

## Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela

*Ovulation physiology, fertilization and initial embryonic development in the bitch*

A.A.P. Derussi<sup>1,3</sup>, M.D. Lopes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluna de Pós-graduação (mestrado), Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: [ana\\_pagnano@yahoo.com.br](mailto:ana_pagnano@yahoo.com.br)

### Resumo

Os aspectos relacionados à ovulação, à fertilização e ao desenvolvimento embrionário inicial na espécie canina apresentam peculiaridades. Nas cadelas há uma grande dificuldade na determinação precisa do momento da ocorrência das ovulações, devido ao período adicional necessário à maturação oocitária, já que os oócitos caninos são liberados ainda em estágio imaturo, esse fato, associados a longevidade dos espermatozoides no trato genital da fêmea são responsáveis por um comprometimento da determinação da cronologia do desenvolvimento embrionário. Um maior conhecimento a respeito dessas particularidades é de grande valia para aplicação das principais técnicas reprodutivas nos canídeos domésticos e não domésticos. O objetivo desta revisão de literatura é discutir aspectos relacionados à ovulação, à fertilização e ao desenvolvimento embrionário inicial das cadelas, visando ao uso desses conhecimentos na prática veterinária e na área de biotecnologia reprodutiva.

**Palavras-chave:** fertilização, canina, fisiologia reprodutiva.

### Abstract

*The aspects related to the ovulation, fertilization and initial embryonic development on canine species have several peculiarities. Due to the difficulty to determine the exact moment of ovulation, the additional period required after ovulation for the oocytary maturation and the longevity of the spermatozoa in the reproduction system of the bitches, the chronology of the embryonic development are engaged. The major knowledge of these particularities has a great importance for the application in reproduction biotechnology in the domestic and non-domestic carnivores. Therefore, the aim of this review is to discuss this knowledge in the practical veterinary as well as in the area of reproductive biotechnology.*

**Keywords:** fertilization, canine, physiology of reproduction.

### Introdução

Cerca de 10 a 20 anos atrás, os estudos realizados sobre a reprodução da espécie canina baseavam-se apenas na transferência de dados já conhecidos em outras espécies, porém muitos aspectos da fisiologia reprodutiva e do desenvolvimento embrionário dos cães diferem dos modelos clássicos. Atualmente, o interesse na espécie canina e o conhecimento de suas particularidades reprodutivas aumentaram, pois, além de esses animais serem de companhia, são utilizados como modelos experimentais para outras espécies de canídeos e para o homem (Concannon e Verstegen, 2005).

Técnicas de reprodução assistida como a produção e a transferência de embriões, podem auxiliar no manejo de colônias de cães, no resgate de material genético de indivíduos inférteis ou geneticamente superiores, idosos, ou em estado terminal. A partir do momento em que as técnicas de produção de embriões *in vitro* se tornarem consistentemente eficazes nos cães domésticos, tais tecnologias poderão ser aplicadas à espécie de canídeos não domésticos.

Há necessidade de um maior conhecimento e padronização na determinação precisa da ovulação, da maturação oocitária e da cronologia do desenvolvimento embrionário para que se consiga mimetizar as condições *in vivo* e alcançar bons resultados nas técnicas de reprodução artificial (Reynaud et al., 2005). O objetivo desta revisão de literatura é discutir os aspectos fisiológicos do processo de ovulação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial nas fêmeas caninas, para obtenção de um conhecimento maior a respeito das particularidades reprodutivas dessa espécie e aplicação posterior desses conhecimentos na prática veterinária e na área de biotecnologia reprodutiva.

## Fisiologia da ovulação

### *Foliculogênese ovariana, dinâmica folicular e luteinização pré-ovulatória*

A oôgenese é caracterizada pela produção de oócitos pelas células germinativas primordiais (oôgonias) e pela proliferação mitótica de células epiteliais internas originadas de uma interação de diversos tipos celulares, ainda na fase pré-natal. Nos mamíferos, a oogênese inicia-se durante a vida fetal e desenvolve-se por meses ou anos nos animais adultos. Diferentemente de outras espécies, a oôgenese na cadela pode ocorrer até dois meses após o nascimento, pois células em proliferação já foram observadas na região do córtex ovariano (Fayer-Hosken et al., 2000).

Os folículos primordiais nas cadelas foram identificados com 17 a 54 dias após o nascimento, contendo oócitos pequenos, com 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro e formados por uma única camada de células da granulosa. Nesse estágio, a comunicação entre o oócito e as células foliculares é incompleta, e a zona pelúcida (ZP) começa a ser formada (Songsasen e Wildt, 2007). Os folículos primários que foram detectados em torno do 120º dia após o nascimento e os oócitos mediam  $78 \pm 15 \mu\text{m}$ , apresentando uma ZP distinta (Durrant et al., 1998).

Nos oócitos primários, as mitocôndrias estão em número crescente, refletindo um aumento natural da atividade metabólica (Songsasen e Wildt, 2007). Os grânulos lipídicos aumentam em quantidade durante todo o processo da oogênese, fato que resulta em uma aparência escura marcante do oócito canino, diferentemente de outras espécies de mamíferos. A função fisiológica destes grânulos não é conhecida. Sabe-se que ocupam 5% da área citoplasmática e acredita-se que sejam importantes como reserva nutricional durante o processo e desenvolvimento embrionário, já que o período anterior à implantação é relativamente prolongado (Landim-Alvarenga e Bicudo, 1997).

Os folículos secundários ou pré-antrais avançados contêm oócitos com diâmetro acima de 100  $\mu\text{m}$  e citoplasma escuro devido à presença dos grânulos lipídicos. Folículos antrais avançados foram evidenciados em cadelas jovens, a partir dos seis meses de idade, durante o proestro (Concannon et al., 1989). Com a liberação da onda pré-ovulatória de hormônio luteinizante (LH), os folículos se desenvolvem rapidamente de 4 a 13 mm e são denominados de folículos pré-ovulatórios (Concannon et al., 1989; Fayer-Hosken et al., 2000; Songsasen e Wildt, 2007).

Uma característica intrigante da gametogênese na cadela é o elevado índice de folículos poliovulatórios (11%); uma taxa consideravelmente maior do que o da mulher (4%), da gata (3%) e dos primatas não humanos (2%). Essa porcentagem alta dos folículos poliovulatórios nas cadelas talvez esteja relacionada a uma grande densidade de folículos primordiais, presentes no córtex ovariano da cadela jovem, que acabam se coalescendo (Luvoni et al., 2005).

Os primeiros estudos relacionados ao acompanhamento da dinâmica folicular em cadelas basearam-se na remoção ovariana por laparotomia ou necrópsia em vários estágios do ciclo estral (Wildt et al., 1977). Posteriormente, England e Allen (1989) realizaram marcação ovariana utilizando esferas de metal após o procedimento de laparotomia e exames ultrassonográficos para o monitoramento do desenvolvimento folicular.

Outras pesquisas fundamentaram-se na simples observação do colapso abrupto da parede folicular que gerava o desaparecimento da imagem ovariana no estudo ultrassonográfico para a determinação da ovulação (Hayer et al., 1993). Atualmente, busca-se o detalhamento destas modificações durante as fases do ciclo estral, na tentativa de uma padronização e definição do momento ovulatório. Este exame é particularmente mais difícil de ser realizado em comparação com as outras espécies domésticas, já que os folículos pré e pós-ovulatórios nas cadelas são bastante semelhantes e muitas vezes não se observa o colapso folicular após a ovulação. A visibilização dos corpos lúteos hemorrágicos nas cadelas é semelhante a dos folículos pré-ovulatórios, devido provavelmente à espessura da parede em ambas as estruturas (Fontbonne e Malandain, 2006).

Nos resultados ultrassonográficos obtidos por Hayer et al. (1993), os folículos pré-ovulatórios foram identificados como estruturas circulares anecoicas, pequenas e circundadas por parede ecóica, presentes no primeiro dia de proestro. Essas estruturas mediram de  $3,7 \pm 0,6 \text{ mm}$  a  $6,9 \pm 0,7 \text{ mm}$ , entre os dias -5 e 0; sendo que o dia 0 corresponde ao dia do surgimento da onda pré-ovulatória de LH. As estruturas anecoicas apresentaram um aumento significativo para  $7,5 \pm 0,7 \text{ mm}$ , no segundo dia após a onda pré-ovulatória de LH (dia+2).

No final da fase do proestro, durante o período pré-ovulatório, o tamanho dos folículos ovarianos aumentou juntamente com o aparecimento de uma quantidade de fluido anecoico, o que facilitou a visualização dessas estruturas. Nesse estágio, os folículos foram classificados como pré-luteinizados (Fontbonne e Malandain, 2006).

O folículo pré-ovulatório mediu de 6 a 9 mm e apresentou-se como uma estrutura anecoica, circular e espessa. Um dia após a ovulação, foi notada a formação do corpo lúteo hemorrágico, muito similar ao folículo pré-ovulatório (Fontbonne e Malandain, 2006). O diâmetro desta estrutura continuou a aumentar durante todo o desenvolvimento do corpo lúteo para  $8,1 \pm 0,6 \text{ mm}$ , no primeiro dia do diestro (Hayer et al., 1993).

Hayer et al. (1993) observaram também que, na fase folicular do ciclo estral, o aumento significativo da concentração de estradiol foi correlacionado com o tamanho folicular, no entanto, do dia 0 do ciclo estral até o

primeiro dia do diestro, o crescimento médio do diâmetro dos folículos, em processo de luteinização, foi correlacionado com o aumento da concentração de progesterona.

Nas cadelas são observados dois tipos de luteinização pré-ovulatória. Primeiramente há uma luteinização de menor importância, que ocorre de 2 a 3 dias antes da onda pré-ovulatória de LH, morfológica e endocrinologicamente detectável, a qual ocorre em pequenos pontos no interior da parede folicular, da metade para o final do proestro. Secundariamente há uma luteinização pré-ovulatória mais notável, que ocorre entre o surgimento da onda pré-ovulatória de LH até 3 dias após, gerando uma rápida proliferação das células luteais na periferia de folículos pré-ovulatórios. Essa situação é também acompanhada pelo aumento dos níveis de progesterona sérica de 1,0 a 3,0 ng/ml para 2,0 a 9,0 ng/ml no período correspondente à ovulação (Concannon e Verstegen, 2005).

O aumento na concentração de progesterona no momento da ovulação é um fato particular dos canídeos (Reynaud et al., 2005). O nível sérico elevado de progesterona, associado a uma fase rápida de luteinização, pode ser correlacionado ao surgimento da onda pré-ovulatória de LH, estimando-se a ocorrência da ovulação, dois dias após a onda pré-ovulatória de LH (Concannon e Verstegen, 2005).

#### *Ovulação e maturação oocitária*

A determinação da ovulação permite um melhor controle reprodutivo, porém a correlação entre as modificações físicas e as mudanças comportamentais entre o estro e o tempo de ovulação não é precisa nas cadelas (Gier, 2006).

O uso de dosagens hormonais para reconhecimento da ovulação é bastante discutido. As gonadotrofinas nas cadelas são secretadas de forma pulsátil, e esses pulsos são coincidentes. A onda pré-ovulatória do LH e a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) estão intimamente relacionadas à ocorrência da ovulação, porém a correlação entre essas gonadotrofinas é complexa, já que ocorre uma regulação diferencial da secreção de FSH e LH nas cadelas (Reynaud et al., 2005).

A progressão do anestro é associada a uma crescente secreção de FSH, concomitante à secreção de LH. Estes fatos mostram que o aumento do FSH circulante pode ser considerado um evento crítico para a ocorrência da foliculogênese ovariana e para o término do anestro (Kooistra e Okkens, 2001).

A dosagem de LH nas cadelas não é realizada rotineiramente, é dispendiosa e consome tempo, o que explica o fato de muitos pesquisadores e clínicos optarem pela mensuração das concentrações de progesterona sérica para estimar a ocorrência da ovulação. Uma concentração plasmática de progesterona de 2 ng/ml (16 nmol/L) corresponde ao dia 0 do ciclo estral ou ao surgimento da onda pré-ovulatória de LH, portanto o conhecimento das concentrações de progesterona assume um papel preponderante no manejo de coberturas naturais controladas ou nas inseminações artificiais (I.A.; Kustritz, 2001; Reynaud et al., 2005; Gier, 2006). Segundo Lévy e Fontbonne (2007), a concentração de progesterona no momento da ovulação é praticamente constante e por volta de  $6,26 \pm 1,55$  ng/mL.

A realização de exames citológicos seriados, desde o início do proestro, pode também facilitar a determinação da onda pré-ovulatória de LH e segundo Feldman e Nelson (2004), uma contagem de 80% de células superficiais determina a concentração máxima de estrógeno (dia -2 do ciclo estral). A mudança abrupta dos tipos celulares resultando em parabasais e intermediárias indica o primeiro dia do diestro, correspondente ao dia +7 do ciclo estral (dia +7 em relação à onda pré-ovulatória de LH). O exame citológico é de fácil realização, porém não determina o dia da ovulação. A combinação das concentrações de progesterona, do LH, a análise das células do epitélio vaginal e a endoscopia vaginal são essenciais para facilitar a determinação da ovulação de uma forma mais confiável (England e Concannon, 2002).

Na cadela, os oócitos liberados medem  $82,4 \pm 0,6$   $\mu$ m e apresentam-se em estado imaturo, na prófase da meiose I, ainda em estado de vesícula germinativa (VG), sendo também denominados de oócitos primários, não podendo, portanto, ser fecundados imediatamente após sua liberação (England e Concannon, 2002).

Oócitos em estágio de VG estão presentes nas tubas uterinas, 44 horas após a ovulação, ou dois dias após a onda pré-ovulatória de LH. A fase de metáfase I (MI) ocorre dentro de 44 a 48 horas da ovulação, sendo caracterizada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar. O segundo corpúsculo polar é liberado após o término da meiose II, ou seja, após a fertilização, cerca de 54 horas após a ovulação (Luvoni et al., 2006). A maturação nuclear nas cadelas está completa após 48 a 72 horas das ovulações, juntamente com elevados níveis de progesterona (Concannon et al., 1989; Reynaud et al., 2005), quando os oócitos atingem a porção média das tubas uterinas.

Reynaud et al. (2005) avaliaram o reinício da meiose em oócitos de cadela durante as primeiras horas após a ovulação. A maturação oocitária teve início em 17 a 24 horas após a ovulação. O diâmetro, incluindo zona pelúcida desses oócitos após a ovulação, variou de 86 a 135  $\mu$ m, com média de 110  $\mu$ m. O núcleo dessas células era de localização periférica, rodeado por grânulos de lipídeos e grande quantidade de mitocôndrias. No período de 24 a 48 horas após a ovulação, esses óvulos se encontravam na parte média das tubas uterinas, porém ainda apresentavam-se em estágio imaturo.

No período de 17 a 44 horas após a ovulação, o estágio de metáfase I foi evidenciado, sendo que os

primeiros oócitos em metáfase II (MII) foram observados, nas tubas uterinas, 48 a 54 horas após as ovulações (Reynaud et al., 2005).

Concannon e Verstegen (2005) descreveram a maturação oocitária completa. Nesse estudo, a ocorrência das ovulações foi observada após 60 horas do surgimento da onda pré-ovulatória de LH, ou seja, no final da fase do proestro até a metade do estro. Houve uma correlação entre a ocorrência da ovulação e as alterações de comportamento, entretanto a duração do proestro e do estro pode ser diferente entre os indivíduos, o que dificulta a aplicação deste conceito. O processo da ovulação na maioria das cadelas completa-se em 24 horas, podendo em algumas fêmeas se completar em apenas 12 horas (Fontbonne e Malandain, 2006).

## Fertilização

### *Transporte gametogênico e fertilização*

O transporte espermático apresenta propriedades inerentes ao trato reprodutivo da fêmea, sendo conhecido como transporte passivo. As contrações vaginais e as contrações miométriais, ocorridas durante o coito, são fatores que proporcionam a propulsão espermática no trato reprodutivo feminino, fazendo com que os espermatozoides sejam encontrados nas tubas uterinas, em pouco tempo após o acasalamento, cerca de 20 a 50 segundos. Vinte e quatro horas após o acasalamento, uma quantidade pequena de sêmen é ainda encontrada livre no lúmen uterino, e, nesse caso, os espermatozoides estão aderidos às criptas luminiais das glândulas endometriais (England et al., 2006).

A presença de reservas espermáticas, principalmente nas regiões das criptas e das glândulas uterinas, próximas à junção útero-tubárica, funciona como local de armazenamento de espermatozoides, possuindo uma função de nutrição e também de controle do número de espermatozoides que atingem as tubas uterinas, colaborando, desse modo, para o controle da polispermia (England et al., 2006).

England et al. (2006) definiram este transporte nas tubas uterinas como sendo um “transporte simultâneo em direções opostas”, pois movimentos peristálticos/ antiperistálticos da musculatura das tubas uterinas, contrações de sua mucosa e do mesossalpinge associados à ação ciliar são fatores participantes desse processo e acabam alterando a configuração das tubas de forma momentânea, permitindo que fluidos e espermatozoides em suspensão possam ser transportados de um compartimento para outro.

No processo de fertilização, ocorre a penetração do espermatozoide já capacitado no oócito secundário maduro presente na porção distal da tuba uterina, levando à fusão dos pró-núcleos feminino e masculino e à liberação do segundo corpúsculo polar, formando o núcleo de uma nova célula, a primeira célula do embrião (Concannon, 2000; Reynaud et al., 2005).

A fertilidade dos espermatozoides caninos apresenta um declínio cerca de 1 a 2 dias após serem depositados no trato genital da fêmea, porém o número de espermatozoides férteis permanece alto, em média por 6 a 7 dias (Tsutsui, 1989; Concannon, 2000, Reynaud et al., 2005).

Nos oócitos, o declínio da fertilidade ocorre cerca de cinco dias após a ovulação, sendo rara a fertilização após o 7º dia da ovulação (England e Concannon, 2002). Algumas cadelas, entretanto, podem ter oócitos ainda aptos a serem fecundados com até 7 a 8 dias (108 horas) após a ovulação. Foi observado, ainda, que acasalamentos após 9 a 10 dias do pico de LH podem ser férteis e resultarem em gestação (Tsutsui et al., 2006).

Concannon et al. (2001) relataram que o ápice de fertilidade nas cadelas está compreendido entre o dia 0 do surgimento da onda de LH até o 5º dia após, já que nesse período estão incluídos o pico de LH e as ovulações. De acordo com England et al. (2006), esse período termina com o fechamento da cérvix e a subsequente degeneração dos oócitos não fecundados.

Em acasalamentos precoces, ou seja, que ocorrem antes das ovulações, a capacidade de fertilização está diminuída, já que é necessário um período para a maturação oocitária (Concannon e Verstegen, 2005). No caso de acasalamentos tardios, cerca de dois ou mais dias após a maturação oocitária, também ocorre uma diminuição significativa na possibilidade de gestação, pois além da viabilidade oocitária diminuída, há o fechamento da cérvix, cerca de 1 a 2 dias após esse período (Concannon, 2000; England e Concannon, 2002).

## Desenvolvimento embrionário inicial

### *Eventos pré-implantação e migração uterina*

Os oócitos fertilizados são mantidos dentro das tubas uterinas por 9 a 10 dias e entram no útero no estágio de mórula (Tsutsui, 1989; Songsasen e Wildt, 2007). O desenvolvimento embrionário na espécie canina é considerado lento, e o período anterior à implantação é particularmente demorado (18 a 20 dias) se comparado às outras espécies domésticas (Reynaud et al., 2005).

As clivagens se iniciam por volta de 72 a 96 horas após as ovulações. Segundo Tsutsui et al. (2006), os zigotos apresentam-se bipartidos na porção média/distal da tuba uterina, após 120 horas das ovulações, com

diâmetro variando entre 110 a 170  $\mu\text{m}$ . De acordo com Reynaud et al. (2005), as clivagens prosseguem com o estágio de 8 células, de 124 a 288 horas após as ovulações ou 4,5 a 12 dias, sendo essa fase correspondente à ativação do genoma embrionário. Nesta etapa, alguns embriões ainda estão envolvidos por uma camada de células do *cumulus*. A divisão subsequente em 16 células ocorre na porção distal da tuba uterina, com diâmetro variando entre 188 a 200  $\mu\text{m}$  (incluindo ZP).

Aparentemente, a clivagem embrionária de 2 a 16 células ocorre mais rapidamente após a fertilização de oócitos jovens, se comparada a de oócitos em estágio de maturação mais avançada. Este achado pode explicar, em parte, porque a duração da gestação é similar entre acasalamentos que ocorrem antes ou poucos dias após a maturação oocitária (Concannon et al., 2001).

O período de ocorrência das fertilizações tem uma duração limitada de 5 a 7 dias após a onda pré-ovulatória de LH. Clivagens mais rápidas no período pré-implantação são necessárias para tornar os estágios de desenvolvimento embrionários similares, compensando esta variação de tempo entre as fertilizações, possibilitando que os embriões atinjam estágios similares antes de serem efetivamente implantados (Concannon et al., 2001).

As mórulas são visíveis com 192 a 216 horas após as ovulações (8,5 a 10 dias) e permanecem acumuladas no segmento distal das tubas uterinas, sendo dependentes da secreção dessa estrutura para garantir sua nutrição (Bysted et al., 2001; Reynaud et al., 2005).

Uma cavidade se desenvolve rapidamente no centro da mórula, após 10 a 12 dias das ovulações. Essa cavidade, repleta de fluido, que se acumula nos espaços intercelulares irregulares é denominada blastocele. O blastocisto é caracterizado por conter em média 32 a 64 células que se tornam expandidas ao final do 12º dia (Allen, 1995). O diâmetro do blastocisto inicial é de 215 a 350  $\mu\text{m}$ , chegando a 500 a 750  $\mu\text{m}$  na fase expandida, porém, pode chegar a 1.000  $\mu\text{m}$ , quando atinge o estágio de blastocisto tardio (Reynaud et al., 2005).

Nas células embrionárias, ocorre simultaneamente a diferenciação dos tecidos embrionários: o trofoblasto, que dará origem a placenta e a massa celular interna, a qual dará estruturação ao próprio embrião (Allen, 1995).

Entre os estágios de blastocisto inicial e expandido (10 a 12 dias), ocorre uma diminuição da espessura da zona pelúcida, provavelmente por conseqüência de ação enzimática e crescimento embrionário. Com 16 a 20 dias, o blastocisto chega a 2500  $\mu\text{m}$  e sua conformação expandida previne o *flushing* de embriões intactos do útero com 20 a 21 dias (Reynaud et al., 2005).

O blastocisto pode se apresentar sem a zona pelúcida, porém, a existência de uma ruptura da zona pelúcida ou ação de enzimas proteolíticas que degradam essa estrutura ainda é pouco conhecida nos cães (Reynaud et al., 2005).

Os embriões entram no útero, permanecem livres nos cornos e corpo do útero, por um período variável de 12 a 17 dias após as ovulações. Nesta fase, os embriões atingem um diâmetro de 2.300  $\mu\text{m}$  e ocorre a migração trans-uterina (Reynaud et al., 2005).

Na maioria das espécies a migração uterina ocorre em 40% ou mais dos animais gestantes, principalmente quando o número de ovulações entre o ovário direito e esquerdo são diferentes. A migração embrionária uterina considera a distribuição embrionária igualitária entre os cornos direito e esquerda, possibilitando um espaço, possível ao desenvolvimento embrionário normal (Tsutsui et al., 2001). Diferenças entre o número de ovulações, substâncias estimulatórias secretadas pelos embriões e a ocorrência de peristaltismo uterino são fatores que podem explicar essa ocorrência (Tsutsui et al., 2002).

Tsutsui et al. (2001) observaram migrações de 87,5% dos embriões do lado oposto à fertilização, sugerindo que a migração trans-uterina ocorre independente do número de embriões que adentram ao útero, mesmo quando o número de ovulações é diferente entre os ovários de um mesmo animal. De acordo com Reynaud et al. (2005), a migração provavelmente ocorre na tentativa de distribuir igualmente o número de embriões entre os dois cornos.

#### *Implantação e desenvolvimento embrionário inicial*

Os estudos sobre o momento da implantação nos cães são bastante discordantes entre os autores. Segundo Reynaud et al. (2005), a implantação se completa com 18 a 21 dias após as ovulações. Allen (1995) e Concannon (2000) sugerem que a implantação ocorre por volta do 22º ao 23º dia a partir da onda pré-ovulatória de LH ou cerca do 24º ao 25º dias após as ovulações.

Barrau et al. (1975) evidenciaram uma diferenciação macroscópica dos sítios de implantação, após o décimo dia do final do estro, através da observação de alterações por toda extensão do corno uterino e edema das glândulas das zonas basais e intermediárias do endométrio.

A invasão endometrial ocorre por volta do 13º dia de gestação e foi caracterizada pelo aparecimento de massas de sinciciotrofoblasto que penetravam entre as células epiteliais maternas de forma crescente em direção ao perimétrio, espalhando-se pelo lúmen e dentro das glândulas endometriais. O trofoblasto que cresceu ao redor da camada de capilares foi caracterizado por estabelecer uma estreita relação com os vasos sanguíneos maternos (Barrau et al., 1975).

No 16º dia de gestação foi verificada uma expansão considerável dos sítios de implantação e a invasão primária estendeu-se completamente por todo o útero, menos ventralmente ao embrião, porém, a penetração máxima do trofoblasto só foi observada em torno do 26º dia, caracterizando a maturação do sincício fetal (Barrau et al., 1975).

A taxa de implantação embrionária é calculada pela divisão entre número de embriões implantados e número de corpos lúteos existentes, sendo este valor bastante variável entre os autores. Shimizu et al. (1990) encontraram uma taxa de implantação em torno de 88% e Bysted et al. (2001) uma taxa de 51%.

Entre o 21º e 40º dia de gestação cada embrião adquire um formato esférico. Até o 35º dia há uma constrição entre cada vesícula embrionária, após este período há expansão dessas constrições, de forma que as membranas corio-alantoideas adjacentes entram em contato umas com as outras e ambos os cornos uterinos tornam-se uniformemente distendidos, permanecendo assim até o final da gestação (Allen, 1995).

### Considerações finais

O controle sobre alguns aspectos do ciclo estral, tais como, fisiologia da ovulação, fertilização e desenvolvimento embrionário na espécie canina é importante e necessário principalmente quando se pretende utilizar determinadas tecnologias reprodutivas, como a maturação oocitária (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões. A despeito dos resultados insatisfatórios da MIV nas cadelas, estudos recentes (Concannon e Verstegen, 2005; Reynaud et al., 2005; Songsasen e Wildt, 2007) sobre vários aspectos da reprodução em cães, estão obtendo êxito e cada vez mais existe uma conscientização de que pesquisas nesta área são fundamentais para garantir o progresso e a aplicação destes conceitos à reprodução assistida.

A manipulação e controle do ciclo reprodutivo dos cães também geram a possibilidade da erradicação de doenças genéticas importantes e progresso genético da espécie, auxiliando na preservação de espécies de canídeos não domésticos, ameaçados de extinção. O uso do cão como modelo experimental, inclusive em estudos humanos, torna a pesquisa relacionada a esta espécie extremamente desafiadora e promissora à comunidade científica.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro (processo 06/54612-3).

### Referências bibliográficas

- Allen WE. Prenhez. In: Allen WE. *Fertilidade e obstetrícia no cão*. São Paulo: Varela, 1995. p.57-58.
- Barrau MD, Abel JH, Torbit CA, Tietz WJ. Development of the implantation chamber in pregnancy bitch. *Am J Anat*, v.143, p.115-130, 1975.
- Bysted BV, Dieleman SJ, Hyttel P, Greve T. Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *J Reprod Fertil*, v.57, p.181-186, 2001.
- Concannon PW. Canine pregnancy: Predicting parturition and timing events of gestation. In: Concannon PW. *Recent advances in small animal reproduction*. Ithaca: 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org/>. Acesso em 18 set. 2007.
- Concannon PW, McCann JP, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fertil*, v.39, p.3-25, 1989.
- Concannon PW, Tsutsui T, Shille, V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J Reprod Fertil*, v.57, p.169-179, 2001.
- Concannon PW, Verstegen J. Some unique aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary practice. In: World Small Animal Veterinary Association, 30, 2005, México. *Proceedings ...* México: WSAVA, 2005. p.1-8.
- Durrant BS, Pratt NC, Russ KD, Bolamba D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, v.79, p.917-932, 1998.
- England GC, Allen WE. Real-time imaging of the ovary and uterus of the dog. *J Reprod Fertil*, v.39, p.91-100, 1989.
- England GC, Burgess CM, Freeman SL, Smith SC, Pacey AA. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. *Theriogenology*, v.6, p.1410-1418, 2006.
- England GC, Concannon PW. Determination of the optimal breeding time in the bitch; Basic consideration. In: Concannon, P.W. et al. *Recent advances in small animal reproduction*, Ithaca, 13 dez. 2002. Disponível em: <http://www.ivis.org/>. Acesso em 13. dez. 2006.
- Fayrer-Hosken RA, Dookwah HD, Brandon CI. Immunocontrol in dogs. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.365-372, 2000.
- Feldman EC, Nelson RW. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: Feldman EC, Nelson RW. *Canine and feline*

*endocrinology and reproduction*. 23.ed. Philadelphia: W.B Saunders, 2004. p.752-774.

**Fontbonne A, Malandain E.** Ovarian ultrasonography and follow-up of estrus in the bitch and queen. *In*: Fontbonne A, Malandain E. Recent advances in small animal reproduction. Ithaca, 2006. Disponível em: <http://www.ivis.org/>. Acesso em 2 nov. 2007

**Gier J.** Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch. *Theriogenology*, v.66, p.141-142, 2006.

**Hayer P, Günzel-Apel AR, Lüerssen D, Hoppen HO.** Ultrassonografic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in bitch. *J Reprod Fertil Suppl*, n.47, p.93-100, 1993.

**Kooistra HS, Okkens AC.** Role of changes in the pulsatile secretion pattern of FSH in initiation of ovarian folliculogenesis in bitches. *J Reprod Fertil Suppl*, n.57, p.11-14, 2001.

**Kustritz MV.** Use of commercial luteinizing hormone and progesterone assay. Kits in canine breeding management. *In*: Concannon, P.W. *et al.* Recent advances in small animal reproduction. Ithaca, 2001. Disponível em: <http://www.ivis.org/>. Acesso em 15 mai. 2006.

**Lévy, X; Fontbonne, A.** Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.128-134, 2007.

**Landim-Alvarenga FC, Bicudo SD.** Ultrastructural study of pré-implantation dog embryos. *Braz J Morphol Sci*, v.14, p.213-217, 1997.

**Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D.** Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.41-59, 2005.

**Luvoni GC, Chigioni S, Beccaglia M.** Embryo production in dogs: from *in vitro* fertilization to cloning. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.286-290, 2006.

**Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, Viaris de Lesegno C, Chastant-Maillard S.** *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, v.130, p.193-201, 2005.

**Shimizu T, Tsutsui T, Murao I, Orima H.** Incidence for transuterine migration of the embryos in the dog. *Jap J Vet Sci*, v.52, p.1273-1275, 1990.

**Songsasen N, Wildt DE.** Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation system in the domestic dog. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.2-22, 2007.

**Tsutsui T.** Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dog. *J Reprod Fertil Suppl*, v.39, p.269-275, 1989.

**Tsutsui T, Shimizu T, Hori T, Kawakami E.** Factor affecting transuterine migration of canine embryos. *Theriogenology*, v.12, p.1117-1121, 2002.

**Tsutsui T, Hori T, Okazaki H, Tanaka A, Shiono M, Yokosuka M, Kawakami E.** Transfer of canine embryos at various development stages recovered by hysterectomy of surgical uterine flushing. *Theriogenology*, v.4, p.401-405, 2001.

**Tsutsui T, Hori T, Endo S, Hayama A, Kawakami E.** Intrauterine transfer of early canine embryos. *Theriogenology*, v.66, p.1703-1705, 2006.

**Wildt DE, Levinson CJ, Seager SW.** Laparoscopic exposure and sequential observation of the ovary of the cycling bitch. *Anat Rec*, v.189, p.443-449, 1977.