996.

DE LOS REYES, 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. 1-11, 2005.

DE LOS REYES, M.; PALOMINOS, J.; LANGE, J.; ANGUITA, C.; BARROS, C. In vitro sperm penetration through the zona pellucid of immature and in vitro matured oocytes using fresh, chilled and frozen canine semen. **Theriogenology**, v. 110, p.37-45, 2009.

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

DULCIBELA, T.; DUFFY, P.; REINDOLLAR, R.; SU, B. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin stimulated meiotic maturation and aging *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 870-876, 1990.

DULCIBELLA, T. Biochemical and cellular insights into the temporal window of normal fertilization. **Theriogenology**, v. 49, p. 53-65, 1998.

DURINZI, K.L., SANIGA, E.M., LANZENDORF, S.E. The relationship between size and maturation *in vitro* in the unstimulated human oocyte. **Fertility and Sterility**, v. 63, p. 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.

FARSTAD, W.; MONDAIN-MONVAL, M.; HYTTEL, P.; SMITH, A.J.; MARKENG, D. Periovarian 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, p.375-387, 2000a.

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

FELDMAN, E.; NELSON, R. Ovarian Cycle and Vaginal Citology. In: **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 3rd edition, p. 752-776, 2004. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

FISCHER, B.; BAVISTER, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal Reproduction Fertility**. V.99, p. 673-679, 1993.

FULTON, R. et al. Assisted reproductive techniques for the treatment of canine infertility. **Society for theriogenology Newsletter**, v. 21, p. 2-7, 1998.

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.

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

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

HANNA, C.; MENGES, S.; KRAEMER, D.; LONG, C.R. Synchronisation of canine germinal vesicle stage oocytes prior to in vitro maturation alters the kinetics of nuclear progression during subsequent resumption of meiosis. **Reproduction, Fertility and Development**. v.20, p. 606-614, 2008.

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

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

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

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

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

HISHINUMA, M.; MINAMI, S.; OKAMOTO, Y.; MIYATAKE, K.; SEKINE, J. Recovery, morphological quality, and *in vitro* maturation of follicular oocytes from bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 62, p.1652-1662, 2004.

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

HOSSEIN, M.S.; KIM, M.K.; JANG, G.; FIBRIANTO, H.Y.; OH, H.J.; KIM, H.J.; KANG, S.K.; LEE, B.C. Influence of season and parity on the recovery of *in vivo* canine oocytes by flushing fallopian tubes. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 330-341, 2007.

IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of reproduction and fertility**, v.50, n.1, p. 119-121, 1977.

IWAMATSU, T.; YANAGIMACHI, R. Maturation *in vitro* of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamsters. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.45, p. 83-90, 1975.

IZADYAR, F. et al. *In vitro* maturation of bovine oocyte in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 371-377, 1996.

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

JOHNSTON, D.S.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. **Canine and Feline Theriogenology**, Ed. Saunders, 1st edn, Philadelphia, Pensilvania. 2001, p. 337-355.

KIM, M.K.; FIBIRANTO, Y.H.; JU OH, H., JANG, G., KIM, H.J.; LEE, K.S.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different of the estrus cycle. **Journal of Veterinary Science**, v.5, p. 253-258, 2004.

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

KIM, M.K.; HOSSEIM, M.S.; JU, OH H; FIBRIANTO, H.Y.; JANG, G.; KIM, H.J.; HONG, S.G.; PARK, J.E.; KANG, S.K; LEE, B.C. Glutathione content of *in vivo* and *in vitro* matured canine oocytes collected from different reproductive stages. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.69, p. 627-632, 2007.

KUBELKA, M. et al. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. **Gamete Research**, v. 19, p. 423-431, 1998.

LIEBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H.; NORTHEY, D.L.; FIRST, N.L. Development potential of bovine oocytes mature *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 376-383, 1987.

LONERGAN P.; MONAGHAN, P.; RIZOZ, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, D. Effects of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilisation and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37. p. 48-53, 1994.

LOPES, G.; SOUSA, M.; LUVONI, G.C.; ROCHA, A. Recovery rate, morphological quality and nuclear maturity of canine cumulus-oocyte collected from anestrus or diestrus bitches of different ages. **Theriogenology**, v. 68, p. 821-825, 2007.

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

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

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

MARTHE, M. A humanização dos bichos de estimação. Disponível em < <http://veja.abril.com.br/220709/nossa-familia-animal-p-084.shtml>> Acessado em: janeiro 2010.

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

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

MOTLIK, J. Cytoplasmatic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 25, p. 3817-3825, 1989.

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

OTOI, T.; Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reprod Fertil Dev**, v. 11, p. 387-390, 1999.

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

OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI, M.; KURNIANI KARJA, M.W.; SUZUKI, T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. **Reproduction 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.

PIRES, E.A. **Efeito da suplementação de cisteína e cisteamina sobre maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia durante a fase pré-ovulatória do estro.** 53f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2006.

RENTON, J.P. et al. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, n. 1, p. 221-231, 1991.

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

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.** 129 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2007.

ROBERTSON, J.B.; SRSEN, V.; KING, W.A. Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured *in vitro*. **Proc 12th Int. Congress of Animal Reproduction**, London, v. 4, p. 1808-1910, 1992.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Endocrinologia reprodutiva na cadela. **Clínica Veterinária**, ano VII, n.40, p. 50-58, 2002.

RODRIGUES, B.A. **Maturação e fecundação *in vitro* de ovócitos de caninos domésticos (*canis familiares*).** 119 f. Tese (Doutorado em Reprodução

Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

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, p. 58-62, 2003b.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Effect of two temperatures on *in vitro* nuclear maturation of bitch oocytes: relation to time culture intervals. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n. 1-2, p. 37-39, 2004.

ROTA, A.; CABIANCA, G. *In vitro* maturation rate of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 44, n. 2, p. 105-109, 2004.

SENGER, P.L. Reproductive cyclicity. In: SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Pullman: Current conceptions Inc. 2003, p.151.

SILVA, A.E.F.; RODRIGUEZ, P.; CAVALCANTE, L.F.; RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. The influence of oxygen tension on cumulus cells viability of canine COCs matured in high-glucose medium. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 44 (suppl 2), p.259-262, 2009.

SILVA, A.E.F. **Maturação *in vitro* de oócitos de caninos domésticos (*canis familiaris*)**. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

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.

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

SOUZA, L.C.; JÚNIOR, O.A.P.; MENDONÇA, A.O.; BALLARIS, A.L. Associação homem-animal: reflexos na economia. **Revista de Educação continuada**, v. 4, n.1, p. 62-65, 2001.

SRSEN, V.; KALOUS, J.; NAGYOVA, E.; SUTOVSKY, P.; KING, W.A.; MOTLIK, J. Effects of follicle stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Urocyon lagopus*) oocytes *in vitro*. **Zygote**, v.6, p. 299-309, 1998.

STROM HOLST, B.; LARSSON, B.; RODRIGUES-MARTINEZ, H.; LAGERSTEDT, A.S.; LINDE-FORSBERG, C. Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, p. 587-92, 2001.

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

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

TSUTSUI, T.; AHIMS, K.; NIAHI, M.; KUVO, N.; MURAO, I.; SHIMIZU, T.; OGASA, A., An experimental trial on embryo transfer in the dog. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.51, p. 797-800, 1989.

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

VANNUCCHI, C.I.; OLIVEIRA, C.M.; MARQUES, M.G.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A. In vitro canine oocyte maturation in homologous oviductal cell co-culture with hormone-supplemented media. **Theriogenology**, v. 66, p.1677-1681, 2006.

VANNUCHI, C.I.; FAUSTINO, M.; MARQUES, M.G.; NICHI, M.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.D.; VISINTIN, J.A. Effects of gonadotrophin exposed medium with high concentrations of progesterone and estradiol 17 β on *in vitro* maturation of canine oocytes. **In vitro cell Dev Biol Anim**, v.45, p.328-333, 2009.

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

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

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: **The Physiology of Reproduction**. 2 ed. Edited by E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press, Ltd, New York, 1994, p. 79-122.

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

YABIKU, R.M. Animais de estimação: lucros estimados. Disponível em <<http://www.bichoonline.com.br>> Acessado em: set 2009.

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

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

APÊNDICES

APÊNDICE 1- Método de Harris-Shorr para coloração de esfregaços vaginais. Jaboticabal-SP, 2010.

Ordem de passagem	Reagente	Tempo
1	Solução álcool/éter 1:2	5 minutos
2	Álcool 70%	Mergulhar 10 X
3	Álcool 50%	Mergulhar 10 X
4	Água destilada	Mergulhar 10 X
5	Hematoxilina de Harris	2 minutos
6	Água destilada	Mergulhar 2 X
7	Água amoniacal	1 minuto
8	Água destilada	Mergulhar 1 X
9	Álcool 70%	Passagem
10	Álcool 95%	Passagem
11	Corante Shorr	2 minutos
12	Álcool 95%	Passagem
13	Álcool absoluto ou etanol	Passagem

APÊNDICE 2- Composição do meio básico (MB) utilizado para MIV de oócitos caninos. Jaboticabal-SP, 2010.

Meio básico para MIV	10 mL
TCM 199 com bicarbonato	9 mL
SFB	1 mL
Piruvato sódico (100mM)	20 µL
Solução antibiótica (10.000 UI/mL penicilina + 10 mg/mL estreptomicina)	50 µL

APÊNDICE 3- Concentração dos hormônios utilizados nos meios de MIV de oócitos caninos. Jaboticabal-SP, 2010.

Concentração dos hormônios	10 mL
hCG	10 UI/mL
P4	1µg/mL
E2	1µg/mL

APÊNDICE 4- Composição do meio HF-10 suplementado para capacitação espermática. Jaboticabal-SP, 2010.

Constituintes	1 mL
HF-10 (N-6013, Sigma)	938 µl
Glutamina (G-7513, Sigma)	10 µL
SFB	50 µL
Solução antibiótica (10.000 UI/mL penicilina +10 mg/mL estreptomicina)	2 µL

APÊNDICE 5 – Composição da solução de hialuronidase 0,2%. Jaboticabal-SP, 2010.

Solução hialuronidase 0,2%	10 mL
PBS Ca ⁺⁺ free	10 mL
Álcool polivinílico (0,1%)	0,01 g
Hialuronidase	0,02 g

APÊNDICE 6 – Composição da solução de Pronase 0,5%. Jaboticabal-SP, 2010.

Solução pronase 0,5%	10 mL
PBS Ca ⁺⁺ free	10 mL
PVA	0,01 g
Pronase	0,05 g

APÊNDICE 7 – Composição da solução de formaldeído 3%. Jaboticabal-SP, 2010.

Solução formaldeído 3%	10 mL
PBS	9700 µL
Formaldeído	300 µL

APÊNDICE 8 – Composição da solução de bloqueio (SB; 4°C). Jaboticabal-SP, 2010.

Solução de bloqueio	100 mL
PBS	100 mL
BSA (1mg/mL)	0,1 g
Glicina (100mM)	0,7507 g
Azida de sódio (0,2%)	0,2 g

APÊNDICE 9 – Composição da solução de *Lens culinaris* (Lecitina). Jaboticabal-SP, 2010.

Solução de <i>Lens culinaris</i>	10 mL
PBS ou água milli-Q	10 mL
Lecitina	0,01 g