CAMILA INFANTOSI VANNUCCHI

Estudo da maturação nuclear *in vitro* de oócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira

São Paulo

2003

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1306 Vannucchi, Camila Infantsi
FMVZ Estudo da maturação nuclear *in vitro* de oócitos de cães em
meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células
homólogas da tuba uterina / Camila Infantsi Vannucchi. -- São
Paulo : C.I. Vannucchi, 2003.
77 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução
Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira.

1. Oócitos. 2. Estrógeno. 3. Progesterona. 4. Tuba uterina.
5. Cães. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VANNUCCHI, Camila Infantsi

Título: Estudo da maturação nuclear *in vitro* de oócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Este projeto de vida é dedicado
inteiramente a minha mãe, certa
da eterna partilha que há entre
nós.

Ao meu pai, por esta
imensurável alegria de tê-lo
em minha vida

HISTORINHA... (continuação)

Os poucos anos que sucederam meu último relato certamente não representam período suficiente para sólido aprendizado, mas permitiram que, como ferro em brasa, ficasse marcada em mim a opção correta do caminho futuro. Agora, além da medicina veterinária, a investigação científica é alba trajetória. Novamente, a explicação para esta clarividência está na mistura heterogênea de personagens que permeiam minha vida. A força hercúlea da minha **mãe**, a sabedoria taciturna do meu **pai**, o consciente arrojo da **Andréa**, os gestos carinhosos do **Paulo**, a amizade jovial do **Dani** e o companheirismo incondicional da **Gi** sustentam, dia após dia, o intenso amor que sinto pelo orgulho da minha vida: minha **FAMÍLIA**. A **tia Ana** e o **tio Iraci** cuidam de mim de forma tão especial que às vezes acredito "estar no lugar certo". Não há como não dizer das pessoas que, sem explicação, nos invadem e refrescam como uma suave brisa marítima: meu colosso de amigo **Celinho**, que me ensina "coisas" de veterinária, mas principalmente preciosidades das "coisas" da vida, esses raros momentos de pura alegria; minha eterna amiga **Silvia (Vá)** que me faz constantemente ter a certeza ser a amizade verdadeira para poucos; a minha direção quando estou à deriva **Mayra**, que possui a qualidade única de sentir e sofrer mutuamente e, por isso, aqui afirmo que meu amor talvez não se expresse em palavras, mas que sempre permanece muito vivo dentro de mim e a escoteira de todas as horas **Vi**, pessoa com quem se pode contar, sempre!

Durante todos esses anos de estudos na pós-graduação, tive a oportunidade de fazer grandes revelações e, para mim, a mais marcante foi em relação a minha orientadora **Clair (Clarice)**. Todo este período de união eu devo exclusivamente à liberdade com que me ouvia nos momentos de relaxamento, apreensão, nervosismo, depressão e principalmente de decisão. Demonstrou-me

como é possível ser grande sem necessariamente perder a verdadeira essência. É importante ressaltar também a participação do maior incentivador da minha carreira, **Visintin**, a quem devo minha lealdade e respeito por ser uma das pessoas mais empreendedoras que conheço, sempre dedicado à formação profissional e humana das pessoas de quem gosta. Agradeço, também, a todos os **pós-graduandos do Laboratório Biogenesis**, que me ajudam a vencer o grande desafio da minha vida: o peso!!! Não posso deixar de mencionar o auxílio da **Mariana** que se vem demonstrando uma voraz investigadora. Também, os contratempos dos experimentos revelaram uma agradável união com uma promissora acadêmica, **Claudia (Britz)**, e minha mais nova amiga, **Karina (Loira)**. Quero, ainda, reforçar minha gratidão aos funcionários do **Serviço de Obstetrícia e Ginecologia** do Hospital Veterinário (USP).

O **Departamento de Reprodução Animal** há 10 anos vem sendo minha passagem obrigatória diária, pois este local abrigou todos os meus anseios profissionais e presenteou-me com grandes amigos. Hoje, mais sóbria, afirmo ser o VRA, para mim, um templo de devoção, portanto agradeço a todos os **funcionários e professores** que dividem as angústias e alegrias de se fazer pesquisa no Brasil.

Uma vez, um guru me disse para em tudo imprimir, com minhas próprias palavras, a seguinte frase: "Um líder prevê o imprevisto". Como fui incapaz de mudá-la, principalmente em sua essência, eis a maneira de retribuir à nova luz que apareceu em meu caminho...

OBRIGADA

RESUMO

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.** [*In vitro* canine oocyte nuclear maturation in hormonal supplemented mediums and homologal oviductal cells co-culture in dogs]. 2003. XXf. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

As novas biotécnicas são ferramentas inovadoras no estudo da fisiologia da reprodução de cães, bem como na preservação do material genético de espécies ameaçadas de extinção. Tendo em vista, pois, a relevância de tais ferramentas, emprestou-se a este estudo o objetivo maior de avaliar os efeitos do 17- β estradiol, progesterona e do co-cultivo em células da tuba uterina na maturação *in vitro* de oócitos de cães. Ovários de cadelas em anestro foram fatiados em PBS com 10% SFB. Os oócitos foram selecionados e divididos em 8 grupos: grupo 1 (sem suplementação hormonal), grupo 2 (20 μ g/ml de 17- β estradiol), grupo 3 (20 μ g/ml de progesterona), grupo 4 (20 μ g/ml de 17- β estradiol e 20 μ g/ml de progesterona), grupo 5 (co-cultivo em células da tuba uterina sem suplementação hormonal), grupo 6 (co-cultivo em células da tuba uterina + 20 μ g/ml de 17- β estradiol), grupo 7 (co-cultivo em células da tuba uterina + 20 μ g/ml de progesterona) e grupo 8 (co-cultivo em células da tuba uterina + 20 μ g/ml de 17- β estradiol + 20 μ g/ml de progesterona). O cultivo das células da tuba uterina foi realizado por no mínimo 48 horas previamente à adição dos oócitos. Para a maturação, utilizou-se TCM 199 suplementado com 2,5 μ g/ml de FSH e 5 μ g/ml de LH. Decorridas 48, 72 e 96 horas em estufa a 39°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade, os oócitos foram fixados em paraformaldeído a 4% com Triton 10X e corados com Hoescht 33342 (0,5 μ g/ml) em

glicerol. O estágio de maturação nuclear (vesícula germinativa - VG, quebra da vesícula germinativa – QVG, metáfase I – MI, metáfase II – MII, degenerados ou não passíveis de determinação) foi avaliado em microscópio invertido equipado com luz ultravioleta e filtro de 365-420 de excitação/emissão. Os dados foram analisados mediante o PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica, sendo o efeito dos tratamentos verificado por meio do teste de Kruskal-Wallis, e as comparações múltiplas do teste de Wilcoxon com os tratamentos comparados dois a dois, considerando as diferenças significativas quando $p < 0,05$. Verificou-se influência positiva da suplementação hormonal no desenvolvimento oocitário *in vitro*, particularmente com referência à adição de progesterona, associada ou não ao estrógeno. Não houve influência significativa do co-cultivo de células da tuba uterina na maturação oocitária em comparação aos meios de cultivo, sem presença de células epiteliais da tuba uterina, suplementados com hormônios esteróides. Conquanto sem significância estatística, verificou-se tendência de os oócitos, obtidos de cadelas em anestro, desenvolverem-se ao estágio de metáfase II após o período de maturação de 96 horas. Demonstrou-se, portanto, ser plenamente exeqüível o estudo da maturação de oócitos de cães em sistemas de cultivo *in vitro* a partir de ovários obtidos por ovário-histerectomia, tal estudo propicia, ademais, a pesquisa de características reprodutivas fisiológicas da espécie.

Palavras-chave: Oócito. Estrógeno. Progesterona. Tuba uterina. Cães.

ABSTRACT

VANNUCCHI, C. I. ***In vitro* canine oocyte nuclear maturation in hormonal supplemented mediums and homologal oviductal cells co-culture in dogs.** [Estudo da maturação nuclear *in vitro* de oócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina]. 2003. 77f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Recent biotechniques are innovative tools for the canine reproductive physiology research, as well as for assisted reproduction of endangered species. The aim of this study was to evaluate the effects of estradiol-17 β , progesterone and the co-culture in oviductal epithelial cells on canine oocytes *in vitro* maturation. Ovaries from anestrus bitches were sliced in PBS with 10% FCS. Oocytes were selected and distributed in 8 groups: group 1 (no hormonal supplementation), group 2 (estradiol-17 β at 20 μ g/ml), group 3 (progesterone at 20 μ g/ml), group 4 (estradiol-17 β at 20 μ g/ml + progesterone at 20 μ g/ml), group 5 (co-culture in oviductal epithelial cells without hormonal supplementation), group 6 (co-culture in oviductal epithelial cells + estradiol-17 β at 20 μ g/ml), group 7 (co-culture in oviductal epithelial cells + progesterone at 20 μ g/ml) and group 8 (co-culture in oviductal epithelial cells + estradiol-17 β at 20 μ g/ml + progesterone at 20 μ g/ml). Oviductal epithelial cells culture was performed at least 48 hours prior to oocyte co-culture. For *in vitro* maturation, TCM 199 supplemented with FSH (2.5 μ g/ml) and LH (5 μ g/ml) was utilized. After periods of 48, 72 and 96 hours at 39°C in highly humidified atmosphere of 5% CO₂ in air, oocytes were fixed with Triton-X10 in paraformaldehyde at 4% and stained with Hoescht 33342 (10 μ g/ml) in glycerol. Oocytes were examined through an inverted fluorescence microscope equipped with a 365-420 nm wavelength

excitation/emission filter. Nuclear maturation was classified according to chromatin configuration in: germinal vesicle stage (GV), germinal vesicle break down (GVBD), metaphase I (MI), metaphase II (MII) and degenerated and unidentifiable oocytes. Data was evaluated through PROC NPAR1WAY of non parametrical variance analysis and treatment was verified by the Kruskal-Wallis test and the Wilcoxon test for multiple comparisons. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Positive influence of hormonal supplementation for oocyte development rates was verified, particularly with respect to progesterone. No significant influence of oviductal cells co-culture was however verified. In addition, a tendency of oocytes reaching metaphase II in the 96 hour period was observed. Therefore, the study of canine *in vitro* oocyte maturation is feasible and provides an important tool for reproductive physiology research.

Key words: Oocyte. Estradiol-17 β . Progesterone. Oviductal epithelial cells. Dogs.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Fêmas doadoras	19
2.2	Colheita de gametas	22
2.3	Classificação dos oócitos	23
2.4	Meios de lavagem	25
2.5	Meios de maturação oocitária	27
2.6	Período de cultivo <i>in vitro</i> em meio de maturação	32
2.7	Métodos de avaliação da maturação oocitária	33
2.8	Cultivo <i>in vitro</i> de células da tuba uterina e emprego nos processos de MIV, FIV e CIV	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Animais	40
3.2	Cultivo de células da tuba uterina	40
3.3	Colheita de oócitos	41
3.4	Delineamento experimental	42
3.5	Avaliação do estágio de maturação dos oócitos	44
3.6	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	47
4.1	Vesícula germinativa (VG)	47
4.2	Quebra da vesícula germinativa (QVG)	49
4.3	Metáfase I (MI)	51
4.4	Metáfase II (MII)	52
4.5	(Outros) Degenerados ou não passíveis de determinação	54

5	DISCUSSÃO.....	56
6	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	ANEXOS	77

As biotécnicas da reprodução possuem atualmente importância primordial no manejo reprodutivo assistido, pois são ferramentas inovadoras no controle de mecanismos fisiológicos, além de auxiliar o estudo da reprodução em diferentes espécies animais. As pesquisas *in vitro* propiciam importante esclarecimento dos processos fisiológicos que ocorrem *in vivo*. Além do interesse científico, a biotécnica da reprodução serve à terapêutica alternativa para o tratamento da infertilidade, principalmente na medicina humana. Do ponto de vista zootécnico, permite ainda a manutenção de características fenotípicas desejáveis, possibilitando o intercâmbio internacional de material genético.

O estudo do processo de fecundação em cadelas não tem por objetivo o ganho econômico imediato; não obstante, verificam-se expressivos esforços da comunidade científica visando ao desenvolvimento de técnicas de controle populacional com base no conhecimento de eventos fisiológicos. Neste último sentido, o estudo da fecundação representa indiscutível interesse econômico.

As vantagens das biotécnicas em sistemas *in vitro* podem ser sumariadas mediante a consideração dos seguintes tópicos: a) estudos detalhados dos mecanismos reprodutivos das espécies; b) avaliação da funcionalidade espermática, com vistas a se alcançar uma análise mais acurada da potencialidade reprodutiva; c) criopreservação de gametas para preservar a genética dos melhores indivíduos; d) conhecimento dos processos de fecundação para a utilização de métodos imunológicos contraceptivos.

A área de reprodução em cães carece de linhas de pesquisa nas quais o escopo principal seja entender e estabelecer referências para a fisiologia da espécie. Apesar de haver necessidade de desenvolver e aplicar técnicas de reprodução assistida, a limitação dos conhecimentos sobre os processos reprodutivos é patente.

Com respeito às demais espécies domésticas, a cadela apresenta fisiologia reprodutiva peculiar. A maturação oocitária, por exemplo, difere da observada em outras espécies, pois o desenvolvimento citoplasmático ocorre no folículo pré-ovulatório e, o nuclear, na tuba uterina (GUÉRIN, 1998). Na maioria das espécies o oócito em estágio de vesícula germinativa (prófase I) sofre meiose nas etapas finais da maturação folicular e é eliminado em estágio de metáfase II (já com o primeiro corpúsculo polar expulso). A segunda divisão meiótica completa-se durante a penetração do espermatozóide. Quanto à cadela, os oócitos são liberados ainda em estágio de vesícula germinativa e, na tuba uterina, há expulsão do primeiro corpúsculo polar (metáfase II). Os níveis hormonais são diferenciados, pois ocorre luteinização pré-ovulatória, ou seja, a maturação oocitária dá-se em concentrações crescentes de progesterona (CONCANNON; McCANN; TEMPLE, 1989; GUÉRIN, 1998).

As características bioquímicas dos oócitos de cadelas são distintas das observadas em outras espécies; tais diferenças determinam adaptações nas condições de cultivo *in vitro*. Os oócitos são bastante ricos em lipídeos, disto resulta uma coloração escurecida quando visualizados ao estereomicroscópio; tal fato prejudica a distinção da idade e do estágio da maturação oocitária. Alguns fatores são cruciais para o êxito da maturação *in vitro*: qualidade dos oócitos; meio de maturação adequado (tipo e concentração dos hormônios suplementados); células do cumulus (relação entre a camada de células da granulosa e o oócito) e suplementação de proteínas ou de soro (suplementação com albumina sérica bovina - BSA, fluido sintético de oviduto - SOF, monocamada de células da tuba uterina, soro fetal bovino - SFB - ou de fêmeas em estro) (FARSTAD, 2000a).

Atualmente, sabe-se que a taxa ou porcentagem de degeneração dos oócitos caninos é muito elevada, pois o processo de maturação *in vitro* é delicado e apenas os oócitos pré-ovulatórios são mais facilmente maturados. Para os canídeos, a maturação *in vitro* apresenta sucesso limitado com taxas de maturação até metáfase II de apenas 20% (FARSTAD, 2000b), tal fato comprova que os sistemas de cultivo *in vitro* são modelos inadequados em relação ao ambiente fisiológico, necessitando modificações (HEWITT; ENGLAND, 1999b). Tanto a maturação como a fecundação *in vitro* são relativamente mais efetivas para o gato doméstico e diversas espécies de felinos silvestres do que para os canídeos; aqueles primeiros, contrariamente aos canídeos, já contam com condições de cultivo padronizadas (GOODROWE et al., 2000). De fato, até a atualidade, há reportada uma única gestação obtida por transferência de oócitos fecundados *in vitro* na espécie canina (ENGLAND; VERSTEGEN; HEWITT, 2001)

As biotécnicas reprodutivas tais como a maturação oocitária *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o desenvolvimento embrionário, combinadas com métodos de criopreservação e transferência de embriões aumentam as chances de preservação de material genético (BOLAMBA; BORDEN-RUSS; DURRANT, 1998; OTOI et al., 2000c). Pesquisas com espécies domésticas como o cão podem servir de modelo biológico para o desenvolvimento da reprodução assistida dos canídeos (BOLAMBA; BORDEN-RUSS; DURRANT, 1998) e, desta maneira, contribuir para a conservação de espécies em extinção, especialmente quando se tratar de pequenas populações mantidas em recintos fechados (GOODROWE et al., 2000).

O conhecimento básico dos padrões e relações endócrinas, obtidos por estudos associados às biotécnicas, é crítico para se alcançar sucesso na reprodução das várias espécies. A baixa competência meiótica dos oócitos caninos cultivados *in*

vitro é o obstáculo principal na produção de embriões para futuros programas de recuperação genética de canídeos. Neste sentido, o estudo vertente pretende contribuir para o conhecimento geral dos mecanismos de controle do ciclo estral canino, utilizando-se os eventos observados *in vitro* para predizer mecanismos *in vivo*.

A identificação dos produtos de secreção da tuba uterina ainda é motivo de estudos, principalmente quanto aos elementos protéicos secretados durante o período ovulatório ou próximo dele (PACEY; FREEMAN; ENGLAND, 2000; STAROS; KILLIAN, 1998). Como se observa, as atuais pesquisas direcionam-se para o entendimento das funções destas moléculas nos processos mais precoces da reprodução; visa-se, com tal conhecimento, tanto a desenvolver métodos para aumentar a fertilidade em estudos *in vitro*, como ao estabelecimento de técnicas imun contraceptivas.

As modificações oocitárias a partir do estágio de vesícula germinativa até o de metáfase II da meiose ocorrem na tuba uterina. As células e suas secreções devem possuir importância crucial na ocorrência e desenvolvimento destes eventos. Alguns protocolos de fecundação *in vitro* para a espécie bovina acrescentam ao meio de cultivo fluido sintético de tuba uterina, que já tem sua composição identificada.

Em face do exposto, perseguem-se neste estudo os objetivos arrolados a seguir.

- 1) Estudar o desenvolvimento oocitário *in vitro* visando a determinar se tal procedimento poderá vir a ser utilizado, futuramente, como modelo experimental para a implementação de estudos de fisiologia e reprodução assistida na espécie canina;

2) Comparar, com base na utilização de distintos meios de maturação, a influência de diferentes protocolos de suplementação hormonal (estrógeno e/ou progesterona) sobre as taxas de maturação oocitária;

3) Verificar a influência do co-cultivo de células da tuba uterina na maturação oocitária;

4) Verificar qual período de maturação (intervalos de tempo de 48, 72 e 96 horas) mostra-se mais favorável para oócitos de cadelas em anestro.

O primeiro estudo realizado na área de biotécnicas da reprodução em cães foi conduzido em 1976 por Mahi e Yanagimachi, nele os autores abordam diversos questionamentos com relação à maturação oocitária, capacitação espermática e fecundação. Em tal trabalho sugeriu-se, pela primeira vez, a utilização de oócitos de cadelas como testes de penetração da zona pelúcida por espermatozóides. Na atualidade, estes parâmetros visam a identificar a fertilidade de reprodutores. Não obstante, o estudo *in vitro* dos gametas visando a analisar suas características funcionais – como o teste de penetração de oócitos de cadelas em qualquer estágio de maturação, para testar a capacidade fecundante dos espermatozóides – proporciona subsídios para o desenvolvimento de métodos de reprodução assistida (HAY et al., 1997b; HEWITT; ENGLAND, 1997a).

O oócito canino é imaturo na ovulação, portanto o momento e as modificações necessárias para sua completa maturação são de interesse e importância para o entendimento da fisiologia da reprodução em cães (RENTON et al., 1991). O oócito, em estágio de vesícula germinativa, completa a primeira divisão meiótica no período que se estende de 48 a 72 horas após a ovulação e permanece apto à fecundação por, aproximadamente, 108 horas (YAMADA et al., 1992). Em conclusão, os oócitos no estágio de vesícula germinativa, após a ovulação, requerem de 2 a 5 dias para completar a maturação (OTOI et al., 2000c). Embora em menor escala, Hewitt e England (1998b) evidenciaram taxa de maturação nuclear em 7% dos oócitos ainda no interior dos folículos. De acordo com Nickson et al. (1993), os mecanismos envolvidos e o tempo exato dos eventos da maturação oocitária *in vitro* ainda não foram determinados.

Durante o processo de maturação oocitária na tuba uterina, os oócitos estão expostos a concentrações crescentes de progesterona (CONCANNON; McCANN;

TEMPLE, 1989; HEWITT; ENGLAND, 1997b). A luteinização folicular pré-ovulatória nas cadelas resulta, inclusive, em ação progestacional antes da ovulação.

A habilidade do oócito para iniciar a meiose em condições artificiais é definida como competência meiótica, e depende do grau de crescimento atingido pelo oócito antes de ser liberado pelo folículo (HEWITT; ENGLAND, 1998a). A competência meiótica é atingida mediante um processo que envolve duas fases caracterizadas, respectivamente por: a) habilidade de iniciar a meiose e ultrapassar o processo de quebra da vesícula germinativa; b) habilidade para completar a maturação até metáfase II.

A aquisição da competência meiótica do oócito, como indício do crescimento, é fundamental na maturação *in vitro*.

2.1 Fêmeas doadoras

Os ovários para a obtenção de oócitos para maturação *in vitro* podem ser provenientes de animais vivos por ovariectomia, punção folicular, ou colheita *post-mortem* (GUÉRIN, 1998).

De acordo com Nickson et al. (1993), os ovários de fêmeas pré-púberes possuem número reduzido de oócitos de pequenos tamanhos e com camada incompleta de células do cumulus oophorus. Comparando-se a taxa de maturação oocitária até metáfase I, anáfase I e metáfase II de grupos de ovários provenientes de cadelas jovens (1-6 anos) e idosas (7 anos em diante), constatou-se que oócitos de cadelas jovens apresentam maior taxa de maturação, embora não tenham sido

observados efeitos da idade dos animais sobre a proporção de oócitos que alcançaram o estágio de quebra da vesícula germinativa (HEWITT; ENGLAND, 1998a). Os oócitos de cadelas idosas têm a capacidade de maturar *in vitro*, mas esta habilidade é comprometida quando comparada à de fêmeas jovens. Fêmeas com idade inferior a 6 meses apresentam menor porcentagem de folículos pré-antrais e antrais e, ainda, alta taxa de degenerados, indicando atresia acelerada durante os primeiros meses de vida (DURRANT et al., 1998). Cadelas doadoras de meia idade proporcionam maior número de folículos do que fêmeas jovens (DURRANT et al., 1998). Em contrapartida, Hay et al. (1997b) verificaram que cadelas com menos de 1 ano de idade fornecem maior número de oócitos por ovário, comparando-se a animais velhos. Ao confrontar a quantidade de oócitos fornecidos por indivíduo, em diferentes idades, verificou-se que cadelas com 9 meses de idade fornecem maior número de oócitos do que fêmeas com 6 meses ou menos, 7, 8 e ainda com mais de 12 meses (HAY et al., 1997b). Segundo McDougall et al. (1997), há aumento no número total de pequenos folículos em cadelas em idade próxima à puberdade (6-10 meses), principalmente pela população de folículos em preparação para a ovulação no primeiro ciclo. Já para fêmeas com histórico de um ou mais períodos de estro, observa-se grande número de folículos desenvolvidos em processo de maturação (McDOUGALL et al., 1997).

A influência da higidez das doadoras de ovários sobre a maturação oocitária ainda não foi devidamente estudada, assim, hipoteticamente, pode ser admitida como um fator que se demonstre relevante (HEWITT; ENGLAND, 1998a), muito embora recentemente Rodrigues e Rodrigues (2003b) tenham demonstrado ser possível a maturação de oócitos obtidos de cadelas com piometra. Cadelas sem raça definida (SRD) fornecem maior número de folículos do que as de raça pura,

pois se entende que a seleção genética altere a sensibilidade ovariana às gonadotrofinas (DURRANT et al., 1998).

O tamanho do oócito pode influenciar diretamente a competência meiótica durante o processo de maturação *in vitro* (OTOI et al., 2000b; OTOI et al., 2001). Quanto maior seu tamanho, maior a habilidade de transpor a fase de quebra da vesícula germinativa para atingir as fases de metáfase I, anáfase I e metáfase II, o que representa maior porcentagem de maturação (HEWITT; ENGLAND, 1998a; OTOI et al., 2000a). Oócitos de diâmetro superior a 120 μm apresentam competência meiótica para os estágios finais da maturação nuclear (HEWITT; ENGLAND, 1998a; OTOI et al., 2000a) e são verificados em maior quantidade durante a fase de proestro e estro (OTOI et al., 2001). Em cadelas em diestro predominam os oócitos de diâmetro menor ou igual a 100 μm (HEWITT; ENGLAND, 1998a).

Estudando a taxa de maturação de oócitos de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, Yamada et al. (1993), ao compararem fêmeas em anestro com fêmeas contendo folículos pré-ovulatórios, verificaram que os oócitos de cadelas em anestro não mostraram tendência a maturação por mais de 144 horas em cultivo. Observaram, ademais, ser o período de diestro prejudicial ao desenvolvimento oocitário, atribuindo este efeito deletério ao tecido luteal presente (NICKSON et al., 1993). Não há diferença, entretanto, na porcentagem de maturação para o estágio de quebra da vesícula germinativa ou metáfase I, anáfase I e metáfase II entre oócitos obtidos de fêmeas em proestro e estro (HEWITT; ENGLAND, 1997b). Em contrapartida, Hewitt e England (1998b) não constataram influência do estágio do ciclo estral no processo de maturação oocitária, observaram, porém, folículos em diferentes fases de desenvolvimento, vale dizer, uma população bastante

heterogênea. A retirada de oócitos apenas de folículos selecionados permite a obtenção de oócitos com maior potencial para o desenvolvimento *in vitro*, evitando-se, destarte, a colheita ao acaso (HEWITT; ENGLAND, 1998a). Para predizer a habilidade do oócito em iniciar a meiose até os estágios de metáfase I e II, sua qualidade inerente (graus de classificação) deve ser utilizada como um indicador mais confiável do que o estágio do ciclo estral no qual a fêmea doadora se encontra, pois observou-se porcentagem semelhante de maturação nuclear em oócitos obtidos de fêmeas em diversas fases do ciclo estral (RODRIGUES; RODRIGUES, 2003b).

2.2 Colheita de gametas

Em termos genéricos, os protocolos de fecundação *in vitro* prevêm duas técnicas para obtenção de oócitos. Conforme a primeira delas, a coleta dá-se a partir de ovários provenientes de fêmeas submetidas a ovariectomia ou a ovariosterectomia. Para as espécies de grande porte utiliza-se, freqüentemente, uma segunda técnica: a de punção folicular. Contudo, dada a localização cortical dos folículos no tecido ovariano da cadela, torna-se difícil a punção isolada dos folículos, os quais permanecem abaixo da superfície ovariana e só se tornam aparentes pouco antes da ovulação (HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998; OTOI et al., 2000b). Yamada et al. (1992) puncionaram os folículos pré-antrais (com diâmetros de 3 a 10 mm) de cadelas tratadas com protocolos de superovulação. De outra parte, pesquisas conduzidas com cadelas em diferentes fases do ciclo estral empregaram a técnica de fatiamento dos ovários, deste *modus faciendi* pode resultar

a liberação de uma quantidade maior de oócitos do que a propiciada pela técnica de punção folicular, mantendo-se, ao menos, uma camada de células do cumulus oophorus (NICKSON et al., 1993). A técnica de fatiamento é feita com lâminas de bisturi em espaços de 1 mm. Não obstante, o fatiamento dos ovários pode ser responsável pela baixa obtenção de oócitos de qualidade adequada (HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998). Esta técnica permite, porém, obter oócitos de folículos em diferentes estágios do desenvolvimento e até em atresia. Quando possível, para evitar danos aos complexos cumulus-oócito (COC), os folículos devem ser puncionados, principalmente em ovários de fêmeas em estro, oportunidade na qual os diâmetros foliculares são maiores (HEWITT; ENGLAND, 1997a).

2.3 Classificação dos oócitos

A seleção dos oócitos a serem submetidos à maturação *in vitro* baseia-se, fundamentalmente, nas camadas de células da granulosa pelas quais o gameta encontra-se envolvido (DURRANT et al., 1998; NICKSON et al., 1993; YAMADA et al., 1992). Após 48 horas de cultivo, Nickson et al. (1993) verificaram a degeneração de oócitos com apenas 1 camada de células da granulosa, enquanto parte dos oócitos com mais de 2 camadas expandiam-se, com expulsão do primeiro corpúsculo polar após 24 horas. Uma das funções das células do cumulus é transferir aporte nutricional ao oócito, mecanismo este de fundamental importância para a espécie canina, pois as células do cumulus mantêm-se ligadas ao zigoto até o estágio de mórula (NICKSON et al., 1993). Portanto, manter as camadas de

células do cumulus é vital para o desenvolvimento dos oócitos e futuros embriões caninos.

Nos estudos *in vitro*, a associação oócito-cumulus deteriora-se após 48-72 horas de cultivo, já em oócitos ovulados espontaneamente tal processo ocorre em 5 dias de cultura (NICKSON et al., 1993). Esta diferença pode ser atribuída à deficiência do meio de cultivo e/ou à imaturidade dos oócitos colhidos diretamente dos ovários.

Os folículos ovarianos contendo oócitos em crescimento apresentam várias camadas de células do cumulus. Desta forma, a classificação oocitária não se deve basear unicamente -- conforme estabelecido para outras espécies -- no número de camadas de células da granulosa (DURRANT et al., 1998).

Segundo Hewitt e England (1997a) é possível classificar os complexos cumulus oócitos (COC) em três graus distintos:

GRAU I -- pigmentação escura e com uma ou mais camadas de células do cumulus;

GRAU II -- pigmentação clara com camadas incompletas de células do cumulus;

GRAU III -- coloração pálida, sem formato definido e sem células do cumulus aderidas. São oócitos considerados degenerados.

Apenas os COC de grau I devem ser selecionados para maturação *in vitro*, pois apresentam taxas de desenvolvimento oocitários favoráveis (HEWITT; ENGLAND, 1997a; HEWITT; ENGLAND, 1997b; HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998; HEWITT; ENGLAND, 1998a). Hay et al. (1997b), por seu turno, recomendam a escolha, para protocolos de maturação *in vitro*, apenas de oócitos com diâmetro

aproximado de 100 μm , contendo ooplasma escuro circundado por massa espessa e bem formada de células do cumulus.

2.4 Meios de lavagem

Em estudos de maturação e fecundação *in vitro* foram propostos, com igual sucesso, diversos protocolos. As pesquisas conduzidas com a espécie canina utilizam, com adaptações mínimas, meios de cultivo muito semelhantes aos empregados para as demais espécies.

A composição do meio de maturação deve obedecer, conforme Guérin (1998) aos seguintes preceitos: a) conter produtos que se assemelham ao de células tubáricas, por exemplo, o *tissue culture medium* 199 (TCM199), suplementado com albumina sérica bovina (BSA) ou soro fetal bovino (SFB); b) elementos capacitores, tais como heparina, taurina ou hipotaurina; c) hormônios e fatores de crescimento, como as gonadotrofinas e o *epidermal growth factor* (EGF); d) substâncias antibacterianas e/ou anti-micóticas, por exemplo, penicilina, gentamicina, estreptomicina e anfoterecina B.

As condições de temperatura, pressão osmótica, pH e da atmosfera devem ser controladas.

Os ovários, quando retirados do organismo vivo, devem ser mantidos em condições adequadas. Diversos meios de preservação e transporte podem ser adotados: solução salina a 35°C (OTOI et al., 2000c), solução salina suplementada com gentamicina a 37°C (NICKSON et al., 1993; YAMADA et al., 1992), solução

salina a 38°C (HAY et al., 1997b), PBS (*phosphate buffer solution*) com penicilina e estreptomicina a 39°C (HEWITT; ENGLAND, 1997b; HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998; HEWITT; ENGLAND, 1998a) e solução salina 0,9% suplementada com penicilina G sódica, sulfato estreptomicina e anfotericina B (BOLAMBA; BORDEN-RUSS; DURRANT, 1998; DURRANT et al., 1998).

Para lavagem dos ovários e retirada dos oócitos, diversos meios são sugeridos pela literatura; dentre eles pode-se citar: lavagem dos ovários em solução salina suplementada com gentamicina a 37°C e manutenção dos oócitos retirados por punção folicular em meio TYH (solução Krebs-Ringer bicarbonato modificada) com 10% de soro fetal bovino inativado e sulfato de gentamicina (YAMADA et al., 1992), lavagem dos ovários em PBS a 37°C e dos oócitos retirados por fatiamento em meio TCM199 com sais Earle, HEPES, L-glutamina e sulfato de gentamicina (NICKSON et al., 1993), fatiamento em PBS com gentamicina (OTOI et al., 2000c), ovários fatiados em PBS com 0,5% de BSA (HOLST et al., 2000), lavagem e fatiamento dos ovários em TCM199 com sais Earle, HEPES, penicilina, sulfato de estreptomicina e bicarbonato de sódio (HEWITT; ENGLAND, 1997a; HEWITT; ENGLAND, 1998a; HEWITT; ENGLAND, 1999b), lavagem dos ovários e liberação dos complexos cumulus oócito (COC) em TCM199 com 0,3% de BSA (HEWITT; ENGLAND, 1997b), lavagem dos ovários e obtenção do oócitos em PBS com 0,4% de BSA (HAY et al., 1997a), manutenção e fatiamento dos ovários em TCM199 com 20% de soro fetal bovino inativado, penicilina, estreptomicina e bicarbonato de sódio a 39°C (HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998).

É possível utilizar alternativamente soluções de digestão como, por exemplo, meio BWW (Briggs-Whitten-Whittingham) modificado sem BSA contendo collagenase e DNase durante 1 hora a 37°C para fragmentos ovarianos (1-2 mm)

(BOLAMBA; BORDEN-RUSS; DURRANT, 1998). Durrant et al. (1998) compararam 3 protocolos de digestão para recuperação de folículos de tecido ovariano, e verificaram que o protocolo de digestão seguido de refrigeração a 4°C *overnight* apresentou a menor porcentagem de oócitos degenerados, tal procedimento, porém, acarretou danos às camadas de células da granulosa. A refrigeração seguida de digestão alterou as células da granulosa, mas não os oócitos sensíveis ao dano enzimático. A refrigeração dos ovários a 4°C não afetou a porcentagem de oócitos, os quais se desenvolveram *in vitro* até o estágio de blastocisto.

2.5 Meios de maturação oocitária

A maioria dos estudos de maturação de oócitos em cães utiliza o meio TCM199, modificado ou não, sob condições de temperatura e umidade variáveis (NICKSON et al., 1993; HEWITT; ENGLAND, 1997a; HEWITT; ENGLAND, 1997b; HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998; HEWITT; ENGLAND, 1998a; HEWITT; ENGLAND, 1999b). Yamada et al. (1992) utilizaram grupos de 15 a 20 oócitos em 0,4 ml de meio TYH (solução de Krebs-Ringer bicarbonato modificado) sob óleo mineral, incubados a 37°C em 5% de CO₂. Já Hewitt e England (1997a) utilizaram 10 oócitos em gotas de 400 µl em meio TCM199 modificado, sob óleo, a 39°C em 5% de CO₂. Em diferente protocolo, Hay et al. (1997a) empregaram grupo de 10 oócitos em gotas de 95 µl de meio tampão Tyrode modificado (TALP), sob óleo, a 38°C em 5% de CO₂. Bolamba, Boden-Russ e Durrant (1998), em linha de pesquisa com digestão oocitária, empregaram meio de maturação BWW (Briggs-Whitten-

Whittingham) modificado a 37°C. Os meios de maturação podem sofrer substituição diária durante o período de incubação (NICKSON et al., 1993).

O meio TCM199, além de modificado, pode ser suplementado com esteróides e outras substâncias favoráveis ao desenvolvimento oocitário, tais como soro fetal bovino e albumina sérica bovina (BSA). O emprego destas substâncias aumenta a sobrevivência dos oócitos em cultura, pois suporta a maturação e a conseqüente fecundação na medida em que previne alterações desfavoráveis da zona pelúcida e favorece a aderência das células do cumulus ao oócito (HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998). Em cães, várias substâncias e concentrações foram testadas, porém sem avaliar a real eficiência de: 10% de soro de cadelas em estro no TCM199 (NICKSON et al., 1993), 5% de soro fetal bovino no TCM199 suplementado com insulina e antibiótico (OTOI et al., 2000c), 10% de soro fetal bovino no TCM199 (ELLINGTON; MYERS-WALLEN; BALL, 1995), 0,3% de BSA no TCM199 (HEWITT; ENGLAND, 1997a; HEWITT; ENGLAND, 1997b; HAY et al., 1997b). Na tentativa de verificar as melhores condições de cultivo de oócitos caninos, Hewitt, Watson e England (1998) compararam as taxas de maturação de oócitos cultivados em diferentes protocolos, variando essencialmente o tipo e a concentração de substâncias suplementadas ao meio de maturação padrão TCM199 (5%, 10% e 20% de soro fetal bovino; 0,3% e 4% de BSA). Como conclusão, verificaram ser inadequada a suplementação com 5% de soro fetal bovino (SFB), resultando em alta taxa de oócitos degenerados e que 0,3% de BSA é o tratamento ótimo para maturação até metáfase I, anáfase I e metáfase II durante 48 horas de cultivo. Os autores concluíram, ainda, que a suplementação com 20% de soro fetal bovino favorece a maturação até 96 horas, isto porque, conforme observaram, o SFB é indicado para evitar alterações morfológicas da zona pelúcida. Constataram,

además, ser recomendável a troca dos meios após 48 horas de cultura, pois tal procedimento aumentou a taxa de maturação.

Otoi et al. (1999) avaliaram a influência de várias concentrações (5, 10 e 20%) de soro de cadelas em anestro, estro e diestro na maturação oocitária *in vitro*. Devido à maior concentração de estrógeno e progesterona no soro de cadelas em estro, uma proporção mais elevada de oócitos submetidos a tal suplementação sérica reassumiu a meiose até estágios de metáfase I e II. A adição de hormônios no meio de cultivo para a maturação pode ser usada para mimetizar os eventos pré-ovulatórios *in vivo* ao empregar-se soro de cadelas em estro na concentração de 10%.

Os níveis hormonais circulantes durante o estágio de maturação oocitária são particulares da espécie canina, pois ocorre o fenômeno de luteinização pré-ovulatória. Ou seja, os oócitos em estágio de vesícula germinativa encontram-se sob a ação de níveis decrescentes de estrógenos e progressivos de progesterona (GUÉRIN, 1998; HEWITT; ENGLAND, 1997b; NICKSON et al., 1993). Os primeiros pesquisadores a utilizarem suplementação hormonal em estudo conduzido *in vivo* foram Yamada et al. (1992), nesse experimento fêmeas foram submetidas a protocolos de superovulação para posterior maturação *in vitro* de oócitos puncionados de folículos pré-ovulatórios. De outra parte, o estudo exclusivamente *in vitro* das influências hormonais no desenvolvimento oocitário em cadelas iniciou-se com Hewitt e England (1997b) com utilização de meios de maturação suplementados com estrógeno e progesterona, ambos em doses fixas. Os autores não observaram diferença na porcentagem de maturação entre os meios e o grupo controle após 48 e 96 horas, disto concluíram não terem, os hormônios esteróides, efeito sobre a maturação oocitária *in vitro*. Entretanto, Nickson et al. (1993) sugerem

a substituição da suplementação hormonal de estrógenos por progestágenos para auxiliar o desenvolvimento oocitário durante o espaço temporal colocado entre o estágio de expulsão do primeiro corpúsculo polar e a fecundação.

Bolamba, Borden-Russ e Durrant (1998), por sua vez, utilizaram meios suplementados com FSH, hCG e estradiol para cultivar oócitos de folículos pré-antrais avançados e antrais precoces; esse procedimento acarretou uma porcentagem muito pequena de oócitos que progrediram de metáfase I a metáfase II. Russ et al. (1998) avaliaram meios de maturação semelhantes nos quais, além da suplementação com gonadotrofinas, adicionaram EGF. Como resultado, observaram aumento significativo da expansão de células do cumulus e da maturação nuclear dos oócitos.

Em raposas, Krogenaers et al. (1993) avaliaram a influência da suplementação do meio de maturação com FSH e verificaram que esta gonadotrofina induz alterações metabólicas, aumentando a taxa de maturação dos oócitos até metáfase II. Em contrapartida, os meios de maturação adicionados de FSH e LH não operaram no sentido de aumentar a porcentagem de oócitos maturados após 48 e 96 horas, entretanto, os autores questionam a concentração das gonadotrofinas, e sugerem a adição de quantidades superiores às fisiológicas (HEWITT; ENGLAND, 1999a).

A tentativa de mimetizar os processos reprodutivos fisiológicos *in vitro* é o principal objetivo das pesquisas mais recentes. Assim, Hewitt e England (1999b) desenvolveram estudo no qual cultivaram oócitos de cadelas em fluido sintético de tuba uterina (SOF) e diretamente em cultura de células da tuba uterina. Esta proposta baseia-se no fato de que a maturação oocitária *in vivo* nas cadelas ocorre no interior da tuba uterina, portanto as secreções tubáricas devem exercer papel

relevante no desenvolvimento dos oócitos (GUÉRIN, 1998). Acredita-se, ademais, que a interação física dos gametas e embriões com o epitélio da tuba uterina tem importância por suportar, respectivamente, a fecundação e o desenvolvimento embrionário, pois facilita a absorção de secreções presentes (HEWITT; ENGLAND, 1999b).

O cultivo de oócitos caninos em meio SOF define-se como protocolo limitado, pois, embora tenha aumentado a porcentagem de oócitos que reiniciaram a maturação *in vitro* após 96 horas, não afetou o restante da maturação nuclear (HEWITT; ENGLAND, 1999b). Conforme estes últimos autores, a composição do meio SOF, elaborada com base nas características conhecidas de outras espécies, pode ser inadequada para cadelas; exemplos de tal desajuste podem estar nos níveis de proteínas, de carboidratos e de íons bicarbonato como fonte de dióxido de carbono para a manutenção do pH. A alta taxa protéica no meio de maturação oocitária em cadelas pode ser a chave para o melhor desenvolvimento embrionário, pois, como verificado pelos autores em foco, concentrações crescentes de BSA aumentam a taxa de maturação oocitária (HEWITT; ENGLAND, 1999b). O acréscimo de BSA nos meios de maturação pode facilitar a aderência de fatores de crescimento e evitar o decréscimo da concentração de oxigênio (HEWITT; ENGLAND, 1999b).

Olson et al. (1999) avaliaram a eficiência da maturação oocitária em 3 meios sintéticos que simulam o microambiente da tuba uterina; segundo verificaram, os meios propostos aumentaram as taxas de maturação em relação ao meio controle, porém sem diferença relevante com respeito aos meios clássicos utilizados nos estudos de maturação *in vitro*.

Em face da presença de espermatozóides na tuba uterina, até mesmo antes da ovulação, Saint-Dizier et al. (2001a) estudaram a influência das células espermáticas na maturação oocitária em cães. Segundo observado por esses autores, a penetração de espermatozóides no oócito pode induzir a meiose *in vitro*, pois tem efeito estimulador em oócitos precoces (vesícula-germinativa).

2.6 Período de cultivo *in vitro* em meio de maturação

Após a ovulação, os oócitos *in vivo* permanecem na tuba uterina, onde sofrem o processo de maturação nuclear, ou seja, atravessam a fase de vesícula germinativa para metáfase II (expulsão do primeiro corpúsculo polar). A maturação nuclear dos oócitos vem sendo monitorada pela remoção dos oócitos do meio de cultura em diferentes intervalos de tempo para avaliação do estágio de maturação meiótica. Segundo Yamada et al. (1992), a primeira divisão meiótica não está completada até pelo menos 48 horas após a ovulação. Em face disto, os pesquisadores utilizaram período de cultivo de oócitos de 72 horas com avaliação após 24 e 48 horas (momento no qual observou-se a expansão das células do cumulus). Já Nickson et al. (1993), optaram por período de maturação de até 96 horas com monitoração após 1, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Ao comparar dois períodos de maturação oocitária, 48 e 96 horas, Hewitt e England (1997b) não verificaram diferença sobre a taxa de maturação até metáfase II. Em publicação posterior, os mesmos autores avaliaram oócitos em cultivo por: 0, 48 e 96 horas (HEWITT; ENGLAND, 1998a).

Recentemente, diversas pesquisas estabeleceram 72 horas como o período de maturação para cães (OTOI et al., 2000c; RODRIGUES; RODRIGUES, 2003b). Ao se comparar três diferentes tempos de incubação (24, 30 e 48 horas), Luvoni et al. (2003) verificaram que o período de maturação de 30 horas foi suficiente para o início da meiose (estágio de quebra da vesícula germinativa) mas não para suportá-la até os estágios de metáfase I e II. Porém, quando estenderam o intervalo de cultivo para 48 horas, evidenciou-se aumento na taxa de oócitos degenerados.

2.7 Métodos de avaliação da maturação oocitária

Em decorrência do conteúdo lipídico e da alta densidade dos oócitos caninos, a visualização dos componentes do ooplasma torna-se mais difícil, pois à microscopia de luz o citoplasma mostra-se escurecido. Os métodos de avaliação do ooplasma incluem centrifugação com retirada mecânica do material lipídico ou marcadores nucleares fluorescentes que permitem identificar o ooplasma sem a necessidade de se retirar o material lipídico (HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998). Entretanto, as técnicas difundidas para avaliação da maturação oocitária em outras espécies também se aplicam para a espécie canina. A maioria dos trabalhos nesta linha de pesquisa utiliza a técnica de coloração dos oócitos em aceto-orceína com prévia fixação em ácido acético e álcool e visualização da morfologia nuclear em microscopia de interferência ou contraste de fase (BOLAMBA; BORDEN-RUSS; DURRANT, 1998; DURRANT et al., 1998; HEWITT; ENGLAND, 1997a; HEWITT; ENGLAND, 1997b; HEWITT; ENGLAND, 1998a; HEWITT; ENGLAND, 1998b;

HEWITT; ENGLAND, 1999b; MAHI; YANAGIMACHI, 1976; OTOI et al., 1999; YAMADA et al., 1992). Embora de execução mais simples, a interpretação do estágio de maturação é mais subjetiva, além disso, a confecção da lâmina dificulta a visualização da região equatorial dos oócitos e provoca grande perda de material ao tentar-se encontrar a melhor pressão da lamínula sobre o oócito. Dadas essas limitações, Nickson et al. (1993) propuseram a utilização de técnicas de biologia molecular para monitorar as mudanças durante a maturação oocitária, mensurando-se as concentrações do RNAm da glicoproteína ZP3 que compõe a matriz extracelular da zona pelúcida.

A coloração escurecida do ooplasma de oócitos de cadelas parece ser um dos fatores principais na avaliação do grau de maturação *in vitro*. A possibilidade de utilização de técnicas capazes de clarear o núcleo destes oócitos implica uma compreensão melhor dos mecanismos de maturação. Em face disso, Hewitt, Watson e England (1998) compararam diversos métodos de avaliação do estágio de maturação e verificaram que a fixação adicional em citrato de sódio por 10 minutos facilitou a coloração de aceto-orceína, pois aumentou a claridade visual do ooplasma. Embora não disponível na maioria dos laboratórios, devido ao elevado custo dos equipamentos apropriados, pode-se adotar métodos fluorescentes com iodeto de propídio ou Hoeschst 33258 (HAY et al., 1997a; HEWITT; ENGLAND, 1997a). A principal vantagem da utilização das sondas fluorescentes é a possibilidade de identificar o núcleo do oócito sem a necessidade de retirar o material lipídico, uma vez que estas colorações têm a capacidade de marcar apenas o DNA de cada célula. Em função da intensidade de condensação cromossômica e da configuração da cromatina dos oócitos após cultivo, melhor visualizada por meio

de técnicas fluorescentes, é possível classificá-los nos diferentes estágios de divisão celular da meiose (HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998; LUVONI et al., 2003)

Para a classificação do grau de maturação Hewitt e England (1997b) preconizaram o padrão abaixo discriminado.

- estágio de vesícula germinativa (GV) - núcleo vesicular com nucléolo distinto circundado por filamentos finos de cromatina;
- estágio de quebra da vesícula germinativa (QVG) - reinício da meiose com algum grau de descondensação da cromatina e desaparecimento da vesícula nuclear. O nucléolo é corado fracamente e os cromossomos são facilmente visíveis (longos e finos) agrupados ao redor do nucléolo;
- estágio entre reinício da meiose e final da metáfase I (MI, AI e MII) - cromossomos enrolam-se, adquirem espessura menos delgada e não são mais distinguíveis, formando pares bivalentes de cromossomos:

Metáfase I - formação de pares de cromossomos;

Anáfase I - dois grupos de cromossomos (afastamento dos pares e movimentos em direções opostas à região equatorial);

Metáfase II - grupo denso de cromossomos, formando o primeiro corpúsculo polar e outro grupo mais afastado permitindo a visualização individual dos cromossomos.

2.8 Cultivo *in vitro* de células da tuba uterina e emprego nos processos de MIV, FIV e CIV

A tuba uterina pode ser considerada, na cadela, um microambiente no qual ocorrem diversos processos, tais como: suporte aos gametas, suporte à fecundação, desenvolvimento embrionário precoce e transporte do embrião viável (LUVONI et al., 2003; STAROS; KILLIAN, 1998; VERHAGE et al., 1997). O epitélio da tuba uterina funciona, em cães, como reservatório funcional para espermatozóides, pois estudos *in vitro* demonstram que o cultivo de células da tuba uterina pode manter a atividade flagelar dos espermatozóides por mais de 48 horas, principalmente em tubas uterinas extraídas de fêmeas em estro (PACEY; FREEMAN; ENGLAND, 2000). Nos cães, a tuba uterina possui qualidades singulares que permitem a maturação oocitária e, ainda, a sobrevivência dos gametas e embriões por extensos períodos de tempo, particularidades restritas à esta espécie (LUVONI et al., 2003).

O epitélio da tuba uterina é composto de células ciliadas e não ciliadas as quais se modificam acentuadamente durante o ciclo estral e progressivamente com o envelhecimento do animal (MYERS; COOK; MOSIER, 1984). A morfologia e as características bioquímicas do epitélio são controladas por esteróides ovarianos (VERHAGE et al., 1997). O estrógeno isoladamente provoca hipertrofia e diferenciação do epitélio, enquanto a progesterona induz a desdiferenciação (VERHAGE et al., 1998). Desta forma, durante o proestro e estro há mudança na proporção de células ciliadas e não ciliadas, com 60% do epitélio formado por células ciliadas. Comparando as diferentes porções da tuba uterina, Myers, Cook e Mosier (1984) verificaram que durante o estro as células ciliadas predominavam na ampola e infundíbulo, enquanto no istmo a proporção entre células ciliadas e não ciliadas era semelhante. No momento da ovulação, o epitélio consiste de células colunares ciliadas diferenciadas e secretórias, contendo grânulos de secreção de glicoproteínas de alto peso molecular, estas últimas são específicas da tuba uterina

e dependentes de estrógenos (VERHAGE et al., 1997). As moléculas de glicoproteína são elementares nos processos de fecundação, pois atuam diretamente na zona pelúcida dos oócitos e no acrossomo dos espermatozóides (VERHAGE et al., 1997). O fluido da tuba uterina é um transudato seletivo, composto de proteínas secretadas pelo seu epitélio.

Com o objetivo de identificar proteínas do fluido da tuba uterina de bovinos, Staros e Killian (1998) submeteram amostras obtidas *in vivo* à eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida e observaram maior produção protéica durante o período não luteínico, sendo a albumina a principal proteína do fluido tubárico. Foram identificadas proteínas de diversos pesos moleculares com padrões distintos de associação com a zona pelúcida de oócitos de acordo com a fase do ciclo estral; além disso, também verificou-se a existência de uma molécula associada ao estro.

As células secretoras que revestem o lúmen da tuba uterina sintetizam uma glicoproteína espécie-específica correlacionada com o estágio de diferenciação do tecido (VERHAGE et al., 1998). Estudos já demonstraram a grande importância desta proteína como facilitadora da ligação da zona pelúcida com os espermatozóides. Destarte, a glicoproteína de tuba uterina, purificada ou recombinante, pode ser benéfica para os protocolos de FIV bem como alvo para estudos de imun contracepção (VERHAGE et al., 1998).

Para obtenção das células da tuba uterina, Hewitt e England (1999a) testaram os métodos da lavagem com TCM199 e 0,3% de BSA, da pressão na tuba uterina íntegra, da raspagem da superfície interna da tuba uterina com lâmina de bisturi e da raspagem com lâmina de microscopia. A lâmina de bisturi distinguiu-se como o método que permitiu a obtenção do maior número de células. As células da tuba uterina foram divididas em dois grupos: cultivo no TCM199 com 0,3% de BSA e co-

cultivo por 6 horas a 39°C a 5% de CO₂. O co-cultivo em células da tuba uterina apenas melhorou a maturação nuclear após o largo espaço temporal de 96 horas, no entanto, o término da meiose foi beneficiado (HEWITT; ENGLAND, 1999a).

O emprego do co-cultivo em células da tuba uterina é objetivo das mais recentes pesquisas, pois se atribui a este procedimento a maior similaridade aos mecanismos de maturação oocitária *in vivo* (BOGLIOLO et al., 2002; LUVONI et al., 2003). Nos referidos estudos, verificou-se influência positiva das células da tuba uterina na maturação nuclear de oócitos de cães, tanto para o co-cultivo em monocamada com células da tuba uterina obtidas de fêmeas em estro (BOGLIOLO et al., 2002), bem como para a interação física dos oócitos com a mucosa das tubas uterinas em sistemas de cultivo fechados (LUVONI et al., 2003).

A cultura de células da tuba uterina pode ser utilizada para avaliação da capacitação espermática, para testes de penetração em zona pelúcida e para o co-cultivo de embriões produzidos *in vitro* (ELLINGTON; MEYERS-WALLEN; BALL, 1995; NICKSON et al., 1993). As células da tuba uterina depois de lavadas várias vezes são ressuspensas e cultivadas. De acordo com Ellington, Meyers-Wallen e Ball (1995), são mantidas a 38,5°C em 5% de CO₂ com trocas de meio a cada 24 horas, momento em que são retiradas as células não aderidas. Após 48 horas de cultivo as células aderem à placa de cultivo e iniciam a monocamada a qual se torna uniforme em 1 semana de cultura, momento a partir do qual apresentam atividade ciliar abundante.

O co-cultivo de oócitos de cadela pode ser realizado em células do cumulus de oócitos bovinos. Otoi et al. (2000c) optaram por esse protocolo de maturação visando a avaliar a competência dos oócitos para a FIV, após 72 horas. Entretanto, o co-cultivo com células do cumulus de bovinos não afetou o desenvolvimento

subseqüente dos oócitos maturados até blastocisto. Em face disso, os autores sugeriram a utilização do cultivo de células somáticas ou a suplementação do meio de cultivo com hormônio do crescimento em meios de maturação.

3.1 Animais

Os ovários e tubas uterinas foram colhidos de fêmeas híginas, entre 1 e 6 anos de idade, submetidas à ovário-histerectomia de rotina no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital Veterinário da FMVZ-USP. O estágio do ciclo estral das fêmeas era anestro, detectado por meio de citologia vaginal, de acordo com Olson et al. (1984), e dosagem de progesterona sérica pela técnica de radioimunensaio (kit Progesterone Coat-a-Count – DPC®), sendo inferior a 0,5 ng/ml.

3.2 Cultivo de células da tuba uterina

Até a manipulação das amostras em laboratório, os ovários foram mantidos em solução fisiológica a 39°C (solução de transporte) e as bolsas ovarianas armazenadas em solução fisiológica à temperatura ambiente. No laboratório as bolsas ovarianas eram lavadas 2 vezes em solução fisiológica à temperatura ambiente e colocadas em placa de Petri contendo solução de PBS com 10% de SFB para proceder-se à retirada de todo tecido adjacente às tubas uterinas. O lúmen das tubas uterinas foi lavado com PBS + 10% de SFB por meio de agulha fina para posterior incisão longitudinal. A superfície luminal foi mecanicamente removida por atrito, com auxílio de uma lâmina de bisturi e as células da tuba uterina eram, portanto, liberadas para a solução contida na placa de Petri.

O líquido presente na placa de Petri foi transferido para um tubo cônico e as células da tuba uterina formaram um pellet por decantação, decorridos 10 minutos. As células epiteliais eram lavadas por centrifugação a 500 rpm por 5 minutos no meio de lavagem (Anexo A), ressuspendidas em meio de maturação (meio MIV – Anexo B) e transferidas para placa de cultivo com 4 poços de 500 µl contendo meio de maturação de acordo com os grupos experimentais. As células da tuba uterina foram mantidas em estufa a 39°C e 5% de CO₂ em alta umidade. Após 48 horas o cultivo era avaliado quanto a formação de vesículas de secreção, e o meio renovado de acordo com cada grupo experimental.

3.3 Colheita dos oócitos

Os ovários foram transportados em solução fisiológica a 39°C (solução de transporte). No laboratório, foram lavados 2 vezes nesta solução. Os ovários foram colocados em placas de petri contendo solução de PBS adicionado de 10% de SFB a 39°C e seccionados com lâminas de bisturi em fatias finas para liberação dos complexos oócitos-cumulus (COC).

Os oócitos eram rastreados sob estereomicroscópio (em aumento de 20 a 40X), lavados 3 vezes em meio de lavagem (Anexo A) e classificados de acordo com a homogeneidade do citoplasma e o número de camadas de células do *cumulus oophorus*. Apenas COCs de grau I (de acordo com a classificação de HEWITT; ENGLAND, 1997a) foram selecionados e adicionados à monocamada de células da tuba uterina previamente cultivada por, no mínimo, 48 horas ou para os grupos sem

co-cultivo em células da tuba uterina. O número total de oócitos era dividido em dois poços contendo 500 µl de meio de maturação (meio MIV - Anexo B), em placas de 4 poços, de forma a satisfazer dois grupos por manipulação e mantidos a 39°C e 5% de CO₂ em alta umidade, durante 48, 72 e 96 horas.

3.4 Delineamento experimental

Desta forma, o delineamento experimental proposto contou com 8 grupos, de acordo com as diferentes condições de cultivo (co-cultivo em células da tuba uterina e a suplementação com hormônios esteróides):

Grupo 1 - maturação de oócitos em meio MIV (Anexo B), 2,5 µg/ml de FSH, 5 µg/ml de LH, sem suplementação de hormônios esteróides (Controle 1);

Grupo 2 - maturação de oócitos em meio MIV, 2,5 µg/ml de FSH e 5 µg/ml de LH, com suplementação de 20 µg/ml de estrógeno;

Grupo 3 - maturação de oócitos em meio MIV, 2,5 µg/ml de FSH e 5 µg/ml de LH, com suplementação de 20 µg/ml de progesterona;

Grupo 4 - maturação de oócitos em meio MIV, 2,5 µg/ml de FSH e 5 µg/ml de LH, com suplementação de 20 µg/ml de estrógeno e 20 µg/ml de progesterona;

Grupo 5 - maturação de oócitos em co-cultivo de células da tuba uterina no meio MIV, 2,5 µg/ml de FSH e 5 µg/ml de LH, sem prévia suplementação com hormônios esteróides (Controle 2);

Grupo 6 - maturação de oócitos em co-cultivo de células da tuba uterina no meio MIV, 2,5 µg/ml de FSH e 5 µg/ml de LH com prévia suplementação de 20 µg/ml de estrógeno;

Grupo 7 - maturação de oócitos em co-cultivo de células da tuba uterina no meio MIV, 2,5 µg/ml de FSH e 5 µg/ml de LH com prévia suplementação de 20 µg/ml de progesterona;

Grupo 8 - maturação de oócitos em co-cultivo de células da tuba uterina no meio MIV, 2,5 µg/ml de FSH e 5 µg/ml de LH com prévia suplementação de 20 µg/ml de estrógeno e 20 µg/ml de progesterona;

As etapas envolvidas no delineamento experimental estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Cronologia dos procedimentos executados nos períodos de colheita e processamento das amostras – São Paulo – 2003

DIA (horas)	PROCEDIMENTO
Dia 0 (0 horas)	Colheita das tubas uterinas Processamento das amostras Cultivo de células da tuba uterina em 4 grupos
Dia 2 (48 horas)	Troca de meios <i>Colheita dos oócitos</i>
<i>DIA 0 (0 HORAS)</i>	<i>Cultivo dos oócitos no co-cultivo em células da tuba uterina</i>
<i>DIA 2 (48 HORAS)</i>	<i>Troca de meios</i> <i>Avaliação da maturação oocitária (48 horas)</i>
<i>DIA 3 (72 HORAS)</i>	<i>Avaliação da maturação oocitária (72 horas)</i>
<i>DIA 4 (96 HORAS)</i>	<i>Avaliação da maturação oocitária (96 horas)</i>

3.5 Avaliação do estágio de maturação dos oócitos

Para avaliação do estágio de maturação foi utilizada a técnica da fluorescência. Após os períodos de cultivo (48, 72 e 96 horas), os oócitos foram mantidos em solução contendo hialuronidase (2 mg/ml) por 10 minutos para a retirada total das células do cumulus (por aspirações repetidas) e posteriormente em PBS contendo 20% de SFB para inativação da enzima. Os oócitos foram transferidos para solução de Triton 10X em paraformaldeído a 4% (Anexo C), onde permaneceram por 1 hora para fixação. Após este período, os oócitos foram lavados em PBS com 0,3% de BSA e transferidos para solução de Triton 10X em PBS com 0,3% de BSA, onde permaneceram por mais 1 hora. Decorrido este período, os oócitos eram colocados em gota com 10 µg/ml de bisbenzímide (Hoechst 33342) em glicerol entre lâmina e lamínula.

A avaliação do estágio de maturação nuclear foi realizada em microscópio invertido equipado com luz ultravioleta e filtro de 365-420 de excitação/emissão.

Os oócitos foram classificados segundo Hewitt e England (1997b), de acordo com a morfologia do DNA, por graus variados de condensação cromossômica, ou seja:

1. Vesícula germinativa (VG – prófase I) - presença de núcleo vesicular com cromossomos pouco condensados (Figura 1A);
2. Quebra da Vesícula germinativa (QVG) - cromossomos apresentam algum grau de condensação com dispersa distribuição, porém ainda com núcleo de aspecto vesicular (Figura 1B);

3. Metáfase I (MI – formação de pares de cromossomos) - cromossomos atingem grau mais avançado de condensação, não sendo possível a visualização individual dos cromossomos (Figura 2);
4. Metáfase II (MII) - apresentam um grupo denso de cromossomos formando o primeiro corpúsculo polar e outro grupo, mais afastado, caracterizado pela placa metafisária (Figura 3);
5. Outros - estruturas degeneradas ou não passíveis de determinação.

3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS 2000).

Os dados foram analisados através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica, sendo o efeito dos tratamentos verificado por meio do teste de Kruskal-Wallis, e as comparações múltiplas do teste de Wilcoxon com os tratamentos comparados dois a dois.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos e tempos) para uma determinada variável resposta. As variáveis classificatórias utilizadas foram tratamento (G1 a G8) e tempo de maturação (48, 72 e 96 horas). As variáveis respostas avaliadas foram VG, QVG, MI, MII e outros.

Figura 1 – Oócito em estágio de vesícula germinativa (A) e quebra da vesícula germinativa (B)

Figura 2 – Oócito em estágio de metáfase I

Figura 3 – Oócito em estágio de metáfase II

Foram realizadas, no total, 41 cirurgias eletivas de ovário-histerectomia de cadelas em anestro, proporcionando 1.331 oócitos classificados como grau I. Assim, cada fêmea forneceu, em média, 32,46 oócitos. Entretanto, durante os processos de maturação *in vitro* e de coloração dos oócitos, várias estruturas foram perdidas, resultando, ao final, 1.037 oócitos. A perda oocitária durante todo o processo de maturação *in vitro* foi de 22,09%.

4.1 Vesícula germinativa (VG)

Ao se comparar as taxas de vesícula germinativa entre os diferentes grupos, após 48 horas de maturação, não se verificou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 2). O grupo 3 (suplementação com progesterona) apresentou a menor taxa de oócitos em VG, em contrapartida ao grupo 4 (suplementação com estrógeno e progesterona) com o maior número de vesículas germinativas (44,44%). Em relação ao período de maturação de 72 horas, o grupo 2 (suplementação com estrógeno) apresentou o maior número de vesículas germinativas (55,00%), diferindo significativamente dos demais grupos. Por outro lado, a menor taxa de oócitos em VG (14,92%) foi observada no grupo 6 (co-cultivo de células da tuba com suplementação de estrógeno), porém sem diferença estatística com o grupo 7 (co-

cultivo de células da tuba uterina com suplementação de progesterona) e grupo 1 (sem suplementação de hormônios esteróides) (Tabela 2). Já às 96 horas de cultivo, verificou-se a menor taxa de oócitos em VG (10,00%) para o grupo 5 (co-cultivo de células da tuba sem suplementação com hormônios esteróides), o que diferiu significativamente dos demais grupos. A maior taxa de vesículas germinativas (52,50%) foi observada para o grupo 4, o qual, no entanto, em termos estatísticos, não diferiu significativamente dos grupos 1 e 3.

Comparando a porcentagem de oócitos em vesícula germinativa nos diferentes períodos de avaliação, verificou-se diferença estatisticamente significativa para os grupos 2, 3, 5 e 6. No grupo com suplementação de estrógeno, a menor taxa de VG foi verificada às 96 horas, diferindo estatisticamente das 72 horas de cultivo. Padrão distinto foi observado para o grupo 3 (suplementação com progesterona) no qual a porcentagem de vesículas germinativas aumentou significativamente ao longo do tempo. Por outro lado, o grupo 5 (co-cultivo de células da tuba uterina sem suplementação com hormônios esteróides) mostrou tendência inversa, pois a menor taxa de oócitos em VG (10,00%) foi verificada às 96 horas, e a maior (42,31%) às 48 horas. Para o grupo 6, houve diferença estatística significativa entre os períodos de 48 e 72 horas de maturação, com decréscimo na porcentagem de vesículas germinativas de 32,73% para 14,92%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Número absoluto e porcentagem de oócitos de cadelas em vesícula germinativa nos diferentes grupos às 48, 72 e 96 horas de maturação *in vitro* - São Paulo - 2003

GRUPOS (nº total oócitos)	HORAS		
	48	72	96
G1 (105)	14/33 (42,42) ^{A,a}	10/41 (24,39) ^{B,C,a}	14/31 (45,16) ^{A,B,C,a}
G2 (124)	16/41 (39,02) ^{A,ab}	22/40 (55,0) ^{A,a}	14/43 (32,56) ^{B,C,D,b}
G3 (122)	9/30 (30,0) ^{A,ab}	13/51 (25,49) ^{B,C,b}	20/41 (48,78) ^{A,B,a}
G4 (131)	16/36 (44,44) ^{A,a}	18/55 (32,73) ^{B,C,a}	21/40 (52,5) ^{A,a}
G5 (164)	22/52 (42,31) ^{A,a}	15/52 (28,85) ^{B,C,a}	6/60 (10,0) ^{E,b}
G6 (180)	18/55 (32,73) ^{A,a}	10/67 (14,92) ^{C,b}	13/58 (22,41) ^{D,E,ab}
G7 (109)	14/35 (40,0) ^{A,a}	7/28 (25,0) ^{B,C,a}	13/46 (28,26) ^{C,D,E,a}
G8 (102)	9/24 (37,50) ^{A,a}	12/35 (34,28) ^{B,a}	11/43 (25,58) ^{D,E,a}

^{A,B,C,D,E} Letras diferentes maiúsculas sobrescritas entre linhas da mesma coluna diferem significativamente (p<0,05)

^{a,b,ab} Letras diferentes minúsculas sobrescritas dentro do mesmo grupo na mesma linha diferem significativamente (p<0,05)

4.2 Quebra da vesícula germinativa (QVG)

Em relação à taxa de oócitos em quebra da vesícula germinativa às 48 horas de avaliação, verificou-se maior porcentagem (33,33%) para o grupo 4, enquanto a menor taxa (7,31%) foi observada no grupo 2 (Tabela 3). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos 4, 3 e 1, os quais apresentaram as maiores taxas de QVG. Os grupos 3 e 4, por sua vez, diferiram estatisticamente dos grupos 2, 5, 6, 7 e 8, para os quais foram observadas as menores taxas de oócitos em quebra da vesícula germinativa. Após 72 horas de cultivo, o grupo com a maior taxa de QVG (42,86%) foi o referente ao co-cultivo com células da tuba uterina suplementado com progesterona (grupo 7), seguido do grupo 3 (suplementação com

progesterona), mas sem diferença significativa. A menor taxa (7,50%) foi verificada para o grupo 2 (suplementação com estrógeno), porém sem diferença significativa com respeito aos grupos 1, 5, 6 e 8. Os grupos 3 e 8 apresentaram as maiores porcentagens de oócitos em QVG às 96 horas de avaliação, respectivamente: 26,83% e 25,58% (Tabela 3). Já para o grupo 5 foi verificada a menor taxa de QVG (6,66%), entretanto sem diferença significativa com respeito aos grupos 1, 2, 3, 6 e 7.

Comparando-se a taxa de oócitos em quebra da vesícula germinativa nos diferentes períodos de avaliação, apenas para o grupo 7 houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 3). Às 72 horas, verificou-se a maior taxa de QVG (42,86%), diferindo dos resultados referentes às 48 e 96 horas, respectivamente: 8,57% e 21,74%.

Tabela 3 - Número absoluto e porcentagem de oócitos de cadelas em quebra da vesícula germinativa nos diferentes grupos às 48, 72 e 96 horas de maturação *in vitro* - São Paulo – 2003

GRUPOS (nº total oócitos)	HORAS		
	48	72	96
G1 (105)	6/33 (18,18) ^{A,B,a}	8/41 (19,51) ^{B,C,D,a}	4/31 (12,90) ^{A,B,C,a}
G2 (124)	3/41 (7,31) ^{B,a}	3/40 (7,50) ^{D,a}	6/43 (13,95) ^{A,B,C,a}
G3 (122)	6/30 (20,0) ^{A,B,a}	18/51 (35,29) ^{A,B,a}	11/41 (26,83) ^{A,a}
G4 (131)	12/36 (33,33) ^{A,a}	17/55 (30,91) ^{A,B,C,a}	6/40 (15,00) ^{A,B,C,a}
G5 (164)	4/52 (7,69) ^{B,a}	8/52 (15,38) ^{C,D,a}	4/60 (6,66) ^{C,a}
G6 (180)	5/55 (9,09) ^{B,a}	12/67 (17,91) ^{B,C,D,a}	7/58 (13,34) ^{B,C,a}
G7 (109)	3/35 (8,57) ^{B,b}	12/28 (42,86) ^{A,a}	10/46 (21,74) ^{A,B,C,b}
G8 (102)	4/24 (16,66) ^{B,a}	7/35 (20,0) ^{B,C,D,a}	11/43 (25,58) ^{A,B,a}

^{A,B,C,D} Letras diferentes maiúsculas sobrescritas entre linhas da mesma coluna diferem significativamente (p<0,05)

^{a,b,ab} Letras diferentes minúsculas sobrescritas dentro do mesmo grupo na mesma linha diferem significativamente (p<0,05)

4.3 Metáfase I (MI)

Após 48 horas de cultivo, a taxa mais elevada de oócitos em metáfase I (31,42%) coube ao grupo 7 (co-cultivo em células da tuba uterina com suplementação de progesterona), enquanto o grupo 6 (co-cultivo em células da tuba uterina sem suplementação de hormônios esteróides) apresentou a menor porcentagem de oócitos em MI (1,82%) (Tabela 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2, 3, 7 e 8, mas estes últimos apresentaram taxas significativamente superiores às dos grupos 1, 4, 5 e 6 (Tabela 4). Às 72 horas de avaliação, o grupo 8 apresentou maior porcentagem de oócitos em MI (25,71%), porém não diferiu estatisticamente dos grupos 1, 3 e 5. A menor taxa de metáfase I após 72 horas correspondeu ao grupo 6 (5,97%), o qual se mostrou, estatisticamente, distinto dos grupos 1, 2, 4 e 7. Quando as taxas de oócitos em metáfase I às 96 horas de cultivo foram comparadas, o grupo 7 apresentou a maior porcentagem (30,43%), entretanto, não distinguiu-se significativamente dos grupos 2, 4 e 8. A menor taxa de oócitos em MI coube ao grupo 5 (5,00%), e não houve diferença estatística significativa relativamente aos grupos 1, 3, 4 e 6.

Comparando-se os diferentes períodos de maturação, apenas no grupo 2 (suplementação com estrógeno) e no grupo 7 (co-cultivo com células da tuba uterina com suplementação de progesterona) houve diferenças estatisticamente significativas. Taxas superiores de oócitos em metáfase I foram verificadas às 96 horas de cultivo no grupo 2 (30,23%). Para o grupo 7, as porcentagens de MI foram superiores às 48 horas, porém não diferiram das concernentes às 96 horas, as

quais, por sua vez, não apresentaram diferença significativa com respeito à taxa de oócitos avaliados às 72 horas (Tabela 4).

Tabela 4 - Número absoluto e porcentagem de oócitos de cadelas em metáfase I nos diferentes grupos às 48, 72 e 96 horas de maturação *in vitro* - São Paulo – 2003

GRUPOS (nº total oócitos)	HORAS		
	48	72	96
G1 (105)	3/33 (9,09) ^{B,C,a}	6/41 (14,63) ^{A,B,C,D,a}	4/31 (12,90) ^{B,C,a}
G2 (124)	8/41 (19,51) ^{A,B,ab}	4/40 (10,00) ^{B,C,D,b}	13/43 (30,23) ^{A,a}
G3 (122)	6/30 (20,00) ^{A,B,a}	11/51 (21,57) ^{A,B,a}	6/41 (14,63) ^{B,C,a}
G4 (131)	2/36 (5,55) ^{B,C,a}	11/55 (20,00) ^{A,B,C,a}	7/40 (17,50) ^{A,B,C,a}
G5 (164)	4/52 (7,69) ^{B,C,a}	2/52 (3,85) ^{D,a}	3/60 (5,00) ^{C,a}
G6 (180)	1/55 (1,82) ^{C,a}	4/67 (5,97) ^{C,D,a}	4/58 (6,89) ^{C,a}
G7 (109)	11/35 (31,42) ^{A,a}	3/28 (10,71) ^{B,C,D,b}	14/46 (30,43) ^{A,ab}
G8 (102)	4/24 (16,66) ^{A,B,C,a}	9/35 (25,71) ^{A,a}	11/43 (25,58) ^{A,B,a}

^{A,B,C,D} Letras diferentes maiúsculas sobrescritas entre linhas da mesma coluna diferem significativamente (p<0,05)
^{a,b,ab} Letras diferentes minúsculas sobrescritas dentro do mesmo grupo na mesma linha diferem significativamente (p<0,05)

4.4 Metáfase II (MII)

Ao se comparar as taxas de oócitos em metáfase II às 48 horas de cultivo, não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados, embora o grupo 3 tenha apresentado a maior porcentagem de oócitos em MII (3,33%) (Tabela 5). Este mesmo perfil também foi observado após 72 horas de

maturação oocitária, entretanto, neste período, a maior taxa correspondeu ao grupo 4 (3,63%). Em referência ao período de maturação de 96 horas, o grupo 1 (sem suplementação com hormônios esteróides) apresentou taxa de oócitos em metáfase II (6,45%) significativamente superior às dos grupos 4, 5, 7 e 8, porém não se revelou estatisticamente distinta das taxas concernentes aos grupos 2, 3 e 6.

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com respeito aos períodos de maturação oocitária para os oito grupos contemplados neste estudo, embora houvesse a tendência de os oócitos maturarem a metáfase II após 96 horas de cultivo (Tabela 5).

Tabela 5 - Número absoluto e porcentagem de oócitos de cadelas em metáfase II nos diferentes grupos às 48, 72 e 96 horas de maturação *in vitro* - São Paulo – 2003

GRUPOS (nº total oócitos)	HORAS		
	48	72	96
G1 (105)	0/33 (0,0) ^{A,a}	0/41 (0,0) ^{A,a}	2/31 (6,45) ^{A,a}
G2 (124)	1/41 (2,44) ^{A,a}	0/40 (0,0) ^{A,a}	1/43 (2,32) ^{A,B,a}
G3 (122)	1/30 (3,33) ^{A,a}	0/51 (0,0) ^{A,a}	1/41 (2,44) ^{A,B,a}
G4 (131)	0/36 (0,0) ^{A,a}	2/55 (3,63) ^{A,a}	0/40 (0,0) ^{B,a}
G5 (164)	0/52 (0,0) ^{A,a}	0/52 (0,0) ^{A,a}	0/60 (0,0) ^{B,a}
G6 (180)	0/55 (0,0) ^{A,a}	1/67 (1,49) ^{A,a}	3/58 (5,17) ^{A,B,a}
G7 (109)	0/35 (0,0) ^{A,a}	0/28 (0,0) ^{A,a}	0/46 (0,0) ^{B,a}
G8 (102)	0/24 (0,0) ^{A,a}	0/35 (0,0) ^{A,a}	0/43 (0,0) ^{B,a}

^{A,B} Letras diferentes maiúsculas sobrescritas entre linhas da mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$)

^{a,b,ab} Letras diferentes minúsculas sobrescritas dentro do mesmo grupo na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$)

4.5 Outros (degenerados ou não passíveis de determinação)

Quando os oócitos foram avaliados às 48 horas de cultivo, verificou-se maior taxa de degenerados ou não passíveis de determinação (54,54%) para o grupo 6 (co-cultivo de células tuba uterina com suplementação de estrógeno), enquanto o grupo 4 (suplementação com estrógeno e progesterona) apresentou a menor porcentagem (13,8%) (Tabela 6). Porém, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos 6 e 5, e o mesmo se deu com relação aos grupos 4, 1, 2, 3, 7 e 8, sendo estes últimos os grupos com porcentagens inferiores de oócitos degenerados ou não passíveis de determinação. De forma semelhante, o grupo 6 apresentou a maior taxa de estruturas degeneradas ou não passíveis de determinação (59,70%) às 72 horas de cultivo, enquanto novamente ao grupo 4 coube a menor porcentagem (12,73%). As diferenças estatísticas verificadas às 72 horas assemelham-se às correspondentes às 48 horas, descritas anteriormente. Com referência ao período de maturação de 96 horas, maiores taxas de degenerados ou não passíveis de determinação (76,66%) foram verificadas para o grupo 5, estatisticamente superior aos demais grupos. Em contrapartida, o grupo 3 apresentou a menor porcentagem (7,32%), não diferindo significativamente dos grupos 1, 2, 4, 7 e 8 (Tabela 6).

Para o grupo 5, o período de cultivo apresentou influência sobre a taxa de estruturas degeneradas ou não passíveis de determinação, pois às 96 horas esta porcentagem foi estatisticamente superior aos percentuais correspondentes aos períodos de 72 e 48 horas (Tabela 6). Por outro lado, o grupo 3 apresentou perfil inverso, ou seja, conforme o período de cultivo aumentou, houve significativa

redução na porcentagem de oócitos degenerados ou não passíveis de determinação, principalmente entre os períodos de 72 e 96 horas. Em relação aos demais grupos, não houve diferença significativa de estruturas degeneradas ou não passíveis de determinação entre os tempos de cultivo (Tabela 6).

Tabela 6 - Número absoluto e porcentagem de oócitos de cadelas degenerados ou não passíveis de determinação nos diferentes grupos às 48, 72 e 96 horas de maturação *in vitro* - São Paulo – 2003

GRUPOS (nº total oócitos)	HORAS		
	48	72	96
G1 (105)	9/33 (27,27) ^{B,C,a}	16/41 (39,02) ^{B,C,a}	7/31 (22,58) ^{C,a}
G2 (124)	13/41 (31,71) ^{B,C,a}	10/40 (25,00) ^{C,D,a}	9/43 (20,93) ^{C,a}
G3 (122)	8/30 (26,66) ^{B,C,a}	8/51 (15,68) ^{D,ab}	3/41 (7,32) ^{C,b}
G4 (131)	5/36 (13,8) ^{C,a}	7/55 (12,73) ^{D,a}	5/40 (12,50) ^{C,a}
G5 (164)	22/52 (42,31) ^{A,B,b}	26/52 (50,00) ^{A,B,b}	46/60 (76,66) ^{A,a}
G6 (180)	30/55 (54,54) ^{A,a}	40/67 (59,70) ^{A,a}	32/58 (55,17) ^{B,a}
G7 (109)	6/35 (17,14) ^{C,a}	5/28 (17,86) ^{D,a}	8/46 (17,39) ^{C,a}
G8 (102)	6/24 (25,00) ^{B,C,a}	7/35 (20,00) ^{D,a}	9/43 (20,93) ^{C,a}

^{A,B,C,D} Letras diferentes maiúsculas sobrescritas entre linhas da mesma coluna diferem significativamente (p<0,05)

^{a,b,ab} Letras diferentes minúsculas sobrescritas dentro do mesmo grupo na mesma linha diferem significativamente (p<0,05)

As atuais biotécnicas da reprodução possuem potencial indiscutível tanto para o desenvolvimento de estudos de fisiologia como para a amplificação de características zootécnicas, principalmente nas espécies de produção. Para os canídeos, o emprego das técnicas reprodutivas *in vitro* contribuem para a urgente necessidade de preservação de material genético, especialmente para espécies ameaçadas de extinção, particularmente com respeito ao manejo de pequenas populações em zoológicos (GOODROWE et al., 2000). Entretanto, para a utilização satisfatória das técnicas de reprodução assistida é preciso conhecimento dos padrões endócrinos e mecanismos de controle do ciclo estral, fator imperativo para a utilização rotineira dessas biotécnicas para a espécie canina. Os estudos da maturação *in vitro* de oócitos caninos ainda são limitados, tal fato contrasta com o avanço das pesquisas concernentes a outras espécies (FUJII et al., 2000).

As modificações fisiológicas do sistema reprodutivo à época do desenvolvimento folicular, ovulação e maturação oocitária, contribuem para a emergência de alterações celulares do oócito; tais mudanças culminam com a finalização da primeira divisão meiótica. Todavia, tais alterações *in vivo*, ainda não estão completamente definidas para a espécie canina, o que prejudica adaptações das condições de cultivo *in vitro*. Sabe-se que a maturação oocitária ocorre sob altas concentrações de progesterona, em um microambiente (tuba uterina) previamente modificado por ações estrogênicas. O principal objetivo dos protocolos de maturação oocitária em cães é mimetizar as condições hormonais *in vivo*, porém os experimentos até agora efetuados com tal propósito não alcançaram êxito pleno, pois as taxas de maturação alcançadas são reduzidas quando comparadas às espécies de produção, variando de 0 a 42% (FARSTAD, 2000a; SAINT-DIZIER et al., 2001b).

Quando a maturação oocitária de cadelas em diferentes fases do ciclo estral é comparada torna-se evidente que a competência meiótica depende de fatores hormonais específicos. Otoi et al. (2001) afirmam que a capacidade dos oócitos para a maturação *in vivo* é influenciada por hormônios os quais, por sua vez, contribuem positivamente para o desenvolvimento do próprio oócito. De fato, oócitos com diâmetro superior a 120 μm apresentam maior taxa de maturação nuclear e são obtidos em maior proporção de ovários em fase folicular (OTOI et al., 2000b; OTOI et al., 2001). Durante as fases de diestro ou anestro, os folículos ovarianos apresentam alta porcentagem de oócitos com diâmetros menores, enquanto na fase folicular a proporção de oócitos de maior diâmetro é mais elevada (OTOI et al., 2000b). No presente estudo, as cadelas selecionadas apresentavam-se em anestro, ou seja, sem a presença de hormônios sexuais circulantes, tal fato, em parte, pode ser responsável pelas reduzidas taxas de oócitos que progrediram até o estágio de metáfase II (aproximadamente 6%). Entretanto, foi possível verificar que, em determinados grupos, o desenvolvimento nuclear dos oócitos ocorreu até o estágio de metáfase I, em proporção de até 30%. Bolamba et al. (2002) sugerem dever-se, a baixa taxa de maturação oocitária no cão, ao fato de que o estímulo pré-ovulatório para as células da tuba uterina favorece a síntese de fatores estimuladores da maturação nuclear. No presente experimento esses fatores não se fizeram presentes, pois, conforme afirmado acima, foram utilizadas cadelas em anestro, e, como sabido, nessa condição tanto seus folículos ovarianos como as células de suas tubas uterinas não sofrem o impacto dos aludidos fatores de estimulação.

Durante o período de desenvolvimento oocitário, após o pico de LH, as células da granulosa sintetizam e depositam uma matriz extracelular mucoelástica, responsável pela expansão dos complexos cumulus-oócito (SALUSTRI et al., 1993).

As células da granulosa possuem, ainda, função nutritiva para o oócito, por meio de um mecanismo de comunicação próprio, desempenhado por junções do tipo GAP, pelo qual há troca de nutrientes e precursores metabólicos (LUVONI et al., 2001). De acordo com o estágio de maturação do oócito, as células da granulosa estimulam de forma constante as modificações bioquímicas, especialmente a fosforilação de proteínas oocitárias (SALUSTRI et al., 1993). Por este motivo, um dos principais parâmetros para a seleção de oócitos para cultivo *in vitro* é a aparência morfológica dos complexos cumulus-oócito (LUVONI et al., 2001) porque o número de camadas de células do cumulus é um importante fator para a aquisição da competência meiótica. Entretanto, a comunicação entre as células somáticas e o oócito depende do estágio do ciclo estral, pois, durante o anestro, não ocorre a formação de junções GAP, responsáveis pela constante nutrição dos oócitos. De acordo com Bogliolo et al. (2002), durante o anestro altera-se a comunicação existente entre o compartimento somático e germinativo dos oócitos, um dos fatores apontados para explicar as baixas taxas de maturação durante esta fase do ciclo estral, mesmo após 72 ou 96 horas de cultivo.

Na tentativa de simular a maturação de oócitos de cadela *in vivo*, diversas pesquisas empenham-se em suplementar os meios de cultivo com fatores reconhecidamente importantes para o estímulo da maturação em outras espécies. A adição de fatores de crescimento, proteínas e células epiteliais já foi testada, associada ou não a hormônios, principalmente os sexuais e gonadotrofinas (FARSTAD, 2000a). A inclusão de hormônios nos meios de maturação tem como objetivo principal mimetizar o microambiente ao qual o oócito está submetido durante o período de maturação *in vivo*. Este trabalho associou tanto a suplementação com hormônios esteróides e gonadotrofinas como o co-cultivo de células da tuba uterina,

na tentativa de produzir, artificialmente, as condições de maturação oocitária em cães.

Os hormônios gonadotróficos desempenham papel fundamental no desenvolvimento dos folículos ovarianos e, indiretamente, do oócito em crescimento. A onda pré-ovulatória de LH induz a quebra da vesícula germinativa *in vivo*, pois reduz a comunicação existente entre as células do cumulus e o oócito (EPPIG, 1993). Desta forma, o transporte de substâncias inibitórias da competência meiótica através das junções do tipo GAP é cessado, isto, indiretamente, provoca a quebra da vesícula germinativa do oócito. O LH estimula, ainda, a síntese de um sinal indutor para o início da meiose, possivelmente representado pelo cálcio (EPPIG, 1993). No entanto, o transporte de cálcio das células da granulosa para o oócito é possível somente através das junções GAP. O aumento intra-oocitário dos níveis de cálcio é responsável pela redução do AMPc e este mecanismo, por sua vez, é o evento pelo qual se dá a quebra da vesícula germinativa e, portanto, o início da meiose.

O FSH tem participação primordial na expansão dos complexos cumulus-oócito, mediada, provavelmente, por AMPc (SALUSTRI et al., 1993). Os oócitos que adquirem competência meiótica passam a sintetizar um fator solúvel requerido para a produção de ácido hialurônico pelas células da granulosa, componente essencial da matriz extracelular durante a expansão das células do cumulus. Por este motivo, a aludida expansão depende do estágio de desenvolvimento oocitário, com exceção da espécie suína, na qual pode haver expansão apenas em resposta à ação do FSH. Em raposas, Krogenaers et al. (1993) verificaram o aumento dos níveis de AMPc dos oócitos cultivados em meio de maturação contendo FSH, com aumento não significativo de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II. Além do fator

parácrino, componentes do fluido folicular e do soro fetal bovino (SFB) podem estimular as células da granulosa a se manterem responsivas às gonadotrofinas e a sintetizarem o ácido hialurônico (EPPIG, 1993). No presente trabalho, a suplementação com gonadotrofinas (FSH e LH) foi utilizada independentemente do grupo experimental, desta maneira, não exerceu influência como um fator de variação. Por outro lado, o fato de oócitos de fêmeas em anestro apresentarem reduzido número de junções GAP com as células da granulosa (LUVONI et al., 2001) pode ter influenciado negativamente o desempenho do LH e FSH, na medida em que as gonadotrofinas atuam diretamente nessa comunicação.

A importância da suplementação dos meios de cultivo com gonadotrofinas foi anteriormente abordada por Hewitt e England (1998b) os quais constataram a ineficiência desses hormônios em estimular e sustentar a maturação *in vitro*, embora estudos relacionando dose-resposta ainda não tenham sido conduzidos. Segundo Salustri et al. (1993), o EGF pode substituir o FSH no estímulo das células da granulosa para a produção de ácido hialurônico. Estudando o efeito da suplementação hormonal nos meios de maturação, Russ et al. (1998) verificaram o efeito positivo de fatores de crescimento, como o EGF, principalmente quando associados a gonadotrofinas, favorecendo a expansão das células do cumulus. Já Rodrigues e Rodrigues (2003a) testaram a suplementação com hormônios e proteínas e constataram que a adição de BSA pode aumentar a taxa de oócitos que atingem metáfase I, porém sem o devido suporte para as etapas finais da maturação nuclear, essa conclusão corrobora o estudo de Hewitt, Watson e England (1998).

Os hormônios esteróides participam efetivamente do processo de maturação nuclear oocitária na medida em que promovem modificações bioquímicas diretas no oócito ou na tuba uterina. Esta constatação foi inicialmente descrita por Nickson et

al. (1993), que observaram efeito positivo da adição do soro de cadelas em estro ao meio de maturação, e posteriormente corroborada por Otoi et al. (1999). Neste último experimento os autores comparam os efeitos da suplementação com soro de cadelas em estro, metaestro e anestro e verificaram que um número significativo de oócitos atingiu os estágios de metáfase I e II da maturação nuclear em meio contendo soro de fêmeas em estro.

No presente experimento a participação dos hormônios esteróides, estrógeno e progesterona sobre as taxas de maturação nuclear dos oócitos foi bastante variável. A avaliação efetuada após 48 horas indicou que o grupo contendo progesterona (grupo 3) apresentou as menores taxas de vesícula germinativa, porém a maior proporção de oócitos em metáfase II, sugerindo que a progressão dos estágios de VG para MII ocorreu no grupo 3 já nas primeiras horas de maturação *in vitro*. O grupo contendo estrógeno (grupo 2) apresentou as maiores taxas de vesícula germinativa às 72 horas. Entretanto, a maior porcentagem de oócitos em estágio de VG ocorreu no grupo com suplementação de estrógeno e progesterona nos períodos de 48 e 96 horas. Já quando avaliada a taxa de oócitos em quebra da vesícula germinativa, o grupo contendo progesterona apresentou os melhores índices às 72 e 96 horas. Por outro lado, o grupo suplementado com estrógeno mostrou os menores índices de QVG. Evidencia-se, assim, um efeito benéfico da progesterona sobre a quebra da vesícula germinativa, principalmente nos períodos mais avançados de maturação *in vitro*. A progesterona exerce um efeito estimulador sobre a síntese de um fator promotor de maturação (MPF) no oócito, responsável pela quebra da vesícula germinativa (SALUSTRI et al., 1993). Os oócitos de camundongos em estágio de vesícula germinativa não possuem MPF, mas sim em estágio de QVG, com pico máximo quando atingem metáfase II. O

principal mecanismo para a ativação do MPF é a redução dos níveis de AMPc que, por sua vez, é provocada pela ação de gonadotrofinas (SALUSTRI et al., 1993).

O estradiol parece ser o principal responsável pelos estímulos observados nos estágios finais da maturação oocitária, pois exerce importante função no controle das junções do tipo GAP entre as células do cumulus e o oócito (RODRIGUES; RODRIGUES, 2003a). Por outro lado, Fujii et al. (2000) sugerem que a secreção de estrógeno e inibina pelo folículo pré-ovulatório pode suprimir o desenvolvimento dos folículos subordinados. Os resultados da presente pesquisa sugerem que a participação isolada do estrógeno na suplementação hormonal não se mostrou positiva, porém, quando em associação a progesterona, observou-se que os oócitos tenderam a atingir o estágio de metáfase II após 72 horas de cultivo. De acordo com Concannon, Hansel e Mcentee (1977), há uma relação intrínseca entre as concentrações de estrógeno e progesterona durante o ciclo estral na cadela, pois a queda brusca da relação estrógeno-progesterona parece ser a principal responsável pela liberação pré-ovulatória de LH. Desta maneira, o sinergismo existente entre estes dois esteróides no meio de maturação oocitário pode ter contribuído tanto para o estímulo direto à célula germinativa como para criar condições propícias à atuação do LH nas células da granulosa. Por outro lado, os dados obtidos por este estudo confrontam-se aos de Hewitt e England (1997b) que não observaram efeito da suplementação com hormônios esteróides na maturação oocitária *in vitro*, note-se, porém, que os aludidos autores utilizaram concentrações de estrógeno e progesterona (1 µg/ml) inferiores às adotadas neste experimento (20 µg/ml).

A suplementação com progesterona isoladamente foi benéfica à maturação nuclear até o estágio de metáfase II, nas primeiras 48 horas de avaliação. O efeito

positivo da progesterona foi anteriormente referido por Otoi et al. (1999), ao utilizarem soro de cadelas em estro para a suplementação do meio de maturação. Sabe-se que a síntese de progesterona na cadela ocorre mesmo anteriormente à ovulação, portanto, o soro de cadelas em estro apresenta concentrações elevadas de progesterona e proporcionou os melhores índices de maturação nuclear (16,3%) após 72 horas de cultivo (OTOI et al., 1999). Entretanto, no presente estudo, o grupo sem suplementação de hormônios esteróides apresentou a maior taxa de MII às 96 horas de maturação. Assim, é possível inferir que a progesterona pode acelerar o processo de maturação nuclear dos oócitos de cadela, pois, em meios de maturação sem hormônios, também foi possível verificar oócitos em estágio de metáfase II, porém, somente após 96 horas.

Em relação à taxa de estruturas degeneradas ou não identificadas nos grupos com suplementação hormonal, observa-se que a presença de progesterona isoladamente (grupo 3) ou em associação ao estrógeno (grupo 4) promove uma taxa significativamente menor que o grupo sem hormônios esteróides (grupo 1), após 72 horas de maturação. Já a suplementação com estrógeno (grupo 2) não mostrou ser diferente em relação ao grupo controle. Por este motivo, pode-se atribuir à progesterona um efeito inibitório sobre a degeneração dos oócitos de cadelas quando em período de maturação de 72 horas.

A maturação oocitária em cadelas desenvolve-se na porção média da tuba uterina, a partir de oócitos ovulados em vesícula germinativa ou prófase I. Por este motivo, as células da tuba uterina podem ter participação direta nos eventos da maturação. Entretanto, até o momento poucos estudos abordaram o co-cultivo em células da tuba como forma de implementar as taxas de maturação oocitária *in vitro* (BOGLIOLO et al., 2002; BOLAMBA et al., 2002; HEWITT; ENGLAND, 1999b;

LUVONI et al., 2003) essa forma de co-cultivo tem sido utilizada, sobretudo, como alternativa para o estudo da capacitação e avaliação espermática (ELLINGTON; MEYERS-WALLEN; BALL, 1995; PACEY; FREEMAN; ENGLAND, 2000). Nesta pesquisa privilegiou-se o co-cultivo em células da tuba uterina, suplementado ou não com hormônios esteróides, na maturação *in vitro* de oócitos de cadelas; perseguiu-se, portanto, a primeira das abordagens aqui referidas, isto com o fito de contribuir para o preenchimento da lacuna acima apontada.

Às 72 horas de maturação *in vitro*, verificou-se menor porcentagem de oócitos em estágio de vesícula germinativa no grupo de co-cultivo com suplementação de estrógeno (grupo 6), porém, neste mesmo período de avaliação foi possível observar a maior porcentagem de oócitos degenerados, o que permite afirmar que a diminuição da taxa de VG deve-se ao aumento do número de degenerados e não à progressão da maturação oocitária. Esta mesma afirmação também é válida quando considerado o período de 96 horas para o grupo de co-cultivo sem suplementação hormonal (grupo 5), o qual, igualmente, apresentou redução na porcentagem de vesículas germinativas e aumento na proporção de degenerados. Hewitt e England (1999b) compararam a utilização do co-cultivo de células da tuba uterina sem suplementação hormonal ao fluido de oviduto sintético (SOF) na maturação oocitária *in vitro* e verificaram que, tanto o SOF como o co-cultivo, não apresentaram efeito na proporção de oócitos que progrediram aos estágios finais da maturação, mesmo após 96 horas. No presente trabalho, foi possível verificar resposta semelhante, pois para o grupo 5 (co-cultivo de células da tuba uterina sem suplementação com hormônios esteróides) houve progressão ao estágio de quebra da vesícula germinativa, após 72 horas, porém, sem evolução para os estágios avançados de maturação nuclear. Ademais, conquanto não se tenha revelado estatisticamente

significativo, foi observado, ao longo dos períodos de cultivo *in vitro*, aumento da taxa de degenerados.

As células da tuba uterina possuem padrão de secreção diferenciado conforme o perfil hormonal a que estão submetidas (BOGLIOLO et al., 2002; HEWITT; ENGLAND, 1999b). Segundo Verhage et al. (1997), as características bioquímicas do epitélio da tuba uterina são controladas por hormônios esteróides. Desta forma, a utilização do co-cultivo em células da tuba uterina previamente sensibilizado *in vivo* ou *in vitro* por hormônios esteróides pode ajudar a implementar as condições de maturação *in vitro* de oócitos de cadelas uma vez que obedece ao padrão fisiológico. Com base neste argumento, Bogliolo et al. (2002) empregaram, para a maturação oocitária *in vitro*, o co-cultivo de células da tuba uterina obtidas de fêmeas em estro e verificaram o aumento na porcentagem de oócitos que iniciaram a meiose até o estágio de metáfase II, por período de 48 e 96 horas. Quando a maturação oocitária foi avaliada para o grupo 7 deste experimento (co-cultivo em células de tuba uterina com progesterona), foi possível observar efeito benéfico na taxa de oócitos que iniciaram a meiose após 72 horas de maturação (42,86% de oócitos em quebra da vesícula germinativa concomitantemente com reduzida porcentagem de vesículas germinativas); taxa esta significativamente distinta da verificada para o grupo controle (grupo 5). O grupo 7 apresentou, ademais, as melhores taxas de maturação à metáfase I após 48 e 96 horas de cultivo, corroborando os dados obtidos por Bogliolo et al. (2002). Entretanto, é possível utilizar-se o co-cultivo de células da tuba uterina obtidas mediante ovário-histerectomia de cadelas em anestro, co-cultivo esse previamente sensibilizado pela progesterona e no qual se dará a maturação oocitária *in vitro*, ao invés da utilização

do co-cultivo de células da tuba uterina de cadelas em estro, uma vez que, como sabido, é maior a disponibilidade de fêmeas em anestro.

Na maioria das espécies, após a ovulação, quando há decréscimo dos níveis estrogênicos e acréscimo da progesterona, ocorre a perda da atividade ciliar e secretória do epitélio da tuba uterina, mediada por receptores (VERHAGE et al., 1997). Ainda pensando em termos genéricos, sabe-se que a síntese de glicoproteínas pelas células secretoras da tuba uterina está diretamente relacionada ao estímulo estrogênico e são produzidas em toda sua superfície, exceto na ovelha em que o processo em foco limita-se à ampola e infundíbulo (VERHAGE et al., 1998). Ademais, a síntese e liberação das glicoproteínas da tuba uterina reduzem-se muito quando progestágenos exógenos são administrados (VERHAGE et al., 1998). Em contrapartida, na cadela, o principal hormônio esteróide envolvido nos mecanismos da ovulação, maturação oocitária e fertilização é a progesterona. De fato, os resultados deste experimento reforçam esta idéia, já que a maior taxa de maturação oocitária para o estágio de metáfase I, às 96 horas de avaliação, ocorreu para o grupo 7 (co-cultivo de células da tuba uterina com progesterona). Porém, o grupo de co-cultivo com células da tuba uterina suplementado com estrógeno e progesterona (grupo 8) apresentou a maior taxa de oócitos em metáfase I às 72 horas e também taxa superior de oócitos em quebra da vesícula germinativa (25,58%) quando comparada ao grupo controle (grupo 5) às 96 horas de maturação. Portanto, nesta espécie, tanto o estrógeno como a progesterona devem desempenhar importante papel no desenvolvimento das células epiteliais da tuba uterina e, desta maneira, na maturação nuclear dos oócitos. Embora o grupo de co-cultivo com células da tuba uterina suplementado unicamente com estrógeno (grupo 6) tenha apresentado taxa de maturação nuclear a metáfase II de 5,17% às 96

horas, também apresentou alta taxa de oócitos degenerados ou não passíveis de determinação, taxa esta estatisticamente significativa em relação às correspondentes aos demais grupos. Assim, a suplementação apenas com estrógeno no co-cultivo de células da tuba uterina não se mostrou benéfica para a maturação nuclear de oócitos de cadelas, principalmente quando comparada à suplementação associada ou não à progesterona.

Quando foi realizada a comparação entre os processos de maturação *in vitro* com e sem co-cultivo de células da tuba uterina não foram observadas diferenças relevantes que beneficiassem a maturação nuclear. Notou-se, apenas, aumento na taxa de oócitos em estágio de quebra da vesícula germinativa ao longo do tempo para o grupo com co-cultivo de células da tuba uterina suplementado com progesterona (grupo 7), o que poderia sugerir efeito positivo no início da meiose. Contudo, neste mesmo grupo não se observou acréscimo da taxa dos oócitos que atingiram os estágios finais da maturação. Para explicar este resultado pode-se aventar duas hipóteses distintas: ou o meio de maturação empregado foi suficiente para estimular o início da meiose, mas não se revelou capaz de suportá-la; ou o simples fato de se extrair o oócito do folículo ovariano e, portanto, simular a retirada de fatores inibitórios provocados pelo LH, tenha sido bastante para estimular a quebra da vesícula germinativa, sem necessariamente haver ocorrido competência meiótica (EPPIG et al., 1993).

Segundo diversos autores, o processo de maturação oocitária *in vivo* completa-se, aproximadamente, em 3 ou 4 dias (BOGLIOLO et al., 2002; FUJII et al., 2000; OTOI et al., 2000c). Entretanto, os estudos *in vitro* adotam período de maturação variável, desde 48 até 96 horas, independentemente da fase do ciclo estral em que se encontram as fêmeas doadoras. Mais recentemente, as pesquisas

concernentes às biotécnicas da reprodução tendem a empregar o período de 72 horas nos protocolos de maturação *in vitro* (OTOI et al., 2002; RODRIGUES; RODRIGUES, 2003b). Todavia, tal escolha não tem como base pesquisas sistemáticas para identificar os períodos de maturação adequados para diferentes condições de cultivo. Luvoni et al. (2003) verificaram ter sido, o período de incubação de 30 horas, suficiente para que os oócitos iniciassem a meiose, embora tal lapso temporal não se tenha demonstrado amplo o bastante para que a maturação alcançasse os estágios de metáfase I e II. Entretanto, ao se estender o período de maturação para 48 horas observou-se maior taxa de oócitos degenerados. Contudo, não houve padronização da fase do ciclo estral das fêmeas doadoras, pois os referidos autores não a consideraram como fator relevante de variação. No presente estudo, foram testados três diferentes períodos de cultivo para oócitos obtidos de fêmeas em anestro. Embora sem evidência estatística, as maiores taxas de oócitos em metáfase II foram atingidas depois de decorridas 96 horas de maturação. Para os grupos 2 (suplementação com estrógeno) e 7 (co-cultivo em células da tuba uterina contendo suplementação com progesterona), o período de cultivo de 96 horas apresentou as maiores taxas de oócitos em metáfase I. Desta forma, muito embora o objetivo principal deste estudo não tenha sido o de comparar períodos de maturação para oócitos obtidos de fêmeas em diferentes estágios do ciclo estral, é possível aventar ser o período de maturação um fator a se ter em conta em futuros experimentos, vale dizer: é possível que existam distintos períodos de maturação mais favoráveis para os oócitos obtidos de cadelas em diferentes fases do ciclo estral.

Neste experimento, o tempo de permanência mais prolongado dos oócitos em cultivo *in vitro*, para fêmeas em anestro, mostrou ser benéfico para taxas de

maturação até metáfase II. Por outro lado, é importante ressaltar que o período de maturação de 96 horas também acentuou a porcentagem de oócitos degenerados, conforme observado para o grupo 5 (co-cultivo em células da tuba uterina sem suplementação hormonal). Destarte, urge pesquisas no sentido de esclarecer as necessidades adequadas do cultivo *in vitro* para diferentes condições hormonais das fêmeas doadoras.

Segundo Eppig (1993), a maturação oocitária é definida como o reinício da meiose com progressão subsequente à metáfase II, concomitantemente a processos citoplasmáticos essenciais à fertilização e desenvolvimento embrionário. Entretanto, ao se analisar a interpretação dos dados obtidos em estudos de maturação oocitária na espécie canina, além de autores que concordam com a definição de Eppig (1993) observam-se pesquisadores cujas opiniões são discordantes. Assim, alguns autores adotam o estágio de quebra da vesícula germinativa como referente ao restabelecimento da meiose e aos estágios de metáfase I, anáfase I e metáfase II como maturação nuclear completa (BOLAMBA; BORDEN-RUSS; DURRANT, 1998; HEWITT; ENGLAND, 1997b; LUVONI et al., 2003; RODRIGUES; RODRIGUES, 2003b). No presente trabalho, optou-se por classificar os estágios de desenvolvimento nuclear separadamente, obtendo-se taxa de maturação nuclear até metáfase II de 6,45% para o grupo controle sem co-cultivo em células da tuba uterina e de 30,43% de oócitos em metáfase I para o grupo 7 (co-cultivo em células da tuba uterina com suplementação de progesterona). Embora não tenha sido o parâmetro adotado por esta pesquisa, a classificação agrupada da maturação nuclear oocitária pode ser pertinente, principalmente por ser a fisiologia da espécie canina parcialmente desconhecida. Saint-Dizier et al. (2001b) demonstraram que a penetração do espermatozóide no oócito pode induzir a meiose *in vitro*,

principalmente nos estágios mais precoces do desenvolvimento nuclear. Desta forma, oócitos em estágio de metáfase I podem ser penetrados por espermatozóides; é possível, ademais, ter este fato um efeito estimulador sobre a meiose fazendo-a alcançar a metáfase II *in vivo*.

No estudo vertente foi possível observar ser a maturação nuclear *in vitro* de oócitos de cadelas uma biotécnica inovadora para a reprodução em cães. Por outro lado, o processo, para os cães, revelou-se muito delicado e ineficaz em relação ao êxito atualmente alcançado quando empregado em bovinos e suínos. Embora outros experimentos já tenham abordado fatores importantes para o estudo da maturação oocitária em cães, tais como suplementação (protéica ou hormonal) do meio de cultivo, idade e fase do ciclo estral das fêmeas doadoras, tamanho e morfologia dos complexos cumulus-oócito e tempo de maturação; outros experimentos são necessários para a futura adequação das novas biotécnicas da reprodução (MIV, FIV e CIV). Em cães, a utilização dos processos reprodutivos *in vitro* será importante para avaliação clínica de infertilidade e, ainda, como auxiliar no manejo reprodutivo de espécies silvestres com fisiologia reprodutiva semelhante à do cão doméstico.

Nas condições deste estudo e com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

- 1) O estudo da maturação de oócitos de cães em sistemas de cultivo *in vitro*, a partir de ovários obtidos por ovário-histerectomia, é plenamente exeqüível além de permitir a pesquisa de características reprodutivas fisiológicas da espécie;
- 2) Houve influência positiva da suplementação hormonal no desenvolvimento oocitário *in vitro*, particularmente com referência à adição de progesterona, associada ou não ao estrógeno;
- 3) Não houve influência significativa do co-cultivo de células da tuba uterina na maturação oocitária, em comparação aos meios de cultivo, sem presença de células epiteliais da tuba uterina, suplementados com hormônios esteróides;
- 4) Embora não se tenha observado significância do ponto de vista estatístico, verificou-se que os oócitos, obtidos de cadelas em anestro, desenvolveram-se ao estágio de metáfase II após o período de maturação de 96 horas, tal fato sugere o aprofundamento desta questão em estudos futuros.

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. 03, p. 265-273, 2002.

BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K. D.; DURRANT, B. S. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultures in advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 933-942, 1998.

BOLAMBA, D.; RUSS, K. D.; OLSON, M. A.; SANDLER, J. L.; DURRANT, B. In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**, v. 58, n. 9, p. 1689-1703, 2002.

CONCANNON, P. W.; HANSEL, W.; MCENTEE, K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. **Biology of Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 604-613, 1977,

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

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.

ELLINGTON, J. E.; MEYRES-WALLEN, V. N.; BALL, B. A. Establishment of coculture system for canine sperm and uterine tube epithelial cells. **Veterinary Record**, v. 136, n. 21, p. 542-543, 1995.

ENGLAND, G. C. W.; VERSTEGEN, J. P.; HEWITT, D. A. Pregnancy following in vitro fertilization of canine oocytes. **Veterinary Record**, v. 148, n. 1, p. 20-22, 2001.

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

FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canide species. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p.175-186, 2000a.

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

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

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

GUÉRIN, C. Fécondation in vitro chez la chienne. Où en est-on? **Pratique Médicale et Chirurgicale des Animaux de Compagnie**, v. 33, p. 155-161, 1998.

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Canine spermatozoa – cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v. 48, n. 8, p. 1329-1342, 1997b.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 50, n. 1/2, p. 123-139, 1997a.

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

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 83-91, 1997b. Suplement 51.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Incidence of oocyte nuclear maturation within the ovarian follicle of the bitch. **Veterinary Record**, v. 143, n. 21, p. 590-591, 1998b.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Influence of gonadotrophin supplementation on the in vitro maturation of bitch oocytes. **Veterinary Record**, v. 144, n. 9, p. 237-238, 1999a.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 55, n. 1, p. 63-75, 1999b.

HEWITT, D. A.; WATSON, P. F.; ENGLAND, G. C. W. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v. 49, n. 6, p. 1083-1101, 1998.

HOLST, B. S.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, n. 1, p. 77-83, 2000.

KROGENAES, A.; NAGYOVÁ, E.; FARSTAD, W.; HAFNE, A. L. In vitro maturation of blue fox and camp production in oocyte-cumulus cell complexes. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 250, 1993.

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

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

McDOUGALL, K.; HAY, M. A.; GOODROWE, K. L.; GARTLEY, C. J.; KING, W. A. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, preipubertal and mature bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 25-31. 1997. Supplemment 51.

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

MYERS, R. K.; COOK, J. E.; MOSIER, J. E. Comparative aging changes in canine uterine tubes (oviducts). Electron microscopy. **Amercian Journal of Veterinary Research**. v. 45, n. 10, p. 2008-2014, 1984.

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

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

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Bitch oocyte diameter in relation to meiotic competence. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 464, 2000a.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 535-542, 2000b.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, n. 7-8, p. 387-390, 1999.

OTOI, T.; MURAKAMI, M.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; UNE, S.; SUZUKI, T. Development of canine oocytes matured and fertilized in vitro. **Veterinary Record**, v. 146, n. 2, p. 52-53, 2000c.

OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI, M.; KARJA, N. W. K.; SUZUKI, T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. **Reproduction and Fertility Development**, v. 13, n. 2/3, p. 151-155, 2001.

OTOI, T.; WILLINGHAM, L.; SHIN, T.; KRAEMER, D. C.; WESTHUSIN, M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. **Reproduction**, v. 124, n. 6, p. 775-781, 2002.

PACEY, A. A.; FREEMAN, S. L.; ENGLAND, G. C. W. Contact of dog spermatozoa with homologous uterine tube epithelium prolongs flagellar activity in relation to the stage of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 109-118, 2000.

RENTON, J. P.; BOYD, J. S.; ECKERSALL, P. D.; FERGUNSON, J. M.; HARVEY, M. J. A.; MULLANEY, J.; PERRY, B. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, n. 1, p. 221-231, 1991.

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

RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 59-66, 2003b.

RUSS, K. D.; BOLAMBA, D.; HARPER, S. A.; SANDLER, J. L.; DURRANT, B. S. Effects of epidermal growth factor and hormones on cumulus expansion and nuclear maturation of cultured dog oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 147, 1998. Supplement 2.

SAINT-DIZIER, M.; RENARD, J. P.; CHASTANT-MAILLARD, S. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 97-105, 2001a.

SAINT-DIZIER, M.; SALOMON, J. F.; PETIT, C.; RENARD, J. P.; CHASTANT-MAILLARD, S. In vitro maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.147-50, 2001b. Supplemment 57.

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

SAS Institute Inc., **SAS user's guide: statistics**. Ver. 5 ed. Cary: SAS Institute. 2000.

STAROS, A. L.; KILLIAN, G. J. In vitro association of six oviductal fluid proteins with the bovine zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, n. 1, p. 131-137, 1998.

VERHAGE, H. G.; FAZLEABAS, A. T.; MAVROGIANIS, P. A.; O'DAY-BOWMAN, M. B.; SCHMIDT, A.; ARIA, E. B.; JAFFE, R. C. Characteristics of an oviductal glycoprotein and its potential role in fertility control. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 217-226, 1997. Supplemment 51.

VERHAGE, H. G.; MAVROGIANIS, P. A.; O'DAY-BOWMAN, M. B.; SCHMIDT, A.; ARIAS, E. B.; DONNELLY, K. M.; BOOMSMA, R. A.; THIBODEAUX, J. K.; FAZLEABAS, A. T.; JAFFE, R. C. Characteristics of an oviductal glycoprotein and its potential role in the fertilization process. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 5, p. 1098-1101, 1998.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Maturation, fertilization and development of dog oocyte in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 46, n. 5, p. 853-858, 1992.

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

ANEXO A – Meio de lavagem

M 199 com HEPES	5,0 ml
BSA V	0,015 g
Piruvato 0,2mM	10 µl
Kanamicina ou Gentamicina	25 µl
Filtrar em 0,22 µm	

ANEXO B – Meio de maturação (meio MIV)

M 199 com BICARBONATO	5,0 ml
BSA FAF	0,015 g
Piruvato	10 µl
Kanamicina ou Gentamicina	25 µl
FSH	25 µl
LH	3,6 µl
Filtrar em 0,22 µm	
Progesterona	25 µl
Estradiol	5 µl

ANEXO C – Solução de fixação**Paraformaldeído 4%**

5 ml de água destilada

0,4 g de paraformaldeído

1 gota de NaOH (1N)

Homogenizar em placa aquecida até a solução ficar transparente

Adicionar 5 ml de PBS (2X). Ajustar o pH em 7,0 a 7,4

Paraformaldeído com Triton 100X

9 ml de paraformaldeído

1 ml Triton 100X