

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**MATURAÇÃO E FECUNDAÇÃO "*IN VITRO*" DE OVÓCITOS DE CANINOS DOMÉSTICOS  
(*CANIS FAMILIARIS*)**

**BERENICE DE ÁVILA RODRIGUES**

PORTO ALEGRE

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**MATURAÇÃO E FECUNDAÇÃO "*IN VITRO*" DE OVÓCITOS DE CANINOS DOMÉSTICOS  
(*CANIS FAMILIARIS*)**

**BERENICE DE ÁVILA RODRIGUES<sup>1</sup>**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção  
do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de  
Reprodução Animal

**Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues**

PORTO ALEGRE

2003

---

<sup>1</sup> Médica veterinária, Mestre em Reprodução Animal

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**BERENICE DE ÁVILA RODRIGUES**

**MATURAÇÃO E FECUNDAÇÃO "*IN VITRO*" DE OVÓCITOS DE CANINOS DOMÉSTICOS**  
**(*CANIS FAMILIARIS*)**

**Aprovada em 12 de dezembro 2003**

**APROVADO POR:**

---

**Prof. Dr. José Luiz Rodrigues**

**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos**

**Membro da Comissão**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara I. B. Rubin**

**Membro da Comissão**

---

**Dr<sup>a</sup>. Lígia Pegoraro**

**Membro da Comissão**

*Com efeito, o desejo ardente do conhecimento é o único móvel que atrai e sustenta o investigador em seus esforços. E é precisamente esse conhecimento que ele aprende de modo real e que sempre lhe escapa que se torna, ao mesmo tempo, o seu único tormento e sua única felicidade.*

*Claude Bernard*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todos que contribuíram para a concretização deste estudo.

Ao professor Doutor José Luiz Rigo Rodrigues pela oportunidade e pela confiança outorgadas, assim como pela orientação conferida durante a realização dos experimentos.

Ao professor Carlos Bacelar, proprietário do canil Infinitus, e sua esposa Eliete pela gentileza na concessão das instalações e pela cooperação entusiasta e carinhosa na disposição dos doadores de sêmen utilizados nos experimentos.

Aos colegas e funcionários do HCV da Faculdade de Veterinária da UFRGS pela atenção e solicitude dispensadas na cessão dos ovários de cadelas e gatas, que foram usados em vários experimentos durante a realização deste estudo.

Aos colegas clínicos veterinários da Grande Porto Alegre e do Vale do Sinos, em especial à Clínica Veterinária Arca de Noé (SL), que com carinho e desprendimento colaboraram para que os experimentos se mantivessem em andamento, através da doação de ovários de pacientes submetidas à ovariectomia, naqueles estabelecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, em especial às veterinárias Fabiana Forell, Lucila dos Santos e Eliana Lopes Franco, pelo apoio e pelo auxílio inestimável em diferentes momentos da realização deste estudo.

À senhora Leda, funcionária do laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, pela gentileza e pela simpatia de todos os dias.

À minha filha Carolina, pela paciência e pelo carinho nos momentos mais difíceis da execução deste estudo.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>2.1 Anatomia e vascularização ovariana na cadela</b> .....	18
<b>2.2 Oogênese</b> .....	18
<b>2.3 Foliculogênese</b> .....	19
<b>2.4 Endocrinologia reprodutiva na cadela</b> .....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	21
Introdução.....	21
O Ciclo estral.....	22
Hormônios.....	22
Perfil hormonal e morfológico do ciclo estral da cadela.....	23
Proestro.....	24
Estro.....	25
Metaestro/diestro.....	26
Anestro.....	28
Consideração final.....	29
<b>2.5 Maturação ovocitária</b> .....	29
<b>2.5.1</b> Maturação de ovócitos <i>in vivo</i> .....	29
<b>2.5.2</b> Maturação de ovócitos <i>in vitro</i> .....	30
<b>2.6 Fecundação ovocitária</b> .....	33
<b>2.6.1</b> Fecundação de ovócitos <i>in vivo</i> .....	33
<b>2.6.2</b> Fecundação de ovócitos <i>in vitro</i> .....	35
<b>2.6.3</b> Capacitação e reação acrosssômica <i>in vitro</i> .....	36
<b>3 ARTIGO 1</b>	
<b>EFFECT OF TWO TEMPERATURES ON <i>IN VITRO</i> NUCLEAR MATURATION OF BITCH OOCYTES: RELATION TO TIME CULTURE INTERVALS (EFEITO DE DUAS TEMPERATURAS NA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OVÓCITOS DE CADELAS: RELAÇÃO COM TEMPO DE CULTIVO)</b> .....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	38
INTRODUCTION.....	39
MATERIALS AND METHODS.....	39
Ovaries and collection of oocytes.....	39
<i>In vitro</i> maturation.....	39
Assessment of nuclear stage of maturation.....	40
RESULTS AND DISCUSSION.....	40

#### **4 ARTIGO 2**

<b>MEIOTIC RESPONSE OF <i>IN VITRO</i> MATURED CANINE OOCYTES UNDER DIFFERENT PROTEINS AND HETEROLOGOUS HORMONE SUPPLEMENTATION</b> .....	43
CONTENTS.....	43
INTRODUCTION.....	43
MATERIALS AND METHODS.....	44
Ovaries and collection of oocytes.....	44
<i>In vitro</i> maturation.....	45
Assessment of nuclear stage of maturation.....	45
STATISTICAL ANALYSIS.....	45
RESULTS.....	45
DISCUSSION.....	47

#### **5 ARTIGO 3**

<b>INFLUENCE OF REPRODUCTIVE STATUS ON <i>IN VITRO</i> OOCYTE MATURATION IN DOGS</b> .....	51
ABSTRACT.....	51
INTRODUCTION.....	51
MATERIALS AND METHODS.....	52
Ovaries and collection of oocytes.....	52
<i>In vitro</i> maturation.....	53
Assessment of nuclear stage of maturation.....	53
STATISTICAL ANALYSIS.....	53
RESULTS.....	53
DISCUSSION.....	55

#### **6 ARTIGO 4**

<b>EMBRYONIC DEVELOPMENT OF <i>IN VITRO</i> MATURED AND <i>IN VITRO</i> FERTILIZED DOG OOCYTES</b> .....	57
ABSTRACT.....	57
INTRODUCTION.....	58
MATERIALS AND METHODS.....	59
Experiment 1.Effect of hormonal supplementation with human somatotropin (hST) and estradiol concentrations.....	59
Recovery and culture of oocytes.....	59
<i>In vitro</i> maturation.....	59
Assessment of nuclear stage of maturation.....	60
Experiment 2. <i>In vitro</i> fertilization at different reproductive states.....	60
Sperm preparation.....	60
Assessment of sperm quality and capacitation status of spermatozoa.....	60

<i>In vitro</i> fertilization (IVF) and <i>in vitro</i> culture (IVC).....	61
STATISTICAL ANALYSIS.....	62
RESULTS.....	62
Experiment 1. Effect of hormonal supplementation with hST and estradiol concentrations.....	62
Experiment 2. <i>In vitro</i> fertilization at different reproductive states.....	62
DISCUSSION.....	63
ACKNOWLEDGMENTS.....	66
<b>7 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO A: DIAGRAMA DA OOGÊNESE.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO B: RECENT APPROACHES TO THE STUDY OF <i>IN VITRO</i> OOCYTE MATURATION AND <i>IN VITRO</i> FERTILIZATION OF CANINE OOCYTES.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO C: MATURATION OF CANINE OOCYTES IN TCM- 199 SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT PROTEINS.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO D: MEIOTIC RESPONSE OF <i>IN VITRO</i> MATURED CANINE OOCYTES UNDER HETEROLOGOUS HORMONE SUPPLEMENTATION.....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO E: <i>IN VITRO</i> OOCYTE MATURATION OF PRE-COOLED DOMESTIC CAT OVARIES.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO F: MATUREÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OVÓCITOS FELINOS.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO G: EFEITO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE HEPARINA NA CAPACITAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ESPERMATOZÓIDES CANINOS.....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO H: COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA NA CAPACITAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SÊMEN CANINO.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO I: EFEITO DO PRÉ-RESFRIAMENTO OVARIANO SOBRE A INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DE OVÓCITOS DE GATAS DOMÉSTICAS (<i>FELIS CATUS</i>).....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO J: CLIVAGEM DE OVÓCITOS MATURADOS E FECUNDADOS <i>IN VITRO</i> DE CADELAS NOS ESTÁGIOS FOLICULAR, LUTEAL E ANESTRO DO CICLO ESTRAL.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO K: MENSAGEM DR. GWATKIN- aceite de artigo no periódico <i>Molecular Reproduction and Development</i>.....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO L: MENSAGEM DR. OTOI- confirmação embriões caninos.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO M: MENSAGEM DR. CARMONA- confirmação aceite para publicação do artigo 1.....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO N: CONVITE PARA PARTICIPAÇÃO NO 5<sup>o</sup>. PRÊMIO INTERNACIONAL DE PESQUISA DO INSTITUTO ROYAN (Irã).....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO O: MEIOS USADOS NOS EXPERIMENTOS.....</b>	<b>116</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

AI- anáfase I  
AMPc- monofosfato de adenosina cíclica  
bFGF- fator de crescimento fibroblástico básico  
BSA- albumina sérica bovina  
Ca<sup>2+</sup>-cálcio  
CCM- meio de capacitação canino  
CDC- controle de divisão celular  
CIV- cultivo *in vitro*  
EBS- estrous bitch serum  
ECS- estrous cow serum  
EGF- fator de crescimento epidérmico  
Fert- TALP medium- TALP meio de fecundação  
FIV- fecundação *in vitro*  
FSH- hormônio folículo estimulante  
GnRH- hormônio liberador de gonadotrofina  
hCG- gonadotrofina coriônica humana  
HEPES- ácido N-2 hidroxietil-piperazina N<sup>2</sup>-2 sulfato de etanol  
IGF-I- fator de crescimento similar à insulina  
IVC- *in vitro* culture  
IVM- *in vitro* maturation  
IVF- *in vitro* fertilization  
IVP- *in vitro* production  
Kd- quilodalton  
LH- hormônio luteinizante  
MAPkinase- proteína quinase de ativação mitogênica  
MI- metáfase I  
MII- metáfase II  
MIV- maturação *in vitro*  
MPF- fator proteico promotor de maturação  
mRNA- ácido ribonucleico mensageiro  
NaHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de sódio  
PGF-2 $\alpha$  -prostaglandina F2 $\alpha$   
RNA- ácido ribonucleico  
SOF- meio sintético de fluido de oviduto  
Sperm- TALP medium- TALP meio espermático  
TALP- Tyrode albumina lactato  
TCM- 199- Tissue Culture Medium 199  
TE-transferência embrionária  
TGF-alpha- fator alfa de transformação de crescimento

Thr 14- threonina

TRH- hormônio liberador de tireotrofina

TRIS- tris-hidroxy- methyl- amino -metano

Tyr 15- tirosina

VG- vesícula germinal

ZP- zona pelúcida

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

TABELA 1- Two combined temperatures and three time culture intervals on the <i>in vitro</i> nuclear maturation of bitch oocytes.....	42
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### ARTIGO 2

TABELA 1- The <i>in vitro</i> nuclear maturation rates of canine oocytes exposed to different heterologous hormone supplementation.....	46
TABELA 2- The <i>in vitro</i> nuclear maturation rates of canine oocytes exposed to different proteins.....	47

### ARTIGO 3

TABELA 1- The mean ( $\pm$ S.D.) number of oocytes recovered from bitches at different reproductive stages.....	54
TABELA 2- Meiotic rate of canine oocytes recovered at different reproductive stages.....	54

### ARTIGO 4

TABELA 1- Composition of Synthetic Oviduct Fluid (SOF) medium.....	67
TABELA 2- Effects of hST supplemented maturation medium and estradiol concentrations on nuclear maturation of bitch oocytes.....	67
TABELA 3 - Effect of presence of ovarian functional structures on the recovery of high morphologically quality and total oocyte number in the bitch.....	67
TABELA 4- Relationship between oocyte fertilization and bitch estrous cycle stages.....	68
TABELA 5- Developmental capacity of <i>in vitro</i> matured canine oocytes recovered from bitches at different reproductive states.....	68
TABELA 6- Correlation coefficients of pronuclei formation and cleavage or cleavage in relation to acrosome reacted (AR) and capacitated spermatozoa (B- pattern).....	69

### ANEXOS

ANEXO C- The <i>in vitro</i> nuclear maturation rates of canine oocytes exposed to different proteins.....	102
ANEXO D- The stage of <i>in vitro</i> nuclear maturation of bitch oocytes under heterologous hormone supplementation.....	104
ANEXO E- Meiotic progression of fresh and cooled cat oocytes after <i>in vitro</i> maturation.....	105

## LISTA DE FIGURAS

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>FIGURA 1</b> - Controle neuroendócrino na fêmea pré-púbere.....	22
<b>FIGURA 2</b> - Citologia vaginal de proestro.....	24
<b>FIGURA 3</b> - Ovócitos caninos primários (prófase I).....	26
<b>FIGURA 4</b> - Momento da ovulação e período fecundante na cadela.....	26

### ARTIGO 4

<b>FIGURA 1</b> - an oocyte stained with Hoechst 33342 at 72 h after insemination, showing a male and a female pronucleus (320X).....	69
<b>FIGURA 2</b> - 4-8 cells embryo after fixation and staining, showing the blastomeres (320X).....	69
<b>FIGURA 3</b> - two eight-cells canine embryos resulting from <i>in vitro</i> fertilization of oocyte matured <i>in vitro</i> ; 72 h after insemination (200X).....	69
<b>ANEXO A</b> : Diagrama da oogênese.....	93
<b>ANEXO B</b> :	
<b>FIGURA 1</b> - A photomicrograph of a 4-8 cell cleavage stage <i>in vitro</i> -produced canine embryo.....	98

## RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de 1) determinar a eficácia de duas temperaturas (37<sup>o</sup> C e 39<sup>o</sup> C) e três intervalos de tempo (48, 72 e 96h) comumente usados na maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos caninos, 2) verificar o efeito de hormônios heterólogos: hormônio foliculo estimulante (FSH) 0,5µg/ml, estradiol 20µg/ml e somatotropina humana (hST) 1µg/ml; e o efeito de proteínas: 0,4 % albumina sérica bovina (BSA), 10 % de soro de vaca em estro inativado (SVE), e 10 % soro de cadela em estro inativado (SCE) na maturação nuclear de ovócitos caninos, 3) observar a influência da condição reprodutiva das doadoras de ovários (folicular, diestro, anestro, piometra, e prenhez) sobre os índices de maturação *in vitro* ovocitária, 4) verificar a habilidade para fecundação *in vitro* de ovócitos coletados de fêmeas em diferentes estágios do ciclo estral, previamente maturados *in vitro* e adicionalmente, examinar sua capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro*. O meio de maturação usado nos experimentos foi TCM-199 suplementado com 25 mM Hepes/l (v/v) com 10 % de soro de vaca em estro inativado (SVE), 50 µg/ml de gentamicina, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio, 22 µg/ml de ácido pirúvico, 1 µg/ml de estradiol, 0,5 µg/ml de FSH e 0,03 UI/ml de hCG. O meio de maturação era modificado de acordo com a proposta experimental apresentada. Os resultados do primeiro experimento não mostraram diferença estatística no índice de meiose de ovócitos maturados à 37°C ou à 39°C em quaisquer dos intervalos testados (48, 72, 96 horas), embora a proporção de ovócitos que alcançaram metáfase II a 37°C após 72 horas da maturação *in vitro*, mostrasse uma tendência estatística à significância (p = 0,064), quando comparada àquela dos ovócitos maturados à 39°C. Foi concluído que temperaturas de 37°C e 39°C são similares para maturação *in vitro* de ovócitos de cadelas. No segundo experimento deste estudo, os índices mais elevados (p < 0,05) de retomada da meiose após 72 horas de maturação *in vitro* foram obtidos, quando TCM 199 era suplementado com 0,4 % de BSA. Uma influência positiva sobre a aquisição de metáfase II (MII) foi observada com a suplementação de 1µg/ml de hST no meio de maturação. Ao contrário, ovócitos maturados em TCM 199 com 10 % de soro de cadela em estro não se desenvolveram até o estágio de MII. Os resultados deste experimento mostraram que a suplementação de proteínas e de hormônios ao TCM-199 não facilitam as etapas finais da maturação *in vitro* de ovócitos de cadelas. No terceiro experimento, os resultados de maturação dos ovócitos não mostraram diferença estatística na progressão do material nuclear até o estágio de MII entre os ovócitos provenientes de cadelas em várias condições reprodutivas (fase folicular: 5,4 %; diestro: 4,2 %; anestro: 4,4 %; piometra: 8,1 % e prenhez: 4,7 %). A retomada da meiose mostrou índices de 24,6 % na fase folicular, 19,6 % no diestro, 16,4 % no anestro, 37,1 % na piometra e 29,2 % na prenhez. Índices positivos e mais elevados de resíduo acima do valor esperado foram observados para as condições de piometra e de prenhez nos estádios de metáfase/anáfase I (MI/AI). Nossos resultados indicam que a maturação nuclear *in vitro* de ovócitos caninos não é influenciada pela condição reprodutiva *in vivo* da fêmea no momento da coleta ovariana. No experimento de fecundação *in vitro* (FIV), 888 ovócitos selecionados através de sua qualidade morfológica superior foram distribuídos em 3 grupos de acordo com o estágio do ciclo estral da doadora em: a) folicular, b) anestro, c) luteal. Após período de 48 horas de maturação a 37°C em TCM 199 suplementado com 25 mM Hepes/l (v/v), com 10 % soro de vaca em estro inativado (SVE), 50 µg/ml de gentamicina, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio, 22 µg/ml de ácido pirúvico, 20 µg/ml de estradiol, 0,5 µg/ml de FSH, 0,03 UI/ml hCG e 1 µg/ml de hST, os ovócitos eram fecundados *in vitro* (2x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml) por um período de 24 horas. A percentagem de ovócitos nucleados desenvolvendo-se em embriões foi de 10,1 % (27/ 267). O índice de clivagem (2-8 células) após cinco dias da FIV foi similar nas fases reprodutivas (folicular, anestro, e luteal). Contudo, o índice geral de fecundação foi superior nos ovócitos oriundos de cadelas nos estágios folicular (42,4 %) e anestro do ciclo (34,3 %) comparativamente àqueles provenientes da fase luteal (18,6 %) (p < 0,001). Além disso, foi verificada influência da fase folicular sobre o desenvolvimento de pronúcleos, com os índices nesta fase (24,2 %) sendo estatisticamente diferentes daqueles observados no anestro e na fase luteal (9,6 % e 3,7 %, respectivamente) (p < 0,004). Não foi estabelecida correlação entre a proporção de espermatozoides capacitados ou com reação acrossômica e formação pronuclear e/ou percentagem de clivagem.

Em resumo, conclui-se que:

- a) ovócitos caninos podem ser maturados *in vitro* de forma similar às temperaturas de 39°C e 37°.
- b) a adição de hormônios (FSH, estradiol, hST) e proteínas (BSA, SVE, SCE) ao meio TCM 199 não eleva os índices de maturação nuclear até o estágio de MII de ovócitos caninos maturados *in vitro*.
- c) em cães, a seleção de ovócitos com base na coleta dentro de um estágio específico do ciclo estral não deve ser usada para prever índices de meiose ou habilidade para desenvolvimento embrionário *in vitro*.

d) ovócitos caninos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* podem se desenvolver a zigotos com até 8 células.

Palavras chave: canino, ovócito, *in vitro*, maturação, fecundação, clivagem, temperatura, ciclo estral.

## ABSTRACT

This study was designed 1) to determine the effectiveness of two commonly employed *in vitro* maturation (IVM) temperatures (37<sup>o</sup> C and 39<sup>o</sup> C) and three *in vitro* maturation time culture intervals (48, 72 and 96h) to produce nuclear mature dog oocytes, 2) to assess the effects of heterologous hormones: follicle-stimulating hormone (FSH) 0,5µg/ml, estradiol 20µg/ml, and human somatotropin (hST)1µg/ml; and the effects of proteins: 0.4 % bovine serum albumin (BSA), 10 % inactivated estrous cow serum (ECS), and 10 % inactivated estrous bitch serum (EBS) on oocyte nuclear maturation of dog oocytes, 3) to observe the influence of bitch reproductive status (follicular, diestrus, anestrus, pyometra, and pregnancy) on *in vitro* oocyte maturation rates, 4) to verify the ability of *in vitro* matured oocytes recovered from females at different estrous cycle stages to be *in vitro* fertilized, and additionally to examine their capacity to embryonic development *in vitro*. Basic medium used in the experiments was TCM- 199 supplemented with 25 mM Hepes/l (v/v), with 10 % heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50 µg/ml gentamicin, 2.2 mg/ml sodium bicarbonate and 22 µg/ml pyruvic acid, 1 µg/ml oestradiol, 0.5 µg/ml FSH and 0.03 IU/ml hCG. Maturation medium was modified following the beyond described experimental proposals.

Despite the proportion of oocytes that reached the metaphase II (MII) stage at 37°C after 72 h of *in vitro* culture, tended to be higher ( $p = 0.064$ ) when compared with that matured at 39°C, the results of the first experiment showed that there was no statistical difference in the rate of meiosis of oocytes matured at 37°C or at 39°C at any time point (48, 72, 96h). It was concluded that temperatures of 37°C and 39°C are similar to the *in vitro* culture of bitch oocytes.

In the second experiment of this study, the highest rates ( $p < 0.05$ ) of meiotic resumption after 72 hours of IVM were achieved when TCM 199 was added with 0.4 % BSA. A positive influence on the MII acquisition rate was observed with 1µg/ml hST supplement in maturation medium. On the contrary, oocytes cultured in TCM 199 with 10% estrous bitch serum supplementation did not develop to the MII stage. The results in this experiment showed that the protein and hormone supplements added to TCM-199 culture medium tested did not improve the final steps of *in vitro* maturation of bitch oocytes.

In the third experiment, the results of oocyte maturation showed no statistical difference in nuclear progression to the MII stage among oocytes retrieved from bitches at various reproductive states (follicular phase, 5.4 %; diestrus, 4.2 %; anestrus 4.4 %; pyometra, 8.1 % and pregnancy, 4.7 %). Resumption of meiosis was 24.6 % at the follicular phase, 19.6 % for diestrus, 16.4 % for anestrus, 37.1 % for pyometra and 29.2 % for pregnancy. Positive and higher numbers of residue above the expected value were observed for the pyometra and pregnancy conditions at the metaphase/anaphase I (MI/AI) stages. Our results indicate that *in vitro* nuclear maturation of dogs oocytes is not influenced by the *in vivo* reproductive status of the female at the moment of oocyte retrieval.

In the *in vitro* fertilization (IVF) experiment, oocytes ( $n = 888$ ) selected for high morphological quality were distributed into 3 groups according the donor's estrous cycle stage: a) follicular, b) anestrus, c) luteal stage. After 48h of maturation at 37°C in TCM 199 supplemented with 25 mM Hepes/l (v/v), with 10 % heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50 µg/ml gentamicin, 2.2 mg/ml sodium bicarbonate, 22 µg/ml pyruvic acid, 20 µg/ml estradiol, 0.5 µg/ml FSH, 0.03 IU/ml hCG and 1 µg/ml hST, the oocytes were submitted to 24h of *in vitro* fecundation ( $2 \times 10^6$  cells/ml). Percentage of nucleated oocytes developing into embryos was 10.1 % (27/ 267). Cleavage rate (2-8 cell stages embryos) after 5 days of IVF was similar among the reproductive categories (follicular, anestrus, and luteal). However, the overall fertilization rate was observed to be superior on oocytes derived from bitches at follicular phase (42.4 %) and anestrus (34.3 %) than at the luteal phase (18.6 %) ( $p < 0.001$ ). Furthermore, there was an effect of follicular phase on pronucleus development, in which rate at that phase (24.2 %) was statistically different from those at anestrus and luteal stages (9.6 % and 3.7 %, respectively) ( $p < 0.004$ ). There was no correlation between the proportion of capacitated or acrosome reacted spermatozoa and pronuclei formation and/or cleavage percentage.

In summary, it is concluded that:

- canine oocytes can be *in vitro* matured at 39°C and 37°C temperatures.
- addition of hormones (FSH, estradiol, hST) and proteins (BSA, ECS, EBS) to TCM 199 does not improve the nuclear *in vitro* maturation rate of canine oocytes to the MII stage.
- in dogs, selection of oocytes based on a specific estrous cycle stage should not be used to predict an expected frequency of *in vitro* meiotic maturation or ability to *in vitro* embryo development.
- canine oocytes *in vitro* matured, *in vitro* fertilized and *in vitro* cultured are capable of development to 8- cell embryos.

**Key words:** canine, oocyte, *in vitro*, maturation, fertilization, cleavage, estrous cycle.

## 1 INTRODUÇÃO

O avanço do conhecimento científico, responsável pelo êxito na aplicação de técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial e a conservação seminal no cão, permitiu com que tecnologias avançadas como a fecundação *in vitro* e a transferência de embriões se tornassem alvos de pesquisa importantes na exploração dos fenômenos reprodutivos em caninos domésticos e selvagens.

Estas áreas constituem na atualidade um segmento em expansão da medicina veterinária, porque a destruição do habitat de diferentes espécies de plantas e de animais, entre os quais vários canídeos, e que é gerada pelo sinergismo entre a elevação da temperatura do globo terrestre e diferentes formas de desestruturação ambiental provocadas pelo homem, vêm estimulando a preocupação pela preservação da biodiversidade no planeta.

Experimentos realizados com gametas de cães (*Canis familiaris*) são considerados importantes, no momento em que o cão, sendo usado como modelo experimental, pode responder a uma série de questões da fisiologia reprodutiva de canídeos selvagens, considerando-se as similaridades entre as espécies.

Dessa forma, a definição de um sistema adequado de cultivo *in vitro* para ovócitos e espermatozóides possibilitaria a expansão de técnicas de reprodução assistida, facilitando os procedimentos de coleta e a produção de embriões, e conseqüentemente a conservação de gametas. A crioconservação do germoplasma poderá constituir-se na próxima etapa para salvaguardar a diversidade genética em populações mantidas em cativeiro ou sob ameaça de extinção. Não obstante o caráter futuro, a perspectiva de aplicação dessas técnicas em caninos é bastante real.

Mais adiante, o trabalho a nível celular que contribui para a facilitação ou a inibição da fecundação vem por sua vez auxiliar na introdução de novos métodos de controle populacional em caninos domésticos, constituindo-se numa opção atraente para substituir os métodos contraceptivos cirúrgicos e hormonais em vigor.

A competência na maturação (citoplasmática e nuclear) e no desenvolvimento (fecundação, formação de pronúcleo e clivagem) de ovócitos de caninos *in vitro* continua até o presente momento bastante limitada, apesar dos esforços continuados de diferentes equipes laboratoriais ao redor do mundo.

Na tentativa de elevar os índices embrionários de produção *in vitro* (PIV) a partir de ovócitos caninos, a pesquisa nesta área tem focalizado o desenvolvimento de um meio de cultivo que possa preencher os requisitos imprescindíveis ao estabelecimento da competência meiótica celular.

Vários fatores, que incluem a adição ou remoção de componentes do meio, como proteínas, esteróides, gonadotropinas, hormônios e fatores de crescimento, fluido e/ou células de oviduto, assim como a seleção ovocitária com base na fase do ciclo estral da fêmea no momento da remoção ovariana, constituem alguns dos aspectos explorados no sentido de contribuir para o sucesso na maturação extra-corporal de ovócitos oriundos de cadelas.

Não obstante, não existe até o presente momento uma solução para o problema da eficiência reduzida no desenvolvimento embrionário *in vitro* em caninos domésticos.

Sabe-se que, ovócitos caninos podem ser penetrados e fecundados *in vitro* por espermatozóides homólogos. No entanto, a deficiência na aquisição de estádios mais avançados de desenvolvimento, a



saber mórula e blastocisto continua sendo o reflexo de um sistema operacional de maturação pouco adaptado às exigências da espécie.

Neste sentido, o aperfeiçoamento de técnicas para produção de sistemas *in vitro* em caninos domésticos é requerido, de forma que a sua aplicabilidade possa ser repassada a espécies selvagens que se encontrem em situação de vulnerabilidade em seu habitat natural e/ou sob ameaça de extinção e que, adicionalmente, contribuam para o estabelecimento de procedimentos que auxiliem a contornar os obstáculos reprodutivos em caninos domésticos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Anatomia e vascularização ovariana na cadela

Os ovários caninos são estruturas orgânicas de formato ovalado. Envoltores pela *Bursa ovarica* e suspensos pelo mesovário, estão localizados à altura das 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> vértebras lombares, em situação caudal aos rins (SCHUMMER et al., 1995).

Os ovários na cadela apresentam um comprimento médio de 20mm e possuem uma largura de aproximadamente 15mm. As medidas orgânicas estão relacionadas ao tamanho corporal, à idade e ao estágio do ciclo estral (DIETERICH, 1994). No anestro, as dimensões são inferiores a 1,5x 1,0x 0,8 cm (ENGLAND, 1999).

O suprimento arterial é efetuado bilateralmente pela *A. ovarica* por divisão da *A. abdominal* à altura da 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> vértebras lombares. Ramificações da *A. ovarica* conectam-se ao ovário e se inserem na zona vasculosa (WAIBL et al., 1996). Estas ramificações formam em direção à zona parenquimatosa uma rede capilar muito fina, responsável pela nutrição dos ovócitos (LIEBICH, 1993).

O fluxo venoso orgânico é efetuado do lado direito pela *V. ovarica*, que se origina da *V. caudalis*, enquanto o fluxo do lado esquerdo tem origem na *V. renalis*. Nas proximidades dos ovários, as veias formam um plexo capilar ao redor dos ramos da *A. ovarica*. Após entrada no hilo ovariano, as veias se agrupam na zona vascular, onde se inserem à rede capilar (KÖSTER, 1999).

### 2.2 Oogênese

O processo conhecido como oogênese inicia-se nos mamíferos do sexo feminino durante o desenvolvimento embrionário. As células germinativas primordiais que são células grandes, arredondadas e fosfatase alcalina reagente positivas (RÜSSE e SINOWATZ, 1991), migram do endoderma do saco vitelino e do alantóide do embrião para o local de diferenciação gonadal, isto é, o ovário primitivo, onde por crescimento e divisões mitóticas transformam-se em oogônias (GORDON, 1994; ENGLAND, 1999). Esta fase de multiplicação se encerra na cadela, somente pouco após o nascimento (THEISS, 1997), considerando-se que o ovário nessa espécie não apresenta por ocasião do nascimento nenhum folículo primordial (BAUMGARTINGER, 1996).

No período correspondente às duas semanas pós-parto, as oogônias começam a se dividir (GORDON, 1994). Com o ingresso na Meiose I, estágio pré-leptoteno, as oogônias evoluem para ovócitos primários. Em algumas espécies, tais como humanos, eqüinos, ruminantes e cavídeos, este processo acontece antecipadamente ao nascimento, em suínos e em felinos logo após e em caninos, leporídeos e cricetos somente nas primeiras semanas subsequentes a esse evento (ANDERSEN, 1970). Os ovócitos primários, aderidos uns aos outros por conexões intercelulares, passam sucessivamente pelos estádios da prófase I, conhecidos como leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno e dictoteno (ALBERTS et al., 1994).

Ao completar a prófase da 1<sup>a</sup> divisão meiótica, na forma morfológica conhecida como vesicular, as conexões intercelulares se desfazem (BAUMGARTINGER, 1996).

Os ovócitos primários, com 30 a 50µm, envoltos por uma camada fina de células foliculares, constituem assim os folículos primordiais (THEISS, 1997), que são observados nos caninos três semanas após o nascimento (BAUMGARTINGER, 1996).

Neste momento, o ovócito interrompe sua atividade, que somente será retomada na fase folicular pré-ovulatória (BUCCIONE et al., 1990; HOLDEFLEISS, 1998).

Dois meses após o nascimento, quando a oogênese se conclui (ANDERSEN, 1970), todos os folículos primordiais com o número definitivo de ovócitos já terão se formado (THEISS, 1997; ENGLAND, 1999). Este número, que inicialmente corresponde a 700.000, reduz-se na puberdade para 355.000 (SCHOTTERER, 1928), dos quais 99 % não são ovulados (LEISER, 1990).

### 2.3 Foliculogênese

Foliculogênese é definida como o processo responsável pela formação e pelo desenvolvimento dos folículos nos ovários. Na cadela, a foliculogênese inicia com a formação dos folículos primordiais após o nascimento, em um intervalo situado entre 02 e 12 semanas (ANDERSEN e SIMPSON, 1973). Por outro lado, Mc Dougall et al. (1997) sugerem, que a presença de oogônias em diferenciação à ocorrência do primeiro estro, é indicativa nessa espécie da persistência da foliculogênese ainda na puberdade.

Foliculogênese do estágio primordial para o pré-ovulatório é regulada pela interação de fatores endócrino, parácrino e autócrino no ovário (JEWGENOW, 1998). Fatores de crescimento peptídico, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator alfa de transformação de crescimento (TGF-alpha), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e fator de crescimento similar à insulina (IGF-I), parecem estar envolvidos de modo importante na foliculogênese ovariana (JEWGENOW, 1996), provavelmente durante os estágios de crescimento pré-antral e antral precoce (CORTVRINDT e SMITZ, 2001).

Dentro do seu mecanismo dinâmico, a foliculogênese é caracterizada por proliferação acentuada e diferenciação das células somáticas, que compõem o folículo (ARMSTRONG e WEBB, 1997).

O folículo é a unidade funcional e ambiental que abriga o ovócito e o local no qual, através da liberação de gonadotropinas, da produção de hormônios esteróides, diferentes peptídeos, relaxina e fatores de crescimento, se processa seu crescimento e maturação (HAFEZ, 1993; HOLDEFLEISS, 1998).

Os folículos primordiais, presentes nos ovários caninos ao redor da 3<sup>a</sup> semana pós-nascimento (MC DOUGALL et al., 1997), abrigam os ovócitos de 1<sup>a</sup> ordem. Eles evoluem para folículos primários, quando a única camada de células escamosas (foliculares) sofre diferenciação, tornando-se cuboidal (HOLDEFLEISS, 1998; BARBER et al., 2001).

Através de divisões mitóticas celulares, o folículo primário com um diâmetro de 30 a 100 µm, circundado por uma camada cuboidal de células da granulosa, evolui para secundário, que é constituído por diversas camadas adicionais de células da granulosa (geralmente em número de cinco). A apresentação estrutural multilaminar é conhecida como *Stratum granulosum* (THEISS, 1997; BYSTED, 1999). Na cadela, o

diâmetro de um folículo secundário fica situado entre  $102 \pm 36,60\mu\text{m}$  (DOLEZEL et al., 2003) e  $148,9\mu\text{m}$  (BARBER et al., 2001).

Quando o diâmetro folicular alcança um tamanho de  $50\mu\text{m}$ , forma-se entre o ovócito e as células da granulosa, a estrutura conhecida como zona pelúcida (ZP) (PICTON, 2001). A zona pelúcida, neste momento com  $3,5\mu\text{m}$  de espessura, continua sua expansão no decorrer da foliculogênese, tendo sido verificado espessura de  $7,2\mu\text{m}$ , quando os folículos chegam a secundários (BARBER et al., 2001).

Por regulação hormonal endógena, possivelmente de dependência do hormônio folículo estimulante (FSH) (GORE-LANGTON e DANIEL, 1990), fluido se acumula entre as células da granulosa (GOSDEN et al., 1988). O espaço extra-celular se expande e dá origem à formação cavitária conhecida como *Antrum folliculare* (BUCCIONE et al., 1990). O antrum forma o folículo terciário ou antral, que recebe quando maduro a denominação de folículo de Graaf e que, na cadela, desenvolve-se com o ingresso na puberdade (RÜSSE e SINOWATZ, 1991).

Andersen e Simpson (1973) relatam que os ovócitos nos caninos alcançam seu diâmetro máximo com a formação do *antrum*, quando o diâmetro folicular registra  $350,8\mu\text{m}$  (BARBER et al., 2001). A zona pelúcida adquire neste momento espessura de 5 a  $9,5\mu\text{m}$  (ANDERSEN e SIMPSON, 1973; BARBER et al., 2001), e é envolta por 3 a 5 camadas de células da granulosa.

No folículo antral observam-se dois tipos de células da granulosa com funções distintas. As células granulosas do Cumulus oophorus são organizadas como um epitélio pseudo-estratificado e envolvem o ovócito. Já as células granulosas murais constituem as camadas internas da parede folicular e formam um epitélio pseudo-estratificado em contato com a lâmina basal, adjacente à teca externa (BUCCIONE et al., 1990). As células granulosas murais cessam sua proliferação com o desenvolvimento continuado da estrutura folicular, vindo a expressar atividade enzimática através da aromatase P-450 e mais tarde passam a expressar receptores LH.

As células do cumulus formam uma sub-população de células da granulosa cuja função é fornecer nutrientes aos ovócitos durante seu crescimento, participar na formação da ZP e sintetizar a matriz extracelular composta por proteínas e pelo polissacarídeo ácido hialurônico (PM 2,500Kd), de importância no transporte ou na atração dos espermatozoides no oviduto (BEDFORD e KIM, 1993; TOSHIMORI, 2000). Estas células e as células da *corona radiata*, constituem a camada de contato direto com o ovócito.

As células da granulosa são importantes como precursoras nas trocas metabólicas e nutricionais com o ovócito no folículo (BUCCIONE, et al., 1990). Vários estudos demonstraram que elas influenciam a função ovocitária durante o desenvolvimento folicular de uma maneira particular (BUCCIONE et al., 1990; JEWGENOW e GÖRITZ, 1995).

As células da granulosa, murais e cumulus oophorus formam com o ovócito um sincício poroso de junções mediadas (*gap junction-mediated syncytium*) (BUCCIONE et al., 1990).

Quando a cadela completa 6 a 7 meses, o tamanho folicular no ovário varia bastante, embora não exceda a  $0,5\text{mm}$ . Neste momento, a maioria dos folículos terciários encontra-se em diferentes estágios de degeneração (ANDERSEN e SIMPSON, 1973).

## 2.4 Endocrinologia reprodutiva na cadela

(Reproductive endocrinology in the bitch)

**B.A. Rodrigues<sup>1</sup>; J.L. Rodrigues<sup>1</sup>**

(artigo publicado no periódico Clínica Veterinária, ano VII, n.40, setembro/outubro, p.50-58, 2002)

### Resumo

Na fêmea canina, a manifestação dos eventos endócrinos durante o ciclo estral segue um padrão particular. Aspectos peculiares até hoje parcialmente elucidados, como a expressão ou a inibição hormonal nas fases do ciclo e durante os momentos de transição entre as mesmas são pouco difundidos na literatura. O objetivo desta revisão bibliográfica é reunir dados recentes relacionados aos aspectos endocrinológicos da fisiologia reprodutiva da cadela. Também a atividade biológica das gonadotrofinas FSH e LH, dos esteróides estradiol e progesterona, e do hormônio peptídico prolactina é apresentada, enfatizando-se as variações de suas concentrações séricas durante os eventos do ciclo. A atualização dos conhecimentos nessa área poderá servir de suporte teórico aos colegas na condução de técnicas reprodutivas de forte apelo na clínica veterinária, tais como os serviços de supervisão de ciclo estral e de inseminação artificial.

**Unitermos:** Espécie canina, ciclo estral, endocrinologia, hormônio

### Abstract

The endocrine events during the canine oestrous cycle follow a particular pattern. Unique aspects related to hormonal expression or inhibition in the oestrous cycle phases, as well as during the transition periods, are until today poorly understood and scarcely described in literature. The aim of this review is to gather recent data on endocrine features of the reproductive physiology of the bitch. Biological activities of the gonadotrophins follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), of the steroids oestradiol and progesterone, and of the peptidic hormone prolactin are presented, with emphasis on the variations on plasma concentrations during the cycle. Up-to-date knowledge on this area could help veterinarians to make use of appealing reproductive techniques, like oestrous cycle supervision and artificial insemination.

**Key words:** Canine species, oestrous cycle, endocrinology, hormones

### Introdução

No decorrer dos últimos 30 anos, experimentos relacionados aos mecanismos de ação hormonal em canídeos domésticos (*Canis familiaris*) levaram à expansão dos conhecimentos referentes à fisiologia da reprodução nessa espécie (CONCANNON et al., 1979; HOFFMANN, 2000; ONCLIN e VERSTEGEN, 1997; PAULSMEIER, 1998).

---

<sup>1</sup> Berenice de Ávila Rodrigues. Médica Veterinária, MSc. Doutoranda em Reprodução Animal pela Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS /BRASIL. E- mail: berenice@portoweb.com.br

<sup>1</sup> José Luiz Rodrigues. Médico Veterinário, MSc, PhD, Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS/ BRASIL. E-mail: jlr@orion.ufrgs.br

As informações obtidas servem de suporte para o avanço de metodologias terapêuticas aplicáveis na indução de cio (VERSTEGEN et al., 1994), em casos de doenças reprodutivas (VERSTEGEN et al., 1993; HOFFMANN et al., 2000), e subsidiam a introdução, o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de biotécnicas de reprodução assistida em caninos (FARSTAD, 2000).

### O ciclo estral

O ciclo estral da cadela compreende um período de inatividade sexual, conhecido como anestro, que é seguido por outro de atividade reprodutiva, cuja manifestação principal é definida como estro. Esta forma de apresentação cíclica e os espaçamentos interestros de 5 a 12 meses fazem com que a fêmea canina seja referenciada na literatura como uma espécie monoéstrica estacional (CONCANNON et al., 1989).

O ciclo reprodutivo da cadela apresenta quatro fases bem distintas, estabelecidas por alterações hormonais que induzem a transformações de ordem morfológica e clínica, citológicas, vaginais e cervicais. Essas fases são conhecidas como proestro, estro, metaestro/diestro e anestro (JÖCHLE e ANDERSEN, 1977).

O ingresso na puberdade, que dá início à atividade sexual, está relacionado a modificações nos níveis hormonais e no desenvolvimento orgânico, e é regido por fatores de ordem genética e ambiental (SOKOLOWSKI, 1977) (figura 1).

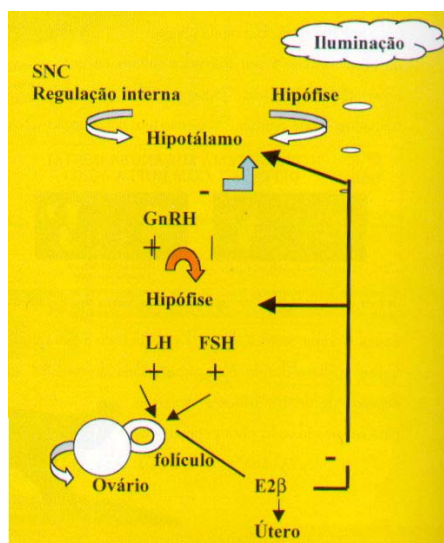


Figura 1- Controle neuroendócrino na fêmea pré-púbere (KLEIN, 1999 modificado).

O início da vida reprodutiva na fêmea canina é verificado entre o 6<sup>o</sup> e o 24<sup>o</sup> mês após o nascimento (FELDMANN e NELSON, 1997), dois a três meses após a cadela ter alcançado seu peso adulto (VALTONEN e JALKANEN, 1993). Nessa espécie, o ingresso na puberdade também está relacionado a fatores raciais e individuais (VERSTEGEN, 1999).

### Hormônios

Com a puberdade, o hipotálamo inicia a liberação pulsátil do decapeptídeo GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina), que alcança, pelas vias capilares do sistema portal hipofisário, as células nas

quais as gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) são secretadas (KOOISTRA et al., 1999).

O FSH e o LH, a exemplo do que ocorre com o GnRH, são liberados de forma pulsátil na circulação (CONCANNON, 1993), e estimulam a síntese de esteróides sexuais (progestágenos, andrógenos e estrógenos) nos compartimentos celulares dos folículos ovarianos (KLEIN, 1999; HOFFMANN, 2000).

A progesterona é produzida nas células da granulosa dos folículos ovarianos maduros e no corpo lúteo, através da secreção de LH (WEY, 1998). O LH é responsável pelo estímulo e o controle da síntese de andrógenos nas células da teca nos folículos (KLEIN, 1999). A androstenediona e a testosterona são os andrógenos que aparecem como produtos intermediários na síntese de estrógenos - no processo designado como aromatização - por ação da enzima citocromo P-450 aromatase (FELDMANN e NELSON, 1997; HOFFMANN, 2000).

A aromatização de andrógenos em estrógenos pode ser um dos mecanismos facilitadores que inicia o comportamento passivo característico do estro. A conversão ou metabolização androgênica em estradiol, supostamente regularia a liberação de LH na fêmea canina (FELDMANN e NELSON, 1997).

O Estradiol- $\beta$ 17 é sintetizado nas células da granulosa dos folículos, sob influência da gonadotrofina FSH, através da aromatase P-450 (KLEIN, 1999). Inicialmente, esse processo obedece a um mecanismo de retroalimentação negativa, no qual o aumento da concentração de estradiol leva à supressão da secreção de LH; a seguir, em uma forma reversa de retroalimentação positiva sobre a hipófise e o hipotálamo, é verificada, simultaneamente à queda do estradiol, elevação na liberação de LH (CONCANNON, 1993). A queda do estrógeno é suficiente para liberar as células receptoras do efeito inibitório da retroalimentação negativa (CONCANNON et al., 1979).

Decorridos 25 a 30 dias da ovulação, com a progressão do ciclo já na fase luteal, verifica-se a secreção do hormônio peptídico prolactina, que é produzido nas células acidófilas da adenohipófise por estimulação estrogênica direta hipofisária, ou indireta hipotalâmica, através de hormônio liberador de tireotrofina (TRH) (WEY, 1998). No ovário, ela é responsável pela manutenção funcional do corpo lúteo através da produção de progesterona nas células da granulosa. Foi provado que, na cadela, o LH não é essencial para a integridade funcional e morfológica do corpo lúteo, e aparece mais como um hormônio luteotrófico facultativo, estimulando direta ou indiretamente a secreção de progesterona (VERSTEGEN, 1999). Atualmente, a prolactina é conhecida como a principal luteotrofina em caninos (ONCLIN e VERSTEGEN, 1997).

### **Perfil hormonal e morfológico do ciclo estral da cadela**

As alterações endócrinas relacionadas ao mecanismo de interrupção do anestro na cadela não se encontram totalmente esclarecidas (KOOISTRA et al., 1999). O FSH e o LH são foliculotróficos na cadela. É possível que elevações na secreção de LH ao lado de aumentos discretos de FSH dêem início à atividade cíclica nesta espécie, e que para o início da fase folicular o FSH não seja tão importante quanto o LH (CONCANNON, 1993).

Embora existam dados escassos relativos ao desenvolvimento folicular na cadela, os estudos ecográficos e a mensuração do estradiol plasmático sugerem que o desenvolvimento dos folículos nessa espécie se inicia aproximadamente 50 dias antes da ocorrência da ovulação. Várias ondas foliculares, que

são observadas antecipadamente ao proestro (ENGLAND e HEWITT, 1999), produzem elevações transientes nas concentrações plasmáticas de estradiol (CONCANNON, 1986).

### Proestro

O proestro na cadela tem duração média de 7 a 10 dias (CONCANNON et al., 1989), e é caracterizado por edema dos lábios vulvares e corrimento sanguinolento da *Rima vulvae* (JÖCHLE e ANDERSEN, 1977). O caráter sanguinolento do corrimento é resultado da diapedese eritrocitária proveniente da ruptura de vasos subepiteliais endometriais (FELDMANN e NELSON, 1997) em miscigenação à secreção das glândulas holócrinas uterinas (HOFFMANN, 2000) (figura 2).

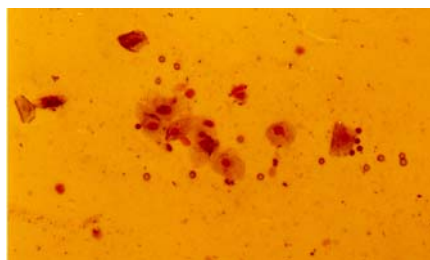


Figura 2- citologia vaginal de proestro

Nos esfregaços vaginais, a proporção relativa de diferentes tipos de células epiteliais pode ser usada como identificadora do ambiente endócrino (ARTHUR et al., 1996). O número de células basais e parabasais sediadas nas camadas mais profundas do epitélio reduz-se à medida que o ciclo avança em direção ao estro e dá lugar ao aparecimento de células intermediárias superficiais e células superficiais, que compõem os estratos espinoso e superficial (BAAR, 1995), de modo que nos quatro a cinco dias precedentes ao pico de LH, o índice de células parabasais torna-se inferior a 5% (CONCANNON e DIGREGORIO, 1986).

Sob a influência da elevação progressiva da concentração de estrógeno ocorrem a estratificação epitelial e a proliferação celular. As células mais distantes do estrato basal, sofrendo com a redução no aporte nutricional e de oxigênio, perdem a sua capacidade de exocitose e acabam degenerando (FELDMANN e NELSON, 1997; VERSTEGEN, 1999). O predomínio de células superficiais nos esfregaços é indicativo de progressão do ciclo, e está associado ao efeito estrogênico máximo alcançado, assinalando a expressão hormonal deste momento (FELDMANN e NELSON, 1997).

O estradiol  $\beta$ -17 atinge seu ápice 24 a 48 horas antes do estabelecimento da elevação sérica máxima pré-ovulatória do hormônio luteinizante, isto é, do pico de LH (VALTONEN e JALKANEN, 1993). Os níveis iniciais de estradiol de 90pg/mL de plasma reduzem-se a 10-20pg/mL ao final do proestro (HOFFMANN et al., 1996; VERSTEGEN, 1999). Esse declínio, que ocorre concomitantemente à elevação da concentração plasmática de progesterona, reflete a maturação folicular vários dias antes da ovulação (FELDMANN e NELSON, 1997). Alguns pesquisadores (LEAVITT et al., 1971) concluíram que o aumento da progesterona tem origem nos folículos pré-ovulatórios e nas células intersticiais ovarianas, conceito defendido por outros autores (FELDMANN e NELSON, 1997), segundo o qual a produção de progesterona a partir de células intersticiais ou foliculares seria efetuada em maior quantidade que a necessária para servir como precursora na síntese de estrógenos nos dias iniciais do pró-estro. A queda do estrógeno e a elevação inicialmente discreta da progesterona induzem à secreção de



FSH e especialmente de LH, que é mediada por um vigoroso mecanismo de retroalimentação positiva (FELDMANN e NELSON, 1997).

A liberação de FSH é discreta, possivelmente devido ao mecanismo de retroalimentação negativa mediada pelo estradiol e pela inibina (OLSON et al., 1982).

A inibina é secretada nas células da granulosa nos folículos, e age no controle do crescimento folicular e na taxa de ovulação. Em canídeos selvagens, como a raposa azul (*Alopex lagopus*), as concentrações periovulatórias são similares às de estradiol. Níveis elevados desses hormônios durante a seleção do folículo dominante colaboram para a redução das concentrações de FSH, condição por sua vez requerida para a manutenção da dominância dos folículos recrutados (MONDAIN-MONYAL et al., 1993).

Contrariamente à liberação de FSH, a de LH é importante, e a elevação pré-ovulatória determina na cadela o fim da fase folicular e o ingresso na fase luteal (SHILLE e STABENFELDT, 1980). Ao pico de LH, que persiste por 12 -24 horas (FELDMANN e NELSON, 1997), 24 -72 horas (CONCANNON et al., 1989), 3,3±2,4 dias (GUÈRIN et al., 1997) com índices de 15,77±/ 7,66ng/mL (NISHIYAMA et al., 1999), e que excedem em 20 a 40 vezes os valores basais, segue-se a ovulação. Decorridas 36 a 50 horas da sua apresentação, observa-se a luteinização dos folículos maduros, que, após a ovulação, evoluem para corpos lúteos secretores de progesterona (CONCANNON, 1993).

O pico de LH é o momento mais marcante do ciclo estral da cadela, pois todos os eventos, da ovulação à parição, lhe são retroativos.

A constância temporal registrada no intervalo entre o pico de LH e a ovulação faz com que a expressão máxima desta gonadotrofina na circulação seja referenciada na literatura como o dia 0 do ciclo da fêmea canina (GÜNZEL e KOIVISTO, 1984).

## **Estro**

A duração média desta fase é de cinco a nove dias (CONCANNON et al., 1989; FELDMANN e NELSON, 1997). A turgidez vulvar observada no proestro dá lugar a maciez e flacidez, que se fazem acompanhar de supressão ou modificação da secreção vaginal de sanguinolenta para serosanguinolenta, e permissão à cópula. A concentração hormonal de progesterona eleva-se acima do nível basal antes do estabelecimento do pico de LH, devido à capacidade de síntese e de secreção mediada pelas células foliculares ovarianas, que se tornam funcionais mesmo antes do desenvolvimento do corpo lúteo (FELDMANN e NELSON, 1997).

Os níveis de progesterona, que no início do proestro se encontravam abaixo de 1ng/mL, aumentam de forma que valores de 2 a 3ng/mL, registrados no momento do pico de LH, sobem a 4,9±1,0ng/mL no instante da ovulação (BOUCHARD et al., 1991), muito embora estudos recentes tenham revelado índices médios de 2,34ng/mL no dia da sua ocorrência (HASE et al., 2000). A concentração máxima é atingida 20 a 30 dias após o pico de LH, com valores situados entre 30 e 90 ng/mL (JEFFCOATE, 1998).

Atualmente, a determinação da progesterona sérica por meio de análises seriadas é um meio valioso usado na identificação da ovulação na fêmea canina (RODRIGUES et al., 1996; HENSEL, 1998; MEISL, 1998).

Nessa espécie, as ovulações são múltiplas e parecem acontecer de forma sincronizada à ruptura dos folículos, ocorrendo num intervalo curto de tempo situado em até 12 horas (DIETERICH, 1994), 24 horas (MEISL, 1998), 12 a 96 horas (FELDMANN e NELSON, 1997), com estabelecimento em 24 a 48 horas (HASE et al., 2000) ou 36 a 50 horas (CONCANNON et al., 1989), após o pico de LH.

Concannon demonstrou que o processo ovulatório mantém relação com o aumento da progesterona. A falha na sua elevação faz com que a proporção na concentração sérica progesterona/estradiol não se modifique, o que acaba por impedir o desencadeamento do pico de LH e a ovulação (VERSTEGEN, 1999).

Os ovócitos são liberados dos folículos de forma espontânea como ovócitos primários (BYSTED, 1999) no início da primeira divisão meiótica (FARSTAD, 2000) (figura 3).

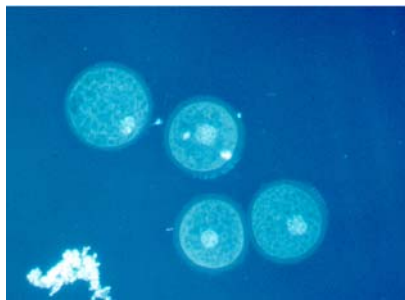


Figura 3- Ovócitos caninos primários (prófase I)

São necessárias entre 48 e 72 horas para que os eventos da maturação sejam completados na porção distal do oviduto (CONCANNON et al., 1989), quando os ovócitos alcançam o estágio de metáfase II e verifica-se eliminação do 1º corpúsculo polar (TSUTSUI, 1989). A sobrevivência dos ovócitos maduros se estende por 1 a 2 dias. Assim, avaliados estes aspectos, considera-se que o período fértil na fêmea canina ocorra do 4º ao 7º dias após o estabelecimento do pico de LH (JEFFCOATE, 1998) (figura 4).

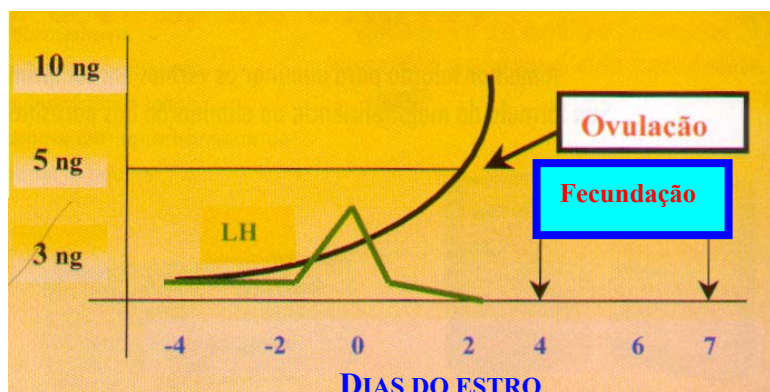


Figura 4- Momento da ovulação e período fecundante na cadela. (CONCANNON, 1993, modificado)

### Metaestro/Diestro

O metaestro/diestro abrange um intervalo aproximado de 56-58 dias na fêmea prenhe e de 60-100 dias na fêmea não prenhe (CONCANNON, 1986; FELDMANN e NELSON, 1997).

O metaestro, que por definição é um intervalo curto de tempo entre o estro e o diestro nos mamíferos, representa o momento transicional da fase folicular para a de dominância do corpo lúteo. O diestro é referenciado como a fase do ciclo na qual hormonalmente se observa dominância da progesterona (HOFFMANN, 2000).

O início do diestro é marcado por repentina alteração da citologia vaginal. O quadro citológico composto pela presença de neutrófilos granulócitos e o reaparecimento de células provenientes das camadas epiteliais mais profundas, assim como o retorno às condições anatômicas e clínicas pré-cíclicas, com reversão do tamanho vulvar e recusa ao acasalamento, aliados à ausência de secreção vaginal perceptível, caracterizam o diestro (JÖCHLE e ANDERSEN, 1977).

O perfil hormonal sérico nas fêmeas, estejam elas prenhes ou não, é similar (JEFFCOATE, 1998; VERSTEGEN, 1999), com as concentrações de progesterona não diferindo entre os 15 dias precedentes e os 40 dias subseqüentes ao pico de LH. No entanto, estudos baseados na observação de elevações específicas nas concentrações fecais de estradiol, de testosterona e de progesterona após implantação embrionária, isto é, 17 a 21 dias após o pico de LH (FELDMANN e NELSON, 1997), sugerem que o corpo lúteo gestacional, a única fonte de progesterona em caninos (JEFFCOATE, 1998), sintetiza e secreta mais desses esteróides que aquele de fêmeas não prenhes (RICHKIND, 1983; WASSER et al., 1995; GUDERMUTH et al., 1998). De todo modo, a progesterona estabelece um patamar inicial semelhante nas fêmeas prenhes ou não por três semanas, com concentrações da ordem de 15 a 60 ng /mL (FELDMANN e NELSON, 1997), 30ng/mL (HENSEL, 1998), 35,1±2,6 ng/mL (ONCLIN e VERSTEGEN, 1997), 30 a 90 ng/mL (JEFFCOATE, 1998). Devido à similaridade nas concentrações circulantes hormonais, toda fêmea canina em diestro é considerada pseudoprenhe até que haja confirmação ou negação da condição gestacional (FELDMANN e NELSON, 1997). O desenvolvimento de pseudogestação (pseudociese ou falsa prenhez) entre 6 e 14 semanas (FELDMANN e NELSON, 1997; HARVEY, 1998) após o estro é uma condição relativamente comum. A pseudogestação manifesta parece ser um estado ligado à sensibilidade individual de certas fêmeas ao desenrolar normal dos eventos endócrinos desta fase do ciclo (FELDMANN e NELSON, 1997), ou às concentrações excessivamente elevadas de prolactina, ou a uma resposta exagerada à atuação hormonal (HARVEY, 1998). Outros autores relacionam essa condição à simples queda da progesterona, descartando a influência de outros hormônios, como o hormônio de crescimento (GH) ou a própria prolactina (HOFFMANN et al., 1996). Mais recentemente, a heterogeneidade molecular e diferenças na atividade biológica da prolactina em fêmeas no diestro (GOBELLO et al., 2001), assim como a supressão do efeito inibitório tônico do hipotálamo, que leva à liberação espontânea elevada de prolactina através de um estímulo neurogênico (FREEMAN et al., 2000), têm sido incorporados aos argumentos expostos, na tentativa de explicar a origem na secreção excessiva desse hormônio.

Nos primeiros 20 dias do diestro, a produção de progesterona pelo corpo lúteo independe de estímulo gonadotrófico hipofisário. Esta independência é, no entanto, transitória e o suporte hipofisário acaba sendo necessário após esse período para garantir a manutenção da função lútea, conforme comprovado em experimentos anteriores (CONCANNON, 1980; OKKENS et al., 1986).

O nível plasmático da progesterona começa a declinar decorridos aproximadamente 30 dias da identificação do pico de LH (JEFFCOATE, 1998), para alcançar valor basal de 1ng/ml aos 64±1 dias nas

fêmeas prenhes, e aos  $67 \pm 2,1$  dias nas fêmeas não prenhes (ONCLIN e VERSTEGEN, 1997). O mecanismo luteolítico nas fêmeas prenhes é facilitado pela atuação da PGF-2 $\alpha$  (FELDMANN e NELSON, 1997). Nas fêmeas não prenhes, os fatores de regressão ainda são desconhecidos, e especula-se se o funcionamento do corpo lúteo estaria vinculado a um intervalo de tempo pré-determinado, ou se o declínio da progesterona ocorreria por insuficiência de suporte luteotrófico (HOFFMANN, 2000), ou ainda se a regressão luteal seria mediada por mecanismos reguladores autócrinos e parácrinos desconhecidos (HOFFMANN et al., 1996).

Paralelamente ao declínio da progesterona, eleva-se a atividade secretória da prolactina. A concentração de 5ng/mL é similar em todas as fêmeas no intervalo situado de -15 a +25 dias após o estabelecimento do pico de LH, mas esse quadro se altera, e elevações acima de 10ng/mL na concentração hormonal após o 35º dia relacionam-se à prenhez e sugerem uma possível regulação gestacional específica para essa condição (ONCLIN et al., 1995; ONCLIN e VERSTEGEN, 1997).

A relaxina, presente no plasma de fêmeas prenhes após a terceira semana gestacional, coincide com as primeiras elevações de prolactina, e parece estar envolvida nessa regulação (STEINETZ et al., 1987; ONCLIN e VERSTEGEN, 1997). O papel principal da relaxina, que é essencialmente produzida pela placenta na espécie canina, deve estar relacionado à manutenção dos níveis hormonais progesterônicos no corpo lúteo ou à estimulação indireta da secreção de prolactina na hipófise, ou finalmente à estimulação de fatores luteotróficos desconhecidos até o momento (VERSTEGEN, 1999).

### **Anestro**

Embora este seja considerado um período de relativa quiescência ao final da reparação endometrial (JÖCHLE e ANDERSEN, 1977), sabe-se atualmente que, ao contrário, hipófise e ovário permanecem em atividade durante esta fase do ciclo (OLSON et al., 1982).

Analogamente às demais fases do ciclo ovariano, a duração do anestro é variável, com um período que oscila entre 2 e 10 meses (CONCANNON et al., 1989), e está relacionada a fatores raciais, etários, sanitários, ambientais, etc (FELDMANN e NELSON, 1997).

A citologia do anestro é bastante escassa, com predomínio de algumas células parabasais e intermediárias profundas (FELDMANN e NELSON, 1997).

A situação hormonal na transição do diestro para o anestro acusa um nível relativamente constante nas concentrações plasmáticas de LH e de FSH, com elevações individuais, indicando o caráter pulsátil secretório para estas gonadotrofinas. Na cadela, as elevações de LH e de FSH são coincidentes, embora as diferenças nas características destas elevações sejam importantes, com as concentrações de FSH declinando mais lentamente que aquelas de LH, em função da meia vida mais prolongada daquela (KOOISTRA et al., 1999).

O fim do anestro está comprovadamente relacionado a uma elevação de LH (CONCANNON, 1993). Experimentos mostraram que a estimulação endógena de LH pela administração exógena de GnRH (VAN HAAFTEN et al., 1994) ou de preparações de LH suína purificada (VERSTEGEN et al., 1997) são capazes de induzir estro fértil em cadelas.

O mecanismo pelo qual o LH induz a atividade folicular deve ser múltiplo, mas a elevação rápida nos níveis de estradiol em cadelas submetidas a tratamentos com LH sugere que o aumento na

esteroidogênese folicular é um efeito primário desta gonadotrofina que acaba por induzir, através do aumento em estradiol, o desencadeamento parácrino ou autócrino no crescimento folicular, promovendo elevação adicional na secreção de estradiol nos momentos precedentes ao reinício do ciclo estral da fêmea canina (VAN HAAFTEN et al., 1994; VERSTEGEN et al., 1997).

### **Consideração final**

O delicado mecanismo de regulação, secreção e interação hormonal responsável pelas alterações que conduzem ao desencadeamento ou que ocorrem durante o ciclo estral na espécie canina tem sido alvo de um número expressivo de experimentos.

As investigações comprovam a existência de questões fundamentais relativas aos eventos endócrinos nessa espécie, até o momento não elucidadas.

Os aspectos particulares do ciclo estral da cadela apenas começam a ser desvendados, e conceitos antigos revisados fazem crer que o universo da reprodução canina é mais vasto do que se imagina.

Informações recentes destacando o papel da prolactina como fator de inibição tônica sobre a liberação de LH no anestro e as características secretórias das gonadotrofinas FSH e LH no desencadeamento da foliculogênese abrem perspectivas ao desenvolvimento de metodologias avançadas, com possibilidade de incorporação em reprodução canina.

## **2.5 Maturação ovocitária**

### **2.5.1 Maturação de ovócitos *in vivo***

Quando a fêmea alcança a puberdade, em consequência do recrutamento folicular, o ovócito inicia uma fase de crescimento, na qual o seu volume se expande (PICTON et al., 1998). Durante esta fase, o diâmetro ovocitário aumenta de 20 $\mu$ m para 110 $\mu$ m (ANDERSEN, 1970). A nível nuclear, o elevado índice de atividade de transcrição conduz à síntese de ácido ribonucléico (RNA) e de proteínas, que são armazenadas junto com as RNAs e proteínas de origem materna. Uma pequena fração de RNA é desviada para a síntese de peptídeos e proteínas, suportando e regulando a maturação citoplasmática. A maturação citoplasmática ocorre com replicação e redistribuição de organelas, como mitocôndrias e ribossomas, além da formação da zona pelúcida (ZP) e dos grânulos corticais (PICTON et al., 1998; BYSTED, 1999). A zona pelúcida, constituída no período de transição do crescimento folicular de primário à secundário (GÖRITZ et al., 1996), consiste num revestimento glicoproteico extracelular elástico com elevado teor hídrico (STRÖM HOLST et al., 2000). Esta estrutura está vinculada à interação espermática -ovocitária, à indução da reação acrossomal no espermatozóide e ao controle da polispermia pós-fecundação (WASSARMAN, 1992). A zona pelúcida circunda a membrana vitelina dos ovócitos mamíferos até o estágio embrionário precoce de blastocisto, momento em que o embrião a rompe e alcança o espaço exterior, num processo denominado de eclosão (WASSARMAN, 1988; EPIFANO et al., 1995).

Folículos saudáveis contêm ovócitos constituídos pela presença de vesícula germinal (VG) com cromatina numa apresentação descondensada, protegida pela membrana nuclear (MATTSON e ALBERTINI, 1990).

Durante o período de transição do estágio de VG ao estágio de metáfase II (MII), que caracteriza a maturação, várias mudanças ocorrem preparando o ovócito à fecundação e à manutenção do desenvolvimento embrionário precoce. No decorrer dos eventos meióticos, o ovócito precisa evitar e corrigir erros que poderiam levar a desenvolvimento anormal, estabelecendo fases de quiescência, essenciais na aquisição de competência (MATTIOLI, 1993). Maturação ovocitária nuclear e citoplasmática, que pode ocorrer de maneira independente, deve contudo acontecer de modo coordenado para assegurar a competência no desenvolvimento celular. Para tanto, as conexões íntimas transzonais entre as células da granulosa e ovócitos precisam ser mantidas para que ocorra transferência de substâncias regulatórias entre os dois compartimentos celulares (SMITZ et al., 2001).

A competência na finalização da meiose é estabelecida em duas etapas sequenciais. Inicialmente, o ovócito exibe habilidade para permitir o rompimento da VG, conhecida como quebra da vesícula germinal (VGBD), que envolve condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana nuclear (KUBELKA et al., 1998), para então a seguir, progredir para metáfase I (MI), do grego metha (após) e phasis (aparência). Nesse estágio, os cromossomas se encontram dispostos no plano central do eixo metafásico e observa-se a formação de bivalentes (HEWITT e ENGLAND, 1997). A seguir, completa-se a transição do estágio de MI até o estágio de MII (MOTLIK et al., 1984). Ovócitos no estágio de MII mostram um grupo compacto de cromossomas no formato morfológico do 1º. corpúsculo polar e outro com cromossomas apartados, permitindo sua identificação individual (HEWITT e ENGLAND, 1997). Os ovócitos, que em MII permanecem nesta condição morfológica até ativação ou fecundação, contêm fator proteico promotor de maturação (MPF) e fator citostático (CSF), e são caracterizados pela presença de eixo metafásico estável (MOTLIK et al., 1998). O fator protéico de maturação é ativado quando se inicia o rompimento da vesícula germinal e a condensação dos cromossomas. A atividade máxima é verificada nos estádios de MI a MII (CHOI et al., 1998).

### 2.5.2 Maturação de ovócitos *in vitro*

Maturação ovocitária *in vitro* (MIV) é um processo complexo, cujo objetivo é mimetizar as alterações dinâmicas que ocorrem no folículo ovariano durante o período pré-ovulatório (BYERS et al., 1992).

Experimentos com ovócitos caninos submetidos à MIV revelaram similaridade com os eventos manifestados *in vivo*, confirmando portanto, a necessidade de cultivo dos gametas femininos por um período situado ao redor de 48-72 horas (FULTON et al., 1998), muito além daquele observado em outros carnívoros como felinos domésticos, nos quais maturação ovocitária extra-corporal já é possível às 24 horas da exposição à MIV (WOLFE e WILDT, 1996). Nesta espécie, o índice médio de ovócitos completando maturação nuclear fica situado entre 50 % e 60 % nos experimentos *in vivo* e *in vitro* (JOHNSTON et al., 1989), ao passo que em caninos o índice médio registrado de maturação ovocitária

entre os estádios de Metáfase I/Anáfase- Telófase I/Metáfase II é de 20 % (BOLAMBA et al., 1998; HEWITT e ENGLAND, 1998b; FARSTAD, 2000). Existem evidências de que os requerimentos necessários à maturação ovocitária em cães, sobrevivência espermática e fecundação diferem do padrão conhecido para os demais mamíferos (HEWITT e ENGLAND, 2001).

Os meios empregados na maturação *in vitro* de ovócitos de canídeos são adaptações daqueles empregados para outros mamíferos e têm falhado na consideração de requerimentos específicos nessas espécies, que diferem consideravelmente do modelo geral (HEWITT et al., 1998).

Um grande número de ovócitos coletados dos ovários são impróprios para cultivo ou acabam degenerando após a maturação *in vitro*. As razões apontam para ovócitos oriundos de folículos atrésicos, sem alterações morfológicas e aparentemente saudáveis (FARSTAD et al., 2001). Mahi e Yanagimachi (1976) observaram que o índice de ovócitos degenerados colhidos de ovários destinados a processamento *in vitro* pode alcançar percentuais de 65 %. Índices similares são registrados por Kofler (1999) com 42,4 % e Razek (1996) com 50 a 63 % de degeneração. Os ovócitos oriundos de folículos atrésicos manifestam mudanças que inicialmente se assemelham à maturação, mas que não lhe conferem competência meiótica (HYTTEL et al., 1997). Adicionalmente, o modo empregado na coleta pode danificar os ovócitos e deve-se considerar a inadequação do meio de maturação propriamente dito (FARSTAD et al., 2001).

A eficácia de um meio de cultivo está vinculada à manutenção da morfologia (FIGUEIREDO et al., 1994); à preservação da viabilidade (JEWGENOW e PITRA, 1993); ao teor de DNA e à expansão do folículo submetido ao cultivo (NUTTINCK et al., 1993).

Entre os meios de cultivo, Tissue Culture Medium (TCM) 199, Krebs Ringer Bicarbonato modificado (KBR), Ham's F-10 e CMRL (MAHI e YANAGIMACHI, 1976; CINONE et al., 1992; NICKSON et al., 1993; YAMADA et al., 1992; YAMADA et al., 1993; SONGSASEN et al., 2001) vêm sendo usados com índices variados de resposta à indução da maturação, sob suplementação com soro fetal bovino (CINONE et al., 1992; OTOI et al., 2000a), com soro de vaca em estro (CINONE et al., 1992) e com soro de cadela em estro (NICKSON et al., 1993).

Experimentos recentes mostraram que tensão gasosa com concentrações de 5 % ou de 20 % de O<sub>2</sub> nos meios de maturação *in vitro* são equivalentes na promoção da maturação nuclear (SONGSASEN et al., 2001).

Temperaturas de exposição à MIV não seguem um padrão e portanto, a incubação de ovócitos caninos *in vitro* já foi realizada a +37° C (MAHI e YANAGIMACHI, 1976), +37,5° C (OTOI et al., 2000a), +38° C (FULTON et al., 1998; SRSEN et al., 1998), +38,5° C (SAINT-DIZIER et al., 2001) e +39° C (HEWITT e ENGLAND, 1997).

Dados adicionais comprovam que diâmetro ovocitário inferior a 100µm impossibilita a progressão na maturação extra-corporal além do rompimento da VG (SRSEN et al., 1998; OTOI et al., 2000b).

Já foi demonstrado que a presença das células do cumulus em experimentos de maturação *in vitro* (MIV) é necessária à maioria dos ovócitos para que expressem sua competência (SIRARD et al., 1988). A expressão da competência meiótica relacionada à presença das células do *Cumulus oophorus*, salientada anteriormente em experimentos com ovócitos felinos (WOOD e WILDT, 1997) foi verificada igualmente no desencadeamento da meiose de ovócitos de canídeos submetidos à MIV (SRSEN et al., 1998; FARSTAD, 2000). De acordo com Nickson et al. (1993), a importância em caninos chega a ser vital,

considerando-se que fisiologicamente estas células permanecem após fecundação em contato íntimo com o ovócito até a aquisição do estágio embrionário de mórula (RENTON et al., 1991). Grazul-Bilska et al. (1997) afirmam que a comunicação estabelecida entre as células do cumulus e o ovócito é importante na regulação da diferenciação meiótica e na maturação do complexo cumulus-ovócito, assim como possibilita o câmbio de nutrientes, de íons e de moléculas reguladoras pequenas tais como cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e 3'5' monofosfato de adenosina cíclica (AMPC).

No entanto, desenvolvimento completo de um dos componentes do complexo cumulus-ovócito não é necessariamente indicativo de maturação adequada ou total de outros. Assim, nem expansão das células do *cumulus*, nem progressão do material nuclear até o estágio de MII são parâmetros úteis na avaliação da maturação citoplasmática, essencial à fecundação e ao desenvolvimento embrionário (BYERS et al., 1992).

De acordo com Nickson et al. (1993) a concentração da glicoproteína 3 da zona pelúcida, ZP3-mRNA, sintetizada de forma elevada em ovócitos em crescimento, aparece como parâmetro de utilidade na avaliação do índice de maturação celular. A maturidade citoplasmática ovocitária também pode ser acessada através da observação da presença (número e localização) de grânulos corticais, através da cinética dos índices de maturação meiótica (extrusão do primeiro corpúsculo polar), através da formação da aster espermática subsequente à fecundação, através da sincronia na formação de pronúcleo e através do teor de glutatona no ovócito (IZADYAR et al., 1996).

Suplementações hormonais com esteróides, consideradas adequadas ao desenvolvimento *in vitro* dos gametas em felinos (JEWGENOW e PITRA, 1993; WOOD et al., 1995), mostraram-se ineficazes na promoção de um índice mais elevado de maturação nos ovócitos caninos (HEWITT e ENGLAND, 1997; HEWITT e ENGLAND 1999a). Contudo, a suplementação de estradiol parece favorecer a MIV de ovócitos felinos através da influência exercida junto às junções porosas entre células do *cumulus* e ovócito (WOOD et al., 1995). Em caninos, concentrações elevadas deste hormônio no meio de maturação favorece a progressão da maturação até MII (NICKSON et al., 1993). A inclusão de hormônio foliculo estimulante (FSH), que contravertidamente induz à expansão das células do *Cumulus oophorus* via AMPC (HEWITT e ENGLAND, 1999a), mas inibe o desencadeamento da meiose dos ovócitos de raposa azul (*Alopex lagopus*) maturados *in vitro*, parece assegurar nesta espécie a conexão adequada entre *Corona radiata* e oolema nas junções porosas citoplasmáticas (SRSEN et al., 1998). Somatotropina bovina em concentrações elevadas (1000ng/ml) já mostrou ser capaz de acelerar e elevar a maturação ovocitária *in vitro* até o estágio de MII (SRSEN et al., 1998).

De acordo com Hewitt e England (1999b), suplementação protéica do meio de maturação com 0,3 % (32mg/ml) de albumina sérica bovina (BSA) pode favorecer o desencadeamento da meiose de ovócitos caninos no estágio primordial, através do rompimento da VG. A capacidade quelante da albumina sérica possibilita a inativação de metabólitos tóxicos decorrentes da produção de radicais livres de oxigênio, oriundos da ativação de superóxidos pelos íons metálicos (BAVISTER, 1995). Segundo Maurer (1992), a albumina permite a incorporação de diversos componentes, como esteróides, vitaminas, ácidos graxos e colesterol, nos meios onde é introduzida, contribuindo de modo estimulante ou inibitório nos mesmos. Num estudo comparativo sobre a influência da suplementação proteica e hormonal na MIV de ovócitos de felinos domésticos, Wood et al. (1995) constataram que a BSA à concentração de 4mg/ml conferia



índices mais elevados de maturação nuclear, comparativamente às amostras submetidas à adição com SFB (5 % v/v), que provavelmente contém elementos inibitórios na promoção do desenvolvimento *in vitro* nessa espécie. Também Ocaña-Quero et al. (1999), realizaram um experimento comparando o efeito de soro de vaca em estro (SVE) ou em anestro, soro fetal (SFB), soro de leitoa em estro e BSA na taxa de MIV de ovócitos bovinos. A suplementação mostrou resultados superiores de maturação com SVE (75%), SFB (77%) e BSA (85%) comparativamente ao meio controle (40%) e aos meios com soro de vaca em anestro (50%) e com soro de leitoa em estro (58%).

Ovócitos de fêmeas caninas em diferentes estágios do ciclo estral têm sido usados com aparente benefício sobre a MIV, quando oriundos de fase folicular (OTOI et al., 2001a; LUVONI et al., 2001), embora observações de outros autores não registrem diferenças na MIV de ovócitos coletados de fêmeas em proestro ou em estro (HEWITT e ENGLAND 1997), assim como de fêmeas em anestro (HEWITT et al., 1998) e em diestro se o diâmetro ovocitário for inferior a 120µm (OTOI et al., 2000b; 2001b).

Luvoni et al. (2001) mostraram que efetivamente há comunicação entre as células do *cumulus* e o ovócito no estágio do proestro e que permeabilidade entre os mesmos favorece a maturação ovocitária a índices mais elevados (11,1 %) do que os observados em ovócitos oriundos de fêmeas em anestro (0 %).

Alguns estudos não constatarem diferenças significativas relacionadas ao número total de ovócitos ou à proporção de gametas de categoria superior recolhidos de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (FUJII et al., 2000). Outros autores verificaram que, o número de ovócitos recolhidos de ovários de fêmeas em anestro é inferior (12,1±1,6) àquele obtido de fêmeas em proestro tardio (35,7±8,5) (LUVONI et al., 2001). Contudo, Ström Holst et al. (2001) relatam que em caninos, a massa ovariana ou a presença de diferentes estruturas ovarianas não afetam significativamente o índice de coleta de ovócitos.

## 2.6 Fecundação ovocitária

### 2.6.1 Fecundação de ovócitos *in vivo*

Nos canídeos, o processo de fecundação ocorre no segmento distal do oviduto, região conhecida como istmo (TSUTSUI, 1989).

A capacidade fecundante espermática é adquirida durante o trânsito através do sistema genital masculino e feminino, antecipadamente à fusão dos gametas (YANAGIMACHI, 1994). Durante este processo, a membrana plasmática espermática vai se modificando de modo seqüencial. Embora uma parte desta modificação se inicie no testículo, durante a espermatogênese, as mudanças mais significativas acontecem quando os espermatozóides passam pelo epidídimo (maturação epididimária) e quando eles sofrem capacitação e/ou reação acrossômica no sistema reprodutivo feminino (TOSHIMORI, 2000). Durante a maturação epididimária, uma das consequências mais proeminentes é a aquisição da motilidade. Episódios importantes referem-se a alterações na modulação do sistema da proteína kinase versus AMP cíclico e o desenvolvimento de um mecanismo para manutenção de níveis baixos de Ca<sup>2+</sup> intra-celular (ROSSI-FERRAGUT et al., 2001).

Capacitação foi descrita como um conjunto de fenômenos amplos, responsável por alterações no metabolismo energético do espermatozóide com elevação da sua motilidade (hiperflagelação)

(SCHÜLKE, 1991), desestabilização na membrana celular (HARRISON, 1996) e promovendo a inativação de proteínas diversas, designadas como inibidores enzimáticos nas células. Essas alterações induzem à reação acrossômica espermática e subsequente penetração da membrana pelúcida dos ovócitos, possibilitando o estabelecimento da fecundação (STEWART- SAVAGE, 1993).

Reorientação e modificação sutis das moléculas da membrana plasmática são observadas quando os espermatozoides são ativados pelos chamados fatores capacitantes (FLESCH e GADELLA, 2000). A presença de glicaminoglicanos nas secreções do útero e do oviduto de cadelas pode induzir à capacitação de espermatozoides caninos (KAWAKAMI et al., 2000). Outros fatores incluem as proteínas da ZP e progesterona (CHENG et al., 1998; KAWAKAMI et al., 1993). Durante esta fase, o gameta masculino utiliza fontes de energia limitada, representadas pelas mitocôndrias da peça intermediária e se locomove por quimiotaxia em busca do gameta feminino (ROSSI- FERRAGUT et al., 2001). Segundo Cohen-Dayag et al. (1995), a resposta quimiotática do espermatozoide é parte do processo de capacitação e se desfaz quando esta etapa é finalizada.

Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), cuja elevação intracelular conduz à reação acrossômica, bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), que controla os eventos de fosforilação e albumina sérica bovina (BSA), que atua removendo o colesterol e o zinco no espermatozoide, aparecem como componentes essenciais na capacitação *in vitro* de espermatozoides mamíferos (YANAGIMACHI, 1994). Entretanto, o início e a finalização da capacitação espermática parece ser regulada por processos inerentes ao próprio gameta (VISCONTI et al., 1995).

Durante ou após a capacitação, o espermatozoide passa pelas células do *cumulus* e se liga à ZP. Desconhece-se se a passagem através das células do *cumulus* e da *corona radiata* é função da motilidade espermática ou se é suportada por digestão enzimática, por ação da hialuronidase da superfície espermática (BEDFORD, 1998; ROSSI- FERRAGUT et al., 2001; MOORE, 2001). A conexão com a ZP é feita pelo espermatozoide através do reconhecimento da glicoproteína ZP3, localizada na superfície daquela, num processo conhecido como adesão primária e que em diversas espécies de mamíferos dá origem à reação acrossômica (WASSARMAN, 1994; TOSHIMORI, 2000).

A reação acrossômica consiste num processo de exocitose do conteúdo acrossomal, que inclui enzimas hidrolíticas como a hialuronidase e a acrosina, esta última responsável por acelerar a dispersão das proteínas do acrossoma de modo a facilitar a penetração espermática através da ZP (TOSHIMORI, 2000; FLESCH e GADELLA, 2000). Espermatozoides, que sofreram reação acrossômica permanecem aderidos aos ovócitos, através da exposição da membrana acrossomal interna, sob interação com a glicoproteína 2 da ZP (mZP2), que atua como receptora espermática secundária (WASSARMAN, 1994).

Tendo penetrado a ZP, o espermatozoide alcança o espaço perivitelino e se funde com o ooplasma. Imediatamente à fusão do ovócito com o espermatozoide, observa-se exocitose dos grânulos corticais; a ZP torna-se refratária (reação da zona) à adesão de espermatozoides livres e à penetração por espermatozoides que tenham alcançado a camada extracelular anteriormente à fecundação, processo estabelecido por inativação de ZP3 e por modificação de ZP2 (WASSARMAN, 1994). No ooplasma, a cromatina presente na cabeça do espermatozoide sofre descondensação e dá origem ao pronúcleo masculino. O bloqueio da polispermia, resultante da redução na solubilidade da ZP, após ativação ovocitária pelo espermatozoide é espécie-específico e ocorre nos caninos ao nível de ZP (DELL AQUILLA et al., 1999; YANAGIMACHI, 1977).

A penetração espermática possibilita ao ovócito retomar a segunda divisão meiótica, que é finalizada pela extrusão do segundo corpúsculo polar. Após a descondensação espermática forma-se uma nova membrana nuclear ao redor da cromatina masculina e feminina, o que induz à formação dos pronúcleos. Durante o desenvolvimento pronuclear há síntese de DNA e transcrição de RNA (ELDER e DALE, 2000). Progressivamente o pronúcleo masculino e o pronúcleo feminino se aproximam e após um curto período de aposição se fusionam, dando origem ao zigoto (BYSTED, 1999). Moore (2001) considera que se a fecundação *in vivo* nos cães é possível no estágio ovocitário vesicular, o processo de singamia dos pronúcleos somente teria início após o ovócito alcançar maturação ao estágio MII (MOORE, 2001).

### 2.6.2 Fecundação de ovócitos *in vitro*

Em canídeos, fecundação ovocitária *in vitro* tem mostrado resultados pouco consistentes, uma situação relacionada a dificuldades encontradas na MIV dos ovócitos com subsequente limitação nos índices de penetração espermática e desenvolvimento embrionário (LUVONI, 2000).

A fecundação é caracterizada através da observação de descondensação espermática, extrusão do 2º corpúsculo polar ou formação de pronúcleo masculino e feminino no ooplasma (POPE et al., 1993).

Mahi e Yanagimachi (1976) relatam índices de 19,7 % de descondensação da cabeça espermática após FIV de ovócitos caninos maturados *in vitro*. Esses autores verificaram que a possibilidade de penetração independe do estágio de maturação celular, com 27,3 % de descondensação sendo registrada em ovócitos não cultivados. Este fato é confirmado em experimentos recentes, nos quais a FIV precoce revela adicionalmente elevação no índice de maturação do estágio de VG a MII (SAINT- DIZIER et al., 2001). Nesta espécie foi demonstrado que, penetração espermática não apresenta correlação com o diâmetro ovocitário, mas de acordo com Otoi et al. (2000b) os ovócitos caninos somente adquirem competência meiótica, quando seu diâmetro alcançar 120µm.

A injeção espermática intracitoplasmática (ICSI), efetuada em um número reduzido de ovócitos retirados do tecido ovariano de fêmeas ovariectomizadas em diversos estágios do ciclo estral, mostrou que formação de pronúcleo masculino (7,8%) e apresentação de pronúcleo feminino com cromatina descondensada (42 %) é possível através desta técnica (FULTON et al., 1998).

A penetração de espermatozoides frescos na ZP de ovócitos caninos maturados *in vitro* por 48-72 hs já foi verificada à 1h da adição seminal ao meio com os ovócitos (NICKSON et al., 1993).

Num outro experimento, Farstad et al. (2001) observaram que na progressão do processo de fecundação de ovócitos de raposa azul (*A. lagopus*) por espermatozoides homólogos, adesão e penetração na ZP era verificada às 4hs da FIV. Após 8hs, vários espermatozoides eram visualizados no espaço perivitelino de cada ovócito; penetração espermática no ooplasma, associada com descondensação da cromatina do espermatozoide já podia ser verificada dentro deste intervalo de tempo. Em cadelas, índices de penetração ovocitária de 10 a 25 % são registrados após 20 horas de fecundação *in vitro* (OTOI et al., 2000b).

Em caninos, o estágio de divisão celular mais avançado já obtido, através de FIV, não ultrapassava até algum tempo atrás 8 células (YAMADA et al.,1992). Recentemente, Otoi et al. (2000a) provaram que ovócitos caninos maturados *in vitro* e submetidos ao co-cultivo com células do *Cumulus oophorus*

bovinas podem não apenas ser fecundados, como também são passíveis de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, embora a índices reduzidos (0,5 %).

Num estudo pioneiro de transferência embrionária (TE) em caninos, England et al. (2001) relataram pela primeira vez implantação embrionária, ainda que sem continuidade gestacional, de três vesículas embrionárias oriundas de FIV de ovócitos submetidos à maturação *in vitro*.

### 2.6.3 Capacitação e reação acrossômica *in vitro*

O processo de capacitação *in vitro* pode ser observado sob determinadas condições entre as quais, remoção do plasma seminal, presença de um acceptor de colesterol ou presença de heparina (HAFEZ, 1993; FOURNIER- DELPECH e THIBAUT, 1993).

Nos meios que suportam a FIV, bicarbonato aparece como componente responsável na indução da capacitação (GADELLA e HARRISON, 2000), estimulando adenililciclase a elevar os níveis intracelulares de AMPc, que age como mensageiro secundário aumentando a função fecundante espermática (VISCONTI et al., 1995).

Mahi e Yanagimachi (1976) verificaram que o espermatozóide canino necessita de aproximadamente 7 hs para capacitação *in vitro*. Estes autores constataram que a presença do bicarbonato no meio de capacitação conduz à elevação do pH, que situado entre 7,4 e 7,8, permite capacitação e facilita a indução da reação acrossômica. Eles consideram que a concentração ideal de bicarbonato, necessária à indução desse processo, esteja situada ao redor de 37,6mmol.

Yamada et al. (1993) demonstraram que espermatozóides caninos capacitados *in vitro* podem penetrar a zona pelúcida de ovócitos homólogos provenientes de folículos pré-ovulatórios, submetidos a tratamentos com gonadotropinas.

Nessa espécie, penetração espermática na zona pelúcida, após 24 horas de co-incubação dos gametas, registra uma adesão de 4,1 espermatozóides por ovócito (HAY et al., 1997) e possibilidade de formação de pronúcleo masculino e feminino em até 37 % de ovócitos incubados com espermatozóides frescos (NICKSON et al., 1993).

De acordo com Hewitt e England (1998a), os meios TALP (Tyrode-Albumin-Laktat-Pyruvat) (BAVISTER et al., 1983) e CCM (Canine Capacitation Medium) (MAHI e YANAGIMACHI, 1978) são similarmente eficazes no estabelecimento da capacitação e na promoção da reação acrossômica de espermatozóides caninos.

A separação e a seleção de espermatozóides viáveis pode ser efetuada através da técnica de swim-up (KEEFER et al., 1985; PARRISH et al., 1986), na qual os espermatozóides com capacidade de migração são submetidos à centrifugação repetida, o que permite a remoção dos fatores decapacitantes presentes no epidídimo e no plasma (PARRISH et al., 1986). Também, a técnica de separação através de gradiente descontínuo com Percoll, um polímero revestido de sílica coloidal que minimiza a geração de espécies deletérias oxigênio reativas (QUINN, 2000), tem sido usada na lavagem espermática para preparação ao processo de FIV em diferentes espécies. Em suínos, espermatozóides tratados através da técnica com

Percoll mostraram aceleração e elevação dos índices de penetração ovocitária após a fecundação *in vitro* (MATÁS et al., 2003).

Considera-se como tendo estabelecido capacitação e reação acrossômica adequada o espermatozóide que exibe aumento de motilidade, hiperativação, basicamente caracterizada por uma alteração na amplitude. O gameta masculino exibe movimentos não progressivos mesclados com breves movimentos lineares (ROSSI-FERRAGUT et al., 2001). Aglutinação intensiva do tipo cabeça-cabeça é característica de capacitação espermática e parece estar relacionada a forças geradas através de mudanças eletrolíticas intra ou extra-celulares nos espermatozoides (SHAMSUDDIN e RODRIGUEZ- MARTINEZ, 1994).

Recentemente, Guérin et al. (1999) demonstraram que a cinética da capacitação espermática em caninos se assemelha a de outras espécies. Modificações efetuadas no meio de capacitação CCM (MAHI e YANAGIMACHI, 1978), através de substituição de bicarbonato de sódio por tris-hidroxi-metil-amino-metano (TRIS) e elevação do teor de BSA de 2g/l para 10g/l foram consideradas benéficas à preservação da motilidade espermática canina, com capacitação sendo observada às 3 horas da incubação espermática (GUÉRIN et al., 1999). Rota et al. (1999) verificaram que o tempo médio no estabelecimento da capacitação com manutenção da integridade acrossomal de espermatozoides submetidos a congelamento ou resfriamento é de 2 horas. Esses procedimentos parecem facilitar as mudanças associadas à capacitação espermática em cães. Esses autores observaram que a conservação dos espermatozoides reduz o número de células não capacitadas e com integridade acrossomal.

Kawakami et al. (1999) verificaram que espermatozoides caninos incubados em CCM acrescido de 20ug/ml de heparina + 10ug/ml de teofilina preservam por mais tempo a motilidade celular. Neste estudo, heparina e teofilina, isoladamente ou em associação, não mostraram quaisquer efeitos sobre a reação acrossômica espermática, o que levou os autores a concluir que o fator principal de indução *in vivo* na reação acrossômica nos caninos está vinculado à zona pelúcida.

Sirivaidyapong et al. (2000) afirmam que a incidência da reação acrossômica espermática está correlacionada à composição do diluidor usado para manutenção celular, assim como à temperatura de incubação dos espermatozoides. Segundo esses autores, espermatozoides submetidos a concentrações elevadas de  $Ca^{2+}$  e à temperatura de +37°C durante o período de incubação manifestam reação acrossômica de forma mais expressiva comparativamente àqueles submetidos a concentrações menores daquele íon e a temperaturas mais reduzidas (+20°C).

### 3 ARTIGO 1

#### EFFECT OF TWO TEMPERATURES ON *IN VITRO* NUCLEAR MATURATION OF BITCH OOCYTES: RELATION TO TIME CULTURE INTERVALS

**B.A. Rodrigues, J.L. Rodrigues**

(aceito para publicação no periódico Revista Brasileira de Ciência Veterinária, janeiro de 2003)

##### Resumo

No presente estudo, duas temperaturas de incubação habitualmente usadas na maturação *in vitro* ovocitária na espécie canina (*Canis familiaris*) foram testadas com o objetivo de verificar o índice de maturação nuclear de ovócitos submetidos a três tempos de cultivo (48, 72 e 96 horas).

O meio de maturação usado foi TCM-199, suplementado com 25mM HEPES/l (v/v), adicionado de 10% de soro inativado de vaca em estro (SVE), 50µg/mL de gentamicina, 2,2mg/mL de bicarbonato de sódio, 22µg/mL de ácido pirúvico, 1,0µg/mL de estradiol (E 8875 Sigma), 0,5µg/mL de FSH (Folltropin-V, Vetrepharm Inc. Ont, Canada) e 0,03UI/mL de hCG (Profasi HP, Serono, Aubonne, Switzerland).

Os ovócitos foram retirados de cadelas submetidas à ovariectomia em caráter eletivo (n=14) ou terapêutico (n=8) no hospital veterinário da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

Não foi encontrada diferença estatística no índice de meiose de ovócitos maturados a 37°C ou a 39°C nos diferentes intervalos de tempo testados.

No entanto, a proporção de ovócitos que alcançaram o estágio de metáfase II (MII) a 37°C após 72 horas de incubação (16/123; 13%) mostrou uma tendência estatística à significância (p=0,064), quando comparada com a proporção de ovócitos maturados a 39°C (6/148; 4,1%).

Os resultados mostram que temperaturas de 37°C e 39°C são equivalentes na indução da maturação *in vitro* de ovócitos caninos.

Palavras chave: canino, ovócito, maturação *in vitro*, temperatura, tempo de cultivo.

##### Abstract

In the present study, two commonly incubation temperatures used on *in vitro* oocyte maturation in canine species (*Canis familiaris*) were analysed with the aim to verify the rate of nuclear maturation of bitch oocytes after three culture intervals (48, 72 and 96 h).

The culture medium was TCM 199, supplemented with 25mM HEPES/l (v/v), with 10% heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50µg/mL gentamicin, 2.2mg/mL sodium bicarbonate and 22µg/mL pyruvic acid, 1.0µg/mL oestradiol (E 8875 Sigma), 0.5µg/mL FSH (Folltropin-V, Vetrepharm Inc. Ont, Canada) and 0.03IU/mL hCG (Profasi HP, Serono, Switzerland).

Oocytes were recovered from ovaries of bitches at random estrous cycle stages by routine ovariectomy (n=14) or by therapeutical ovariectomy (n=8) at the veterinary hospital of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

There was no statistical difference in the rate of meiosis of oocytes matured at 37°C or at 39°C at any time point. However, the proportion of oocytes that reached the metaphase II (MII) stage at 37°C after 72 h of *in vitro* culture (16/123; 13%), tended to be higher ( $P= 0.064$ ), when compared to that matured at the 39°C (6/148; 4,1%).

The results demonstrate that temperatures of 37°C and 39°C are equally effective for the *in vitro* culture of bitch oocytes.

Key words: canine/ oocyte/ *in vitro* maturation/ temperature/ culture time

## **Introduction**

During the last years, little progress has been reported towards understanding the basic requirements of the *in vitro* oocyte development in the bitch.

Parallel studies developed with various mammalian species, particularly cattle, mice and even humans, have been traditionally used as models to study canine oocyte maturation and *in vitro* fertilization.

An elementary aspect, but not emphasized in previous studies, concerns the influence of culture temperature for oocyte development. Temperature modulates the physical properties of the lipids in biological membranes, together with changes in the lipid composition of the membrane (QUINN, 1985).

The lack of information and the need for the standardization of a specific temperature is therefore a very important feature of the *in vitro* reproductive program in the bitch, which still needs to be defined.

The aim of this study was to compare the effect of two different incubation temperatures on the nuclear *in vitro* oocyte maturation in the bitch. The relation to three different time culture intervals was additionally investigated.

## Materials and methods

### ***Ovaries and collection of oocytes***

Ovaries were harvested from purebred (n= 11) and crossbred (n=11) bitches (aged 2.5-120 months). Oocytes were recovered from ovaries of bitches at random stages of the estrous cycle by routine ovariectomy (n= 14) or by therapeutical ovariectomy following vaginal hyperplasia (n=1), cystic endometrial hyperplasia- piometra (n= 3), abortion (n= 1), dystocia (n= 2), vaginitis (n= 1) at the veterinary hospital of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. Oocytes were recovered by slicing the ovaries in modified phosphate-buffered saline (PBS) (WHITTINGHAM, 1971) supplemented with foetal calf serum (FCS) (1:100) at 37°C to release cumulus oocyte complexes (COCs). Oocytes were graded according to the criteria reported by Hewitt et al. (1998). Grade 1 (darkly pigmented and completely surrounded by one or more layers of cumulus cells) and Grade 2 COCs (lightly pigmented with incomplete layers of cumulus cells) were selected for culture (n= 523) and rinsed in HEPES-buffered TCM 199 before maturation.

### ***In vitro maturation***

The culture medium was TCM-199, supplemented with 25mM Hepes/l (v/v), supplemented with 10% heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50µg/mL gentamicin, 2.2mg/mL sodium bicarbonate and 22µg/mL pyruvic acid, 1.0µg/mL oestradiol (E-8875 Sigma), 0.5µg/mL FSH (Folltropin-V, Vetrepharm

Inc., Ont, Canada) and 0.03 IU/mL hCG (Profasi HP, Serono, Aubonne, Switzerland). Selected oocytes were randomly distributed to 37°C and 39°C temperatures and matured at culture intervals of 48, 72 and 96 hours in 100µl droplets (up to 25 oocytes per drop) under mineral oil in a 100% humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air.

#### ***Assessment of nuclear stage of maturation***

At final time of *in vitro* culture (48, 72 or 96 h), oocytes were denuded of cumulus cells, permeabilized in Triton X (Sigma, St Louis, MO, USA), fixed in a 3.7% paraformaldehyde solution and stained with the deoxyribonucleic acid (DNA) specific stain Hoechst 33342 (10µg/ml) (Sigma, St Louis, MO, USA ) for fluorescence microscopic analysis of the nuclear maturation stage.

Nuclear morphology was classified as germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase/anaphase I (MI/AI), metaphase II (MII), unidentified or degenerated (others).

Treatment effects were evaluated by Chi-Square analysis with adjusted residual. The data of meiotic resumption were analysed by Goodness-of-fit chi-square test for an uniform distribution. Effects were considered significant with  $P < 0.05$  as level of significance.

#### **Results and discussion**

There was no statistical difference between the nuclear meiotic rate of oocytes matured at 37°C or at 39°C, suggesting that the outcome of *in vitro* oocyte maturation in the domestic canine species is similar at the tested temperatures. However, the proportion of oocytes maturing to the MII stage at 37°C after 72 h of *in vitro* culture (16/123; 13%) tended to be higher ( $P = 0.064$ ), when the data were compared to the combined temperature of 39°C (6/148; 4.1%) (Table 1).

Meiotic resumption was similar at the combined temperatures at each time point.

Likewise, viability maintenance was similar at the tested temperatures into culture intervals.

Meiosis rate showed a high individual variability with the percentage of MII stage achievement ranging from 0% to 22% among bitches. The majority of oocytes maturing to MII stage were retrieved from bitches aged between 1 to 5 years.

Oocytes retrieved from three bitches submitted to therapeutical ovariohysterectomy following abortion, dystocia and vaginitis matured to MII at rates of 8.5% (3/35), 15.6% (5/32), and 22% (2/9), respectively.

At 37°C and 72 h time culture and at 39°C and 96 h time culture, an increase of oocytes reaching the MII stage and the MI/AI stages achievement was respectively observed (Table 1), suggesting an improvement of the meiotic nuclear acquisition at extended time of *in vitro* culture.

*In vitro* incubation temperatures of bitch oocytes still do not follow an established pattern. Thus, during the last years, several temperatures have been used on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. Oocyte development in canine species has already been attempted at 37°C (MAHI and YANAGIMACHI, 1976), at 37.5°C (OTOI et al., 2000a), at 38°C (SRSEN et al., 1998), at 38.5°C (SAINT- DIZIER et al., 2001) and at 39°C (HEWITT et al., 1998), with variable rates of success.



Temperature and time culture used on *in vitro* studies with oocytes retrieved from ovarian follicles of domestic animals are based on the *in vivo* knowledge of specific physiologic and reproductive mechanisms.

In the bitch, oocytes are ovulated at the prophase of the first meiotic division (Farstad, 2000), 24 to 50 hours after the LH peak (CONCANNON et al., 1989; HASE et al., 2000). Ovulation is a synchronous phenomenon confined to a narrow time window up to 12-24 h (DIETERICH, 1994; MEISL, 1998).

In contrast, 48 to 72 hours are required to complete oocyte maturation to the MII stage in the final portion of the oviduct (CONCANNON et al., 1989), a finding observed on previous *in vitro* studies (FUJII et al., 2000; HEWITT et al., 1998), as well as in the present experiment.

Body temperature is about 38°C (100.5°F) in the bitch. However, thermoregulation mechanisms before parturition, induced by the drop in the plasma progesterone concentrations, lead to temperature decline below 37.5°C (99.5°F) (ALLEN, 1992).

Experimental data have shown good results from *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bitch oocytes at temperatures equal or slightly higher than 37°C (YAMADA et al., 1992; OTOI et al., 2000a), as well as at temperatures above 38°C (SAINT-DIZIER et al., 2001; ENGLAND et al., 2001).

In cattle, ambient temperature influences embryonic development (ZERON et al., 2001), which is the ultimate goal of an *in vitro* program. Therefore, studies conducted to examine oocyte development should also be committed with oocyte competence after *in vitro* fertilization.

It seems that temperatures between or at the physiologic body extremes, do not adversely influence oocyte development in the canine species. Despite that, further research is required to evaluate in which way temperature is capable to favorise embryonic development of advanced stages in the bitch.

The results herein demonstrate that temperatures of 37°C and 39°C are equally adequate to support the nuclear *in vitro* maturation requirements of bitch oocytes.

Table 1: Two combined temperatures and three time culture intervals on the *in vitro* nuclear maturation of bitch oocytes

Temperatur	COCs*	GV (%)*	GVBD (%)*	MI/AI (%)*	MII (%)*	Others (%)*
	n	48 hours culture				
37°C	67	19 (28,4)	10 (14,1)	8 (11,9)	0 (0)	30 (44,8)
39°C	79	25 (31,6)	4 (5,1)	11 (13,9)	2 (2,5)	37 (46,83)
	n	72 hours culture				
37°C	123	20 (16,3)	14 (11,4)	16 (13,0)	16 (13,0)	57 (46,3)
39°C	148	21 (14,2)	23 (15,5)	27 (18,2)	6 (4,1)	71 (48,0)
	n	96 hours culture				
37°C	53	5 (9,4)	5 (9,4)	4 (7,5)	4 (7,5)	35 (66,0)
39°C	53	8 (15,1)	2 (3,8)	9 (17,0)	6 (11,3)	28 (52,8)

\*COCS: cumulus oocyte complexes, GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI/AI: metaphase/anaphase I, MII: metaphase II, others: unidentified or degenerated

## 4 ARTIGO 2

### MEIOTIC RESPONSE OF *IN VITRO* MATURED CANINE OOCYTES UNDER DIFFERENT PROTEINS AND HETEROLOGOUS HORMONE SUPPLEMENTATION

**B.A. Rodrigues, J.L. Rodrigues**

(publicado no periódico *Reproduction in Domestic Animals (RDA)* v. 38, p. 58-62, 2003)

#### Contents

The impact of TCM-199 supplemented with different proteins and heterologous hormones on the *in vitro* maturation (IVM) rate of bitch oocytes was evaluated by nuclear staining under fluorescence microscopy. Oocytes were recovered by slicing of ovaries from bitches presented at various stages of oestrous cycle to ovariectomy.

The basic culture medium was TCM-199 supplemented with 25mM Hepes/l, with 10% heat-inactivated oestrous cow serum (ECS), 50µg/ml gentamicin, 2.2mg/ml sodium bicarbonate and 22µg/ml pyruvic acid, 1.0µg/ml oestradiol (E 8875; Sigma), 0.5 µg/ml follicle-stimulating hormone (FSH) (Folltropin-V, Vetrepharm Inc., Ontário, Canada) and 0.03 IU/ml human gonadotropin (hCG) (Profasi HP, Serono, Aubonne, Switzerland). Oocytes were distributed randomly between basic culture medium (control) and the corresponding experimental treatment. Hormone treatments were: oocytes cultured in; 1) medium without FSH, 2) control medium supplemented with 20µg/ml oestradiol, or 3) medium supplemented with 1µg/ml human somatotropin (hST, Humatrope, Lilly, Saint Cloud, France). The second experiment consisted of oocytes cultured in medium supplemented with 0.4% (w/v) bovine serum albumin (BSA, fraction V, Gibco Grand Island, NY, USA) instead of ECS, or oocytes cultured in medium with 10% inactivated oestrous bitch serum (EBS) instead of ECS. Oocytes were cultured in 100µl droplets (up to 25 oocytes per drop) under mineral oil at 37°C in a 100% humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air. After 72 h of IVM, the highest rates ( $P < 0.05$ ) of meiotic resumption were achieved with the 0.4% BSA supplementation. A positive influence on the metaphase II (MII) acquisition rate was observed with hST supplement. Oocytes cultured with 10% EBS supplementation did not develop to the MII stage.

The results in this study show that the protein and hormone supplements to TCM-199 culture medium tested did not promote the final steps of *in vitro* maturation of bitch oocytes.

#### Introduction

Canine oocytes are ovulated at prophase of the first meiotic division (Farstad, 2000), 36-50 h after the LH luteinization hormone peak (CONCANNON et al., 1989). The competence to undergo meiotic maturation is progressively acquired and depends on the interaction of many correlated factors. There are important changes at the nuclear and cytoplasmic levels, for the oocyte to progress to metaphase II (MII).

Biotechnological procedures, such as *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF), work at cellular level, which leads to the possibility to inhibit or facilitate fertilization. This will be very important to introduce new methods to control overpopulation of dogs as an option for the present surgical methods or hormonal therapies.

In spite of our increased knowledge of *in vitro* techniques, the developmental competence of *in vitro* matured canine oocytes remains very low. This is probably because of inadequate changes at the nuclear and cytoplasmic levels during maturation, as a consequence of inappropriate culture conditions.

The impact of protein and hormone supplementation on IVM of bitch ovarian oocytes has been observed in various studies (NICKSON et al., 1993; HEWITT et al., 1998; SRSEN et al., 1998). These studies have shown that the optimal type and concentration of supplements to facilitate oocyte maturation remains to be achieved.

There are conflicting results on the roles and concentrations of proteins and hormones as IVM supplements in carnivore studies. Hormonal supplementation, viewed as adequate to promote oocyte maturation in cats (JEWGENOW and PITRA, 1993; WOOD et al., 1995), have led to unsatisfactory results in dogs (HEWITT and ENGLAND, 1997; HEWITT and ENGLAND, 1999a).

The follicle-stimulating hormone (FSH) supplementation, that induces cumulus cell expansion and provides adequate connection between Corona radiata and oolemma of *in vitro* cultured Blue fox (*Alopex lagopus*) cumulus oocyte complexes (COCs), does not enhance meiotic progression beyond the germinal vesicle (GV) stage in that species (SRSEN et al., 1998).

Recombinant bovine somatotropin (bST) at high concentrations has already been shown to accelerate and to increase Blue fox *in vitro* oocyte maturation to MII (SRSEN et al., 1998). Porcine somatotropin supplementation did not achieve the same results as recently observed in dogs (WILLINGHAM- ROCKY et al., 2002).

According to Hewitt and England (1999b), supplementation of the culture medium with 0.3% bovine serum albumin (BSA) promotes resumption of oocyte maturation [germinal vesicle breakdown (GVBD)] and progression to metaphase I/anaphaseI/metaphaseII (MI/AI/MII) after 48 and 96 h of oocyte culture.

Oestradiol supplements have been useful to facilitate the final stages of oocyte development in the bitch (NICKSON et al., 1993), by the influence exerted on gap junctions between cumulus cells and the oocyte (WOOD et al., 1995).

A few studies reported improved results on survival and on IVM of dog oocytes by using oviductal fluid and oviductal tissue in co-culture (HEWITT and ENGLAND, 1999b; LUVONI et al., 2002).

The aim of this study was to evaluate how the presence or the absence of different proteins and hormones in the TCM-199 culture medium influences the IVM rate of canine oocytes.

## **Materials and Methods**

### **Ovaries and collection of oocytes**

Ovaries were harvested from purebred (n=19) and crossbred (n=31) bitches (aged 7-108 months) at various stages of oestrous cycle by routine ovariohysterectomy for the purpose of neutering at the veterinary hospital of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Ovarian morphological appearance after collection showed the presence of corpora lutea (n=24) and follicle (n=12). Ovaries without functional tissue were recorded in the remaining bitches (n=14). Oocytes were recovered by slicing the ovaries in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with foetal calf serum (FCS) (1:100) at 37°C to release COCs, which were graded according the criteria reported by Hewitt et al. (1998). Grade 1 COCs (darkly pigmented and completely surrounded by one or more layers of cumulus cells) and grade

2 COCs (lightly pigmented with incomplete layers of cumulus cells) were selected for culture (n=1339) and rinsed in TCM-HEPES-buffered before maturation.

### ***In vitro* maturation**

The basic culture medium, designed in the present study as control group, was TCM-199 supplemented with 25mM HEPES/l (v/v), with 10% heat inactivated oestrous cow serum (ECS), 50µg/ml gentamicin, 2.2mg/ml sodium bicarbonate and 22µg/ml pyruvic acid, 1.0µg/ml oestradiol (E 8875 Sigma), 0.5 µg/ml FSH (Folltropin-V, Vetrepharm Inc.) and 0.03 IU/ml hCG (Profasi HP, Serono). Oocytes were distributed randomly between basic culture medium (control) and the corresponding experimental treatment. Hormone treatments consisted of: group 1: oocytes cultured in control medium without FSH; group 2: oocytes cultured in control medium with 20µg/ml oestradiol, group 3: oocytes cultured in control medium with 1µg/ml hST (Humatrope, Lilly). Protein treatments consisted of: group 4: oocytes cultured in medium with 0.4% (w/v) bovine serum albumin (BSA, fraction V, Sigma) instead of ECS; group 5: oocytes cultured in medium with 10% inactivated oestrous bitch serum (EBS) instead of ECS. Oocytes were cultured in 100µl droplets (up to 25 oocytes per drop) under mineral oil at 37°C (MAHI and YANAGIMACHI, 1976) in a 100% humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air for 72 h.

### **Assessment of nuclear stage of maturation**

At 72 hours of *in vitro* culture, oocytes were denuded of cumulus cells, permeabilized in Triton X, fixed in a 3.7% paraformaldehyde solution and stained with Hoechst 33342 (Sigma, St Louis, MO, USA) (10µg/mL) for fluorescence microscopic analysis of the nuclear maturation stage.

Nuclear morphology was classified as GV, GVBD, MI/AI/MII, unidentified or degenerated (others).

### **Statistical analysis**

Treatment effects were evaluated by chi-Square analysis with adjusted residual. Effects were considered significant with an  $\alpha$ - level of  $p < 0.05$ .

### **Results**

The results showing the meiotic progression after the oocytes were exposed to the different hormones during the IVM period are summarized in Table 1.

Table 1: The *in vitro* nuclear maturation rates of canine oocytes exposed to different heterologous hormone supplementation.

Hormone Treatment	n	GV (%) <sup>*</sup>	GVBD (%) <sup>*</sup>	MI/AI (%) <sup>*</sup>	MII (%) <sup>*</sup>	Others (%) <sup>*</sup>
Control	89	34 (38.2)	7 (7.9)	7 (7.9)	5 (5.6)	36 (40.4)
Without FSH	114	49 (43.0)	21 (18.4)	10 (8.8)	7 (6.1)	27 (23.7)
Control	80	38 (47.5)	14 (17.5)	5 (6.3)	1 (1.3)	22 (27.5)
Oestradiol 20µg	96	48 (50.0)	18 (18.8)	8 (8.3)	4 (4.2)	18 (18.8)
Control	163	31 (19.0)	15 (9.2)	12 (7.4)	4 (2.5)	101 (62.0)
HST	178	35 (19.7)	27 (15.2)	11 (6.2)	10 (5.6)	95 (53.4)

\*GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI/AI: metaphase/anaphase I, MII: metaphase II, others: unidentified or degenerated, hST: human somatotropin, FSH: follicle-stimulating hormone

Although the results showed a positive influence in the presence of human somatotropin (hST) supplementation for the acquisition of maturation, there were no significant differences in the number of oocytes that reached MII at 72 h of IVM, when comparison was established with the control treatment ( $p=0.213$ ).

Maturation medium without FSH contributed to increased GVBD compared with the corresponding control medium, but the difference was not significant ( $p=0.063$ ). Moreover, FSH absence did not enhance the meiotic progression.

Oestradiol supplementation at a higher concentration of 20µg/ml did not produce an effect different from that of 1µg/ml concentration in the control medium ( $p=0.537$ ).

Meiotic resumption percentage for each experimental treatment was measured to be 33.3% for FSH absence, 31.3% for oestradiol 20µg and 27.0% for hST.

The effects of the different protein supplementation treatments on oocyte maturation are shown (Table 2).

Table 2: The *in vitro* nuclear maturation rates of canine oocytes exposed to different proteins.

Protein supplement	n	GV (%)	GVBD (%)	MI/AI (%)	MII (%)	Others (%)
ECS (control)	143	17 (11.9)	14 (9.8)	10 (7.0) <sup>a</sup>	3 (2.1)	99 (69.2)
BSA 0.4%	150	11 (7.3)	15 (10.0)	30 (20.0) <sup>b</sup>	2 (1.3)	92 (61.3)
ECS (control)	143	37 (25.9)	11 (7.7)	6 (4.2) <sup>A</sup>	5 (3.5) <sup>c</sup>	84 (58.7)
EBS	183	44 (24.0)	17 (9.3)	19 (10.4) <sup>B</sup>	0 (0.0) <sup>d</sup>	103 (56.3)

ECS: oestrus cow serum, BSA: bovine serum albumin, EBS: oestrus bitch serum

<sup>A,B; a,b; c,d</sup> superscripts indicate significant difference compared with the corresponding control treatment ( $p < 0.05$ ), by chi-square analysis.

Of 150 oocytes cultured in the presence of 0.4% BSA, 32 (21.3%) achieved maturation to MI/AI/MII. The highest rates of oocytes undergoing nuclear maturation to MI/AI stages (30/150), as well as the rates of meiotic resumption (47/150, 31.3%) were achieved with 0.4 % BSA supplementation. The rate of oocytes undergoing MI/AI maturation with BSA in medium was statistically different from the rate observed in the control group ( $p = 0.020$ ). However, despite the superiority of BSA at that development point, in this study the protein was unable to support further maturation to the MII stage in the same proportion. There was no influence on the number of oocytes matured to the MII stage in TCM-199 with ECS and in TCM-199 supplemented with 0.4% BSA (3/143, 2.1% vs 2/150, 1.3%).

Oocytes matured in medium with 10% EBS did not progress into MII. The percentages of oocytes reaching MII were significantly higher after culture with ECS (control group) (5/143, 3.5%) rather than with EBS (0/183, 0%) ( $p = 0.028$ ). Nevertheless, TCM-199 supplemented with EBS was more efficient at promoting maturation to MI/AI stages compared to the corresponding control group.

## Discussion

The results obtained in this study demonstrate that medium TCM-199 with different protein and heterologous hormone supplementation support resumption of meiosis of bitch oocytes to MII (199/721, 27.6%). The percentages obtained in this study are comparable to the values reported in the literature, i.e., 0-58% (FARSTAD, 2000).

Some reasons supporting the present results point to individual oocyte or donor variations, as already noticed by Sippos (1997), or to oocytes stemming from atretic follicles, which may possess non-detectable changes in oocyte morphology that precludes normal development (FARSTAD et al., 2001). Oocytes destined for atresia mimic progression into meiosis (JEWGENOW and GÖRITZ, 1995) but do not possess meiotic ability (HYTTEL et al., 1997).

A large number of oocytes in the present study were degenerated after culture. This might be a condition acquired during the IVM period (JEWGENOW and GÖRITZ, 1995), but may also be present in several oocytes before culture as have been observed in other studies (MAHI and YANAGIMACHI, 1976; RAZEK, 1996; KOFLER, 1999).

Optimal culture conditions are related to preservation of oocyte morphology (FIGUEIREDO et al., 1994), sustaining oocyte viability (JEWGENOW and PITRA, 1993), DNA content increase and follicle expansion (NUTTINCK et al., 1993). Thus, the low rate of meiotic competence to the MII stage might be related to unsuitability of the present culture medium itself.

In the present study, the oocytes matured in TCM-199 supplemented with 0.4% BSA showed the highest development rates ( $p < 0.05$ ) to MI/AI stage and were statistically different when compared with control treatment. Benefits of BSA supplementation are related to the amount of growth factor (GF) bound to the protein (HEWITT and ENGLAND, 1999b; OCÑA- QUERO et al., 1999). Furthermore, the quenching capacity of serum albumin leads to inactivation of toxic metabolites from free oxygen radical production (BAVISTER, 1995) and allows the incorporation of components, such as steroids, vitamins, fatty acids and cholesterol, with inhibitory or stimulatory responses (MAURER, 1992). This could explain how, despite the superiority of promoting MI, the protein was unable to support further maturation to MII stage at the same rate, and therefore suggesting a conflicting role for BSA on IVM of bitch oocytes.

The present data indicate that maturation medium without FSH contributed to overcoming the meiotic block, but did not enhance the meiotic progression. Follicle-stimulating hormone (FSH) apparently promotes maturation by regulating cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentrations (SALUSTRI et al., 1985), and a drop in intracellular concentrations of cAMP is a prerequisite meiotic step, controlled by M-phase promoting factor (MPF) (SALUSTRI et al., 1985; HEIKINHEIMO and GIBBONS, 1998). Adequate levels and activation of MPF components at the end of oocyte growth leads to the acquisition of meiotic competence (MOTLIK et al., 1998).

On the other hand, *in vitro* culture of Blue fox (*A. lagopus*) oocytes in presence of FSH is associated with arrest of meiotic progression in GV stage (SRSEN et al., 1998). In this study, TCM-199 without FSH contributed to improve GVBD rate. However, as already reported by Srsen et al. (1998) and observed in the present study, FSH absence was associated with a disconnection between corona cells and the oocyte. Follicle-stimulating hormone (FSH) is associated with cumulus cell expansion (GOODROWE et al., 1991). Cumulus cells are responsible for the communications between the germinal and somatic compartments in the oocyte (LUVONI et al., 2001). As meiotic competence is dependent on material exchange at the gap junctions, oocytes without cumulus cells are deprived of their ability to transfer regulatory substances between the cellular compartments (SMITZ et al., 2001) and thus become unable to develop.

Previous work conducted by Nickson et al. (1993) and Otoi et al. (1999) showed that *in vitro* cultured bitch oocytes supplemented with canine oestrous serum achieve very high rates of maturation, which is in disagreement with the data observed in this study. The reasons for this contradiction are not clear, as the percentage of serum was similar in both the present and cited studies. In this study, the serum concentration was based on oestrous bitch clinical signs, i.e. receptivity to mounting and vaginal cytology smear changes. It is known that onset of fully receptive oestrous behavior correlates with the pre-ovulatory LH, which is associated with progesteron levels above 1ng/ml (CONCANNON, et al., 1989). Predominance and distribution of superficial cells on the vaginal smears of oestrous bitches indicate cycle progression, which in turn is very much used to monitor the periovulatory period in bitches (FELDMAN and NELSON, 1997). However, *in vivo* oocyte maturation in the bitch is completed in the oviduct under



much higher progesteron levels, and under influence of physical interaction between oocytes and oviductal mucosa (CONCANNON et al., 1989; TSUTSUI, 1989). This might explain the advantageous effect on meiosis rate of *in vitro* cultured canine oocytes under conditions, those of resembling the oviduct environment (HEWITT and ENGLAND, 1999b; LUVONI et al., 2002).

As the amount and the proportion of oestrogen and progesterone in serum of the females has not been discussed by other authors, we speculate that the concentration in our study was not satisfactory to promote the oocyte development.

As *in vitro* culture of domestic cat oocytes showed that maturation frequency is negatively affected when oestrous cat serum is added to the medium (GOODROWE et al., 1991), it could be additionally presumed that, despite species differences, maturation with EBS reproduced in our study the previous patterns observed in felines. Moreover, experiments conducted *in vitro* may provide spurious results as a result of migration of the steroid hormones from the culture medium to the oil in culture systems that use silicon or mineral oil (GONÇALVES et al., 1996).

Oestradiol supplementation provides, as already reported, maturational support to gonadotropin on *in vitro* culture media tested for cats (GOODROWE et al., 1991).

Based on the arguments that oestradiol functions as a costimulator for FSH-induced follicular growth, for expression of the LH receptor in mural granulosa cells and also as co-enhancer of the production of insulin-like GF I and II (IGFI and -II) (SMITZ et al., 2001), it is reasonable to assume that an environment containing increased oestrogens may help to support continued development *in vitro*.

Accelerating and coordinating cytoplasmic and nuclear maturation by somatotropin supplementation have been observed on IVM studies with Blue fox (*A. lagopus*) (SRSEN et al., 1998) and with dogs (WILLINGHAM- ROCKY et al., 2002). Indeed, our own observations using human somatotropin supplement showed a positive influence on oocyte meiosis, with an increase in the number of oocytes reaching MII. This influence, is probably mediated by a mechanism similar to the mechanism observed when using bST, which is known to enhance luteinization of cumulus cells (LANGHOUT et al., 1991).

In teleosts and amphibians, it has been suggested that LH-dependent transduction signals generated by granulosa cells (e.g. cAMP, calcium ions) are transferred to the oocytes via heterologous gap junctions to modulate or to induce oocyte maturational competence, a mechanism generally correlated to indices of lipid coalescence and GV migration (PATINŌ et al., 2001), this one a feature commonly observed by the present authors.

*In vitro* maturation of bovine oocytes in medium supplemented with bovine growth hormone (bGH) results in accelerated progression of meiosis and induced cumulus cell expansion (BEVERS et al., 1997). This is in agreement with the present observations on IVM of bitch oocytes. Since the effect of growth hormone (GH) on nuclear maturation is cAMP-mediated (HULL and HARVEY, 2001), it can be hypothesized that oocytes reaching MII in this study did experience adequate development levels of MPF and were also supplied with effective activation of MPF components.

However, oocyte developmental competence implies a well-timed successive action of LH stimuli at the follicular level and a premature elevation of LH *in vivo* re-starts the meiosis in the oocyte without adequate environmental changes, which are required to sustain early development. Further, when oocyte

nuclear and cytoplasmic maturation do not proceed in a coordinated way, developmental competence fails (SMITZ et al., 2001).

In conclusion, overcoming the failure of developmental competence remains the great challenge to the IVM and IVF of canine oocytes. The data presented herein confirm the findings reported by other authors and reinforce the need for research to establish efficient techniques to resolve the unknown features of the kinetics of *in vitro* meiotic progression in this species.

## 5 ARTIGO 3

### INFLUENCE OF REPRODUCTIVE STATUS ON *IN VITRO* OOCYTE MATURATION IN DOGS

**B.A. Rodrigues, J.L. Rodrigues**

(artigo publicado no periódico Theriogenology, v. 60, p. 59-66, 2003)

#### **Abstract**

In the bitch, oocytes need 48-72 h to complete post-ovulatory maturation to the metaphase II stage in the isthmus of the oviduct, an interval similar to that found in *in vitro* studies. The effect of estrous cycle stage on *in vitro* meiotic competence of dog oocytes has been described in several studies. However, there are no reports evaluating the possible effects of pyometra or pregnancy on subsequent potential of oocytes recovered from such females to undergo *in vitro* maturation.

In this study, immature cumulus-oocyte complexes (COCs) were recovered from fresh excised domestic dog ovaries in various reproductive states. The donor females were classified into groups based on stage of the estrous cycle: follicular (proestrus or estrus), luteal (diestrus) or anestrus or at the clinical conditions of pregnancy and pyometra. Grades 1 and 2 oocytes were cultured *in vitro* at 37 °C in TCM-199, supplemented with 25 mM Hepes/l (v/v), and with 10 % heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50 µg/ml gentamicin, 2.2 mg/ml sodium bicarbonate and 22 µg/ml pyruvic acid, 1.0 µg/ml estradiol, 0.5 µg/ml FSH and 0.03 IU/ml hCG. The nuclear maturation rate was evaluated at 72 h of incubation under Hoechst 33342 (10 µg/mL) staining for fluorescence microscopy. There was no statistical difference in nuclear progression to the MII stage among the various reproductive states (follicular phase, 5.4 %; diestrus, 4.2 %; anestrus 4.4 %; pyometra, 8.1 % and pregnancy, 4.7 %). Resumption of meiosis was 24.6 % at the follicular phase, 19.6 % for diestrus, 16.4 % for anestrus, 37.1 % for pyometra and 29.2 % for pregnancy. Positive and higher numbers of residue above the expected value were observed for the pyometra and pregnancy conditions at the metaphase/anaphase I (MI/AI) stages.

Our results indicate that *in vitro* nuclear maturation of dogs oocytes is not influenced by the *in vivo* reproductive status of the female. The quality of the oocyte is a more reliable indicator of its potential for meiotic maturation *in vitro* than the hormonal environment of the donor female at the time of oocyte retrieval.

Key words: Dog; Oocyte; *In vitro* maturation; Reproductive status

#### **1. Introduction**

The estrous cycle of the domestic bitch is characterized by a follicular phase (proestrus and early estrus) during which time ovarian follicles are developing and increasing in size as ovulation approaches (ROSZEL, 1975). After ovulation, and formation of corpora lutea, is the luteal phase, which is following by an anestrus phase of variable length. An increase in secretion of LH signals the end of anestrus and is a prelude to resumption of ovarian activity (CONCANNON, 1993; VAN HAAFTEN et al., 1994).

In the bitch, oocytes are spontaneously ovulated at prophase of the first meiotic division (FARSTAD, 2000), 24-50 h after the LH peak (CONCANNON et al., 1989; HASE et al., 2000). Ovulation of preovulatory follicles is a synchronous phenomenon confined to a narrow time window (12 - 24 h) (DIETERICH, 1994; MEISL, 1998).

In contrast, 48-72 h are required to complete post-ovulatory maturation to the metaphase II (MII) stage in the isthmus of the oviduct (CONCANNON et al., 1989), an interval similar to that found in *in vitro* studies (HEWITT et al., 1998; FUJII et al., 2000).

The effect of estrous cycle stage on *in vitro* meiotic competence of dog oocytes has been described in several studies (YAMADA et al., 1993; HEWITT e ENGLAND, 1997; LUVONI et al., 2001; OTOI et al., 2001a). However, there are no reports evaluating the possible effects of pyometra or pregnancy on subsequent potential of oocytes recovered from such females to undergo *in vitro* maturation.

Acquisition of meiotic and cytoplasmic competence is controlled by intercellular communication between cumulus cells and the oocyte to which they are attached. Connection between the cumulus cells and oocyte facilitate the exchange of nutrients, ions and small molecules such, as  $Ca^{2+}$  and cAMP (GRAZUL-BILSKA et al., 1997).

Intercellular communication between the ooplasm and cumulus cells by way of gap junctions are not found during anestrus (LUVONI et al., 2001) and preovulatory endocrine events are related to acquisition of meiotic competence *in vitro* (YAMADA et al., 1993). Despite this observation, other studies showed that the hormonal environment *in vivo* did not affect subsequent *in vitro* maturation of high quality oocytes (CINONE et al., 1992; HEWITT e ENGLAND, 1997).

In cats, the most significant trait for evaluating oocyte quality appears to be cytoplasmic appearance, with translucency or mosaic patterns in the ooplasm being related to the presence of fewer gap junctions (WOOD e WILDT, 1997).

High quality Grade 1 canine oocytes are darkly pigmented and completely surrounded by one or more layers of cumulus cells (HEWITT et al., 1998). Fujii et al. (2000) found that similar numbers and proportions of Grade 1 oocytes can be recovered from bitches at all stages of the estrous cycle. The presence of functional luteal tissue may (NICKSON et al., 1993) or may not (FUJII et al., 2000) be associated with the recovery of fewer Grade 1 dog oocytes.

The number of oocytes that can be recovered from a canine ovary varies greatly and decreases with increasing age of the female. However, ovarian mass or the presence of different ovarian structures do not significantly influence numbers of oocytes recovered (STRÖM HOLST et al., 2001).

The present study was carried out to evaluate whether or not the bitch's reproductive status at the time of oocyte recovery affects the frequency of *in vitro* nuclear maturation. In addition, we assessed the maturation potential of oocytes after retrieval from pregnant females and females with pyometra.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Ovaries and collection of oocytes*

Ovaries were obtained from 61 purebred ( $n=26$ ) and crossbred ( $n=35$ ) domestic bitches, that underwent ovariohysterectomy at the veterinary hospital of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. The bitches were classified into groups based on estrous cycle stages: follicular (proestrus or estrus),

luteal (diestrus) or at anestrus, as well as the clinical conditions of pregnancy or pyometra. The distribution into the various reproductive categories was determined by observation of the presence or absence of follicles or corpora lutea on the surface of the ovary, and was compared to the owner's information about the reproductive profile of the bitch.

Cumulus- oocyte complexes (COCs) were recovered by slicing the ovaries in PBS (WHITTINGHAM, 1971) supplemented with 1 % fetal calf serum (FCS) at 37 °C and graded according to the criteria reported by Hewitt et al. (1998). Grade 1 (darkly pigmented and completely surrounded by one or more layers of cumulus cells) and grade 2 COCs (lightly pigmented with incomplete layers of cumulus cells) ( $n=789$ ) were selected for culture and rinsed in HEPES-buffered TCM 199 before maturation.

#### 2.2. *In vitro* maturation

The basic culture medium was TCM-199, supplemented with 25 mM Hepes/l (Sigma, St Louis, MO, USA), 10% heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50 µg/ml gentamicin, 2.2 mg/ml sodium carbonate and 22 µg/ml pyruvic acid, 1.0 µg/ml estradiol (E 8875 Sigma), 0.5 µg/ml FSH (Folltropin-V, Vetrepharm Inc., Ont., Canada) and 0.03 IU/ml hCG (Profasi HP, Serono, Aubonne, Switzerland). Selected oocytes were matured at 37 °C for 72 h in 100 µl droplets (up to 25 oocytes per drop) under mineral oil (Sigma) in a 100 % humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air.

#### 2.3. *Assessment of nuclear stage of maturation*

Immediately after *in vitro* culture, oocytes were denuded, permeabilized in Triton X (Sigma), fixed in a 3.7 % paraformaldehyde solution and stained with Hoechst 33342 (10 µg/ml) (Sigma) for fluorescence microscopic analysis of the nuclear maturation stage. Nuclear morphology was classified as germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase/anaphase I (MI/AI), metaphase II (MII), unidentified or degenerated (others).

#### 2.4. *Statistical analysis*

The mean Grades 1 and 2 COCs and the total number of oocytes, as well as the mean age of bitches in the different reproductive categories were compared by one-way ANOVA. Correlations were described by Pearson's linear coefficient and by Student's *t*- test for the comparison of the number and quality of recovered oocytes from pure and crossbred bitches. Results were given as mean ± SD. The data for meiotic competence of oocytes were analysed by chi-square analysis with adjusted residual. Differences at a probability value of 0.05 or less were considered significant.

### 3. Results

There were no significant differences in the total number ( $P = 0.072$ ) or the number of Grades 1 and 2 oocytes ( $P = 0.080$ ) recovered for the various reproductive categories (Table 1).

The Grades 1 and 2 and total number of oocytes were negatively and significantly correlated ( $r = -0.534$  and  $-0.469$ ) with the bitch age ( $P < 0.001$ ). The mean age of bitches exhibiting pyometra condition was higher than that of bitches in the anestrus stage of the cycle ( $P = 0.016$ ).

There was no difference in the numbers of Grades 1 and 2 oocytes or in the total number of oocytes recovered from purebred ( $44.3 \pm 32.3$ ;  $122.8 \pm 107.4$ ) versus crossbred ( $35.0 \pm 30.3$ ;  $116.0 \pm 90.6$ ) dogs. The means were compared by Student's *t*-test for independent samples with values of  $P = 0.274$  and  $P = 0.513$ , respectively.

No differences were found in progression of nuclear maturation among oocytes recovered from bitches at the various reproductive categories (Table 2). However, positive and higher numbers of error above the expected value, were observed for oocytes at the MI and AI stages that were recovered from pregnant females and females with pyometra.

The frequency of resumption of meiosis for each reproductive state was: follicular phase, 24.6 %; diestrus, 19.6 %; anestrus, 16.4 %; pyometra, 37.1 % and pregnancy, 29.2 %.

Frequency of error at the follicular phase was positive and higher by Goodness-of-fit chi-square test.

Table 1 The mean ( $\pm$  S.D.) number of oocytes recovered from bitches at different reproductive stages

	Reproductive status of the bitch				
	Follicular phase	Diestrus	Anestrus	Pregnancy	Pyometra
Bitches (n)	13	15	16	9	8
Age (months)	$44 \pm 30.6^{ab}$	$52.4 \pm 34.1^{ab}$	$32.5 \pm 27.4^b$	$47.5 \pm 28.6^{ab}$	$79.5 \pm 30.0^a$
Total oocytes (n)	$156.5 \pm 117.9$	$91.5 \pm 66.4$	$156.8 \pm 122.0$	$88.2 \pm 37.1$	$65.8 \pm 58.9$
Grades 1 and 2 oocytes (n)	$52.8 \pm 39.2$	$28.9 \pm 21.4$	$46.6 \pm 36.5$	$39.4 \pm 24.3$	$19.6 \pm 11.6$

Values with different letters (a, b) within rows depict statistical significance (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

Table 2 Meiotic rate of canine oocytes recovered at different reproductive stages

Reproductive status	No. (%) of oocytes at the stage of <sup>a</sup>					
	Total	GV	GVBD	MI/AI	MII	Others
Follicular stage	224	56 (25.0) <sup>a</sup>	29 (12.9)	14 (6.3)	12 (5.4)	113 (50.4) <sup>c</sup>
Diestrus stage	168	47 (28.0) <sup>a</sup>	12 (7.1)	14 (8.3)	7 (4.2)	88 (52.4) <sup>c</sup>
Anestrus stage	249	40 (16.1) <sup>a</sup>	17 (6.8)	13 (5.2)	11 (4.4)	168 (67.5) <sup>d</sup>
Pyometra	62	24 (38.7) <sup>b</sup>	10 (16.1)	8 (12.9)	5 (8.1)	15 (24.2) <sup>c</sup>
Pregnancy	86	19 (22.1) <sup>a</sup>	12 (14.0)	9 (10.5)	4 (4.7)	42 (48.8) <sup>c</sup>

Values with different letters (a, b, c, d) in the same column differ significantly (chi-square analysis  $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup>: GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI/AI: metaphase/anaphase I, MII: metaphase II, others: unidentified or degenerated

#### 4. Discussion

Reproductive hormone profiles in canine species are very unusual. In dogs a parallel decrease of plasma estradiol and an increase in progesterone prior to ovulation lead to luteinization of ovarian follicular cells (FELDMAN e NELSON, 1997).

Hormone profiles observed during pregnancy are similar from those observed in other reproductive states (JEFFCOATE, 1998). However, it was recently reported that regulation of the corpus luteum may differ according to reproductive status, since increases in prolactin and relaxin have a significant sustaining effect on corpus luteum function, including progesterone production during pregnancy (ONCLIN et al., 2001).

Pyometra is a pathological condition occurring predominantly in bitches under the influence of progesterone at metestrus (DE BOSCHERE et al., 2001). Plasma progesterone values in this condition are not different from those of pregnant or normally cycling bitches (HADLEY, 1975; CHAFFAUX e THIBIER, 1978).

The oocytes cultured in this study were recovered from bitches in various reproductive stages. This was expected to influence nuclear maturation rates due to heterogeneity of the oocyte population. It was thought that the fluctuation in extent of estrogen and progesterone receptors during different reproductive stages (DE COCK et al., 1997; PAULSMEIER, 1998; VERMEIRSCH et al., 1999) would result in significant differences in *in vitro* oocyte maturation rates. Indeed, in our study rate of resumption of meiosis in oocytes recovered during the follicular phase was numerically higher than that of oocytes recovered in other reproductive states. Also, *in vitro* meiotic progression of oocytes to MI/AI stages after recovering during pregnancy or from bitches with pyometra was higher than expected. However, the percentage of oocytes undergoing nuclear maturation after recovery from bitches during various cycle stages and during pyometra and pregnancy was not different. Based on the current and previous results (FUJII et al., 2000; CINONE et al., 1992), we suggest that the reproductive status of the oocyte donor may not be a primary determinant of potential meiotic competence.

In the bitch, the proportion of estrogen and progesterone receptors varies depending on the presence of follicle or luteal tissue during the estrous cycle stages (PAULSMEIER, 1998).

The number of progesterone receptors in primary, secondary or tertiary follicles remain constant throughout the estrous cycle. Primary and secondary follicles are present in the ovary at anestrus, in the follicular phase and at endometrial repair (PAULSMEIER, 1998). Conversely, variations in estrogen receptor concentrations during the estrous cycle phases, have previously been demonstrated (DE COCK et al., 1997; VERMEIRSCH et al., 1999). High levels of estrogen receptors were observed within primary and secondary follicles and in uterine cells during proestrus and anestrus (PAULSMEIER, 1998; VERMEIRSCH et al., 1999). The increase in ovarian capacity to produce estrogen and uterine sensitivity to estrogens even during late anestrus (VAN HAAFTEN et al., 1994), a sexually quiescent stage (VERMEIRSCH et al., 1999), may partially explain why we found no differences in *in vitro* oocyte nuclear maturation between the two stages in this study. However, the rate of meiotic resumption in oocytes recovered during the follicular phase was different ( $P < 0.05$ ) from that of oocytes recovered at the other reproductive states, suggesting that an *in vivo* environment with high estrogen levels may

contribute to resumption of meiosis in canine species, in agreement with previous reports (FULTON et al., 1998; LUVONI et al., 2001).

The distribution and intensity of estrogen-receptor interactions in the uterus are more accentuated during the estrous phase of the cycle (NISKANEN e THRUSFIELD, 1998). Prolonged estrogen influence results in endometrial hyperstimulation and subsequent hyperplasia or pyometra (RADEMACHER, 1998). Because possible changes in steroid receptor distribution are associated with the development of the cystic endometrium hyperplasia complex and pyometra (DE BOSCHERE et al., 2001; VERMEIRSCH et al., 1999), it is difficult to explain the oocyte maturation rates to MI/MII obtained in that category in this study (13/62).

Pyometra is a disease found more frequently in middle-aged to older bitches. In the current study, fewer and less viable oocytes were recovered from such animals. However, the Grades 1 and 2 oocytes collected from dogs with pyometra had similar nuclear meiotic competence to that of Grades 1 and 2 oocytes recovered from females during other reproductive conditions. Thus, it appears that receptor content and distribution was not disturbed in the ovaries of bitches with pyometra. Therefore, the efficiency of maturation in oocytes derived from older bitches with pyometra endorses the inclusion of genetically valuable animals into programs for *in vitro* fertilization, *in vitro* embryo culture and oocyte or embryo cryopreservation.

In summary, the results of the present study reveal that oocytes recovered from the ovaries of dogs in various reproductive stages undergo *in vitro* maturation to the metaphase II stage at similar rates. Therefore, we conclude that selection of oocytes based on their recovery at specific stages of the estrous cycle should not be used to predict an expected frequency of *in vitro* meiotic maturation. Instead, the inherent quality of the oocyte is a more reliable indicator of its potential for meiotic competence.



## 6 ARTIGO 4

### EMBRYONIC DEVELOPMENT OF *IN VITRO* MATURED AND *IN VITRO* FERTILIZED DOG OOCYTES

**B.A. Rodrigues, L.C. dos Santos, J.L. Rodrigues**

(artigo aceito para publicação no periódico Molecular Reproduction and Development em 19.05.03; prova final em andamento sob o número 9999:1: 1- 9, 2003)

#### ABSTRACT

In several studies, early cleavage-stage canine embryos have been derived from *in vitro*-fertilized-oocytes cultured under various conditions. Despite these results, IVF protocols for canine oocytes have yielded low fertilization rates.

In this study, Experiment I compared the effects of tissue culture medium (TCM) 199 supplemented with either (A) 1 µg/ml estradiol or (B) 20 µg/ml estradiol + 1 µg/ml human somatotropin (hST) on the *in vitro* nuclear maturation rate of canine oocytes.

Meiotic progression to the metaphase I and II (MI/MII) stages at 72 h of *in vitro* culture was 10.2 % (11/108) in medium A versus 14.1 % (20/142) in medium B ( $P= 0.802$ ).

In Experiment II, cleavage rate was determined among oocytes recovered from ovaries of bitches at different reproductive stages. Oocytes (n = 888) were retrieved from bitches at the follicular, anestrus and luteal stages and selected for high morphological quality. Oocytes were matured for 48 h in TCM-199 supplemented with 1 µg/ml hST + 20 µg/ml estradiol. Oocytes were *in vitro* fertilized with fresh canine spermatozoa that had been isolated on a Percoll gradient, and were cultured in Synthetic Oviduct Fluid medium (SOF) with bovine serum albumin (BSA) (4mg/ml) up to 5 days in 5 % CO<sub>2</sub> in air at 37 °C. A proportion of oocytes (30.06 %) with identifiable nuclear material had cytoplasm penetrated or fertilized by sperm. The percentage of oocytes developing into early stage embryos was 10.1 % (27/ 267). Although pronuclear development was observed to be higher for oocytes recovered at the follicular, the cleavage rate was similar among oocytes recovered from bitches at the follicular, anestrus and luteal stages.

There was no correlation between the proportion of capacitated or acrosome reacted spermatozoa and pronuclei formation and/or percent cleavage.

It was concluded that TCM 199 supplemented with 1 µg/ml hST and estradiol (20 µg/ml) supports nuclear and cytoplasmic maturation of canine oocytes. In this study, meiotic competence was verified by the *in vitro* production (IVP) and development of embryos up to the 8 cell- stage.

Furthermore, the results indicate that, under the described conditions and despite the influence of reproductive status of the bitch on the developmental competence of *in vitro* fertilized oocytes to the pronuclei stage, cleavage was independent of donor's reproductive estrous cycle stage.

**Key Words:** canine, *in vitro*, cleavage, embryo, pronucleus, capacitation

## INTRODUCTION

To date, only a few studies have been designed to investigate the developmental potential of canine oocytes subjected to *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) (YAMADA et al., 1992; THEISS, 1997; OTOI et al., 2000a; ENGLAND et al., 2001; SONGSASEN et al., 2002). In most of these studies, investigators have found that the efficiency of maturation protocols is low, especially when compared to that of many other mammalian species (NICKSON et al., 1993; BOLAMBA et al., 1998; HEWITT and ENGLAND, 1999a; SAINT-DIZIER et al., 2001; BOLAMBA et al., 2002). The ability of oocytes to undergo normal fertilization and subsequent embryo development involves a progression of nuclear and cytoplasmic events in a stepwise and in a coordinated way (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987).

Structurally, the oocyte is a complex cell within which the organelles maintain specific spatial relationships (CRAN, 1985). Nuclear meiotic progression beyond the germinal vesicle breakdown (GVBD) stage involves chromosome condensation and alignment on the metaphase I (MI) spindle, segregation of homologous chromosomes, emission of the first polar body and metaphase II (MII) spindle formation (EPPIG, 2001,-2002).

Recombinant bovine somatotropin (bST) at high concentrations has already been shown to accelerate and to increase the rate of *in vitro* maturation of blue fox oocytes (SRSEN et al., 1998). Also, we have recently described a positive influence of hST supplement on the MII development rate (RODRIGUES and RODRIGUES, 2003a).

*In vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes exposed to bovine growth hormone (bGH) accelerate the progression of meiosis and induce cumulus cell expansion (BEVERS et al., 1997). The functions of the cumulus cell are of major importance in the regulation of oocyte maturation (TANGHE et al., 2002). Besides this fact, they cause mechanical entrapment of spermatozoa and support sperm penetration into the oocyte during fertilization (CHIAN et al., 1996; VAN SOOM et al., 2002). Nevertheless, the degree of cumulus expansion probably does not correlate directly with the enhancement of male pronucleus (MPN) formation, because active factor (s) involved in cumulus expansion and MPN formation are not exactly the same (DAEN et al., 1994).

The addition of estradiol to culture medium has been useful to promote the final stages of oocyte development in the bitch (NICKSON et al., 1993). Estradiol participates as stimulator for FSH-induced follicular growth, for expression of the LH receptor in mural granulosa cells and also cooperates to the enhancement of the production of insulin-like growth factor I and II (IGF-I and -II) (SMITZ et al., 2001). Furthermore, initial high levels of estrogen are necessary for the cytoplasmic maturation and required for subsequent embryonic development (MOOR and TROUNSON, 1977).

Efforts to fertilize *in vitro*-matured dog oocytes have had limited success due probably to low IVM rates of the oocytes.

Four studies have reported production of *in vitro*- derived canine embryos from *in vitro* fertilization (IVF) of *in vitro* matured oocytes. In those studies, development rates to early embryonic stages ranged from 8.2% to 33.3% (YAMADA et al., 1992; OTOI et al., 2000a; ENGLAND et al., 2001; SONGSASEN et al., 2002). One study produced a single blastocyst (OTOI et al., 2000a) and another study produced one pregnancy with subsequent embryo resorption (ENGLAND et al., 2001). In all of these studies, however,

no correlation was established comparing different reproductive states of the bitches at the time of oocyte retrieval and the results of oocyte fertilization.

In the present study, experiments were designed to investigate 1) nuclear maturation of dog oocytes in TCM 199 supplemented either with 1 µg/ml estradiol or with 1 µg/ml hST + 20 µg/ml estradiol; 2) fertilization and developmental competence of presumptive IVM -IVF zygotes derived from *in vitro* matured oocytes recovered from females at the follicular, anestrus (condition correlated with no estrous behavior and absence of functional structures at the ovarian surface) and luteal stages of the estrous cycle.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experiment 1. Effect of hormonal supplementation with human somatotropin (hST) and estradiol concentrations**

#### **Recovery and culture of oocytes**

In this experiment, ovaries were collected from three pure-bred and five mixed-breed bitches (aged 12- 84 months) at various stages of estrous cycle by routine ovariohysterectomy at the veterinary hospital of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and at local veterinary practices in southern Brazil. Ovarian morphological appearance after collection showed the presence of corpora lutea (n = 4) and follicles (n = 2). Ovaries without functional tissue were observed in the remaining bitches (n = 2). Evaluation of vaginal cytology was performed to determine the stage of the estrous cycle at the moment of oocyte collection.

In this experiment, a total of 1363 oocytes were recovered by slicing the ovaries in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with fetal calf serum (FCS) (1:100) (Nutricell, Campinas, SP, Brazil) at 37° C to release cumulus- oocyte- complexes (COCs), which were graded according the criteria reported by Hewitt et al. (1998). Only Grade 1 COCs (darkly pigmented and completely surrounded by one or more layers of cumulus cells) and Grade 2 COCs (lightly pigmented with incomplete layers of cumulus cells) were used for culture (n = 250) and rinsed in TCM-HEPES-buffered before maturation.

#### ***In vitro* maturation**

Oocytes from each bitch were distributed randomly into 2 groups and allocated to the following maturation treatments: (Treatment A) [TCM-199 supplemented with 25 mM Hepes/l (v/v) (Sigma, M2520, St Louis, MO, USA), with 10 % heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50 µg/ml gentamicin (Sigma, G1264, St Louis, MO, USA), 2.2 mg/ml sodium bicarbonate (Sigma, S5761, St Louis, MO, USA), and 22 µg/ml pyruvic acid (Merk, 1.06619.0050, Darmstadt, Germany), 1 µg/ml estradiol (Sigma, E 8875, St Louis, MO, USA), 0.5 µg/ml FSH (Folltropin-V, Vetrepharm Inc., Ont, Canada) and 0.03 IU/ml hCG (Profasi HP, Serono)]; or (Treatment B) [TCM 199 supplemented with 25 mM Hepes/l (v/v) (Sigma, M2520, St Louis, MO, USA), with 10 % heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50 µg/ml gentamicin (Sigma, G1264, St Louis, MO, USA), 2.2 mg/ml sodium bicarbonate (Sigma, S5761, St Louis, MO, USA), and 22 µg/ml pyruvic acid (Merk, 1.06619.0050, Darmstadt, Germany), 20 µg/ml estradiol (Sigma, E 8875, St Louis, MO, USA), 0.5 µg/ml FSH (Folltropin-V, Vetrepharm Inc., Ont, Canada), 0.03 IU/ml hCG (Profasi HP, Serono) and 1 µg/ml hST (Lilly, FF1D44C, France)].

Oocytes were cultured in 100 µl droplets (up to 25 oocytes per drop) under mineral oil at 37°C (MAHI and YANAGIMACHI, 1976) under 5 % CO<sub>2</sub> in air for 72 h.

#### **Assessment of nuclear stage of maturation**

At 72 hours of *in vitro* culture, oocytes were denuded of cumulus cells, permeabilized in Triton X (Sigma, St Louis, MO, USA), fixed in a 3.7 % paraformaldehyde solution and stained with Hoechst 33342 (10 µg/ml) (Sigma, St Louis, MO, USA) for fluorescent microscopy analysis of the nuclear maturation stage. Nuclear morphology was classified as germinal vesicle intact (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase/anaphase I (MI/AI), metaphase II (MII), unidentified or degenerated (others).

#### **Experiment 2. *In vitro* fertilization at different reproductive states**

In this experiment, a total of 2395 oocytes were obtained from 24 bitches aged between 8 to 96 months. Of these, a total of 888 oocytes with high morphological quality were selected for *in vitro* culture.

The bitches were distributed into the following reproductive categories: (a) follicular (n = 04), (b) luteal (diestrus or pregnancy) (n = 11) or (c) anestrus (n = 09) by visualization of the presence or absence of follicles or corpora lutea on the surface of the ovary, and by performing additional vaginal cytology to determine estrous cycle stage at the moment of oocyte retrieval. Pregnancy was confirmed by the presence of embryonic vesicles into the uterus at the moment of the ovariohysterectomy.

Oocyte recovery followed the conditions specified in Experiment 1. The selected oocytes were matured in medium B (TCM 199 supplemented with 20 µg/ml estradiol + 1 µg/ml hST).

Oocytes were cultured in 100 µl droplets (up to 25 oocytes per drop) under mineral oil at 37°C (MAHI and YANAGIMACHI, 1976) under 5 % CO<sub>2</sub> in air for 48 h.

#### **Sperm preparation**

The sperm rich fraction of the ejaculate from 2 mature fertile Whippet dogs (aged 2 and 5 years) was collected by manual stimulation and transported diluted in Egg Yolk Tris extender (GÜNZEL- APEL, 1994) in water bath at 26 °C to the laboratory.

Aliquots of fresh diluted spermatozoa (~1 ml) were pipetted into a 15 ml conical tube (Falcon # 2095) onto a two-layer discontinuous gradient formed by layering 1 ml of the 45% Percoll solution on top of 1 ml of 90% and centrifuged at 500 g for 20 min at room temperature. The supernatant was removed and the sperm pellet was washed with 5 ml of low bicarbonate-Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) (PARRISH et al., 1988) by centrifugation at 500 g for additional 10 min.

The pellet was then recovered after aspiration of the supernatant, and the spermatozoa were resuspended to give a final concentration of 2 x 10<sup>6</sup> cells/ml in Fert- TALP medium supplemented with 0.56 µg/ml heparin to induce capacitation.

#### **Assessment of sperm quality and capacitation status of spermatozoa**

Samples of spermatozoa were evaluated for motility, viability and capacitation status.

The percentage of total motile sperm (number of sperm with progressive motility divided by the total number of sperm observed) was assessed in 10 µl drops of sperm suspension, using a phase contrast microscope (at 200X). Sperm membrane integrity and capacitation status were evaluated using a dual

staining technique, slightly modified from that described by Hewitt and England (1998a) for the assessment of the functional status of spermatozoa in the dog. In this technique, capacitation is measured by using the fluorescent dyes chlortetracycline (CTC) and Hoechst 33258.

For this purpose, sperm samples (190  $\mu$ l) were mixed into a conical tube of 15 ml with 10  $\mu$ l Hoechst 33342 (Sigma, St Louis, MO, USA) at a concentration of 10  $\mu$ g/ml, and incubated for 2 min. Excess dye was removed by centrifugation at 900 *g* for 5 min after addition of 2 ml of a 2 % (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP) (MW= 40.000, Sigma, P0930, St Louis, MO, USA) solution in PBS. The supernatant was then discarded and the sperm pellet was resuspended in 45  $\mu$ l of Fert-TALP medium with 0.56  $\mu$ g/ml heparin added with 45  $\mu$ l of freshly made CTC (Sigma, St Louis, MO, USA) solution (ROTA et al., 1999). After 20 s, 8  $\mu$ l of a 12.5 % (w/v) paraformaldehyde fixative solution in 0.5 M Tris (pH = 7.4) was added to the sample.

A 10  $\mu$ l drop of the stained sample was allocated under pressure between a slide and a coverslip, sealed with transparent nail varnish and viewed using fluorescence microscopy with 365 nm wavelength excitation filter.

On each smear, a minimum of 100 spermatozoa were counted in each replicate, and classified as belonging to group F (uncapacitated and acrosome intact; spermatozoa with uniform fluorescence over the whole head); group B (capacitated and acrosome intact; fluorescence free band in the postacrosomal region); and group AR (capacitated and acrosome reacted; almost no fluorescence over the whole head except for a thin band in the equatorial segment) (FRASER et al., 1995; HEWITT and ENGLAND, 1998a; ROTA et al., 1999). Dead spermatozoa stained blue color, and were also recorded.

#### ***In vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC)**

The oocytes that had been previously matured for 48 h, were co-incubated with the sperm suspension in a 5 % CO<sub>2</sub> in air atmosphere at 37 °C.

At 24 h post insemination the presumptive zygotes were partially denuded by repeated aspiration into a pipette and transferred to 70  $\mu$ l drops of Synthetic Oviduct Fluid (SOF) medium (Table 1) containing 4 mg/ml BSA, with Na pyruvate, glutamine, gentamicin, and amino acids. Incubation was carried out under mineral oil at the same environmental conditions used for IVF.

At 72 h of *in vitro* culture, the putative cleaved embryos were moved to a separate drop of SOF and cultured for additional 48 h.

After that, zygotes were then completely dislodged from cumulus cells, fixed and stained as described previously in this study in Experiment 1.

The presence of unswollen and/ or swollen sperm head (s) or pronuclei in the cytoplasm of matured oocytes was taken as evidence of sperm penetration (DAEN et al., 1994; DING and FOXCROFT, 1992; LEIBFRIED- RUTLEDGE et al., 1987). The frequency of polyspermy was recorded for all penetrated oocytes.

Embryonic development (cleaved blastomeres with only a single nucleus per cell) and blastomere deviation (nuclear fragmentation ) were assessed.

### Statistical analysis

In experiment 1, which was replicated 7 times, treatment effects were evaluated by Chi-Square analysis with adjusted residual. Effects were considered significant with an alpha level of  $P < 0.05$ .

In experiment 2, which was replicated at least 4 times for each reproductive condition, the influence of reproductive categories on total COC number and on Grades 1 and 2 COCs retrieval, as well as the data for IVF of oocytes were evaluated by the Chi-Square analysis with adjusted residual. Differences at a probability value less than 0.05 were considered significant.

Data for percent motile, capacitation and acrosome reacted spermatozoa, pronuclei formation and/or cleavage rate after IVF were submitted to correlation analysis.

## RESULTS

### Experiment 1. Effect of hormonal supplementation with hST and estradiol concentrations

A total of 250 cumulus- oocyte complexes (COCs) were fixed and stained after culture for 72 h of which 94 oocytes (37.6 %) had identifiable nuclear material.

As shown in Table 2, the percentages of oocytes that underwent maturation to metaphase I/anaphase I/metaphase II (MI/AI/MII) stages between the two culture conditions were low and similar. Oocytes developing to the MII stage were retrieved from ovaries with corpora lutea (CL) or from ovaries without functional tissue, and were 2/108 (1.9 %) in medium A and 5/142 (3.5 %) in medium B.

The addition of hST to the maturation medium enhanced expansion of cumulus cells, especially in COCs surrounded by greater than 2 layers of cumulus cells.

The rate of unidentified or degenerated oocytes (group = others) was high at 72 h of IVM in both media (Table 2).

### Experiment 2. *In vitro* fertilization at different reproductive states

In the current study, donor's reproductive status did not influence the recovery numbers of oocytes. Similarly, high morphologically quality oocytes rates did not differ among the reproductive conditions ( $P = 0.103$ ) (Table 3).

A total of 888 oocytes were fixed and stained after fertilization and *in vitro* culture, of which 267 (30.06%) oocytes had identifiable nuclear material and were observed as having been cytoplasmically penetrated or fertilized (Table 5).

Although the percentage of oocytes that had been penetrated by a single spermatozoon tended to be higher for the luteal stage, penetration capacities did not differ significantly when COCs were compared within anestrus and follicular phase.

Cleavage rate was similar among the reproductive categories (follicular, anestrus, and luteal). However, the overall fertilization rate was observed to be superior with oocytes derived from bitches at the follicular (42.5 %) and anestrus stages (34.3 %) than at the luteal stage (18.6 %) ( $P < 0.001$ ) (Table 4). Furthermore, there was an effect of follicular phase on pronucleus development, the rate at that phase (24.2 %) was statistically different from those at both the anestrus and luteal stages (9.6 % and 3.7 %, respectively) ( $P < 0.004$ ) (Table 5).

The mean number of spermatozoa showing the B- pattern (capacitated and acrosome intact), and AR-pattern (capacitated and acrosome reacted) was measured to be  $51.47 \pm 6.24$ , and  $20.64 \pm 5.02$ , respectively. Mean spermatozoa ( $M \pm SE$ ) motility percentage at the time of IVF was  $68.54 \pm 2.24$ .

As shown in Table 6, there was no correlation between pronuclei formation and/or cleavage and proportion of capacitated or acrosome reacted spermatozoa.

Correlation coefficients between pronuclei formation + cleavage ( $r = 0.114$ ;  $p = 0.594$ ) or isolated cleavage ( $r = 0.115$ ;  $p = 0.592$ ) and percentage of sperm motility were not statistically significant.

Despite that, the individual highest rate of cleavage were seen when pattern B was above 70 % and AR percentage was under 10 %. Final motility after preparation of spermatozoa in those samples was similar or higher than 70 %.

## DISCUSSION

In the first experiment of the present study, supplementation of TCM 199 with plus hST during the *in vitro* maturation period did not significantly enhance the nuclear meiotic maturation of bitch oocytes. In a previous study, the exposure of oocyte- cumulus complexes to the supplement hST showed a positive influence on oocyte meiosis, with an increase in the number of oocytes reaching MII and expansion of cumulus cells (RODRIGUES and RODRIGUES, 2003a), an aspect already reported in *in vitro* matured bovine oocytes in medium supplemented with bovine growth hormone (bGH) (BEVERS et al., 1997).

The influence of hST is probably mediated by a mechanism similar to that observed when using bovine somatotropin (bST) and is linked to an enhancement of luteinization of cumulus cells (LANGHOUT et al., 1991).

Estradiol supplementation provides maturational support to gonadotropins when added to *in vitro* culture media tested for cats (GOODROWE et al., 1991), with the beneficial effects due partially to the nongenomic action of the steroid at the oocyte surface (TESARIK and MENDONZA, 1995). Moreover, estradiol participates as stimulator for FSH-induced follicular growth, for expression of the LH receptor in mural granulosa cells and also cooperates to the enhancement of the production of insulin-like growth factor I and II (IGF-I and -II) (SMITZ et al., 2001). IGF-I and II are potent stimulators of resumption and completion of nuclear maturation (SIROTKIN et al., 2000).

In the current study, low nuclear MII rates and high unidentifiable and/or degeneration percentages were observed in the oocytes after the maturation interval. This might have been caused by the maturation conditions. It is very likely that improper temporal dynamics during the incubation period have influenced our results. However, one should additionally emphasize that degenerative changes, referred to as atresia, are commonly observed in canine oocytes submitted to *in vitro* maturation. Granulosa cells of an atretic follicle have a reduced deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis (GREENWALD, 1989; HIRSHFIELD, 1989). The oocyte undergoes meiosis-like changes (germinal vesicle breakdown) followed by fragmentation and disruption of the oocyte-cumulus connection (TSAFRIRI and BRAW, 1984). Nevertheless, the combined growth hormone (GH) and estradiol stimulation of IGF gene expression or synthesis might have been somewhat favorable in the present study on the meiotic progression of oocytes from ovarian follicles, which were not destined to undergo atresia, as well as on the cytoplasmic changes required for fertilization and cleavage following IVF. Furthermore, an environment containing increased

estrogens may help to support continued development *in vitro* and improve fertilization and cleavage rate (TESARIK and MENDONZA, 1995). In the second experiment with IVF, adjustments on timing of maturation and insemination (48 h after oocyte retrieval) might have reduced the effect of oocyte aging, supporting the results obtained for developmental competence.

Although previous reports have evaluated fertilization or development of canine oocytes fertilized *in vitro* (YAMADA et al., 1992; OTOI et al., 2000a; ENGLAND et al., 2001; SONGSASEN et al., 2002), there has not been a comparative study of fertilization and development of *in vitro* derived embryos from bitches at different reproductive states.

In the present study, the donor's condition did influence the frequency of *in vitro* pronuclei formation. Differences were observed between the follicular phase versus anestrus and luteal stage. Surprisingly, this is in disagreement with our previous results (RODRIGUES and RODRIGUES, 2003b), in which *in vitro* nuclear maturation of bitch oocytes was independent of female's reproductive condition. It is possible that this fact might be attributable to differences in the cytoplasm and chromatin of oocytes based on the stage of the estrous cycle (LEIBFRIED and FIRST, 1979).

Regardless, in Egyptian buffaloes, a number of surface ovarian follicles continue to develop during pregnancy. The presence of a corpus luteum (CL) seems to stimulate the development of a significantly higher number of ovarian follicles, and yields a higher number of good quality oocytes (ABDOON and KANDIL, 2001).

In the current study, the frequency that *in vitro* matured oocytes at the luteal stage cleaved (9.4 %) was comparable to those at the follicular phase (8.0 %) and anestrus stage (13.7 %).

In dogs, the presence of different ovarian structures does not significantly influence the retrieval rate of oocytes (STRÖM HOLST et al., 2001). This seems to be also true for the recovery of high morphological quality oocytes, since in the present study we did not find differences in the retrieval rates among the donors different reproductive conditions. Thus, oocytes derived from peripheral and cortical follicles might be similarly meiotically or developmentally competent. Moreover, morphological similarities between oocytes recovered from follicular phase versus luteal stage have been observed in cats (WOOD et al., 1997). It is also noteworthy that high levels of estrogen receptors were previously observed within primary and secondary follicles and in uterine cells during proestrus and anestrus (PAULSMEIER, 1998; VERMEIRSCH et al., 1999).

In a replicate of the present study, 9 of 44 oocytes from a 24-month-old mixed breed bitch, which was pregnant and therefore included in the category of the luteal stage, and 6 of 13 oocytes from another bitch at anestrus underwent cleavage.

Variability of fertilization frequencies are associated with several factors, of which gamete quality is the most important (POPE, 2000). We observed that fertilization of dog oocytes matured *in vitro* is highly variable among females within the same reproductive status. Despite similar *in vivo* hormone mediated mechanisms, unknown factors probably linked to differentiation of the oocytes, and/ or follicular heterogeneity may be an explanation for the *in vitro* differences observed in the current study. This hypothesis reinforces our previous arguments in which selection of oocytes based on their recovery at specific stages of the estrous cycle should not be used to predict an expected frequency of *in vitro* meiotic maturation (RODRIGUES and RODRIGUES, 2003b). Nevertheless, different cytoplasmic factors are



linked to the development of male and female pronuclei (CHIAN et al., 1992). Indeed, in our study pronuclei percentage was higher ( $P < 0.004$ ) in oocytes retrieved from ovaries of bitches at follicular phase (24.2 %; 21/ 87) than those from bitches at anestrus (9.6 %; 7/ 73) and luteal stages (3.7 %; 4/ 107). The lower developmental competence of oocytes at the luteal stage may have resulted from follicles undergoing atresia.

Apoptosis, the cellular mechanism behind ovarian follicular atresia, seem to be controlled in granulosa cells of antral follicles by hormones, acting via paracrine and/ or autocrine intraovarian signals (SVANBERG, 1999). The low estradiol 17  $\beta$  (E): testosterone (T) ratio into small follicles is indicative of atresia or early developmental stage (DING and FOXCROFT, 1992). Activin, which is also an ovarian growth factor (HULL and HARVEY, 2001), inhibits granulosa cell apoptosis in a dose dependent manner and the expression of activin subunits increases with the size of the follicle (SVANBERG, 1999), which could explain the results for pronuclei development at the follicular stage in the current study. Additionally, it has been demonstrated that follicular blood flow and intrafollicular oxygenation are positively related to the ability of the oocyte- embryo to develop, compared to those from low vascularization (TUCKER and JANSEN, 2002).

Because of the characteristic lipid content in dog oocytes, it was not possible to assess embryo quality before staining. After staining, we observed zygotes which contained two distinct pronuclei (Figure 1), but it was not unusual to see zygotes with a single pronucleus. When mouse oocytes that are arrested at MI are fertilized or parthenogenetically activated, their chromosomes decondense, a pronucleus forms and triploid blastocysts develop from fertilized eggs (EPPIG et al., 1994). Also, asynchronous development of male and female pronuclei may be due to various amounts of a cytoplasmic substance responsible for male pronucleus formation (MPF) (XU and GREVE, 1988).

Good quality cleaving embryos, observed by the presence of blastomeres of fairly equal size with few to no cytoplasmic fragments were achieved at a rate of 10.1 % (27/ 267). *In vitro* fertilized oocytes reached various stages of development by 72 h after insemination. Usually 4 to 8 cell stages embryos were seen at that time (Figures 2 and 3). Further culture for 48 h did increase the number of embryos that developed beyond the 2 cell. These findings are in agreement with those previous reported by Yamada et al. (1992), and could indicate either a delayed fertilization due to a heterogenous sperm population with partially capacitated cells or a slower progression of events after fertilization.

During the *in vitro* culture, there was a minor number of oocytes (9/ 267; 3.4 %) showing uneven blastomere cleavage or that were polyploid. This is a phenomenon not fully understood at the present time (TUCKER and JANSEN, 2002). Embryos formed as a result of IVF of cultured bovine oocytes are reported to possess chromosomal abnormalities, which are responsible for failure to development (YADAV et al. (1991). Inability by the oocyte to synthesize mRNA in adequate amounts could lead to embryonic failure (HANSEN, 2002).

Incidence of polyspermic penetration (Table 5), in our study, may be due to a high sperm concentration ( $2 \times 10^6$  cells/ ml) in a small volume (100  $\mu$ l) of fertilization medium. Exposure to spermatozoa for longer duration, in the current study close to 24 h, and decreased cortical granules migration and/ or release of

the contents, as well as failure to disperse into the perivitelline space, results in a lesser ability to block sperm penetration (FUNAHASHI and DAY, 1993; ZHENG and SIRARD, 1992; SOLOY et al., 1997). However, it is noteworthy that lowering the sperm concentration to decrease the rate of polyspermy has not been very successful, as described by Long et al. (1994).

In this study we found no correlation between cleavage frequency and proportion of capacitated spermatozoa. The ratio of capacitation-like changes showing B pattern spermatozoa, measured in the present study by dual staining with CTC and Hoechst 33342 was high soon after preparation of spermatozoa. Therefore, the capacitating action of heparin at the concentration used in this study proved effective at promoting oocyte penetration, and additionally sustained fertilization potential on fresh sperm samples.

Presence of AR- pattern spermatozoa viewed at the same interval of time, were taken as spontaneous acrosome reactions (ROTA et al., 1999).

In conclusion, our data show that viable oocytes can be obtained from bitches at different reproductive states. Although significant improvements on pronuclei achievement were observed in oocytes derived from bitches at the follicular phase, our results indicate that IVF-derived dog embryos are more dependent on intrinsic developmental program of the oocyte than on reproductive condition of the bitch at the moment of the oocyte retrieval, as reported in our previous maturation studies.

Improvement of culture conditions within an IVF system are needed to provide high penetration rates with minimal polyspermy or abnormal fertilization, as well as to attain subsequent development to the morula and blastocyst stages on the bitch.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank CAPES and CNPQ for financial support, to FAVET/ UFRGS, and the veterinary clinics Arca de Noé, and Veterinária do Vale for generously providing bitch ovaries. We are also thankful to Prof. Carlos Bacellar (Infinitu's Kennel) for his kind help in supplying the stud dogs, and the anonymous reviewers for their valuable suggestions.

TABLE 1. Composition of Synthetic Oviduct Fluid (SOF) medium

Compound	mM	Grams for 100ml
NaHCO <sub>3</sub>	25.07	0.2100
NaCl	107.70	0.6294
KCl	7.20	0.0534
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19	0.0162
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.71	0.0252
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.49	0.0098
Glucose	1.50	0.0270
Phenol red	0.0266	0.0010
Lactato Na	3.30	28.2 ul

The osmolarity and pH of SOF medium were 275 Osmol/Kg H<sub>2</sub>O and 7.5, respectively.

TABLE 2. Effects of hST supplemented maturation medium and estradiol concentrations on nuclear maturation of bitch oocytes (Chi- square analysis).

Hormone Treatment	n	GV (%) <sup>*</sup>	GVBD (%) <sup>*</sup>	MI/AI (%) <sup>*</sup>	MII (%) <sup>*</sup>	Others (%) <sup>*</sup>
Estradiol 20 µg + hST	142	18 (12.7)	18 (12.7)	15 (10.6)	5 (3.5)	86 (60.6)
Estradiol 1 µg	108	11 (10.2)	16 (14.8)	9 (8.3)	2 (1.9)	70 (64.8)

\*GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI/AI: metaphase/anaphase I, MII: metaphase II, others: unidentified or degenerated

TABLE 3. Effect of presence of ovarian functional structures on the recovery of high morphologically quality and total oocyte number in the bitch (Chi- square analysis).

Ovarian structure	Female	Oocytes	Oocytes
	n	Grades 1 and 2 n (%)	total
no structure	09	314 (35.2)	893
corpus luteum	11	389 (37.0)	1052
follicle	04	185 (41.1)	450

TABLE 4. Relationship between oocyte fertilization and bitch estrous cycle stages

Group	No (%) of oocytes fertilized	
	Total	DEC+ PRON+ CLEA*
Anestrus	73	25 (34.3) <sup>A</sup>
Follicular	87	37 (42.5) <sup>A</sup>
Luteal	107	20 (18.6) <sup>B</sup>

\*DEC: decondensation; PRON: pronuclei; CLEA: cleavage

<sup>A, B</sup>: Values with different superscripts in the same column differ significantly (chi-square analysis with adjusted residual,  $P < 0.001$ ).

TABLE 5. Developmental capacity of *in vitro* matured canine oocytes recovered from bitches at different reproductive states.

Reproductive status	FERTILIZATION							
	Oocytes	MP*	PP*	DEC*	PRON*	CLEA*	FRAG*	
	Female with nucleus (n)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Anestrus	09	73	16 (21.9)	30 (41.1)	8 (11.0)	7 <sup>b</sup> (9.6)	10 (13.7)	2 (2.7)
Follicular	04	87	17 (19.5)	29 (33.3)	9 (10.3)	21 <sup>a</sup> (24.2)	7 (8.0)	4 (4.6)
Luteal (diestrus + pregnancy)	11	107	33 (30.8)	51 (47.7)	6 (5.6)	4 <sup>b</sup> (3.7)	10 (9.4)	3 (2.8)
Total	24	267	66 (24.7)	110 (41.2)	23 (8.6)	32 (12.0)	27 (10.1)	9 (3.4)

\*MP: monospermic penetration; PP: polyspermic penetration; DEC: decondensation; PRON: pronuclei; CLEA: cleavage; FRAG: fragmentation

<sup>a, b</sup>: Values with different superscripts in the same column differ significantly (chi-square analysis with adjusted residual,  $P < 0.004$ ).

TABLE 6. Correlation coefficients of pronuclei formation and cleavage or cleavage in relation to acrosome reacted (AR) and capacitated spermatozoa (B- pattern)

spermatozoa	pronuclei + cleavage (n = 17)		cleavage (n = 17)	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
acrosome reacted	- 0.308	0.229	- 0.294	0.252
capacitated	0.402	0.109	0.467	0.059

#### FIGURES

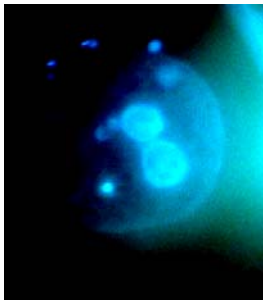


FIGURE 1: an oocyte stained with Hoechst 33342 at 72 h after insemination, showing a male and a female pronucleus (320X).



FIGURE 2 : 4-8 cells embryo after fixation and staining, showing the blastomeres (320X).

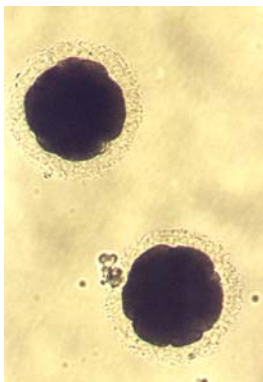


FIGURE 3: two eight-cells canine embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocyte matured *in vitro*; 72 h after insemination (200X).

## 7 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O índice de maturação *in vitro* de ovócitos de cadelas está situado em torno de 20% (FARSTAD., 2000). A literatura nessa área é escassa e os resultados apresentados, com freqüência são contraditórios. Experimentos envolvendo fecundação com desenvolvimento embrionário *in vitro* de gametas caninos se restringem a 5 publicações (YAMADA et al., 1992; OTOI et al., 2000a; ENGLAND et al., 2001; SONGSASEN et al., 2002; RODRIGUES et al., 2003).

De maneira geral, a pesquisa tem se voltado para identificação de fatores relacionados à retomada e à progressão da meiose de ovócitos imaturos do estágio de vesícula germinal (VG) até metáfase II (MII), e em menor escala, na promoção da fecundação e no acompanhamento do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Tem sido relatado que, na espécie canina, o sucesso na competência meiótica *in vitro* é o resultado da ação de gonadotropinas (SRSEN et al., 1998), esteróides (NICKSON et al., 1993), hormônios e fatores de crescimento (WILLINGHAM- ROCKY et al., 2002) ou proteína no meio de maturação (CINONE et al., 1992; HEWITT e ENGLAND, 1999a). Outros autores (SONGSASEN et al., 2002; BOLAMBA et al., 2002) sugerem ao contrário, que a destituição protéica no meio não interfere na maturação nuclear ovocitária em cadelas.

Como as condições para a maturação *in vivo* do ovócito canino são diferentes daquelas observadas em outros animais domésticos, assim também, é de se prever que as condições para a maturação *in vitro* não acompanhem de forma estrita o modelo preconizado para as demais espécies.

A competência no desenvolvimento ovocitário é adquirida durante o crescimento folicular (MOTLIK et al., 2000). Mudanças morfológicas, funcionais e associadas a modificações no aporte vascular e nervoso nas células da granulosa e nas células da teca ocorrem no folículo em crescimento (ARMSTRONG e WEBB, 1997).

Dados escassos relativos ao desenvolvimento folicular na cadela sugerem que, o crescimento dos folículos nessa espécie se inicia aproximadamente 50 dias antes da ocorrência da ovulação. Várias ondas foliculares, que são observadas antecipadamente ao proestro (ENGLAND e HEWITT, 1999) produzem elevações transientes nas concentrações plasmáticas de estradiol (CONCANNON, 1986). O declínio deste esteróide ao final do proestro, associado à elevação da concentração plasmática de progesterona reflete a maturação folicular vários dias antes da ovulação (FELDMAN e NELSON, 1997).

Com base nestas afirmativas, os resultados obtidos por Hewitt e England (1998b), relatando a incidência de 7 % de maturação nuclear intrafolicular até o estágio de rompimento da vesícula germinal (VGBD) em ovócitos de cadelas, parecem demonstrar também nos caninos, e a exemplo do que ocorre em outros mamíferos, a existência de um mecanismo, ainda que parcial, de sinalização antecipada, com trocas metabólicas entre o ovócito e as células foliculares. Efetivamente, o índice de maturação intrafolicular relatado por Hewitt e England (1998b), que é similar àqueles observados no desenvolvimento *in vitro* de embriões oriundos de ovócitos caninos maturados e fecundados *in vitro*, e removidos de ovários sem estímulo hormonal exógeno, com índices de 8.2 % (SONGSASEN et al., 2002) e 10.1 % (RODRIGUES et al., 2003), sugere que nessa espécie alguns ovócitos sejam pré-programados para competência.

No entanto, é preciso considerar que, ovócitos removidos dos folículos ovarianos são passíveis de pseudomaturação (BOLAMBA et al., 2002), um fenômeno no qual ovócitos oriundos de folículos atresícos manifestam mudanças que inicialmente se assemelham à maturação, mas que não lhe conferem competência meiótica (HYTTEL et al., 1997).

*In vivo*, os ovócitos caninos são ovulados na meiose I (FARSTAD, 2000), no estágio que é morfológicamente conhecido como vesícula germinal (VG). A vesícula germinal está constituída por uma membrana nuclear, um nucléolo e cromatina numa apresentação descondensada com 2N cromossomas (ANDERIESZ, 2003). Este número no cão é equivalente a 78 cromossomas.

A competência na maturação é adquirida progressivamente e depende da interação de diversos fatores. Mudanças importantes representadas a nível nuclear, pelo elevado índice de atividade de transcrição com síntese de ácido ribonucléico (RNA) e de proteínas e a nível citoplasmático pela replicação e redistribuição de organelas, como mitocôndrias e ribossomas, além da formação da ZP e dos grânulos corticais (PICTON et al., 1998; BYSTED, 1999), permitem a progressão da maturação até o estágio de metáfase II (MII). Estas mudanças acontecem no istmo do oviduto sob concentrações de progesterona, que excedem os índices plasmáticos de  $4,9 \pm 1,0$  ng/ml, registrados no instante da ovulação (BOUCHARD et al., 1991).

Assim, parece que nas cadelas o sucesso na maturação ovocitária *in vitro* não pode ser dissociado das alterações metabólicas e funcionais que ocorrem *in vivo* no folículo ovariano durante o período pré-ovulatório, tampouco daquelas que se sucedem no oviduto durante o período de transição entre a ovulação e a aquisição da meiose. Seguindo esta linha de pensamento alguns autores apontam para influência favorável de fluido ou tecido de oviduto na sobrevivência e na maturação *in vitro* de ovócitos caninos (HEWITT e ENGLAND, 1999b; LUVONI et al., 2002; BOGLIO et al., 2002). Através da simulação ambiental proposta nestes experimentos, presume-se que aspectos interativos do ovócito com a mucosa e secreções do oviduto sejam mantidos, beneficiando, desta forma, o andamento coordenado da meiose.

A regulação dos níveis hormonais nos meios de maturação nos experimentos *in vitro* aparece portanto, como perspectiva importante de condução na tentativa de possibilitar a aquisição para transcrição e translação celular plenas, que são necessárias ao estabelecimento da competência meiótica.

O papel das gonadotropinas na maturação ovocitária está associado à aceleração da retomada da meiose e à facilitação na sua progressão (MATTIOLI et al., 1991).

A ação regulatória do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) é estabelecida sobre o ovócito através das conexões com as células da granulosa sob intervenção de monofosfato de adenosina cíclica (AMPC) (DEKEL et al., 1988; BEVERS et al., 1997).

Nos tratamentos ovocitários *in vitro* com FSH e LH, a produção e o fluxo transzonal de AMPC entre ovócito e células do cumulus sofrem a princípio uma elevação transitória, negativamente correlacionada com a progressão da meiose, mas através do caráter oscilatório na sua atividade, a redução subsequente no nível de AMPC, durante o período de incubação, permite o desencadeamento da maturação (SHIMADA e TERADA, 2002). O progresso na meiose está associado adicionalmente a oscilações na atividade do fator promotor de maturação ou fator citoplasmático promotor de mitose (MPF) (SALUSTRI et al., 1985; HEIKINHEIMO e GIBBONS, 1998), com desfosforilação dos resíduos de treonina (Thr14) e

de tirosina (Tyr15) da proteína quinase de controle de divisão celular (p34<sup>cdc2</sup>) e elevação da proteína quinase de ativação mitogênica (MAPK) (DOWNS, 1993; FULKA et al., 1998; EPPIG, 2001-2002; DEKEL et al., 2003).

A inclusão de FSH e de LH nos meios de maturação induz à expressão de receptores para progesterona (P4) nas células do cumulus. A elevação na produção deste esteróide tem sido relacionada com o rompimento de vesícula germinal (VGBD) em ovócitos de suínos maturados *in vitro* (SHIMADA e TERADA, 2002). Progesterona parece estimular nessa espécie a interação entre os componentes do complexo cumulus-ovócito, quando a suplementação é efetuada em concentrações similares às encontradas no fluido folicular (MATTIOLI et al., 1988). Em cadelas, foi sugerido que adição de 2.0µg/ml de P4 ao meio de maturação eleva o índice de MII de ovócitos maturados *in vitro* (WILLINGHAM e KRAEMER, 2001), enquanto concentrações mais elevadas induziriam a um efeito oposto. É interessante observar que no experimento realizado pelos presentes autores, usando soro de cadela em estro (SCE) (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a), os resultados de maturação ovocitária foram desencorajadores, ao contrário dos relatos efetuados anteriormente por outros pesquisadores (NICKSON et al., 1993; OTOI et al., 1999). No referido experimento deste estudo, a avaliação do teor de progesterona no soro das fêmeas doadoras dos ovários foi estimada de forma indireta, correlacionando-se sinais clínicos e da citologia vaginal do estro. É possível que o nível hormonal de progesterona presente no soro das cadelas tenha sido inadequado ao estabelecimento da MII ovocitária. *In vivo*, níveis de progesterona sérica de 2-3ng/ml são registrados nesta espécie no momento do pico de LH (FELDMAN e NELSON, 1997). Considerando-se que na cadela o estabelecimento do pico de LH apresenta uma íntima correlação com os sinais clínicos de estro (CONCANNON et al., 1989), isto é, passividade à monta e citologicamente observa-se predomínio de células superficiais nos esfregaços vaginais, estes os sinais usados como parâmetros de identificação hormonal no nosso experimento, presume-se que a concentração de progesterona presente no soro das fêmeas coletadas estivesse situada ao redor dos níveis estabelecidos na literatura para aquele momento, i.é., pico de LH, e portanto, muito aquém dos referenciados como adequados à MIV no experimento realizado por Willingham e Kraemer (2001).

Nossas observações (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a), comparando a eficácia da associação de FSH e de LH ou a destituição hormonal de FSH na indução da maturação em meio de cultivo tecidual (TCM) 199, mostraram que, isoladamente ou em conjunto, as gonadotropinas exerceram atividade reduzida e similar na elevação do índice de meiose de ovócitos caninos. É interessante registrar, que a destituição de FSH no meio de maturação colaborou para o rompimento do bloqueio meiótico ovocitário, muito embora em meio à acentuada dissociação entre as células do cumulus e o ovócito, em conformidade com os achados prévios de Srsen et al. (1998).

A presença das células do cumulus em experimentos de maturação *in vitro* (MIV) é necessária à maioria dos ovócitos para que eles expressem sua competência (SIRARD et al., 1988; TANGHE et al., 2002). O metabolismo das células do cumulus controla o trânsito de metabólitos até o ovócito (CETICA et al., 2002). O papel positivo das células do cumulus durante a maturação é atribuído à sua capacidade metabólica e está associado à inerente habilidade na estabilização da progressão da meiose, assim como na sua retomada. As células do cumulus suportam a maturação citoplasmática e reduzem a tensão gasosa de oxigênio nas imediações do ovócito. Sua influência benéfica estende-se à elevação do número de



espermatozoides com capacidade fecundante ao redor do ovócito. Elas permitem o estabelecimento de um microsistema que facilita a capacitação, reação acrossômica e penetração espermáticas e previnem alterações ovocitárias desfavoráveis à fecundação subsequente (TANGHE et al., 2002).

A conexão entre estas células e os ovócitos em caninos persiste *in vivo* durante o desenvolvimento embrionário até o estabelecimento do estágio de mórula (RENTON et al., 1991), sugerindo assim que a sua função é importante durante as etapas iniciais da clivagem nessa espécie (NICKSON et al., 1993).

Considerando que expansão das células do cumulus é rara na maturação *in vitro* de ovócitos caninos, supõe-se que a desconexão transzonal observada poderia ser atribuída a um processo de contração citoplasmática nos ovócitos (SUZUKI et al., 1994).

Não obstante, LH, de acordo com nossos resultados, apareça como gonadotropina majoritária na indução da maturação nuclear *in vitro*, em conformidade com observações de outros autores (MATTIOLI et al., 1991), a associação com FSH no meio de maturação, além de garantir a integridade do complexo cumulus-oócito, provou que FSH não interfere na progressão da meiose dos ovócitos caninos. Apesar disso, como os teores e as fontes hormonais de FSH e de LH adequadas ao desenvolvimento *in vitro* dos ovócitos não foram investigados, não é possível especificar se proporções diferentes das usadas refletiriam de forma mais apropriada as mudanças dinâmicas requeridas para a maturação *in vivo* na cadela.

O emprego de um teor elevado de estradiol no meio de incubação, considerado eficaz na progressão da maturação ovocitária canina por outros autores (NICKSON et al., 1993), mostrou-se de acordo com nossas observações, insatisfatório na elevação dos índices de maturação nuclear até MII.

No entanto, suplementação do meio de maturação com estradiol é requerida para amparar a atuação gonadotrópica de FSH e LH sobre a aquisição da competência meiótica (EPPIG e DOWNS, 1984; GOODROWE et al., 1991). Tem sido sugerido que teores elevados de estradiol no meio de incubação são necessários à maturação citoplasmática e favorecem a fecundação e o desenvolvimento embrionário precoce (MOOR e TROUNSON, 1977; TESARIK e MENDOZA, 1995). Sugestivamente, quando estradiol foi usado em conjunto com hST no experimento de fecundação *in vitro* deste estudo, os resultados obtidos de clivagem acabaram mostrando que, se usados de forma associada, estes hormônios são capazes de facilitar os estádios finais da maturação nuclear e citoplasmática (RODRIGUES et al., *in press*).

É consensual que o emprego de hormônios de crescimento nos meios de maturação *in vitro* de ovócitos de diferentes espécies beneficia a progressão da meiose, promove expansão das células do cumulus e eleva o índice de desenvolvimento embrionário *in vitro* (BEVERS et al., 1997; SRSEN et al., 1998; IZADYAR et al., 1997). Em cadelas, a adição de somatotropina suína (ST) (WILLINGHAM-ROCKY et al., 2002) ao meio de incubação provou ser superior na aquisição da competência meiótica de ovócitos maturados *in vitro*, comparativamente à inclusão, isolada ou conjunta, de fator de crescimento epidérmico (EGF). Sob adição de 5000ng/ml de ST os autores registraram um índice de 19 % de maturação nuclear até o estágio de MII, equiparável ao índice de 11,8 % obtido em nosso experimento, quando a adição de 1000ng/ml de somatotropina humana (hST) promoveu maturação nuclear de MI a MII (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a). Embora no experimento realizado com hST no meio, os índices de meiose não tenham sido significativamente superiores àqueles observados no meio controle, hST provou ser eficaz na expansão

das células do cumulus de ovócitos caninos, especialmente daqueles provenientes de ovários de cadelas na fase folicular do ciclo estral. Quando a maturação *in vitro* é efetuada na presença de hormônio de crescimento (GH), observa-se elevação dos índices de migração e distribuição de grânulos citoplasmáticos corticais. A exposição ao GH acelera a maturação nuclear e promove clivagem e desenvolvimento embrionário subsequente (IZADYAR et al., 1997).

Parece existir um paradoxo inter-espécies com referência à regulação da meiose *in vitro* de ovócitos maturados sob adição de albumina sérica bovina (BSA).

Albumina sérica bovina provou ser superior ao soro fetal bovino na elevação dos índices de maturação em gatas (WOOD et al., 1995). No entanto, em bovinos, foi relatado que o emprego de BSA como única fonte protéica no meio de maturação *in vitro*, retardava a maturação nuclear e a capacidade de desenvolvimento de ovócitos submetidos à FIV (ALI e SIRARD, 2002). Similarmente aos relatos de Hewitt e England (1999b), nossas observações (RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a) sugerem que a BSA a uma concentração de 0,4 % pode favorecer o desencadeamento da meiose de ovócitos caninos. Nossos dados mostram, entretanto, que a molécula é ineficaz na promoção de índices mais elevados de MII. Estas observações apresentam-se em conformidade com as de Bolamba et al. (2002), que relataram atraso na progressão de MI a MII em ovócitos maturados sob suplementação com BSA e/ou SFB (soro fetal bovino).

A ambiguidade do efeito estimulatório e inibitório da BSA sobre a meiose ovocitária sugere que, a molécula induz a uma regulação inadequada e/ou deficitária no mecanismo molecular de progressão meiótica. Ovócitos submetidos a cultivo em meio suplementado com 0,3 % de BSA podem manifestar perda lipídica intercitoplasmática (OLSON et al., 2001).

A principal finalidade da oogênese é a produção de um ovócito fecundável (CECCONI, 2002).

Interação entre espermatozóide e ovócito é um processo que obedece a uma série de eventos glicobiológicos coordenados e que incluem capacitação espermática, adesão e penetração da zona pelúcida, invasão do espaço perivitelino, adesão e fusão com a membrana plasmática (oolema), ativação ovocitária e descondensação da cromatina presente na cabeça do gameta masculino, preliminarmente à formação de pronúcleo (VAN SOOM et al., 2002).

Certos fatores produzidos pelas células do cumulus durante o crescimento folicular ou MIV são essenciais para o ovócito adquirir habilidade para ser fecundado e sustentar desenvolvimento embrionário normal (SUZUKI et al., 2000).

Analogamente ao que é observado durante o processo de descondensação, formação de pronúcleo masculino, iniciada poucas horas após a fecundação, encontra-se vinculada a concentrações intra-ovocitárias elevadas de glutatona (r- glutamilcisteínaglicina, GSH) (YOSHIDA et al., 1993; ZUELKE et al., 2003) e requer aumento dos teores de cálcio, assim como alcalinização do citoplasma do zigoto (SCHORDERET-SLTKINE e HUARTE, 2003).

Quando não há suficiente glutatona intraovocitária, observa-se desenvolvimento assíncrono do ovócito e do núcleo espermático (YOSHIDA et al., 1993). Isto explicaria a falha na formação simultânea dos pronúcleos masculino e feminino em alguns ovócitos do experimento de fecundação *in vitro* neste estudo (RODRIGUES et al., *in press*). Também é possível que alguns ovócitos com capacidade de maturação até o estágio de MI, tenham sido fecundados ou partenogeneticamente ativados, resultando em

descondensação cromossômica e formação pronuclear isolada, sem progressão adicional, a exemplo do que já foi relatado em camundongos (EPPIG et al., 1994).

Contudo, como isto não explica o motivo pelo qual outros ovócitos, que mostraram pronúcleos masculino e feminino, não foram capazes de progredir em seu desenvolvimento embrionário, considera-se que o programa molecular da embriogênese fosse deficitário nesses ovócitos.

Mecanismos regulatórios intrínsecos do desenvolvimento ovocitário poderiam ser listados como fatores responsáveis pela inibição da progressão durante as fases iniciais da clivagem, processo caracterizado por várias divisões celulares sucessivas, sem aumento do volume embrionário. Bloqueio do desenvolvimento *in vitro* parece estar relacionado à falha na ativação do genoma embrionário (GODDARD e PRATT, 1983). É importante salientar que a cromatina materna e o desenvolvimento do pronúcleo masculino são regulados por fatores citoplasmáticos comuns, vinculados à regulação do ciclo celular, e dependentes da maturação do ovócito (SCHORDERET-SLATKINE e HUARTE, 2003).

Também, eventos de dependência temporal como fecundação retardada poderiam ser anexados a estas hipóteses, considerando-se a heterogeneidade de uma população espermática que alcança as células do cumulus durante a fecundação *in vitro*.

Assim, alguns espermatozoides que tenham sofrido reação acrossômica precoce ou tardia, além de mecanismos de transdução imperfeitos e estímulos inadequados (ELDER e DALE, 2000) podem comprometer o sucesso do processo de fecundação.

Eventos espermáticos (capacitação, reação acrossômica) e fatores de ordem ovocitária (células do cumulus, zona pelúcida) sofrem modulação direta ambiental. O meio de cultivo deve assegurar que sinais essenciais endócrinos e parácrinos sejam gerados e produzidos em tempo e em níveis apropriados, a fim de garantir aos gametas as condições requeridas para maturação nuclear, citoplasmática e genômica (CECCONI, 2002). Somente a eliminação de fatores que agem como causas potenciais do bloqueio de desenvolvimento embrionário contribui para o estabelecimento de um meio de cultivo ideal. Contudo, mudanças convencionais nem sempre são satisfatórias (ROTH et al., 1994).

O potencial de desenvolvimento embrionário observado no experimento de fecundação deste estudo (RODRIGUES et al., *in press*) pode ser equiparado àquele observado por outros autores (YAMADA et al., 1992; OTOI et al., 2000a; SONGSASEN et al., 2002), com clivagem até o estágio de 8 células sendo observada em ovócitos de diferentes fêmeas em diferentes estágios do ciclo estral. Na cadela, este estágio de desenvolvimento é alcançado após três divisões sucessivas num espaço de tempo de aproximadamente três ou mais dias (TSUTSUI, 1975), similarmente ao observado pelos presentes autores (RODRIGUES et al., *in press*). O cultivo dos embriões por 48 horas adicionais não contribuiu para progressão a estágios mais avançados (mórula ou blastocisto), confirmando a necessidade de contornar deficiências e limitações do sistema de cultivo adotado. Em caninos, foi, porém demonstrado que embriões com 8 células são adequados para procedimento de transferência embrionária e satisfazem o estabelecimento de uma prenhez (TSUTSUI et al., 2001). Neste estudo, este estágio de desenvolvimento pôde ser verificado nas diferentes fases do ciclo das fêmeas doadoras dos ovários. O índice geral de clivagem alcançado foi de 10, 1%, com zigotos 8 células mostrando índice de 5,6%. A percentagem de ovócitos nucleados que se desenvolveu em embriões mostrou variabilidade individual acentuada entre fêmeas pertencentes a um mesmo estágio do ciclo estral (RODRIGUES et al., 2003). No entanto, similaridade na percentagem de

clivagem foi observada entre as fases folicular, luteal e anestro. Esta resposta pode ser creditada a diferentes fatores, incluindo-se aqueles de ordem morfológica e qualitativa, tais como tamanho e saúde folicular e ovocitária.

Ondas foliculares parecem acontecer durante a maioria dos estágios reprodutivos em diferentes espécies (EVANS, 2003). A exposição hormonal à qual são submetidos os ovócitos *in vivo* ainda dentro do ambiente folicular, através da impregnação dos receptores presentes nas células do cumulus e da granulosa por gonadotropinas, entre as quais LH, e ainda a influência de  $\alpha$ -inibina e aromatase, e cuja expressão é similar nas células dos folículos em diferentes fases do ciclo de várias espécies (GOUDET et al., 1999), podem servir de argumento para explicar os resultados obtidos, já que o ambiente gonadotrópico influencia no processo de translação proteica, que é importante para maturação citoplasmática (ANDERIESZ, 2003). Também, as concentrações elevadas de receptores para estrógeno, presentes nos folículos primários e secundários durante o proestro e o anestro (PAULSMEIER, 1998; VERMEIRSCH et al., 1999), assim como no corpo lúteo de fêmeas caninas (DOLEZEL et al., 2003) e os teores constantes de progesterona nos folículos primários, secundários e terciários durante o ciclo estral das cadelas (PAULSMEIER, 1998) são fatores que, fazendo parte da memória endócrina retrospectiva do ovócito dentro do ambiente folicular, estimulariam o mecanismo de ação de mensageiros secundários como AMPc. Esta molécula atua junto ao sincício poroso de junções mediadas (gap junctions) (GRAZUL-BILSKA et al., 2001), regulando a secreção e a expressão dos elementos envolvidos nos mecanismos de transcrição e síntese de proteínas necessárias à progressão do desenvolvimento dos gametas. Assim, os atributos intrínsecos responsáveis pela capacidade de desenvolvimento do ovócito, que é adquirida durante o período de crescimento folicular (MOTLIK et al., 2000), acaba sendo um fator confiável e mais importante do que a condição reprodutiva da fêmea no momento da coleta ovocitária nos experimentos de maturação e fecundação *in vitro* em cadelas, em conformidade com os resultados mostrados nos experimentos comparativos deste estudo (RODRIGUES e RODRIGUES 2003b; RODRIGUES et al., *in press*).

No entanto, porque a dinâmica folicular durante o ciclo estral determina que invariavelmente alguns folículos se desenvolvam, enquanto outros seguem para atresia, a capacidade de maturação e de desenvolvimento ovocitário e folicular adquire um caráter heterogêneo (BRÜCK et al., 2000). Embora ovócitos aparentemente sadios possam ser obtidos de alguns folículos atréticos (MC NATTY et al., 1984), esta condição justificaria o índice insatisfatório de clivagem neste estudo e reafirma a importância na condução de experimentos que visem uniformizar e elevar a população de ovócitos com habilidade para competência nos folículos, a fim de garantir um número adequado de gametas para transferência embrionária.

No presente estudo, foi demonstrado que em caninos, embriões podem sofrer divisão *in vitro* até o estágio de 8 células, que é considerado adequado para realização de transferência embrionária e satisfaz o estabelecimento de uma prenhez (TSUTSUI et al., 2001). Este aspecto, que precisaria ser verificado experimentalmente, se constitui no modo definitivo de comprovação do sucesso de um programa de fecundação *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ABDOON, A.S.S.; KANDIL, O.M. Factors affecting number of surface ovarian follicles and oocytes yield and quality in Egyptian buffaloes. **Reproduction Nutrition and Developemnt**. Nouzilly. v. 41, p. 71-77, 2001.
- ALBERTS, B. et al. Germ cells and fertilization. In: **Molecular Biology of the Cell**. 3.ed. New York: Garland Publishing, Inc, 1994, cap. 20, p. 1017, 1024.
- ALI, A.; SIRARD, M.-A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 66, p. 901-905, 2002.
- ALLEN, W.E. Normal parturition. In: **Fertility and Obstetrics in the Dog**. Blackwell Scientific Publications. 1992. p. 71-76.
- ANDERIESZ, C. The Physiology of Producing Good Eggs. Disponível em: < <http://www.fertinet/library/life/Lifeissues5.pdf>> Acesso em: 2003.
- ANDERSEN, A. C. Reproductive System.B/ Female In: ANDERSEN, A. C.; GOOD, L.S. (Eds.): **The Beagle as an experimental dog**. Iowa: Iowa State University Press, 1970. p. 312-326.
- ANDERSEN, A. C.; SIMPSON, M.E. **The ovary and Reproductive Cycle of the dog (Beagle)**. Los Altos: Geron- X, Inc., 1973.
- ARMSTRONG, D.V.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**. Cambridge. v. 2, p. 139-146, 1997.
- ARTHUR, G.H. et al. Infertility in the bitch and queen. In: **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. 7. ed. London: W.B. Saunders, 1996. p. 536.
- BAAR, C. **Untersuchung indirekter Verfahren der Läufigkeits diagnostik bezüglich ihrer Aussagekraft für die Ovulationsterminierung beim Hund**. 1995. 125f. Tese de Doutorado. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, 1995.
- BARBER, M.R. et al. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. **Theriogenology**. Los Altos. v. 55, n. 8, p. 1705-1917, 2001.
- BAUMGARTINGER, P. **Zellgehaltbestimmung in der Eifollikelflüssigkeit der Hündin**. 1996, 140f. Tese de doutorado. Universitätsklinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien, 1996.
- BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of pre-implantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 28, p. 235-247, 1983.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: acts and artifacts. **Human Reproduction**. Update. Oxford, v. 1, n. 2, p. 91-148, 1995.
- BEDFORD, J.M. Mammalian fertilization misread? sperm penetration of the mammalian zona pellucid is unlikely to be a lityc event. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 59, p. 1275-1287, 1998.
- BEDFORD, J.M.; KIM, H.H. Cumulus oophorus as sperm sequestering device *in vivo*. **Journal of Exp. Zoologica**. v. 265, p. 321-328, 1993.
- BEVERS M.M. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**. Los Altos. v. 47, p. 13-22, 1997.

- BOGLIO L. et al. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction Nutrition and Development**. Nouzilly. v. 42, p. 265-273, 2002.
- BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K.D.; DURRANT, B.S. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**. Los Altos. v. 49, n. 5, p. 933-942, 1998.
- BOLAMBA, D. et al. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**. Los Altos. v. 58, p. 1689-1703, 2002.
- BOUCHARD, G. et al. Seasonality and variability of the interoestrus interval in the bitch. **Theriogenology**. Los Altos. v. 36, n. 1, p. 41-50, 1991.
- BRÜCK, I. et al. Effect of administering a crude equine gonadotrophin preparation to mares and follicular development, oocyte recovery rate and oocyte maturation *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 118, p. 351-360, 2000.
- BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 43, p. 543-547, 1990.
- BYERS A.P. et al. Mature domestic cat oocytes does not express a cortical granule-free domain. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 47, p. 709-715, 1992.
- BYSTED, B.V. Aspects of oocyte maturation, ovulation, fertilization and early embryonic development in the dog. In: REPRODUCTION HOS HUND. **Proceedings**. Frederiksberg. Dansk Veterinaerforening for Husdyrreproduktion. Escandinávia, 1999, p. 69-87.
- CECCONI, S. Growth and Differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspectives. **Journal of Reproduction and Development**. v. 48, n. 5, 2002.
- CETICA, P. et al. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction**. v. 124, p. 675-681, 2002.
- CHAFFAUX, S., THIBIER, M. Peripheral plasma concentrations of progesterone in the bitch with piometra. **Annales Recherche Vétérinaire**. v. 9, p. 587-592, 1978.
- CHENG, F. -P. et al. Progesterone –induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 59, p. 733-742, 1998.
- CHIAN, R.C. et al. Fertilization and early cleavage *in vitro* of ageing bovine oocytes after maturation in culture. **Theriogenology**. Los Altos. v. 37, p. 665-672, 1992.
- CHIAN, R.C., PARK, C.K., SIRARD, M.A. Cumulus cells act as sperm trap during *in vitro* fertilization of bovine oocytes. (Abstract). **Theriogenology**. Los Altos. v. 45, p. 258, 1996.
- CHOI, Y.H. et al. Effects of follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**. Los Altos. v. 49, n. 6, p. 1103-1112, 1998.
- CINONE, M. et al. Collection and maturation of oocytes in the bitch. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992. **Proceedings**. The Hague. v. 4, p. 1767-1769.
- COHEN-DAYAG, A. et al. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. **Proceedings**. USA: National Academie of Science, Nov. 1995, v. 92, p. 11039-11043.
- CONCANNON, P.W.; COWAN, R.; HANSEL, W. LH release in ovariectomized dogs in response to estrogen withdrawal and its facilitation by progesterone. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 20, n. 3, p. 523-531, 1979.

CONCANNON, P. Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 58, n. 2; p. 407-10, 1980.

CONCANNON, P.W. Canine physiology of reproduction. In: T. J. BURKE. (Ed.). **Small Animal Reproduction and Fertility: a clinical approach to diagnosis and treatment**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986, p. 23-77.

CONCANNON, P.W.; DIGREGORIO, G.B. Canine vaginal cytology. In: T. J. BURKE. (Ed.). **Small Animal Reproduction and Fertility**. Philadelphia: Lea and Febiger. 1986, p. 96-111.

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

CONCANNON, P.W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 47, p. 3-27, 1993.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. *In vitro* follicle growth: Achievements in Mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlin. v. 36, n. 1, p. 3-9, 2001.

CRAN, D.G. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 74, p. 237-245, 1985.

DAEN, F.P. et al. The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 101, p. 667-673, 1994.

DE BOSCHERE, H. et al. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: Should the two entities be disconnected? **Theriogenology**. Los Altos. v. 7, p. 1509-19, 2001.

DE COCK, H.; DUCATELLE, R.; LOGGHE, J.P. Immunohistochemical localization of estrogen receptor in the normal canine female genital tract. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 14, p. 133-147, 1997.

DEKEL, N., GALIANI, D., BEERS, W.H. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 38, p. 517-521, 1988.

DEKEL, N. et al. Mechanisms involved in control of cell cycle: meiosis in oocytes and mitosis in early embryos. Disponível em: < [http://www.weizmann.ac.il/Biological\\_Regulation/NewFiles/dekeln.pdf](http://www.weizmann.ac.il/Biological_Regulation/NewFiles/dekeln.pdf)>. Acesso em: 2003.

DELL'AQUILA, M.E. et al. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured *in vitro*. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 61, n. 2, p. 533-540, 1999.

DIETERICH, J. **Anwendung der Sonographie zum direkten Ovulationsnachweis und zur Erhebung zyklischer Ovarbefunde bei der Hündin**. 1994. 112f. Tese de doutorado. Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Hannover, 1994.

DING, J; FOXCROFT, G.R. Follicular Heterogeneity and Oocyte Maturation *in vitro* in Pigs. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 47, p. 648-655, 1992.

DOLEZEL, R. et al. Follicular population and oestrogen receptor alpha in canine ovaries during the oestrus cycle. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlin, v. 38, n. 4, p. 347, Abstract P50, 2003.

DOWNS, S.M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**. Los Altos. v. 39, p. 65-79, 1993.

ELDER, K.; DALE, B. Sperm-oocyte interaction. In: ***In vitro* fertilization**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000, p. 62.

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

ENGLAND, G.C.W. The use of ultrasonography and vaginoscopy for examination of the reproductive tract of the bitch. In: REPRODUCTION HOS HUND. **Proceedings**. Frederiksberg. Dansk Veterinaerforening for Husdyrreproduktion. Escandinávia, 1999, p. 50.

ENGLAND, G.C.W.; HEWITT, D.A. Follicular growth and ovulation in dogs. In: **EVSSAR Annual Symposium**. Lyon, 1999, p. 51.

EPIFANO, O. et al. Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. **Development**. v. 121, n. 7, p. 1947-1956, 1995.

EPIG, J.J. et al. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. **Developmental Biology**. v. 164, p. 1-9, 1994.

EPIG, J. The regulation of Meiosis in Oocytes. The Jackson Laboratory 2001-2002 Scientific Report. 71. Disponível em: <[http:// www.jax.org/pubinfo/scirpt/tjlscrip02.pdf](http://www.jax.org/pubinfo/scirpt/tjlscrip02.pdf)>. Acesso em: jul. 2003.

EPIG, J.J.; DOWNS, S.M. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 30, p. 1-11, 1984.

EVANS, A.C.O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlin. v. 38, n. 4, p. 240-246, 2003.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**. Amsterdã. v. 60-1, p. 375-387, 2000.

FARSTAD, W. et al. Maturation and fertilization of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 57, p. 161-165, 2001.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. The ovarian cycle & vaginal cytology in the bitch. In: DI BRYDEN (Ed.) Internal Medicine. **Proceedings 284**. The Post-Graduate Foundation in Veterinary Science of the University of Sydney, 1997, p. 273- 288.

FIGUEIREDO, J.R. et al. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Theriogenology**. Los Altos. v. 41, p. 1333-1346, 1994.

FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **B.B.A.- Reviews and Biomembranes**. v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FOURNIER-DELPECH, S.; THIBAUT, C. Capacitation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M-C.; HUNTER, R.H.F. (Eds.) **Reproduction in Mammals and Man**. 2.ed. Paris: Ellipses, 1993. p. 276.

FRASER, L.R.; BEYDEERA, L.R.; NIWA, K. Ca<sup>2+</sup>-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken. (Abstract) 40, p. 233-241, 1995.

FREEMAN, M.C. et al. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiological Reviews**. v. 80, n. 4, p. 1523-1631, Oct. 2000.

FUJII, M. et al. 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.

FULKA Jr, J.; FIRST, N.L.; MOOR, R.M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Molecular Human Reproduction**. Oxford. v. 4, n. 1, p. 41-49, 1998.



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

FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 98, p. 179-185, 1993.

GADELLA, B.M.; HARRISON, R.A.P. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. **Development**. v. 127, p. 2407-2420, 2000.

GOBELLO, C.; de La SOTA, R.L.; GOYA, R.G. Study of the change of prolactin and progesterone during dopaminergic agonist treatments in pseudopregnant bitches. **Animal Reproduction Science**. Amsterdã. v. 66, n. 3-4, p. 257-267, 2001.

GODDARD, M.J.; PRATT, H.P.M. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the 2 cell block. **J. Embryol. Exp.Morph.** v. 73, p. 111-133, 1983.

GONÇALVES, P.B.D. et al. Aspects of the oocyte maturation and *in vitro* fertilization in the bovine. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. 24 (suplemento) Porto Alegre, p. 98-116, 1996.

GOODROWE, K.L.; HAY, M.; KINGK, W.A. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 45, p. 466-470, 1991.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CAB international, 1994, p. 1-640.

GORE-LANGTON, R.E.; DANIEL, S.A.J. FSH and estradiol regulate antrum-like reorganisation of granulosa cells in rat preantral follicle cultures. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 43, p. 65-72, 1990.

GÖRITZ, F.; JEWGENOW, K.; MEYER, H.H.D. Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the ovary of the domestic cat (*Felis catus*). **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 106, n. 1, p. 117-124, 1996.

GOSDEN, R.G. et al. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 82, p. 813-825, 1988.

GOUDET, G. et al. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor,  $\alpha$ -inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 60, p. 1120-1127, 1999.

GRAZUL-BILSKA, A.T.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Gap junctions in the ovaries. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 57, p. 947-957, 1997.

GRAZUL-BILSKA, A.T. et al. Effects of second messengers on gap junctional intercellular communication of ovine luteal cells throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 65, p. 777-783, 2001.

GREENWALD, G.S. Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 40, p. 175-181, 1989.

GUDERMUTH, D.F. et al. Pregnancy-specific elevations in fecal concentrations of estradiol, testosterone and progesterone in the domestic dog (*Canis familiaris*). **Theriogenology**. Los Altos. v. 50, n. 2, p. 237-48, 1998.

GUÉRIN, C. et al. Estimation du pic de LH chez la chienne par une méthode immunoenzymatique. **Recueil de Médecine Vétérinaire**. p. 49-52, 1997.

GUÉRIN, P. et al. *In vitro* capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. **Theriogenology**. Los Altos. v. 52, n. 4, p. 617-628, Sept. 1999.

GÜNZEL, A.R.; KOIVISTO, P. Aktuelles zum Sexualzyklus der Hündin-diagnostische Möglichkeiten durch vaginalzytologische Untersuchungen mittels Test-simplsets. **Der Praktische Tierarzt**. v.65, n.2; p. 161-166, 1984.

GÜNZEL-APEL, A-R. Instrumentale Samenübertragung. In: GUSTAV FISCHER VERLAG JENA (Eds.). **Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund**. Hannover , 1994, p.79.

HADLEY, J.C. Total unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in peripheral blood during the oestrous cycle of the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 44, p. 445-451, 1975.

HAFEZ, E.S.E. Folliculogenesis, egg maturation, and ovulation. In: E.S.E. Hafez (Ed.): **Reproduction in Farm Animals**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993, p. 114-143.

HANSEN, P.J. Embryonic Mortality from the Embryo Perspective. **Journal Animal Science** 80 (E. Suppl. 2): E33-E44, 2002.

HARRISON, R. A. P. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction Fertility and Development**. Cooloingwood. v. 8, p. 581-594, 1996.

HARVEY, M. Conditions of the non-pregnant female. In: SIMPSON, Gillian M.; ENGLAND, Gary C.W.; HARVEY, Mike (Eds.) **BSVA Manual of small animal reproduction and neonatology**. Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association. 1998, cap. 4, p. 35-51.

HASE, M. et al. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science**. Japão. v. 62, n. 3, p. 243-8, 2000.

HAY, M.A. et al. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**. Los Altos. v. 48, p. 1329-1342, 1997.

HEIKINHEIMO, O.; GIBBONS, W.E. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. **Molecular Human Reproduction**. Oxford. v. 4, p. 745-756, 1998.

HENSEL, P. Physiology des sexualzyklus bei der Hündin.: In: Importierte Parasitosen, Gynäkologie und Andrologie. **Symposium**. Basel. Schweizerische Vereinigung für Kleintiermedizin. Mai 1998, p.75-82.

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

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**. Amsterdã. v. 50, n. 1-2, p. 123-139, Feb. 1998a.

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

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

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. **Veterinary Record**. London. v. 144, n. 9, p. 237-239, Feb, 1999a.

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

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G.C.W. Manipulation of canine fertility using *in vitro* culture techniques. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 57, p. 111-125, 2001.

HIRSHFIELD, A.N. Rescue of atretic follicles *in vitro* and *in vivo*. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 40, p. 181-190, 1989.

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**. Amsterdã. v. 42, n. 2, p. 275-88, 1996.

HOFFMANN, U. **Kontrolle der Ovaraktivität von Hündinnen mittels Östrogenbestimmung im Kot**. 2000. 77f. Tese de doutorado. Institut für Biochemie der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Wien, 2000.

HOFFMANN, B.; LEMMER, W.; RIESENBECK, A. Konservative Behandlungsmöglichkeiten der Pyometra. Aktuelle Probleme in der Fortpflanzung bei Hund und Katze. In: DVG TAGUNG DER FACHGRUPPE FORTPFLANZUNG UND IHRE STÖRUNGEN. Giessen. **Proceedings**. Okt. 2000, p. 64.

HOLDEFLEISS, H. **Vergleichende Untersuchungen zur Gewinnung entwicklungsfähiger Rinderembryonen durch Superovulation oder Ultraschallgeleitet Follikelpunktion und *In vitro*-Produktion**. 1998. 158f. Tese de doutorado. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, 1998.

HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth Hormone: roles in female reproduction. **Journal Endocrinology**. v. 168, p. 1-23, 2001.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**. Los Altos. v. 47, p. 23-32, 1997.

IZADYAR, F. et al. *In vitro* maturation of bovine oocyte in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken. v. 45, p. 372-377, 1996.

IZADYAR, F.; VAN TAL, H.T.; BRANDER, B.; BEVERS, M.M. Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken. v. 47, n. 2, p. 175-180, 1997.

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

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**. Los Altos. v. 39, n. 2, p. 527-535, 1993.

JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterisation before and after culture. **Animal Reproduction Science**. Amsterdã. v. 39, p. 285-297, 1995.

JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. **Theriogenology**. Los Altos. v. 45, p. 889-895, 1996.

JEWGENOW, K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. **Theriogenology**. Los Altos. v. 49, n. 8, p. 1567-1577, 1998.

JÖCHLE, W.; ANDERSEN, A.C. The estrous cycle in the dog: a review. **Theriogenology**. Los Altos. v. 7, n. 3, p. 113-40, 1977.

JOHNSTON, L.A.; O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. **Gamete Research**. v. 24, n. 3, p. 343-356, Nov. 1989.

KAWAKAMI, E. et al. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homolog zone pellucida. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 48, n. 4, p. 841-845, 1993.

KAWAKAMI, E.; ARAI, T.; NAKAMURA, U. Effects of medium containing heparin and theophylline on capacitation and metabolic enzyme activities of ejaculated spermatozoa from dogs with asthenozoospermia. **Animal Reproduction Science**. Amsterdã. v. 54, n. 4, p. 251-259, 1999.

KAWAKAMI, E. et al. Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminoglycan amounts of oviductal and uterine fluids in the bitch. **Journal of Veterinary Medicine Science**. Japão. v. 62, n. 1, p. 65-68, 2000.

KEEFER, C.L.; BRACKETT, B.G.; TROOP, C.G. Bovine fertilization after *in vitro* insemination with motile sperm fractions. **Theriogenology**. Los Altos. v. 23, p. 198, 1985.

KLEIN, R. **Untersuchung zur Wiederherstellung des positiven Feedback Mechanismus von Estradiol-17 $\beta$  und zur Sekretion von Estradiol-17 $\beta$  im Verlauf des Anöstrus der Hündin**. 1999. 151f. Tese de doutorado. Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Giessen. Giessen, 1999.

KOFLER, I. **Intrazytoplasmatische Spermajektion in canine oozyten**. 1999. 76f. Tese de doutorado. Veterinärmedizinischen Universität. Wien, 1999.

KOOISTRA, H.S. et al. Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of estrus cycle and anestrus in beagle bitches. **Biology of Reproduction**. Champaign. v.60, n.1, p. 65-71, 1999.

KÖSTER, K. **Dopplersonographische Untersuchung des Hundeovars im Zyklusverlauf**. 1999. 140f. Tese de doutorado. Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Hannover, 1999.

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

LANGHOUT, D.J.; SPICER, L.J.; GEISERT, R.D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. **Journal Animal Science**. v. 69, p. 3321-3334, 1991.

LEAVITT, W.W.; BOSLEY, C.G.; BLAHA, G.C. Source of ovarian preovulatory progesterone. **Nature, New Biology**, v. 234, n. 52, p. 283-4, 1971.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal Animal Science**. v. 48, p. 76-86, 1979.

LEIBFRIED- RUTLEDGE, M.L. et al. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 36, p. 376-383, 1987.

LEISER, R. Weibliche geschlechtorgane. In: MOSIMANN, W.; KOHLER, T. (Eds.). **Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere**. Berlin: Parey. 1990, p. 232-248.

LIEBICH, H. -G. Weibliche Geschlechtsorgane. In: LIEBICH, H. -G. (Ed.). **Funktionelle Histologie**. 2.ed. Stuttgart: Verlag Schattauer, 1993. p. 256-264.

LONG, C.R. et al. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured *in vitro* under various conditions of fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 102, p. 361-369, 1994.

- LUVONI, G.C. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. **Reproduction Nutrition and Development**. Nouzilly. v. 40, p. 505-512, 2000.
- LUVONI, G.C. et al. Influence of different stages of the oestrus cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 57, p. 141-146, 2001.
- LUVONI, G.C. et al. *In vitro* maturation of canine oocytes in isolated oviduct. In: THIRD EVSSAR EUROPEAN CONGRESS ON REPRODUCTION IN COMPANION, EXOTIC AND LABORATORY ANIMALS. **Proceedings**. Liège, 2002, p. 139-140.
- MC DOUGALL, K. et al. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 51, p. 25-31, 1997.
- MAC NATTY, K.P. et al. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 72, n. 39-53, 1984.
- MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. **Journal Exp. Zool**. v. 196, p. 189-196, 1976.
- MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. Capacitation, acrosome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. **Gamete Research**. v. 1, p. 101-109, 1978.
- MATÁS, C. et al. Effect of sperm preparation method on *in vitro* fertilization in pigs. **Reproduction**. v. 125, p. 133-141, 2003.
- MATTIOLI, M. et al. Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocytes. **Gamete Research**. v. 21, p. 223-232, 1988.
- MATTIOLI, M. et al. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. **Theriogenology**. Los Altos. v. 36, p. 95-105, 1991.
- MATTIOLI, M. Biology of oocyte maturation. In: Embryonic Development and manipulation in Animal Production. CONGRESS OF THE ITALIAN SOCIETY OF EMBRYO TRANSFER AND THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMBRYONIC TECHNOLOGY IN DOMESTIC SPECIES, 1. 1993, Milan. **Proceedings**. Milan, p.17-28.
- MATTSON, B.A.; ALBERTINI, D.F. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken. v. 25, p. 374-383, 1990.
- MAURER, H.R. **Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture: A practical approach**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 1992. p. 15-46.
- MEISL, D. Bestimmung des Optimalen Decktermins bei der Hündin. In: Importierte Parasitosen, Gynäkologie und Andrologie. **Symposium**. Basel. Schweizerische Vereinigung für Kleintiermedizin. Mai 1998, p.85-91.
- MONDAIN-MONYAL, M. et al. Relationship between gonadotrophins, inhibin and sex steroids secretion during the preovulatory period and the luteal phase in the blue fox (*Alopex lagopus*). **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 47, p. 47-56, 1993.
- MOORE, H.D.M. Molecular biology of fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility** Supplement. Cambridge. v. 57, p. 105-110, 2001.
- MOOR, R.M.; TROUNSON, A.O. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 49, p. 101-109, 1977.

- MOTLIK, J.; CROZET, N.; FULKA, J. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v.72, p. 323-328, 1984.
- MOTLIK, J. et al. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**. Los Altos. v. 49, n. 2, p. 461-469, 1998.
- MOTLIK, J. et al. Impact of two-step *in vitro* culture systems on developmental potency of oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlin. v. 35, p. 267-271, 2000.
- NICKSON, D.A. et al. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 47, p. 231-240, 1993.
- NISKANEN, M.; THRUSFIELD, M.V. Association between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. **Veterinary Record**. London. v. 143, p. 493-498, 1998.
- NISHIYAMA, T. et al. Determination of optimal time for mating by artificial insemination with chilled semen using luteinizing hormone surge as an indicator in beagles. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 35, n. 4, p. 348-52, 1999.
- NUTTINCK, F. et al. Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**. Los Altos. v. 39, n. 4, p. 811-821, Apr. 1993.
- OCANÃ-QUERO, J.M. et al. The effect of different sera and bovine serum albumen fraction (BSA) on *in vitro* maturation of immature bovine oocytes. **Archives Zootec**. v. 48, n. 182, p. 167-174, 1999.
- OKKENS, A.C. et al. Influence of hypophisectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 77, n. 1, p. 187-92, 1986.
- OLSON, P.N. et al. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 27, n. 5, p. 1196-206, 1982.
- OLSON, M.A. et al. Resumption of meiosis in canine oocytes cultured with or without bovine serum albumin and gonadotropins. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. **Proceedings**. Omaha: IETS, 2001, v. 55, p. 489.
- ONCLIN, K. et al. Patterns of circulating prolactin, LH and FSH during dopamine-agonist induced termination of anestrus in beagle dogs. **Biology of Reproduction** (Supplement 1). Champaign. v.52, Abstract p. 314, 1995.
- ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J.P. Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrus beagle bitches. **Journal of Reproduction and Fertility** Supplement. Cambridge. v.47, p.203-8, 1997.
- ONCLIN, K.; LAUWERS, F.; VERSTEGEN, J.P. FSH secretion patterns during pregnant and non pregnant luteal periods and 24 h secretion patterns in male and female dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 57, p. 15-21, 2001.
- OTOI, T. et al.. Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction Fertility and Development**. Coolingwood. v. 11, p. 387-390, 1999.
- OTOI, T. et al. Development of canine oocytes matured and fertilised *in vitro*. **Veterinary Record**. London. v. 146, p. 52-53, 2000a.
- OTOI, T. et al. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**. Los Altos. v. 54, p. 535-542, 2000b.

- OTOI, T. et al. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitches ovaries at various stages of the estrous cycles. **Reproduction Fertility and Development**. Coolingwood. v. 13, p. 151-155, 2001a.
- OTOI, T. et al. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from ovaries of bitches at various estrous cycles. **Theriogenology**. Los Altos. v. 55, n. 1, p. 490, 2001b.
- PARRISH, J.J. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**. Los Altos. v. 25, n. 4, p. 591-600, 1986.
- PARRISH, J.J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 38, p. 1171-1180, 1988.
- PATÍÑO, R. et al. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 129, p. 427-439, 2001.
- PAULSMEIER, K. **Immunohistochemical examination of estrogen and progesterone receptors in urogenital tract of the bitch**. 1998. 130f. Tese de doutorado. Institut für Reproduktionsmedizin und dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Hannover, 1998.
- PICTON, H. ; BIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular Cell Endocrinology**. v. 145, n. 1-2, p.27-37, 1998.
- PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**. Los Altos. v. 55, p. 1193-1210, 2001.
- POPE, C.E.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. *In vitro* fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development *in vitro*, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. n. 47, p. 189-201, 1993.
- POPE, C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**. Los Altos. v. 53, p. 163-174, 2000.
- QUINN, P.J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v. 22, p. 128-146, 1985.
- QUINN, P. Review of media used in the art laboratories. Embryologists Newsletter. p. 15, Summer 2000. Disponível em: < <http://www.embryologists.com> > Acesso em: 2003.
- RADEMACHER, K. **Beitrag zur Diagnose des Pyometra-Endometritis-Komplex der Hündin. Report of the Diagnosis of the Pyometra-Endometritis-complex of the bitch**. 1998. 103f. Tese de doutorado. Tierklinik für Fortpflanzung des Fachbereiches Veterinärmedizin und Chirurgische Tierklinik der Freien Universität Berlin, Berlin, 1998.
- RAZEK, G. **Darstellung des Zellkernes der Oozyten des Hundes und Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der kernstruktur der oozyten und anderen morphologischen merkmalen der Follikel und der Oozyten**. 1996. Tese de doutorado. Veterinärmedizinische Universität, Wien, 1996.
- RENTON, J.P. et al. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 93, n. 1, p. 221-231, 1991.
- RICHKIND, M. Possible use of early morning urine for detection of pregnancy in dogs. **Veterinary Medicine Small Animal Clinic**. p. 1067-8, 1983.
- RODRIGUES, B.A. et al. Pseudo-infertilidade na fêmea canina. **A Hora Veterinária**. Porto Alegre. ano 16, n. 94, p. 39-44, 1996.

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

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**. Berlin. v. 38, p. 58-62, 2003a.

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

RODRIGUES, B.A.; dos SANTOS, L.C., RODRIGUES, J.L. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. **article in press**

RODRIGUES, B.A.; dos SANTOS, L.C.; RODRIGUES, J.L. Clivagem de ovócitos maturados e fecundados *in vitro* de cadelas nos estágios folicular, luteal e anestro do ciclo estral. In: XIV REUNIÃO ANUAL DA SBTE. **Anais**. Beberibe: SBTE, 2003, p. 548-549.

ROSSI-FERRAGUT; L.M. et al. Entendendo o processo de fertilização...(da capacitação espermática até a fusão entre as membranas plasmáticas) Parte 1. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**. Ribeirão Preto. v. 51, n. 1, p. 30-34, 2001.

ROSZEL, J.F. Genital Cytology of the bitch. **Veterinary Scope** (Upjohn). v. 11, p. 2-15, 1975.

ROTA, A. et al. *In vitro* capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlorteracycline assay and changes in motility patterns. **Animal Reproduction Science**. Amsterdã. v. 57, p. 199-215, 1999.

ROTH, T.E.; SWANSON, W.F.; WILDT, D.E. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized *in vivo* versus *in vitro*. **Biology of Reproduction**. Champaign v. 51, p. 441-451, 1994.

RÜSSE, I.; SINOWATZ, F. Gametogenese. In: **Lehrbuch der Embryologie der Haustiere**. Berlin: Parey, 1991, p. 42-92.

SAINT-DIZIER, M. et al. *In vitro* maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. n. 57, p. 147-150, 2001.

SALUSTRI, A. et al. Effect of follicle stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell enclosed oocytes cultured *in vitro*. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 33, p. 797-802, 1985.

SCHORDERET-SLATKINE, S.; HUARTE, J. Gametogenesis and gamete interaction during fertilization. Disponível em: < <http://www.gfmer.ch/Books/reproductive-health> > Acesso em: jul. 2003.

SCHOTTERER, A. Beitrag zur Feststellung der Eianzahl in verschiedenen Altersperioden bei der Hündin. **Anat. Anz**. v. 65, p. 177-192, 1928.

SCHÜLKE, B. Grundstruktur der Spermienzelle und Biochemie des Spermas. In: BUSCH, W.; LÖHLE, K.; PETER, W. (Eds.) **Künstliche Besamung bei Nutztieren**. 2.ed. Stuttgart: Gustav Fischer, 1991. p. 209-210, 227-229.

SCHUMMER, A.; VOLLMERHAUS, B.; WILKENS, H. Weibliche Geschlechtsorgane. In: HABERMEHL, K.H., VOLLMERHAUS, B. e WILKENS, H.(Eds): **Lehrbuch der Anatomie der Haustiere**. 7. ed. Berlin: Blackwell Wissenschaftsverlag, 1995. v. II. p. 376-403.

SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. **Animal Reproduction Science**. Amsterdã. v. 36, p. 61-75, 1994.

SHILLE, V.M.; STABENFELDT, G.H. Current concepts on reproduction of the dog and cat. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**. v. 24, p. 211-243, 1980.



SHIMADA, M., THERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. **Molecular Human Reproduction**. Oxford. v. 8, p. 612-618, 2002.

SIPPOS, W. **Die *In-vitro*-Fertilisation caniner Oozyten unter besonderer Berücksichtigung der Supplementierung der *In vitro*-Maturationsmedien mit östrischem Hündinnenserum, fetalem Kälbeserum, 17 $\beta$ -Östradiol und Progesteron**. 1997. Tese de doutorado. Veterinärmedizinische Universität, Wien, 1997.

SIRARD, M.A. et al. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 39, p. 546-552, 1988.

SIRIVAIIDYAPONG, S. et al. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriogenology**. Los Altos. v. 53, n. 3, p. 789-802, 2000.

SIROTKIN, A.V. et al. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. **Reproduction Nutrition and Development**. Nouzilly. v. 40, p. 559-569, 2000.

SMITZ, J. et al. Improving *in vitro* maturation of oocytes in the human taking lessons from experiences in animal species. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlin. v. 36, n. 1, p. 11-17, 2001.

SOKOLOWSKI, J.H. Reproductive patterns in the bitch. Symposium on reproductive problems. **Veterinary Clinics of North America**. v. 7, n. 4, p. 653-65, 1977.

SOLOY, E. et al. Establishment of the block against sperm penetration in parthenogenetically activated bovine oocytes matured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 111, p. 151-157, 1997.

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

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

SRSSEN, V. et al. Effects of follicle- stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of Blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes *in vitro*. **Zygote**. v. 6, n. 4, p. 299-309, 1998.

STEINETZ, B.G.; GOLSMITH, L.T.; LUST, G. Plasma relaxin levels in pregnant and lactating dogs. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 37, n. 3, p. 719-25, 1987.

STEWART-SAVAGE, J. Effect of Bovine Serum Albumin Concentration and Source on Sperm Capacitation in the Golden Hamster. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 49, p. 74-81, 1993.

STRÖM HOLST, B. et al. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge, v. 119, p. 77-83, 2000.

STRÖM HOLST, B. et al. Zona pellucida binding assay- a method for evaluation of canine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 57, p. 137-140, 2001.

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

SUZUKI, H.; JEONG, B.-S.; YANG, X. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 63, p. 723-729, 2000.

SVANBERG, B. **Apoptosis- the cellular mechanism of rat ovarian follicular atresia**. 1999. 56f Tese de doutorado. Göteborgs University. Göteborg, 1999.

TANGHE, S. et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken. v. 61, p. 414-424, 2002.

TERVITT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 30, p. 493-497, 1972.

TESARIK, J.; MENDOZA, C. 1995. Nongenomic effects of 17 $\beta$ - estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. **Journal Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 80, n. 4, p. 1438-1443, 1995.

THEISS, T. **Untersuchungen zur Gewinnung, In-vitro-reifung und fertilisation von Oozyten beim Hund**. 1997. 94f. Tese de doutorado. Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilians- Universität, München, 1997.

TOSHIMORI, K. Sperm plasma membrane modifications associated with fertilization in mammals **Journal of Reproduction and Development**. Coolingwood. v. 46, n. 2, p. 65-78, 2000.

TSAFRIRI, A.; BRAW, R.H. Experimental approaches to atresia in mammals. **Reviews of Reproduction**. Oxford. v. 6, p. 226-265, 1984.

TSUTSUI, T. Studies on reproduction in the dog.V. On cleavage and transport of fertilised ova in the oviduct. **Jap.J.Anim.Reprod**. Japão. v. 21, p. 70-75, 1975.

TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. n. 39, p. 269-275, 1989.

TSUTSUI, T. et al. Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. **Journal Veterinary Medicine Science**. v. 63, p. 401-405, 2001.

TUCKER, K.E.; JANSEN, C.A.M. Why should we assess oocyte and embryo morphology? In: BASURAY, R.; MORTIMER, D. (Eds.) (net). INTERNATIONAL WORKSHOP FOR EMBRYOLOGISTS: TROUBLESHOOTING ACTIVITIES IN THE ART LAB. 2.ed. **Proceedings**. 2002.

VALTONEN, M.; JALKANEN, L. Species-specific features of oestrus development and blastogenesis in domestic canine species. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 47, p.133-7, 1993.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Regulation of mammalian oocyte growth and maturation. **Acta Scientiae Veterinarie**. (Supplement). v. 31, p. 188-205, 2003.

VAN HAAFTEN, B. et al. Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 101, n. 1, p. 221-5, 1994.

VAN SOOM, A. et al. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlin. v. 37, p. 144-151, 2002.

VERMEIRSCH, H. et al. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**. Los Altos. v. 51, p. 729-744, 1999.

VERSTEGEN, J. et al. Induction de l'avortement chez la chienne et chez la chatte par la Cabergolina, agoniste dopaminergique anti-prolactinique spécifique. **Annales de Médecine Vétérinaire**. v. 137, n. 4, p.251-9, 1993.

VERSTEGEN, J. et al. Early termination of anoestrus and induction of fertile estrus in dogs by the dopamine superagonist cabergoline. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 50, p. 410, 1994.

VERSTEGEN, J. et al. Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 111, n. 1, p. 35-40, 1997.

VERSTEGEN, J. Hormonal cycle and vaginal cytology in the bitch. In: REPRODUCTION HOS HUND. **Proceedings**. Frederiksberg. Dansk Veterinaerforening for Husdyrreproduktion. Escandinávia, 1999, p. 7-21.

VISCONTI, P.E. et al. Capacitation of mouse spermatozoa II. protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. **Development**. v. 121, p. 1139-1150, 1995.

WAIBL, H.; WILKENS, H.; MÜNSTER, W. Arterien, Venen. In: HABERMEHL, K. H.; VOLLMERHAUS, B. e WILKENS, H. (Eds.). **Lehrbuch der Anatomie der Haustiere**. 3. ed. Berlin: Parey, 1996, v. III, p.74-276.

WASSARMAN, P.M. The mammalian ovum. In: KNODIL, e NEILL, J. D. (Eds). **The physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1988, p. 69-102.

WASSARMAN, P.M. Mouse gamete adhesion molecules. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 46, n. 2, p. 186-191, 1992.

WASSARMAN, P.M. Gamete interactions during mammalian fertilization. **Theriogenology**. Los Altos. v. 41, n. 1, p. 31-44, 1994.

WASSER, S.K.; DE LEMOS VELLOSO, A.; RODDEN, M.D. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. **Journal of Wildlife Management**. v. 59, n. 4, p. 889-894, 1995.

WEY, N. **Mammatumoren bei der Hündin: klinische Verlaufstudie (1995-1997) und hormonelle Abhängigkeit unter besonderer Berücksichtigung von 17 $\beta$ -Östradiol und Progesteron**. 1998. 152f. Tese de doutorado. Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere des Fachbereiches Veterinärmedizin an der freien Universität Berlin, Berlin, 1998.

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

WILLINGHAM-ROCKY, L.A. et al. Effects of porcine somatotropin and epidermal growth factor on the resumption of meiosis of canine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**. Los Altos. v. 57, p. 742, 2002.

WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**. London, v. 223, p. 125-126, 1971.

WOLFE, B. A; WILDT, D.E. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized *in vitro* after prolonged cold storage. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 106, n. 1, p. 135-141, 1996.

WOOD, T.C. et al. Influence of protein and hormone supplementation on *in vitro* maturation and fertilization of domestic cat eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 104, n. 2, p. 315-323, 1995.

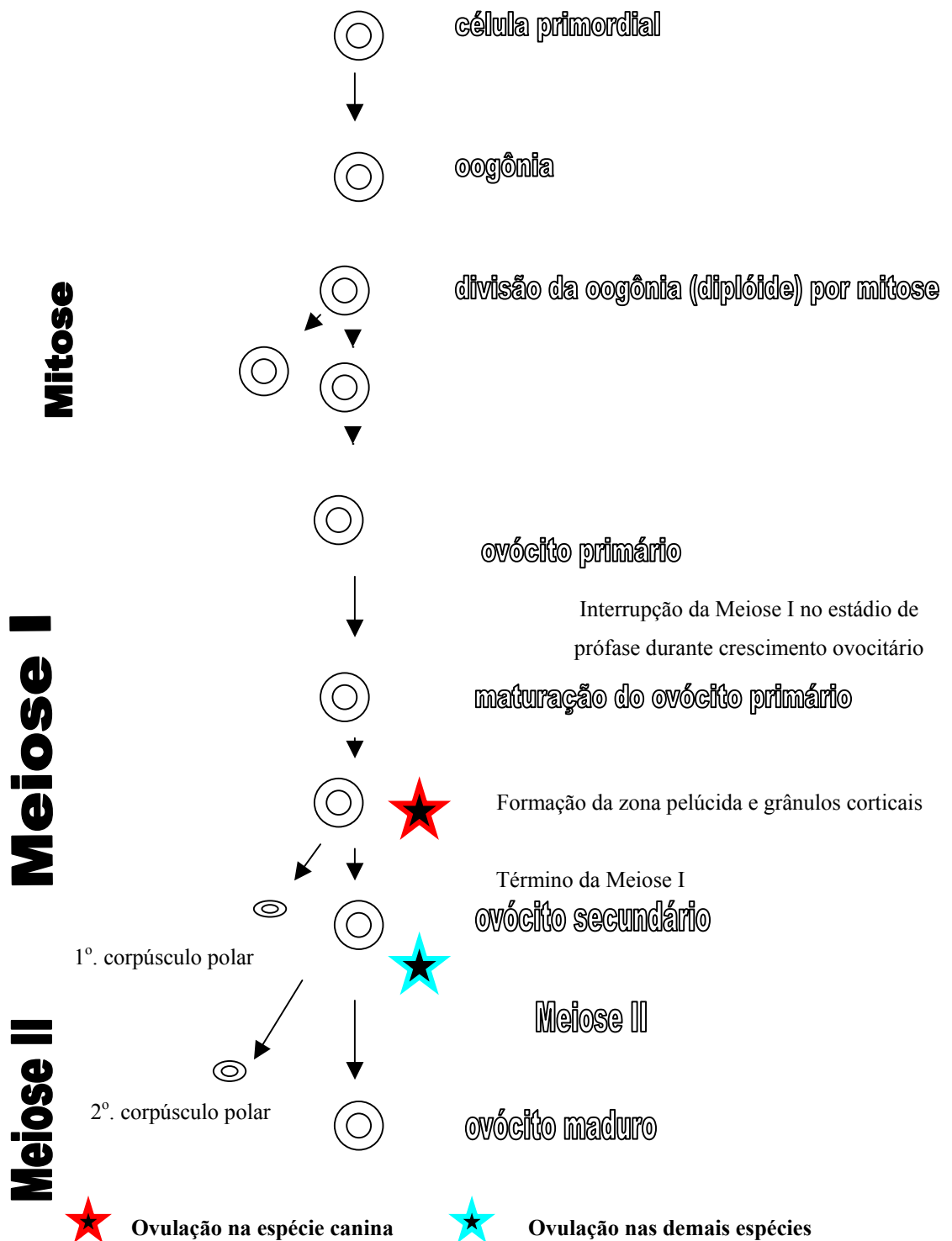
WOOD, T.C.; WILDT, D.E. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 110, n. 2, p. 355-360, 1997.

WOOD, T.C.; MONTALI, R.J.; WILDT, D.E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken. v. 46, p. 190-200, 1997.

- XU, K.P.; GREVE, T. A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 82, p. 127-134, 1988.
- YADAV, B.R. et al. Chromosome analysis of bovine oocytes cultured *in vitro*. **Genet. Sel. Evol.** v. 23, p. 191-196, 1991.
- YAMADA, S. et al. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 46, n. 5, p. 853-858, 1992.
- YAMADA, S. et al. *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 47, p. 227-229, 1993.
- YANAGIMACHI, R. Specificity of sperm-egg interactions. In: EDEDIN, M.; JOHNSON, M.H. (Eds): **Immunobiology of Gametes**. London: Cambridge University Press, 1977, p. 255-295.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL E., NEILL, J.D. (Eds): **The Physiology of Reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994, p. 189-317.
- YOSHIDA, M. et al. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 49, p. 89-94, 1993.
- ZHENG, Y.S.; SIRARD, M.A. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. **Theriogenology**. Los Altos. v. 37, p. 779-790, 1992.
- ZERON, Y. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, p. 447-454, 2001.
- ZUELKE, K.A. et al. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken. v. 64, n. 1, p. 106-112, 2003.

ANEXOS

ANEXO A: DIAGRAMA DA OOGÊNESE (Alberts et al., 1994; Bysted, 1999)



**ANEXO B: RECENT APPROACHES TO THE STUDY OF *IN VITRO* OOCYTE MATURATION AND *IN VITRO* FERTILIZATION OF CANINE OOCYTES**

**(artigo publicado no periódico Embryo Transfer Newsletter, v. 20, n. 4, p. 4-7, dezembro de 2002).**

**Introduction**

In 1827, Karl Ernst von Baer made the first description of a mammalian egg, an oocyte from a pet dog (von Baer KE. De ovi mamalium et hominis genesi. 1827(Facsimile in, Sarton, 1931)). The need for research on *in vitro* reproductive biotechniques in canines increased much latter, when dog breeding soundness became a commercial interest. This was followed a long time later by the idea that fertilization, in mammals, could occur experimentally outside the body of the female.

During the last few years, the additional interest in preventing the extinction of different wild canine species has gradually stimulated a considerable amount of work on the laboratory procedures of *in vitro* oocyte maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF). Current procedures demonstrate that success still remains low in this area, compared to the efficiency of IVM of oocytes from other mammals. However, thanks to persistence and courage of researchers, it has been shown that *in vitro* oocyte maturation rates in the bitch have been improved. Studies have revealed that details of oocyte development in canines (particularly details of nuclear maturation) are beginning to be understood. This paper reviews the technical aspects of current procedures and the significant advances involved in the optimization of IVM/IVF in the dog.

***In vitro* oocyte maturation**

Successful *in vitro* maturation requires the availability of: 1) responsive healthy cumulus-oocyte complexes (COC's), 2) reliable methods for oocyte recovery and 3) well established *in vitro* maturation protocols. These three components are needed to support complete development of cumulus cells, nuclear material, and cytoplasm, which are required for subsequent successful *in vitro* fertilization and *in vitro* embryo production. Canine oocytes are spontaneously ovulated at the beginning of the first meiotic division, and the germinal vesicle breaks down shortly after ovulation (Farstad, 2000). Pre-ovulatory luteinization of the follicle exposes the oocyte to high concentrations of progesterone. Forty-eight to 72 hours are required for the primary oocytes to reach maturity in the oviduct (Tsutsui, 1989). Parallel to the *in vivo* situation, canine oocytes have to be *in vitro* cultured at least for 48-72 hours to complete nuclear maturation (Hewitt et al., 1998). As the current methods used for canine IVM were adapted from other

species, they do not necessarily consider the specific requirements of the dog (Hewitt et al., 1998). Several reasons are suggested for the low competence rate of *in vitro* cultured bitch oocytes.

### ***Collection of ovaries and selection of oocytes***

The majority of dog oocytes used for IVM experiments are retrieved by slicing the ovaries from purebred and crossbred bitches after ovariohysterectomy at various stages of estrous cycle (Nickson et al., 1993). A recent study used oocytes collected from ovaries of females in the luteal phase of pregnancy and with the clinical condition of pyometra (Rodrigues and Rodrigues, 2002 b). Bitch age affects number and quality of oocytes collected, but not the meiotic developmental ability (Ström-Holst et al., 2001; Songsasen et al., 2001; Rodrigues and Rodrigues, 2002 b). It has been observed that the nuclear meiotic competence of oocytes obtained from different females has high individual variability. Reported nuclear meiotic competence percentages range from 0% to 71% (Songsasen et al., 2001).

Oocyte population heterogeneity is high in the ovary due to the release of oocytes from surface follicles and the deeper cortical stroma (Abdoon and Kandil 2001). An elevated number of oocytes, varying from 40% to 65%, collected from bitch ovaries are unsuitable for maturation or degenerate after *in vitro* culture (Razek 1996; Kofler 1999; Farstad et al., 2001). Unsuitability may be associated with follicular atresia, resulting in DNA degeneration and loss of developmental capacity (Jewgenow et al., 1997). Apoptosis of granulosa cells is a sign of follicular atresia. Oocytes display a size-related ability to undergo *in vitro* meiotic maturation, and only those with a diameter equal to or bigger than 120µm can progress into maturation beyond the germinal vesicle breakdown (GVBD) stage. Such oocytes are considered to be meiotically competent (Srsen et al., 1998; Otoi et al., 2000 a).

Meiotically competent oocytes have successfully completed nuclear and cytoplasmic maturation in a coordinate fashion. These events are supported by the presence of cumulus cells (Tanghe et al., 2002). Thus, oocytes with compact multi-layered cumulus investment and darkly pigmented ooplasm are viewed as potentially viable to resume meiosis. Expansion of the cumulus cells (mucification), which relates to meiotic maturation, is rare in dog oocytes submitted to *in vitro* maturation. In a study with blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes, it was shown that corona cells stayed attached to zona pellucida and appeared unexpanded until the end of the culture period (Srsen et al., 1998). The attachment, which was previously observed to persist throughout the embryonic development of morula in the bitch (Renton et

al., 1991), suggests that the role of those cells are also important during the initial cleavage stages in that species.

#### ***Effect of reproductive status***

Treatment of preovulatory oocytes from anestrus bitches with estrogens and gonadotropins prior to *in vitro* culture seems to be advantageous into increasing the percentage of metaphase II (MII) stage oocytes (Yamada et al., 1992), as well as when oocytes are derived from preantral and antral follicles (Fulton et al., 1998). Luvoni et al. (2001) indicated that dog COCs isolated from anestrus ovaries were unable to complete meiosis due to absence of communications between the germinal and somatic compartments through gap junctions. In contrast, other reports suggested that the stage of the estrus cycle or the reproductive status at the time of oocyte collection had no effect on subsequent nuclear *in vitro* maturation (Cinone et al., 1992; Hewitt et al., 1998; Rodrigues and Rodrigues, 2002b). Therefore, when performing *in vitro* maturation of bitch oocytes, the network of communications between cumulus cells and the oocyte seem not to be compromised by the *in vivo* hormonal condition of the female.

#### ***Maturation temperature and gas phase***

The standardization of the specific incubation temperature is a very important feature of the *in vitro* reproductive program in the bitch, which still remains to be defined. Oocyte maturation in canines has been attempted at 37°C (Mahi and Yanagimachi, 1976), at 37.5°C (Otoi et al., 2000 b), at 38°C (Srsen et al., 1998), at 38.5°C (Saint-Dizier et al., 2001) and at 39°C (Hewitt et al., 1998). Nuclear meiotic maturation rate to MII of bitch oocytes matured at 37°C or at 39°C was similar in a recent study (Rodrigues and Rodrigues, 2002c), suggesting that temperature does not affect the outcome of maturation in domestic canine species. Despite that, further research is required to evaluate the manner in which temperature affects advanced stage embryonic development in the bitch.

Oxygen concentrations of 5% or 20% regardless the maturation medium do not appear to exert a significant effect on nuclear maturation of bitch oocytes (Songsasen et al., 2001; 2002).

#### ***Culture media and supplements***

Optimal culture conditions are related to the preservation of oocyte morphology (Figueiredo et al., 1994), viability sustaining (Jewgenow and Pitra, 1993), increase of DNA content and follicle expansion (Nuttinck et al., 1993). In addition to the quality of oocytes, the culture medium and the



supplements used are critical factors involved in all the subsequent steps of the *in vitro* program in the bitch. The most widely used are complex balanced salt solutions including Tissue Culture Medium (TCM) 199, modified Krebs Ringer Bicarbonate (KBR), Ham F-10, and CMRL. Culture medium is commonly supplemented with protein, the usually sources being estrous serum collected from cows, bitches, and from fetal calves, at concentrations between 5 and 20% (Mahi and Yanagimachi, 1976; Yamada et al., 1992; Songsasen et al., 2001; Cinone et al., 1992; Nickson et al., 1993; Otoi et al., 2000 b). Bovine serum albumin is also used as a protein supplement and its positive impact on IVM has been demonstrated (Hewitt et al., 1998; Rodrigues and Rodrigues, 2002a). However, another study showed that canine oocytes are able to complete nuclear meiotic maturation in protein-free medium (Songsasen et al., 2002).

Supplementation of the culture medium with hormones (FSH, LH, estradiol, and growth hormone) is spreading among canine IVM/IVF laboratories across the world. The results indicate that their role and concentrations remain to be determined for the canine species.

*In vitro* maturation rates in the bitch were, until few years ago, found to be in the vicinity of 20% (Farstad, 2000), probably due to inadequate and asynchronous changes in nuclear and cytoplasmic maturation stages during *in vitro* incubation. However, these rates have been increasing recently (Otoi et al., 2000 b; Songsasen et al., 2002). Further, the rates have increased after maturation under conditions more closely resembling the oviductal environment (Hewitt et al., 1999; Luvoni et al., 2002). Both of these aspects have contributed to the enhanced success of IVM research in canines.

### ***In vitro* fertilization**

Studies conducted to examine oocyte development should also be combined with oocyte competence after *in vitro* fertilization, because this is the ultimate goal of an *in vitro* program. The use of IVF demonstrates that sperm penetration induces and increases resumption of meiosis in immature bitch oocytes (Saint-Dizier et al., 2001). Binding and penetration of the zona pellucida can be monospermic or polyspermic, and is independent of the maturation stage or oocyte diameter (Mahi and Yanagimachi, 1976; Saint-Dizier et al., 2001; Otoi et al., 2000 a). Decondensed sperm heads, pronuclei both male and female have been observed after fertilization by “swim-up” or Percoll prepared spermatozoa, and also by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (Fulton et al., 1998; Kofler, 1999; Hewitt and England, 2001). It was demonstrated that in dogs, production of embryos from IVF can be achieved at highly compromised

rates at both early and advanced stages of cleavage (Yamada et al., 1992; Otoi et al., 2000 b; Songsasen et al., 2002). A blastocyst was produced in a study (Otoi et al., 2000 b). More recently, the transfer of one cell and two cell embryos resulted in a single pregnancy, arrested however at the 22<sup>nd</sup> day of gestation (England et al., 2001).

### **Final considerations**

Current studies on *in vitro* oocyte maturation, fertilization and embryonic development in the dog provide valuable groundwork for continued research in this area. Overcoming the oocyte maturation barrier continues to be the major challenge of the *in vitro* program in the bitch. Because successful IVM and IVF relies on adequate culture conditions to support the required metabolic activity of both the oocyte and the spermatozoa, it is important to establish the physical, chemical and biological components affecting the success rates of canine *in vitro* embryo production. Progressive improvements in success rates and publication of such results by different research groups around the world have opened new perspectives in this area and are transforming *in vitro* production in the dog into a focal point of research. With that aspect in mind, it is certainly correct to predict that sooner or later superovulation, embryo cryopreservation and embryo transfer procedures will be accepted as important tools to regulate fertility, to diagnose and predict embryonic survival or mortality, and to provide new insights allowing conservation of genome of valuable pet and wild canines.



*Figure 1. A photomicrograph of a 4-8 cell cleavage stage in vitro-produced canine embryo.*

### **References:**

- Abdoon ASS, Kandil OM (2001). Factors affecting number of surface ovarian follicles and oocytes yield and quality in Egyptian buffaloes. *Reprod Nutr Dev* 41: 71-77.
- Cinone M, Ghneim A, Cira M, Dell Aquila ME, Minoia P (1992). Collection and maturation of oocytes in the bitch. *Proceedings. 12<sup>th</sup> international Congress of Animal Reproduction. 4: 1767-1769.*
- England GCW; Verstegen JP ; Hewitt DA (2001). Pregnancy following *in vitro* fertilization of canine oocytes. *The Vet. Record. 148: 20-22.*
- Farstad W (2000). Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci* 60-61: 375 387.

- Farstad W, Hyttel P, Hafne AL, Nielsen J (2001). Maturation and fertilization of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes *in vitro*. J Reprod Fertil 57: 161-165.
- Figueiredo JR, Hulshof SCJ, Van den Hurk R, Bevers MM, Thiry M, Nusgens B, Beckers JF (1994). Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. Theriogenology. 41: 1333-1346.
- Fulton R, Durrant B, Keskinetepe L, Brandon C, Fayer-Hosken R (1998). Assisted reproductive techniques for the treatment of canine infertility. Soc. for Theriogenology Newsletter. 21: 2, 7.
- Hewitt DA, Watson PF, England GCW (1998). Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. Theriogenology 49: 1083-1101.
- Hewitt DA, England GCW, 1999b: Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. Anim Reprod Sci 55: 63-75.
- Hewitt DA, England GCW (2001). Manipulation of canine fertility using *in vitro* culture techniques. J Reprod Fertil Suppl 57: 111-125.
- Jewgenow K, Pitra C (1993). Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. Theriogenology 39: 527-535.
- Jewgenow K, Thomas CW, Wildt DE (1997). DNA degradation in mural granulosa cells of non- and slightly atretic follicles of fresh and cold-stored domestic cat ovaries. Mol Reprod and Dev. 48: 350-355.
- Kofler I (1999). *Intracytoplasmic sperm injection on canine oocyte*. Thesis. Veterinärmedizinischen Universität, Wien.
- Luvoni GC, Luciano AM, Modina S, Gandolfi F (2001). Influence of different stages of the oestrus cycle of cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation J Reprod Fertil Suppl. 57: 141-146.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D (2002). *In vitro* maturation of canine oocytes in isolated oviduct. Third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals. Liège, Belgium, 2002: 139-140.
- Mahi C.A, Yanagimachi R (1976). Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. J Exp. Zool 196: 189-196.
- Nickson DA, Boyd J, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJA, Renton JP (1993). Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. J Reprod Fertil Suppl. 47: 231-240.
- Nuttinck F, Mermillod P, Massip A, Dessy F (1993). Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. Theriogenology 39: 811-821.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T. (2000 a). Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. Theriogenology 54: 535-542.
- Otoi T, Muramaki , Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T, Une S (2000 b). Development of canine oocytes matured and fertilised *in vitro*. Vet Rec 146: 52-53.
- Razek, K (1996). Documentation of various chromosomal configurations of bitch oocytes and the investigation of the relation between the nuclear structure of oocytes and other relevant criteria with respect to the follicles and the oocytes. Thesis. Veterinärmedizinische Universität, Wien.

- Renton JP, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ, Mullaney J, Perry B (1991). Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* 93: 221-231.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL. Maturation of canine oocytes in TCM-199 supplemented with different proteins. Third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals. Liège, Belgium, 2002a: 94-95.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. accepted to publication in *Theriogenology* 2002b.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL. Effect of two temperatures on *in vitro* nuclear maturation of bitch oocytes: relation to time culture intervals. Submitted to *Brazilian Journal of Veterinary Science* 2002c.
- Saint-Dizier M, Salomon J-F, Pettit C, Renard J-P, Chastant-Maillard S (2001) *In vitro* maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. *J Reprod Fertil Suppl* 57: 147-150.
- Songsasen N, Yu I, Leibo SP (2001). Effects of maturation media and oxygen concentration on nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 55: 494.
- Songsasen N, Yu I, Leibo SP (2002). Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol Reprod Dev* 62: 407-415.
- Srsen V, Kalous J, Nagyova E, Sutovsky P, King WA, Motlik J(1998). Effects of follicle-stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes *in vitro*. *Zygote* 6: 299-309.
- Ström-Holst B, Larsson B, Rodriguez-Martinez H, Lagerstedt A-S, Linde-Forsberg C (2001). Zona pellucida binding assay - a method for evaluation of canine spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 57: 137-140.
- Tanghe S, Soom AV, Nauwynck H, Coryn M, Kruif AD (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod and Dev.* 61: 414-424.
- Tsutsui T (1989). Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 39: 269-275.
- Yamada S, Shimazu Y, Awaji H, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y (1992). Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. *Biol Reprod* 46: 853-858.

## ANEXO C: MATURATION OF CANINE OOCYTES IN TCM-199 SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT PROTEINS

B.A. Rodrigues and J.L. Rodrigues

(Resumo da comunicação livre publicada nos anais do Third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals. Liège, Bélgica, p. 94-95, May 2002)

Advanced technologies as *in vitro* fertilization (IVF) and embryo transfer (ET) have been lately studied in canine species and represent a growing-up research segment stimulated by the concern on conservation of biodiversity.

In spite of improvement on *in vitro* techniques knowledge, the developmental competence of *in vitro* matured canine oocytes remains very low, probably due to inadequate changes at the nuclear and cytoplasmic levels during maturation, as consequence of inappropriate culture conditions.

The aim of this study was to determine the metaphase II rates of canine oocytes exposed to different protein sources added to the TCM-199 maturation medium.

Ovaries were harvested from sexual mature pure (n=13) and crossbreed (n=9) bitches (maximal age of 10 years) at various estrous cycle stages by routine ovariohysterectomy at the veterinary hospital of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Oocytes were recovered by slicing the ovaries and only those darkly pigmented surrounded by one or more layers of cumulus cells (Grade 1 COCs) or oocytes lightly pigmented with incomplete layers of cumulus cells (Grade 2 COCs) were selected for culture (1). The basic culture medium, designed in the present study as control group, was TCM- 199 with 10% heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50µg/ml gentamicyn, 2.2mg/ml sodium carbonate and 22µg/ml piruvic acid, 1.0µg/ml oestradiol (E 8875 Sigma), 0.5 µg/ml FSH (Folltropin-V, Vetrpharm Inc.) and 0.03 IU/ml hCG (Profasi HP, Serono). Media treatments consisted of: Group 1: oocytes were exposed to medium with 0.4% (w/v) bovine serum albumin (BSA, fraction V, Sigma) instead ECS; Group 2: oocytes were exposed to medium with 10.0% inactivated estrous bitch serum (EBS) instead ECS. Oocytes were cultured under mineral oil at 37°C (2) in a 100% humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air. At 72 hours of *in vitro* culture, oocytes were denuded, permeabilized by Triton-X, fixed in a 3.7% paraformaldehyde solution and stained with Hoechst 33342 (10µg/ml) for fluorescence microscopic analysis of the nuclear maturation stage.

Treatment effects were evaluated by Chi-Square analysis with adjusted residual. Effects were considered significant with P< 0.05 as level of significance.

The results are summarized in the Table 1, which shows the developmental competence after the oocytes have been exposed to different protein sources in the maturation medium.

The highest rates of oocytes undergoing nuclear maturation to MI/AI stages were achieved with 0.4 % BSA supplementation. However, despite the superiority of BSA at that development point, in these study that protein was unable to support further maturation to MII stage at the same rate. There were no influence on the number of oocytes matured to MII stage in TCM-199 with ECS and in TCM-199 supplemented with 0.4% BSA (3/143, 2.1% vs 2/150, 1.3%).

Oocytes exposed in medium with 10% estrous bitch serum (EBS) did not progress into MII. The percentages of oocytes reaching MII were significantly higher after culture with ECS (control group) (5/143, 3.5%) than with EBS (0/183, 0%). Nevertheless, TCM-199 supplemented with EBS was more efficient to promote maturation to MI/AI stages compared to the corresponding control group.

Based on these results, the tested protein supplementations did not improve the *in vitro* oocyte meiotic maturation in the bitch.

Table 1: The *in vitro* nuclear maturation rates of canine oocytes exposed to different proteins.

Protein source	n	GV (%)*	GVBD (%)*	MI/AI (%)*	MII (%)*	Others*
ECS (control)	143	17 (11.9)	14 (9.8)	10 (7.0) <sup>a</sup>	3 (2.1)	99 (69.2)
BSA 0.4%	150	11 (7.3)	15 (10.0)	30 (20.0) <sup>b</sup>	2 (1.3)	92 (61.3)
ECS (control)	143	37 (25.9)	11 (7.7)	6 (4.2) <sup>A</sup>	5 (3.5) <sup>c</sup>	84 (58.7)
EBS	183	44 (24.0)	17 (9.3)	19 (10.4) <sup>B</sup>	0 (0%) <sup>d</sup>	103 (56.3)

\*GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI/AI: methaphase/anaphase I, MII: methaphase II, others: unidentified or degenerate

<sup>A,B; a,b; c,d</sup> superscripts indicate significant difference compared with the corresponding control treatment (p< 0.05)

- (1) Hewitt DA et al. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology* 1998; 49: 1083-1101
- (2) Mahi CA and Yanagimachi R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 1976; 196: 189-196

## **ANEXO D: MEIOTIC RESPONSE OF *IN VITRO* MATURED CANINE OOCYTES UNDER HETEROLOGOUS HORMONE SUPPLEMENTATION**

B.A. Rodrigues and J.L. Rodrigues

(Poster publicado nos anais do Third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals. Liège, Bélgica, p. 158-159, May 2002)

Canine oocyte is ovulated at prophase of the first meiotic division, 36 to 50 hours after the LH peak. The competence to undergo meiotic maturation is progressively acquired and depends on the interaction of many correlated factors, with important changes at the nuclear and cytoplasmic levels, conducting the oocyte for metaphase II achievement.

Biotechnologic procedures, as *in vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF), work at cellular level, which leads to the possibility to inhibit or facilitate fertilization. This will be very important to introduce new medicine to control overpopulation of dogs as an option to substitute the present surgical methods or hormonal therapies.

The aim of this study was to determine the meiosis acquisition rates of canine oocytes cultured in maturation medium TCM- 199 under heterologous hormone supplementation.

Ovaries were harvested from pure (n=6) and crossbreed (n=22) bitches (maximal age of 10 years) at various estrous cycle stages by routine ovariohysterectomy at the veterinary hospital of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Oocytes were recovered by slicing the ovaries and only those darkly pigmented surrounded by one or more layers of cumulus cells (Grade 1 COCs) or oocytes lightly pigmented with incomplete layers of cumulus cells (Grade 2 COCs) were selected for culture (1). The basic culture medium, designed in the present study as control group, was TCM- 199 with 10% heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50µg/ml gentamicyn, 2.2mg/ml sodium carbonate and 22µg/ml piruvic acid, 1.0µg/ml oestradiol (E 8875 Sigma), 0.5 µg/ml FSH (Folltropin-V, vetrepharm Inc.) and 0.03 IU/ml hCG( Profasi HP, Serono). Experimental media treatments consisted of: Group 1: oocytes were cultured in control medium without FSH; Group 2: oocytes were exposed to control medium with 20µg/ml oestradiol, Group 3: oocytes were matured in control medium with 1000ng/ml hST (Humatrope, Lilly). Oocytes were cultured under mineral oil at 37°C (2) in a 100% humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air. At 72 hours of *in vitro* culture, oocytes were denuded, permeabilized by Triton X, fixed in a 3.7% paraformaldehyde solution and stained with Hoechst 33342 (10µg/ml) for fluorescence microscopic analysis of the nuclear maturation stage.

Treatment effects were evaluated by Chi-Square analysis with adjusted residual. Effects were considered significant with P< 0.05 as level of significance. The results are summarized in the Table 1, which shows the meiotic progression after the oocytes have been *in vitro* matured.

Although the results showed a positive influence in the presence of hST supplementation for the acquisition of maturation, there were no significant differences in the number of oocytes that reached MII at 72 hours of IVM in all treatment groups.

Maturation medium destituted of FSH contributed to overcome the meiotic block, but did not enhance the meiotic progression.

Meiotic resumption for each experimental treatment was measured to be 33.3% for FSH absence, 31.3% for estradiol 20 $\mu$ g and 27% for hST.

Data here presented suggest that isolated hormone supplementation to medium TCM- 199 is not sufficient to favour final steps of bitch oocyte maturation and show that suitable hormone media composition on IVM of bitch oocytes still need to be better defined.

Ongoing research has been performed in our laboratory focusing hormone interactions, in order to verify the effect of their association on the MII acquisition of canine oocytes.

Table 1: The stage of *in vitro* nuclear maturation of bitch oocytes under heterologous hormone supplementation

Hormon source	n	GV (%) <sup>*</sup>	GVBD (%) <sup>*</sup>	MI/AI (%) <sup>*</sup>	MII (%) <sup>*</sup>	Others(%) <sup>*</sup>
Control	89	34 (38.2)	7 (7.9)	7 (7.9)	5 (5.6)	36 (40.4)
Without FSH	114	49 (43.0)	21 (18.4)	10 (8.8)	7 (6.1)	27 (23.7)
Control	80	38 (47.5)	14 (17.5)	5 (6.3)	1 (1.3)	22 (27.5)
Oestradiol 20 $\mu$ g	96	48 (50.0)	18 (18.8)	8 (8.3)	4 (4.2)	18 (18.8)
Control	163	31 (19.0)	15 (9.2)	12 (7.4)	4 (2.5)	101 (62.0)
hST	178	35 (19.7)	27 (15.2)	11 (6.2)	10 (5.6)	95 (53.4)

<sup>\*</sup>GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI/AI: methaphase/anaphase I, MII: methaphase II, others: unidentified or degenerate

- (1) Hewitt DA et al. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology* 1998; 49: 1083-1101.
- (2) Mahi CA and Yanagimachi R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J. Exp. Zool* 1976; 196: 189-196.



## ANEXO E: *IN VITRO* OOCYTE MATURATION OF PRE-COOLED DOMESTIC CAT OVARIES

B.A. Rodrigues, L.C. dos Santos and J.L. Rodrigues

(Poster publicado nos anais do Third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals. Liège, Bélgica, p. 156-157, May 2002)

The ability to resume meiosis of cat oocytes obtained from ovaries submitted to temporary storage at 4°C, would allow more efficient use and long distance transport of valuable genetic material.

The aim of this study was to verify the effect of 24 hours storage at 4°C on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes.

Oocytes were recovered from sliced ovaries obtained from sexual matured pure (n=1) and crossbreed (n=31) cats at various estrous cycle stages by routine ovariohysterectomy at the veterinary hospital of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Oocytes with an intact corona radiata and attached cumulus and cytoplasm ranging from mottled to homogeneously dark (class-I-COCs) and oocytes with a transparent (lucid) vitellus (class-II-COCs) were selected for culture (1). The basic culture medium was TCM- 199 with 10% heat inactivated estrous cow serum (ECS), 50µg/ml gentamicyn, 2.2mg/ml sodium carbonate and 22µg/ml piruvic acid, 1.0µg/ml oestradiol (E 8875 Sigma), 0.5 µg/ml FSH (Folltropin-V, Vetrepfarm Inc.) and 0.03 IU/ml hCG (Profasi HP, Serono).

Each unit of an ovarian pair was split into 2 experimental groups (Group I: fresh and Group II: cooled). Oocytes from Group I and from Group II were cultured under mineral oil at 37°C for 48 hours in a 100% humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air.

At final time of culture oocytes were denuded, permeabilized by Triton X, fixed in a 3.7% paraformaldehyde and stained with Hoechst 33342 (10µg/ml) for fluorescence microscopic analysis of the nuclear maturation stage. The results are summarized in the Table 1, wich shows the meiotic aquisition in fresh and cooled oocytes exposed to 48 hours culture in TCM-199.

Table 1: Meiotic progression of fresh and cooled cat oocytes after *in vitro* maturation

Oocytes	n	GV (%) <sup>*</sup>	GVBD (%) <sup>*</sup>	MI/AI (%) <sup>*</sup>	MII (%) <sup>*</sup>	Others (%) <sup>*</sup>	Parth. (%) <sup>*</sup>
Fresh	176	19 (11.0)	73 (41.4) <sup>a</sup>	50 (28.4) <sup>a</sup>	15 (8.5)	16 (9.0) <sup>a</sup>	3 (1.7) <sup>a</sup>
Cooled	132	12 (9.1)	37 (28.0) <sup>b</sup>	23 (17.4) <sup>b</sup>	13 (9.8)	42 (31.8) <sup>b</sup>	5 (3.9) <sup>b</sup>

<sup>\*</sup>GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI/AI: methaphase/anaphase I, MII: methaphase II, others: unidentified or degenerated; Parth.: parthenogeneses

<sup>a, b</sup> Values with different superscripts within columns depict statistical significance (P<0.05; chi square)

Oocytes derived from fresh ovaries were more competent to initiate and progress into meiosis than oocytes obtained from cooled ovaries.

However, maturation rate to the MII stage of fresh oocytes was similar to the rate of oocytes obtained from cooled ovaries (15/176 vs 13/132).

Despite that finding, cooled ovaries increased significantly the rate of degenerated oocytes (31.8%), suggesting destabilization on nuclear and cytoplasmic maturation due to storage.

This investigation shows that cooling ovaries procedure preceeding IVM of cat oocytes does not seem to be critical to inhibit meiotic progression to MII stage.

(1) Lengwinat, T., Pitra, Ch., Blottner, S. Follicular immature oocytes of domestic cat: their fertilization and developmental competence during co-culture of feline oviductal epithelial cells. 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. Proceedings, 1992; 4: 1793-1795.

## **ANEXO F: MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS FELINOS**

*Mateus Lange, Berenice de Ávila Rodrigues, José Luiz Rodrigues*

(Resumo número 253, publicado no XIII salão de iniciação científica da UFRGS, sessão Ciências Biológicas em Porto Alegre/RS em 2001)

O objetivo deste experimento é verificar a capacidade de maturação *in vitro* (MIV), através da aquisição do estágio de metáfase II, de ovócitos felinos (*Felis catus*), colhidos de ovários de gatas pré-pubescentes. As gatas doadoras foram divididas em três grupos conforme a idade: grupo I (até 3 meses de idade), grupo II (de 3 a 6 meses de idade), grupo III (maiores de 6 meses). Para liberação dos complexos *Cumuli* oócitos, os ovários provenientes de fêmeas submetidas à ovariectomia foram seccionados finamente com lâmina de bisturi número 11, em placa de Petri, imersos em PBS aquecido à +37°C e acrescido de soro fetal bovino. Após a contagem e seleção morfológica, os ovócitos selecionados eram passados em gotas de lavagem e maturados em gotas de 100µl de TCM 199 sob óleo mineral à temperatura de +39°C, em atmosfera gasosa úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. O progresso na maturação *in vitro* (MIV) foi observado entre 45 e 48 horas após o início do cultivo. Ao final do tempo pré-estabelecido para a MIV, os ovócitos eram então fixados, corados e examinados entre lâmina e lamínula através de microscopia de fluorescência para classificação do estágio de maturação final, baseado nas alterações nucleares obtidas durante o cultivo. A maturação nuclear foi avaliada através do corante bisbenzamida (Hoechst 33342) à concentração de 10µg/ml. O número total de ovócitos considerados maduros (MII) variou conforme os grupos analisados. Dos 16 oócitos colocados em cultivo no grupo I, 1 (6,25%) alcançou o estágio de metáfase II. No grupo II, foram cultivados 53 oócitos, dos quais 10 (18,86%) apresentaram-se em metáfase II. No grupo III, dos 13 ovócitos submetidos a cultivo nenhum atingiu o estágio de maturação (MII). Os experimentos continuam sendo realizados visando a obtenção de um número de amostras suficiente para a análise estatística. (PIBIC-CNPq/UFRGS).

## **ANEXO G: EFEITO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE HEPARINA NA CAPACITAÇÃO *IN VITRO* DE ESPERMATOZÓIDES CANINOS**

*Mateus Lange , Berenice de Ávila Rodrigues, José Luiz Rodrigues*

(Resumo número 121, publicado no XIV salão de iniciação científica da UFRGS, sessão 14 /Reprodução Animal em Porto Alegre/RS em 2002)

O objetivo deste experimento foi verificar a taxa de capacitação *in vitro* de espermatozóides caninos, utilizando-se duas diferentes concentrações de heparina. Um doador da raça Whippet, sexualmente maduro e previamente submetido a exame andrológico para avaliação do potencial reprodutivo era coletado através da estimulação manual com fixação do pênis, sendo o ejaculado dividido em três frações: pré-espermática, espermática ou rica e pós-espermática. A fração rica com os espermatozóides era diluída em Tris-gema de ovo, na proporção de 1:0,5. O ejaculado diluído era dividido em duas frações iguais, sendo estas submetidas à passagem em gradiente de Percoll para separação dos espermatozóides vivos dos mortos. Após centrifugação e lavagem das amostras, o sedimento era ressuspensão em um volume de 190µL de meio de fecundação (Fert-Talp) contendo concentrações de 0,56mg/mL (HHE1) ou 1,68mg/mL (HHE2) de heparina. Os espermatozóides eram em seguida corados de forma conjugada, com os corantes fluorescentes Hoescht 33342 e clortetraciclina, para avaliação das taxas de capacitação, de acordo com a técnica descrita por Hewitt e England (1998). Os resultados parciais obtidos após 4 repetições foram os seguintes: HHE1 73% de espermatozóides viáveis não capacitados e 18,2% de espermatozóides viáveis capacitados; HHE2 47,7% de espermatozóides viáveis não capacitados e 26,2% de espermatozóides viáveis capacitados. Os resultados parciais indicam uma maior taxa de capacitação espermática utilizando-se heparina à concentração de 1,68mg/mL. Aos dados preliminares serão adicionados os resultados obtidos após um maior número de repetições.

### Referência

Hewitt DA, England GCW (1998). The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. 50: 123-139.

## ANEXO H: COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO ESPERMÁTICA NA CAPACITAÇÃO *IN VITRO* DE SÊMEN CANINO

(Lucila Carboneiro dos Santos, Berenice de Ávila Rodrigues, José Luiz Rodrigues)

(Resumo número 238, publicado no XIV salão de iniciação científica da UFRGS, sessão 14 /Reprodução Animal em Porto Alegre/RS em 2002)

O objetivo deste experimento foi verificar a taxa de capacitação *in vitro* de espermatozoides caninos, comparando-se dois métodos de separação espermática: gradiente de Percoll e Swim-up. Um doador da raça Whippet, sexualmente maduro e submetido a exame andrológico prévio para avaliação do potencial reprodutivo era coletado através da estimulação manual com fixação do pênis. Após a coleta, a fração espermática era diluída em Tris gema de ovo, procedendo-se em seguida à avaliação da motilidade e vigor. O sêmen diluído era então fracionado, de modo que 2/3 do mesmo ficavam reservados para separação espermática pela técnica de Swim-up. O volume restante da fração espermática (1/3) era submetido ao método Gradiente de Percoll. Após centrifugação e lavagem das amostras, procedia-se à ressuspensão do sedimento em meio de fecundação (Fert-Talp) contendo 0,56mg/mL de heparina (HHE1). O sêmen era a seguir corado pelo método de coloração conjugada com CTC (clortetraciclina) e com Hoechst 33342 (Hewitt e England, 1998). Os espermatozoides eram classificados em 4 grupos: vivos não capacitados, mortos, vivos capacitados e com reação acrossômica. Os resultados parciais, obtidos em 7 repetições, mostram índices até o momento superiores de capacitação através da técnica de Gradiente de Percoll com uma média de 43,1% espermatozoides vivos capacitados, 35,5% de vivos não capacitados, 11,6% com reação acrossômica e 9,7% de mortos, comparativamente à 21,7% espermatozoides vivos capacitados, 26,6% de vivos não capacitados, 12,1% com reação acrossômica e 41, 3% de mortos observados através da técnica de Swim-up. Este experimento, continua sendo realizado, visando a obtenção de um número de amostras suficientes para a análise estatística. (CNPQ/UFRGS).

### Referência

Hewitt DA, England GCW (1998). The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. 50: 123-139.

**ANEXO I: EFEITO DO PRÉ-RESFRIAMENTO OVARIANO SOBRE A INTEGRIDADE MORFOLÓGICA DE OVÓCITOS DE GATAS DOMÉSTICAS (*FELIS CATUS*).**

**RODRIGUES, B.A.; dos SANTOS, L.C.; RODRIGUES, J.L.**

(Resumo número 1474, publicado no XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET) em outubro de 2002 em Gramado)

**Introdução e Objetivo**

Para o êxito da produção *in vitro* (PIV) de embriões, é prioritário que os ovócitos selecionados sejam provenientes de folículos saudáveis e potencialmente viáveis para maturação *in vitro* (MIV). O objetivo deste experimento foi verificar o efeito do pré-resfriamento de ovários removidos de gatas domésticas sobre a manutenção da integridade morfológica de ovócitos destinados à MIV.

**Materiais e Métodos**

Ovários de gatas domésticas púberes sem raça definida (n=30) eram removidos através de ovariectomia no hospital veterinário da UFRGS. Ovócitos considerados potencialmente viáveis morfológicamente(1) eram selecionados para MIV. Cada unidade de um par ovariano foi separada em dois grupos experimentais (Grupo I: fresco/ n=207 e Grupo II: resfriado/ n=212). Adicionalmente, os ovócitos dentro de um mesmo grupo eram distribuídos, obedecendo à condição reprodutiva das fêmeas (prenhe ou não prenhe). Para análise estatística foi usado o teste de chi-quadrado com ajuste residual.

**Resultados e discussão**

Sessenta e nove(33,3%) ovócitos coletados de ovários frescos nas fêmeas prenhes e 138(66,6%) nas fêmeas não prenhes foram considerados viáveis morfológicamente, comparativamente à 64(30,2%) ovócitos de gatas prenhes e 148(69,8%) de gatas não prenhes nos ovários resfriados. Não foi encontrada diferença estatística significativa nas percentagens de ovócitos morfológicamente viáveis entre os Grupos I e II para a mesma condição reprodutiva( $P \geq 0,05$ ). Ao contrário, dentro de um mesmo grupo, as fêmeas prenhes contribuíram com número inferior de ovócitos viáveis comparativamente ao número recolhido de fêmeas não prenhes( $P \leq 0,05$ ). Os resultados mostram que ovócitos de ovários submetidos a resfriamento mantêm o padrão morfológico e são viáveis para MIV, conforme mostrado recentemente (2). Os dados apresentados sugerem ainda, que a presença de corpo lúteo gestacional influencia os índices de recuperação de ovócitos felinos potencialmente viáveis à MIV.

**Referências**

(1) Goodroove et al., Biol. Reprod. 1991 45: 466-470.

(2) B.A. Rodrigues; L.C. dos Santos; J.L. Rodrigues. *In vitro* oocyte maturation of pre-cooled domestic cat ovaries. Third EVSSAR European Congr. Liège, Bélgica, 2002:156-157.

**ANEXO J: CLIVAGEM DE OVÓCITOS MATURADOS E FECUNDADOS *IN VITRO* DE CADELAS NOS ESTÁGIOS FOLICULAR, LUTEAL E ANESTRO DO CICLO ESTRAL**

RODRIGUES, B. A.; dos SANTOS, L. C.; RODRIGUES, J. L.  
Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, FAVET, UFRGS  
Porto Alegre - RS, Brasil.  
e-mail: [berenice@portoweb.com.br](mailto:berenice@portoweb.com.br)

(Poster apresentado na XIV Reunião Anual da SBTE em Beberibe-Ce de 25 a 31 de agosto de 2003. Anais, p. 548-549).

O objetivo do presente experimento foi determinar o índice de clivagem de ovócitos maturados e fecundados *in vitro*, coletados de cadelas nos estágios folicular, luteal e anestro do ciclo estral. Os ovários foram removidos de cadelas de raça pura (n = 10) ou sem raça definida (n = 14), com idade de 8 a 96 meses, nos estágios folicular (n = 4), luteal (n = 11) e anestro (n = 9) do ciclo estral. As ovariectomias foram realizadas no hospital veterinário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre/RS) e nas clínicas veterinárias Arca de Noé e Veterinária do Vale (São Leopoldo/RS). O estágio do ciclo estral nas fêmeas era determinado através da realização de esfregaços vaginais, associados à presença ou à ausência de estruturas funcionais na superfície ovariana. Os ovócitos selecionados morfológicamente como sendo de qualidade superior (citoplasma uniformemente escuro envolto por duas ou mais camadas densas de células do cumulus oophorus) foram maturados por 48 h em TCM- 199 suplementado com 25mM HEPES, com 10% de soro de vaca em estro inativado (SVE), 50µg/ml de gentamicina, 2,2mg/ml de bicarbonato de sódio, 22µg/ml de ácido pirúvico, 20µg/ml de estradiol (E 8875 Sigma), 0,5 µg/ml de FSH (Folltropin-V, Vetrepharm Inc.), 0,03 UI/ml de hCG (Profasi HP, Serono), e suplementado com 1µg/ml de somatotropina humana (hST) (Lilly, FF1D44C). Os ovócitos eram fecundados *in vitro* com espermatozóides caninos frescos, diluídos preliminarmente em Tris-gema de ovo e separados através de gradiente descontínuo de Percoll. Após 24 h de co-incubação com os espermatozóides, os ovócitos eram cultivados em meio Sintético de Flúido de Oviduto (SOF) com albumina sérica bovina (BSA) (4mg/ml) por até 5 dias a 37°C em atmosfera contendo 5 % CO<sub>2</sub> em ar. O experimento foi replicado no mínimo 4 vezes para cada estágio reprodutivo. Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado para determinar as diferenças entre os grupos. As frequências e os números de fêmeas nas quais clivagem foi observada para cada estágio do ciclo estral foram: 50% (2/4) na fase folicular, 18,2% (2/11) na fase luteal, e 44% (4/9) no anestro. A percentagem individual de clivagem nessas fêmeas variou de 7,9% a 12,5% na fase folicular, 4,3% a 20,5% na fase luteal e 4,5% a 46,2% no anestro. A percentagem de ovócitos nucleados que se desenvolveu em embriões com 2 a 8 células foi de 8,3% (7/84) na fase folicular, 14,9% (10/67) na fase luteal e 15,9% (10/63) no anestro. Não foi constatada diferença estatística significativa nos índices de clivagem entre as fases folicular, luteal e anestro (p = 0,3123). Os resultados evidenciam que a clivagem de ovócitos caninos maturados e fecundados *in vitro* apresenta variabilidade individual acentuada entre fêmeas pertencentes a um mesmo estágio do ciclo estral. Neste experimento, foi demonstrado que, ovócitos caninos isolados de ovários de fêmeas em diferentes estágios do ciclo estral possuem competência para maturação, fecundação e clivagem *in vitro*.  
Apio financeiro: CAPES

**ANEXO K: MENSAGEM DR. GWATKIN- aceite artigo periódico Molecular Reproduction and Development**

Return-Path: <rbg@cwru.edu>  
Received: from lewis.CNS.cwru.edu ([129.22.104.62])  
by portoweb.com.br (8.12.9/8.12.9) with ESMTP id h4JIYsuZ001270  
for <berenice@portoweb.com.br>; **Mon, 19 May 2003 15:34:56 -0300**  
Received: from computer  
(adsl-68-76-99-122.dsl.bcvloh.ameritech.net [68.76.99.122])  
by smtp-b.cwru.edu (iPlanet Messaging Server 5.2 Patch 1 (built Aug 19 2002))  
with ESMTPA id <0HF500FI8CSGPH@smtp-b.cwru.edu> for berenice@portoweb.com.br;  
Mon, 19 May 2003 14:31:29 -0400 (EDT)  
**Date: Mon, 19 May 2003 14:28:19 -0400**  
**From: Dr RBL Gwatkin <rbg@cwru.edu>**  
**Subject: Manuscript #6214 for Mol Reprod Dev**  
To: Berenice De Avila Rodrigues <berenice@portoweb.com.br>  
Message-id: <006101c31e34\$6c522000\$d10ffea9@computer>  
MIME-version: 1.0  
X-MIMEOLE: Produced By Microsoft MimeOLE V6.00.2800.1106  
X-Mailer: Microsoft Outlook Express 6.00.2800.1106  
Content-type: multipart/alternative;  
boundary="Boundary\_(ID\_75mIY3wgocISZpa40oTz7g)"  
X-Priority: 3  
X-MSMail-priority: Normal

This is a multi-part message in MIME format.

--Boundary\_(ID\_75mIY3wgocISZpa40oTz7g)  
Content-type: text/plain; charset=iso-8859-1  
Content-transfer-encoding: 7BIT

Dear Dr Rodrigues:

I am pleased to let you know that your revised manuscript "Cleavage of canine oocytes" has been accepted. Proofs will follow from the publisher in due course.

Sincerely,

Dr Ralph Gwatkin

Editor of MR&D and Professor, Dept of Reproductive Biology

Case Western Reserve University Medical School

President of ReproGene, 25460 Bryden Rd, Beachwood, OH 44122

Tel 216-765-8425

Fax 216-765-0956

E-mail rbg@cwru.edu or ralphgwatkin@ameritech.net



**ANEXO L: MENSAGEM DR. OTOI- confirmação embriões caninos**

---- Original Message ----

**From:** [otoi](mailto:otoi)

**To:** [berenice@portoweb.com.br](mailto:berenice@portoweb.com.br)

**Sent:** Tuesday, October 22, 2002 8:48 PM

**Subject:** Reply from Otoi

Dr. Berenice de Ávila Rodrigues

I saw your pictures containing embryos after IVF.

I think that those are embryos with >8 cell and not fragmentations.

When I culture zygotes after IVF, I exclude non-cleaved embryos at 72 h after IVF and culture only cleaved embryos.

After development culture, we stain all embryos and zygotes by Hoechst for analysis of cell number.

It is difficult to distinguish between oocytes and embryos after IVF,

because canine oocytes and embryos have a lot of lipids.

I recommend that you should culture the non-cleaved embryo in another drop at 72 h after IVF.

Sincerely yours,

\*\*\*\*\*

T. Otoi

Laboratory of Animal Reproduction and Biotechnology

Department of Veterinary Science

Yamaguchi University, 753-8515

Japan

TEL/FAX:+81-83-933-5904

E-mail: [otoi@qube.agr.yamaguchi-u.ac.jp](mailto:otoi@qube.agr.yamaguchi-u.ac.jp)

\*\*\*\*\*

**ANEXO M: MENSAGEM DR. CARMONA-confirmação aceite para publicação do artigo 1**

----- Original Message -----

**From:** Coordenação de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Proc. Tec. POA

**To:** berenice@portoweb.com.br

**Sent:** Thursday, September 04, 2003 4:34 PM

**Subject:** trabalho

Prezada Berenice o trabalho de N°465 de sua autoria será publicado ainda em 2003.

Atenciosamente

Prof. Sérgio Carmona de São Clemente

Editor

**ANEXO N: CONVITE PARA PARTICIPAÇÃO NO 5º. PRÊMIO INTERNACIONAL DE PESQUISA DO INSTITUTO ROYAN (Irã)**

Dear Dr. **Rodrigues**,

Your research paper entitled: "**Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation**" published in **Journal of Reprod. in Domestic Animals 2003 Feb.**, was interesting for the scientific committee of the 5th Royan International Research Award. This award is an annual prize for best five researches in reproductive biomedicine fields. So, you are cordially invited to submit this paper for this award. The deadline for submitting your paper is April 10, 2004, and the final results of jury will be announced in the second part of June. The final ceremony will be in September 2004 jointed to Royan International Congress, in which the winners will present their works and answer the chairpersons' and audiences' questions. For participation you need to send (electronically or airmail) the following documents:

1. Application form (Attached).
2. Your research full paper(s)
3. A color photo (3\*4)
4. Your CV

Looking forward to receive your documents.

Best regards

Kamal Alizadeh / Award Secretariat

Royan Institute

P. O. Box: 19395-4644

Tehran - IRAN

Tel: +98 21 241 3790

Fax: +98 21 240 9314

Email Add.: [info@royaninstitute.org](mailto:info@royaninstitute.org)

Web Site: [www.royaninstitute.org](http://www.royaninstitute.org)

## ANEXO O: MEIOS USADOS NOS EXPERIMENTOS

### 1. Protocolo de coloração com fluorescência para ovócitos caninos e felinos (conforme informação da dra Lauri Willingham Texas A& M University, USA)

#### Protocolo de fixação

#### 3,7% Paraformaldeído (PFM) estoque

Paraformaldeído	3,7g	HCOH P.M 30,03 Nuclear
H <sub>2</sub> O	50ml	
1N (= 1M) NaOH	1 gota	NaOH Reagen P.M. 40,00 1N= 40g/l ou 0,4g/10ml

Agite em placa térmica até clareamento da solução– NÃO FERVA

2x DPBS (without BSA) 50ml

Ajuste o pH em 7,0/7,4 com 1N HCL  
Mantenha em geladeira (4°C)

#### Preparando a solução de fixação:

##### PFM+ TRITON

3,7% PFM Stock 2ml  
Triton X-100 20 ul (100-150 ul para bovinos)

Homogeneize bem (mais ou menos 10-15 minutos).

#### 1,9µM corante Hoechst (EVITE LUZ)

Hoechst 1mg  
DPBS (w/o BSA) 10ml

1:10 dilua com DPBS

1:10 dilua solução diluída com glicerol

Agite por 15-20 minutos

Conserve a 4°C, em vidro protegida luz com papel alumínio

#### Procedimento para fixação:

1.Prepare o fixador PFM+ Triton.

2,5 ml PFM

150 µl Triton X-100

Agite até homogeneização.

2.Fixe os ovócitos em placas de poços (Nunc wells) com aproximadamente 400ul de fixador por 15 minutos.

3.Lave os ovócitos em DPBS/ PVP por 15 minutos.

4. Desligue as luzes da sala. Coloque uma gota (0,3 a 0,4 ul) da solução de Hoechst com glicerol no meio de uma lâmina. Com o menor volume possível de DPBS-PVP transfira os ovócitos para a gota. Cubra a gota gentilmente com uma lamínula ( usar 4 gotas de cola de papel no canto da lamínula), pressionando a lamínula sobre a gota suavemente para não arrebentar os ovócitos (usar uma agulha ou pipeta fina para isso).

5.Sele os 4 cantos da lamínula com esmalte incolor (qualquer esmalte incolor). Permita que as gotas sequem sob proteção da luz ( sob placa de Petry revestida de papel alumínio). Quando as gotas estiverem secas, sele a lamínula por completo.

6.Quando o esmalte estiver seco, a lamina pode ser visualizada com luz ultra-violeta. Vire a lamina e lamínula de modo que esta fique de frente para a objetiva.

7. Manipule o PFM cuidadosamente de acordo com as disposições de uso para o mesmo.

**DPBS-PVP (DPBS com 3mg/ml PVP)**

DPBS 20ml  
 PVP 60mg= 0,060g  
 Misture até completa dissolução da PVP.  
 Conserve a 4°C.

PM=40,0 Sigma polivinilpirrolidona

Componentes	DPBS	2x DPBS
Ca Cl <sub>2</sub>	0,05g	0,10g
KCL	0,10g	0,20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10g	0,20g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,05g	0,10g
NaCl	4,0g	8,0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,575g	1,15g
Glucose	0,50g	1,0g
Na piruvato	0,018g	0,036g
BSA (opcional)	0,25g	0,50g
Pen-Strep	2,5ml	5,0ml
H <sub>2</sub> O	500 ml	500ml

Combine, filtre. Mantenha a 4°C envolto em papel alumínio.

Solução Hoechst (estoque) (x100)

10µg/ml

1mg/ml (=100x) H<sub>2</sub>O Milli-Q

A) 10µl + 90µl PBS= 10x

B) 10µl da solução A +90 µl glicerol= 1x

**2. Meios usados****A. Meio para transporte dos ovócitos**

Água tridestilada (Milli-Q) + PBS

**B. Meio para o Slicing**

Água Milli-Q + PBS + 1% de soro fetal bovino

**C. Solução estoque do meio de maturação**

Meio TCM-199 (solução estoque)

TCM-199 (25mMHepes) 0,5100g

Gentamicina 0,0050g

Ácido Pirúvico (CH<sub>3</sub>COONa) 0,0022g

Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) 0,2200g

H<sub>2</sub>O q.s.p 100ml

pH= 7,4 e Osmol= 280 a 320

**D. Meio para manipulação dos ovócitos (TCM- air)**

TCM-199 (25mMHepes)	1,510g
Gentamicina	0,005g
Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	0,035g
BSA	0,100g
H <sub>2</sub> O q.s.p	100ml

pH= 7,1 e Osmol= 280 a 320

#### **E. Meio de maturação de ovócitos (básico ou controle)**

TCM-199 (9ml) + 1ml (SVE) + hormônios

estradiol.....1,0 µg / ml

FSH.....0,5 µg / ml

hCG.....0,03 UI / ml

#### **F. Meio de cultivo de ovócitos**

##### **Meio sintético de fluido de oviduto (SOF):**

Substância	Gramas/100ml
NaHCO <sub>3</sub>	0,2100
NaCl	0,6294
KCl	0,0534
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0162
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,0252
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,0098
Glicose	0,0270
Fenol vermelho	0,0010
Lactato de sódio	28,2 µl

##### **Elementos de adição (para 5ml de SOF):**

Componentes do eppendorf B (Piruvato, Glutamina, Gentamicina)	93µl
Componentes do eppendorf C+D (Aminoácidos)	150µl
Albumina sérica bovina	0,0200g

#### **G. Fert- TALP**

Substância	Gramas/100ml
NaCl	0,6658
KCL	0,0239
NaHCO <sub>3</sub>	0,2100
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,0041

CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,0294
MgCl <sub>2</sub>	0,0074
Penicilinamina	0,0003
Vermelho fenol	0,0010
Lactato de Na	0,1860

pH= 7,4

### **H. Sperm- TALP**

Substância	Gramas/100ml
NaCl	0,5840
KCL	0,0231
NaHCO <sub>3</sub>	0,2100
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,0041
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,0294
MgCl <sub>2</sub>	0,0038
Gentamicina	0,0050
Vermelho fenol	0,0010
Lactato de Na	0,4035
HEPES (PM 238,3)	0,2384

pH= 7,4

### **I. Percoll**

#### **I.1 Percoll 90**

0,5ml Spem-Talp (concentração 10X) + 4,5ml Percoll  
desprezar 0,5ml e em seguida adicionar 0,5ml de Sperm-TALP

#### **I.2 Percoll 45**

2,0ml de Percoll 90 + 2,0 ml Sperm-TALP