



## **Maturação *in vitro* de oócitos caninos: aspectos fisiológicos e sua relação com a evolução da técnica**

*In vitro maturation of canine oocytes: physiological aspects and its relationship with developments in technology*

**A.P.C. Ribeiro<sup>1</sup>, E.A. Pires<sup>2</sup>, M. Apparício<sup>2</sup>, A.E. Alves<sup>2</sup>, R. Carareto<sup>1</sup>, W.R.R. Vicente<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, TO, Brasil

<sup>2</sup>FCAV, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil

<sup>3</sup>Dep. Med. Vet. Prev. Reprod. Anim., Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil

Correspondência: [apcribeiro@hotmail.com](mailto:apcribeiro@hotmail.com); [apcribeiro@uft.edu.br](mailto:apcribeiro@uft.edu.br)

### **Resumo**

A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos caninos tem sido objeto de inúmeros estudos focados no estabelecimento de um protocolo capaz de elevar os índices de maturação à metáfase II (MII), atualmente considerados baixos. Dentre as inúmeras variáveis atualmente pesquisadas, estão aspectos relacionados às doadoras (idade, raça, fase estral) e às condições de cultivo, como composição ideal do meio de maturação, adição de diversas fontes proteicas, hormônios, fatores de crescimento e agentes antioxidantes, sendo que os resultados atuais mostram-se ainda pouco eficientes em elevar consideravelmente as taxas de MII. Tal fato pode justificar-se nas diversas características peculiares da biologia reprodutiva desta espécie. Desta maneira, a presente revisão tem como escopo apresentar os aspectos gerais destas características, bem como uma compilação dos aspectos atualmente estudados para a maturação oocitária canina.

**Palavras-chave:** biotecnologia, cadela, ovário, reprodução.

### **Abstract**

*The canine oocyte in vitro maturation (IVM) has been the subject of several studies focused on the establishment of a protocol able to increase the maturation rates to metaphase II (MII), currently considered low. Among the many variables currently researched are aspects related to the donors (age, breed, estrous stage) and to the culture conditions, as the ideal composition of the maturation medium, the addition of several protein resources, hormones, growth factors and anti oxidation factors, being that the current results still present little efficiency in increasing considerably the MII rates. Such fact may be justified in the many peculiar characteristics of the reproductive biology of this specie. Therefore, the current review is aiming to present the general aspects of these characteristics, as well as a compilation of the aspects currently studied for canine oocyte maturation.*

*Keywords:* biotechnology, bitch, ovary, reproduction.

### **Introdução**

Durante muito tempo, as pesquisas na área de biotecnologia da reprodução estavam restritas a estudos com animais de produção. Somente a partir da década de 90, com o interesse da comunidade científica pela preservação da biodiversidade animal, a espécie canina passou a ser estudada sob este aspecto. A cadela constitui um modelo experimental para canídeos ameaçados de extinção, dentre eles o cachorro-do-mato vinagre (*Speothos venaticus*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), espécies da fauna brasileira. O processo de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos de fêmeas caninas tem sido objeto de exaustivos estudos, pois seu domínio constitui fator primordial para a implementação da fecundação *in vitro* (FIV) e do cultivo *in vitro* (CIV) e, em última análise, para a obtenção de embriões das espécies de canídeos ameaçados de extinção (Pires, 2006). Porém, há um entrave relacionado aos baixos índices atuais de maturação nuclear *in vitro* dos oócitos nesta espécie: a peculiaridade de sua fisiologia reprodutiva. É relevante, ainda, destacar que as pesquisas em biotecnologia reprodutiva canina compõem atualmente uma área de estudos notoriamente ativa, com a divulgação de dados complexos contradizentes ou complementares. Destarte, o presente artigo objetiva apresentar uma revisão sobre a fisiologia reprodutiva, bem como os principais aspectos envolvidos nos estudos de maturação oocitária canina.



### Considerações gerais sobre a fisiologia reprodutiva da fêmea canina

Atualmente, a grande maioria dos estudos com MIV de oócitos caninos não reportam taxas de maturação à metáfase II (MII) superiores a 15-20% após 48-72 horas de cultivo (Willingham-Rocky et al., 2003; Hossein et al., 2007; Otoi et al., 2007). Dentre os diversos aspectos relacionados à fisiologia que podem aqui ser referenciados como obstáculos ao incremento desses índices, estão: a particular ciclicidade reprodutiva canina, o longo período de ovulação, a ovulação de oócitos não maduros e sob influência de crescentes concentrações de progesterona e a maturação oocitária intratubárica. O ciclo estral das cadelas compreende um período de ausência de atividade reprodutiva, considerando os aspectos clínicos, comportamentais e endocrinológicos. Este período é denominado anestro, e a ele sucedem-se o proestro, o estro e o diestro, considerados, de uma maneira geral, como períodos de atividade reprodutiva. Esta forma de apresentação cíclica e o período de interesse de cinco a 12 meses fazem com que a fêmea canina seja referenciada na literatura como uma espécie monoéstrica não estacional, com ovulação ocorrendo, portanto, apenas uma ou duas vezes ao ano. Entretanto, a interrupção do anestro e as alterações endócrinas relacionadas são eventos ainda não totalmente esclarecidos (Concannon et al., 1989; Kooistra, 1999). Sugere-se que o desenvolvimento considerável dos folículos nesta espécie inicia-se aproximadamente 30 dias antes da ocorrência da ovulação, com ondas foliculares anteriores ao proestro (England e Hewitt, 1999). Ao final do proestro, a queda da concentração de estradiol ocorre concomitantemente à elevação da concentração plasmática de progesterona, refletindo a maturação folicular, vários dias antes da ovulação (Feldmann e Nelson, 1997). O aumento de progesterona origina-se a partir de folículos pré-ovulatórios e células intersticiais ovarianas. A dominância da progesterona no ambiente folicular pré-ovulatório é característica peculiar e diferencia grandemente os canídeos de outros mamíferos domésticos (Leavitt et al., 1971; Farstad, 2000). Ainda, o oócito dos canídeos é único em suas características de desenvolvimento, quando comparado às diferentes espécies animais atualmente estudadas. Sob aspectos gerais, os oócitos imaturos são células diploides que iniciam o processo de mitose quando migram do saco vitelínico embrionário para o local de desenvolvimento gonadal, onde são denominados oogônias (Wassarman e Albertini, 1994). Em caninos, a formação da oogônia pode ser reconhecida em fetos com 42 dias (pós-coito). Durante a fase final da gestação, os lóbulos e cordões corticais ovarianos são compostos exclusivamente por oogônias e células precursoras das células da granulosa. Ao nascimento (63 dias após a ovulação), é comum a presença de oogônias em mitose e oogônias em degeneração. A foliculogênese inicia-se entre duas e 12 semanas depois do nascimento, e folículos primordiais podem ser vistos por volta de três semanas após o nascimento. Quando a fêmea canina atinge três a quatro meses de idade, seus oócitos duplicam de tamanho e a zona pelúcida (ZP) é formada em oócitos com mais de 60 µm de diâmetro. Então, quando o antro é constituído, o oócito tem quase o tamanho de um oócito adulto, aproximadamente 100 µm de diâmetro e, nesse estágio, é rodeado por três a cinco camadas de células da granulosa (Andersen e Simpson, 1973). Segundo Dulcibella (1998), na maioria dos mamíferos, o processo de desenvolvimento oocitário sofre dois momentos de estagnação, em prófase I e metáfase II. A primeira estagnação é interrompida com o crescimento folicular e a maturação oocitária, quando há transição do estágio vesícula germinativa (VG) ao estágio de MII; e a segunda estagnação é quebrada com a fecundação (Dew, 2001). Porém, como citado por Luvoni et al. (2005), oócitos caninos são ovulados imaturos, em estágio de VG, enquanto em outras espécies, os oócitos são ovulados em MII. Outra peculiaridade dos canídeos é o fato de a tuba uterina abrigar por longo período os oócitos imaturos e ser o sítio de evolução à MII bem como da fecundação e do desenvolvimento a blastocisto. Segundo Otoi et al. (2000), os oócitos caninos necessitam de dois a cinco dias para completarem a maturação meiótica na tuba uterina. Adicionalmente, são ainda distintos dos demais pela grande quantidade de material lipídico em seu interior, o que lhes confere um aspecto escuro e homogêneo. A síntese lipídica é incrementada nos oócitos em crescimento e caracteriza um dos aspectos da maturação oocitária (Tesoriero, 1982). Desta maneira, aspectos relacionados à fisiologia endócrina da fase pré-ovulatória, às características bioquímicas intrínsecas do oócito e aos eventos de ovulação e maturação intratubárica, tornam a MIV canina um processo desafiador e atual objeto de inúmeros estudos.

### Aspectos da maturação *in vitro* (MIV) de oócitos caninos

Previsivelmente, em consequência das particularidades inerentes à fisiologia, muitas etapas permanecem não padronizadas dentro do processo de maturação, dentre a obtenção/seleção dos oócitos, a idade e o estágio do ciclo estral das doadoras. Além disso, os meios de cultivo *in vitro* desenvolvidos para maturar oócitos de outras espécies são considerados inadequados para a MIV de oócitos caninos.

#### *Obtenção e seleção dos oócitos caninos para maturação in vitro*

Segundo Otoi et al. (2000), a localização cortical dos folículos no tecido ovariano da cadela dificulta a punção isolada destes, pois eles se tornam aparentes somente antes da ovulação. Assim, Nickson et al. (1993) citaram que a técnica de fatiamento ovariano, realizada com lâminas de bisturi em cortes seriados de 1 mm de espessura, permite a liberação de um número maior de oócitos comparativamente à técnica de punção. Os

oócitos caninos podem também ser obtidos por digestão ovariana, como citado por Durrant et al. (1998) e Bolamba et al. (2002), ao trabalharem com folículos ovarianos pré-antrais e antrais. Sob o aspecto morfológico, as alterações que ocorrem no oócito canino durante os diferentes estágios do ciclo estral podem afetar a habilidade do oócito em se comunicar com as células do *cumulus* e alterar a competência meiótica. Luvoni et al. (2001) citaram que existem junções do tipo “gap” entre as células do *cumulus* e o oócito, envolvidas na diferenciação meiótica e maturação oocitária. O número de camadas de células do *cumulus* constitui, portanto, um dos critérios para a adequada seleção dos oócitos e deve ser associado à avaliação do aspecto citoplasmático, que deve ser escuro e homogêneo, caracterizando a grande quantidade de lipídeo em seu interior. De acordo com Hewitt e England (1997), é possível classificar os complexos oócito-*cumulus* (COCs) em três graus de qualidade: Grau I – pigmentação escura com uma ou mais camadas de células do *cumulus*; Grau II – pigmentação clara com camadas incompletas de células do *cumulus*; Grau III – pigmentação pálida, sem formato definido e sem células do *cumulus* aderidas, sendo tais complexos considerados degenerados (Fig. 1). Os autores afirmam, ainda, que apenas COCs grau I devem ser selecionados para a MIV. Outro fator a ser considerado no momento da seleção dos oócitos é o seu diâmetro. Segundo Wassarman e Albertini (1994), o oócito e as células do *cumulus* crescem coordenadamente, progredindo por uma série de estágios morfológicos definidos. De fato, se o crescimento folicular relaciona-se ao crescimento oocitário, é de se esperar que, em períodos de maior atividade ovariana, seja encontrado maior número de oócitos de maior diâmetro. Neste contexto, Yamada et al. (1992) submetteram fêmeas caninas a protocolo de indução de estro e obtiveram taxa de MII de 32%. Otoi et al. (2000), ao classificarem os oócitos em três grupos de diferentes diâmetros (>100 µm; 100 µm; <100 µm), observaram que apenas oócitos com mais de 100µm de diâmetro avançaram para o estágio de MII em altas taxas (20%), comparativamente a oócitos pequenos (4-10%). Em síntese, considera-se um oócito de boa qualidade (Grau I) a estrutura que contiver os seguintes padrões morfológicos: citoplasma escuro e homogêneo, diâmetro superior a 100 µm e totalmente rodeado por uma ou mais camadas de células do *cumulus*. Oócitos com citoplasma pálido, pigmentado, com camadas incompletas ou ausência de células do *cumulus*, com diâmetro inferior a 100µm (Graus II e III), devem ser descartados (Luvoni et al., 2005).

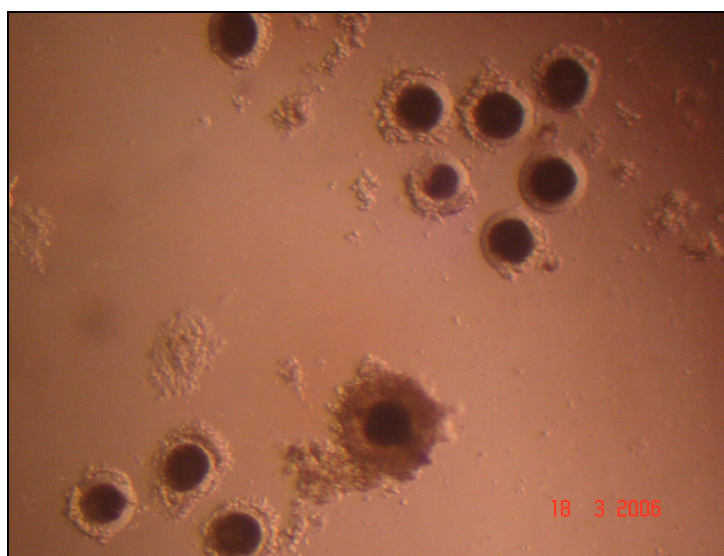


Fig. 1 - Complexos oócito *cumulus* (COCs) caninos, de diferentes graus de qualidade. Seta A: COC grau 1 (selecionado para maturação *in vitro*), seta B e C: COCs graus 2 e 3 respectivamente (não selecionados para maturação *in vitro*). Fonte: Ribeiro (200

#### *Animais doadores: idade, aspectos clínicos e estágio reprodutivo*

A idade da cadela doadora de oócitos influencia diretamente no número de oócitos recuperados, sendo que a taxa média de recuperação diminui cerca de 4,7 COCs por ano (Strom Holst et al., 2001; Rodrigues e Rodrigues, 2003). Segundo Durrant et al. (1998) e Hewitt e England (1998), a habilidade de maturação oocitária *in vitro* também é comprometida em fêmeas com idade superior a sete anos, quando comparadas a animais mais jovens. Em estudo sobre a qualidade morfológica de oócitos, Lopes et al. (2007) concluíram que as fêmeas com idade entre um e três anos são doadoras mais aptas. Com relação ao estado clínico das doadoras, a hipótese que a higidez das fêmeas influencia as taxas de maturação oocitária vem sendo descartada, especialmente após Rodrigues e Rodrigues (2003) demonstrarem a possibilidade de oócitos provenientes de cadelas com piometra alcançarem a maturação completa *in vitro*. Quando considerado o estágio reprodutivo da fêmea doadora e sua



influência sobre as taxas de MIV, encontram-se resultados muito controversos, de forma que esta questão continua a ser alvo de pesquisas. Atualmente, tenta-se relacionar o efeito dos eventos endócrinos pré-ovulatórios *in vivo* com a taxa de maturação *in vitro* (Yamada et al., 1993; Hewitt e England, 1997; Luvoni, 2001; Otoi et al., 2001; Rodrigues e Rodrigues, 2003; Willingham-Rocky et al., 2003; Songsasen et al., 2004). Durante o crescimento e desenvolvimento folicular, o oócito torna-se progressivamente competente e capaz de evoluir à MII (Durrant et al., 1998; Scriban, 1999). Desta maneira, deve-se considerar a influência positiva da permanência do oócito em ambiente folicular sobre as taxas de MIV. Ainda sobre este aspecto, a aquisição de competência meiótica e citoplasmática é controlada por comunicações intercelulares do tipo *gap*, entre as células do *cumulus* e o oócito, pelas quais ocorre a passagem de nutrientes, ions e pequenas moléculas, como o  $Ca^{2+}$  e AMPc (Grazul-Bilska, 1997). Estas comunicações não estão permeáveis durante o período de anestro, em comparação a 89% de junções abertas em oócitos provenientes de ovários em fase de proestro (Luvoni et al., 2001). Nickson et al. (1993) e Yamada et al. (1993) citaram que o número de oócitos obtidos e a taxa de maturação *in vitro* são influenciados pela fase do ciclo estral da doadora no momento da colheita. Tal achado foi corroborado por Martins (2005), que concluiu que a maturação oocitária é beneficiada pela interação da fase do ciclo estral com o meio de maturação e observou que os oócitos submetidos à maturação intrafolicular prévia apresentam taxa de MIV mais alta. Yamada et al. (1993) observaram que cadelas estimuladas com gonadotrofinas apresentam melhores taxas de maturação em comparação às fêmeas não estimuladas. Songsasen e Wildt (2005) alcançaram taxas de 80% de maturação *in vitro*, com oócitos advindos de folículos medindo mais de 2mm de diâmetro. A despeito dessas informações, outros estudos demonstraram que os eventos hormonais pré-ovulatórios não afetam a subsequente MIV de oócitos de alta qualidade, sendo a morfologia do oócito o indicador mais confiável da sua competência meiótica (Cinone et al., 1992; Hewitt e England, 1997; Rodrigues e Rodrigues, 2003; Evecen et al., 2010). Cabe salientar que a grande maioria dos estudos utiliza oócitos advindos de ovários submetidos ao fatiamento (*slicing*), procedimento que inevitavelmente promove a obtenção de uma população heterogênea de oócitos, com distintos graus de desenvolvimento e habilidade para a maturação meiótica. Isto pode explicar parcialmente os resultados díspares obtidos em diferentes laboratórios, além das baixas taxas de MIV na espécie.

#### *Considerações sobre meios e outras condições de cultivo*

O desenvolvimento de um meio de cultivo definido e ideal, no qual os oócitos caninos possam alcançar a MII antes da fecundação, logicamente aumentará as chances de obtenção de um embrião multicelular (Abd el Razek et al., 2001). Com esse propósito, estudos avaliando diferentes meios de maturação *in vitro*, bem como o enriquecimento desses meios com diferentes substâncias, vêm sendo desenvolvidos.

#### *Meio base*

De forma geral, as pesquisas conduzidas com a espécie canina utilizam meios de cultivo semelhantes aos empregados para as outras espécies. A composição de um meio de maturação deve obedecer aos seguintes requisitos: conter produtos que se assemelhem aos das células tubáricas; ser suplementado com fonte proteica; conter hormônios, como gonadotrofinas, e ocasionalmente fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (EGF); conter substâncias antibacterianas e/ou antifúngicas, como penicilina, gentamicina, estreptomomicina ou anfotericina B (Guérin, 1998). Atualmente os meios mais utilizados são o fluido sintético de oviduto (SOF; Hewitt e England, 1997, 1998; Bolamba et al., 2002; Vannucchi, 2003; Martins, 2005) e o meio de cultura de tecidos (TCM-199; Nickson et al., 1993; Hewitt e England, 1999; Fujii et al., 2000; Otoi et al., 2001; Rodrigues e Rodrigues, 2003; Songsassen et al., 2004), acrescidos de proteínas, hormônios, antioxidantes e fatores de crescimento. Saikhun et al. (2008) compararam meios distintos (TCM 199; SOF; Ham-F1).

#### *Hormônios*

Em relação à suplementação hormonal dos meios de cultivo, deve-se considerar que, em cadelas, a concentração sérica do hormônio folículo estimulante (FSH) é aproximadamente 100 ng/mL durante o proestro com elevação durante a onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH). Durante o proestro, a concentração circulante de LH é baixa, e os pulsos não são detectáveis, devido ao *feedback* negativo causado pelo estradiol. A concentração sérica de LH aumenta de aproximadamente 8 para 50 ng/mL (em média 20 ng/mL), um a dois dias prévios à onda pré-ovulatória. A concentração de estradiol é variável, mas, durante o final do proestro e início do estro, sua concentração sanguínea alcança entre 50-110 pg/mL. Concomitantemente, há aumento da concentração de progesterona sérica, de 0,8 ng/mL, no início de proestro, para concentração superior a 1ng/mL durante a onda pré-ovulatória de LH (Concannon, 1991). Assim, comparativamente às outras espécies domésticas, a cadela é a única que apresenta marcada luteinização pré-ovulatória das células foliculares da granulosa, expondo o oócito a alta concentração de progesterona, aproximadamente 7700 ng/mL no fluido folicular durante o período pré-ovulatório (Willingham-Rocky et al., 2003). A suplementação hormonal nos



meios de cultivo deve basear-se no fato de que os oócitos caninos em fase de vesícula germinativa estão fisiologicamente sujeitos a concentrações decrescentes de estrógeno e crescentes de progesterona no folículo pré-ovulatório (Nickson et al., 1993; Hewitt e England, 1997). De fato, a influência hormonal intrafolicular pode ser o fator principal responsável pelo aumento das proporções de maturação à MII (31,9%) de oócitos caninos colhidos de cadelas superovuladas comparativamente ao grupo-controle (cadelas em anestro), que apresentou 12,1% de oócitos em MII (Yamada et al., 1993) e ainda taxas de 80% de maturação nuclear à MII, em oócitos advindos de folículos com mais de 2 mm de diâmetro, comparativamente aos grupos compostos por oócitos advindos de folículos com diâmetro menor que 0,5 mm; entre 0,5 e 1 mm; entre 1-2 mm, que apresentaram, respectivamente, as seguintes porcentagens de oócitos em MII, 16,9%, 7,6% e 38,4% (Songsasen e Wildt, 2005). Segundo Knobil e Neill (1994), oócitos murinos submetidos a meios de cultivos acrescidos de FSH retornaram à meiose pela regulação da concentração de AMPc no COC. Além disso, o FSH é considerado responsável pela expansão das células do *cumulus*, o que geralmente tem uma correlação positiva com a aquisição de competência meiótica (Sutovsky et al., 1993). Alguns estudos sobre a influência da suplementação hormonal na MIV de oócitos caninos utilizaram meios suplementados com estrógeno e progesterona em doses fixas (1 µg/mL) e concluíram não haver efeito positivo (Hewitt e England, 1997). Da mesma forma, Willingham-Rocky et al. (2003) compararam diferentes concentrações de progesterona (0, 20, 200, 2000 ng/mL) e não observaram aumento nas taxas de oócitos em MII. Kim et al. (2005) evidenciaram que a associação de hormônios esteroides (estrógeno e progesterona) na concentração de 2 µg/mL apresenta melhor efeito sobre a maturação de oócitos caninos (16,6% de MII) quando comparada com a mesma concentração isoladamente (com estrógeno, 14,7% de MII; e com progesterona, 10,8% de MII). Por outro lado, Ribeiro (2007), ao utilizar suplementação com progesterona na concentração de 10 µg/mL, não encontrou efeito positivo sobre as taxas de retomada e progressão da meiose. Bolamba et al. (1998) utilizaram meios suplementados com FSH, gonadotrofina coriônica humana (hCG) e estradiol, com resposta insatisfatória na porcentagem de oócitos em MII. Os achados atuais sugerem que a definição das concentrações de gonadotrofinas e esteroides nos fluidos folicular e tubárico é imprescindível para a adequada suplementação hormonal aos meios de cultivo (Luvoni et al., 2005). Com relação à suplementação dos meios com fontes proteicas, o soro fetal bovino (SFB), o soro de fêmea canina ou bovina em estro e a albumina sérica bovina (BSA) são os mais frequentemente utilizados, por aumentarem as taxas de sobrevivência e a maturação oocitária (Younis et al., 1989; Funahashi e Day, 1993). A utilização do meio TCM 199 suplementado com 0,3% de BSA e 20% de SFB aumentou as taxas de maturação até MII (Hewitt et al., 1998). Hatoya et al. (2009) obtiveram maiores taxas de MII (8,7%) quando associaram 10% de SFB ao meio com EGF e estrógeno, comparativamente ao grupo sem adição de SFB, que apresentou 3,3% de oócitos em MII. Rodrigues e Rodrigues (2003), ao compararem a suplementação com soro de cadela em estro ao soro de vaca em estro, concluíram que o primeiro apresentou maior eficiência na promoção da maturação oocitária canina. Otoi et al. (1999) avaliaram a influência de várias concentrações (5, 10 e 20%) de soro de cadela em anestro, estro e diestro na MIV canina e observaram que uma proporção mais elevada de oócitos submetidos à suplementação com soro de cadela em estro reassumiu a meiose até estágios de MI e MII. Segundo os referidos autores, o emprego deste soro na concentração de 10% mimetiza os eventos pré-ovulatórios *in vivo*. De fato, é bem conhecido que o soro sanguíneo contém componentes proteicos, hormônios (gonadotrofinas e esteroides) e fatores de crescimento importantes para a MIV, porém, em consequência desta constituição mista, torna-se difícil atribuir o efeito positivo sobre a maturação oocitária a um componente específico (Luvoni et al., 2005).

#### *Substâncias antioxidantes*

Uma das principais preocupações durante o processo de maturação e fecundação *in vitro* são os danos causados pelos radicais livres, produzidos normalmente no metabolismo oxidativo (Dew, 2001). Entretanto, a maioria das células apresenta um potente sistema de defesa contra radicais livres, representado pela glutatona (GSH), a qual possui como principal função a detoxicação e antioxidação celular (Gasparrini et al., 2006; Lubberda, 2005). Assim, propõe-se o uso de substâncias que atuem como precursores de glutatona, tais como a cisteína, a cisteamina e o β-mercaptoetanol, utilizadas com êxito na MIV de oócitos bovinos (De Matos et al., 1996) e atualmente descritas como coadjuvantes importantes para o aumento da eficiência na produção de embriões bovinos (De Matos et al., 2002; Balasubramanian e Rho, 2007). A adição ao meio de cultivo de substratos energéticos para a promoção da sobrevivência celular e suporte da maturação é estratégia alternativa. Neste sentido, a combinação de insulina transferrina, selênio (ITS) e β-mercaptoetanol pode ser utilizada. A insulina melhora o desenvolvimento embrionário por meio do transporte da glicose, além de exercer ações mitogênicas e antiapoptóticas (importantes na MIV). O selênio atua como estimulador da síntese de GSH, e a transferrina como quelante dos radicais hidroxila, facilitando o transporte de ferro e outros metais para o interior do embrião e agindo como fator de crescimento (Lim e Hansel, 2000; Augustin et al., 2003). Embora Pires (2006) não tenha encontrado efeito positivo da adição de cisteamina (100 mM) e cisteína (0,1 mM) sobre as taxas de MII de oócitos caninos, Hossein et al. (2007) relataram elevação das taxas de MII ao utilizarem adição de 0,5 mM de cisteína e 100 mM de cisteamina ao meio de cultivo.



### Fatores de crescimento

A suplementação de outras substâncias, tais como os hormônios do crescimento (somatotropina bovina - BST e humana - hST) e os fatores de crescimento, foi alternativamente estudada para a MIV canina. Segundo Songsasen et al. (2002), a adição de BST ao meio de maturação promoveu a expansão das células do *cumulus*, mas não a maturação à MII. Ainda, Rodrigues et al. (2006) não verificaram efeito positivo da adição de hST ao meio de cultivo para a MIV. Dentre os principais fatores de crescimento estudados, estão o EGF e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). Bolamba et al. (2006) concluíram que o EGF isoladamente não apresentou efeito benéfico sobre a maturação dos oócitos, porém, quando em associação ao LH e FSH, proporcionou aumento na expansão das células do *cumulus*. Machado (2007), ao estudar o efeito do IGF-I na maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas, não observou efeito sobre a MIV. Desta forma, também o efeito estimulador *in vitro* dos fatores de crescimento e sua interação com gonadotrofinas e esteroides devem ser objeto de estudos adicionais.

### Tempo de incubação

Quanto aos períodos de incubação para a maturação *in vitro*, deve-se levar em consideração que, após a ovulação, os oócitos sofrem a primeira divisão meiótica na tuba uterina em um período não inferior a 48 horas (Yamada et al., 1992; Vannucchi, 2003). Assim, diversas pesquisas estabeleceram 72 horas como o período de maturação oocitária *in vitro* para cães (Otoi et al., 2000; Rodrigues e Rodrigues, 2003), embora Luvoni et al. (2001) tenham observado aumento na taxa de oócitos degenerados quando estenderam o período de incubação de 30 para 48 horas.

### Considerações finais

Com base nas informações compiladas e apresentadas na presente revisão, pode-se observar que a maturação oocitária canina *in vitro* é um procedimento complexo, ainda não padronizado, e que sofre influência de muitas variáveis ainda desconhecidas, especialmente quanto à fisiologia reprodutiva da cadela. Dentro deste contexto, pode-se afirmar que a maturação *in vitro* nesta espécie beneficiar-se-á concretamente quando a fisiologia dos eventos moleculares e bioquímicos da foliculogênese e da ovulação for melhor elucidada.

### Referências bibliográficas

- Abd el Razek IM, Charpigny G, Kodja S, Marquant-Leguienne B, Merillod P, Guyader-Joly C, Humblodt P.** Differences in lipid composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, v.55, p.346, 2001. Abstract.
- Andersen AC, Simpson ME.** The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). Los Altos: Geron-X, 1973.
- Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Ficher B.** Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction*, v.126, p.91-99, 2003.
- Balasubramanian S, Rho G.** Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.282-192, 2007.
- Bolamba D, Borden-Russ KD, Durrant BS.** *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicle in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology*, v.58, p.1689-1703, 2002.
- Bolamba D, Borden-Russ KD, Durrant BS.** *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultures in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, v.49, p.933-942, 1998.
- Bolamba D, Borden-Russ KD, Harper SA.** Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, v.65, p.1037-1047, 2006.
- Cinone M, Ghneim A, Caira M, Dell'aquila ME, Minoia P.** Collection and maturation of oocytes in the bitch. In: International Congress Animal Reproduction, 12, 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague: ICAR, 1992. v.4, p.1767-1769.
- Concannon PW.** Reproduction in the dog and cat. In: Cupps PT. *Reproduction in domestic animals*. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1991. p.517-554.
- Concannon PW, Mc Cann JP, Temple M.** Biology and Endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fertil Suppl*, n.39, p.3-25, 1989.
- De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M.** Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev*, v.45, p.451-457, 1996.
- De Matos DG, Herrera C, Cortvrindt R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini RS.** Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. *Mol Reprod Dev*, v. 2, p.203-209, 2002.
- Dew EV.** *In vitro* maturation of the canine oocyte. 2001. 56f. Thesis (Master of Sciences) – University of Georgia, Atlanta, GA, 2001.



- Dulcibella, T.** Biochemical and cellular insight into the temporal window of normal fertilization. *Theriogenology*, v.49, p.53-65, 1998.
- Durrant BS, Pratt NC, Russ KD, Bolamba D.** Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, v.49, p.917-932, 1998.
- England GCW, Hewitt DA.** Follicular growth and ovulation in dogs. In: EVSSAR Annual Symposium, 1999, Lyon. *Proceedings...* Lyon: EVSSAR, 1999. p.51. Abstract.
- Evecen M, Cirit U, Demir K, Ozdas OB, Taz M, Birler S, Pabuccuoglu S.** Effect of estrous cycle and transport temperature of ovaries on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.117, p.160-165, 2010.
- Farstad W.** Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci*, v.60, n.1, p.375-387, 2000.
- Feldman EC, Nelson RW.** The ovarian cycle & vaginal cytology in the bitch. In: Di Bryden (Ed). *Internal medicine*. Sydney: The Post-Graduate Foundation in Veterinary Science of the University of Sydney, 1997. p.273-288.
- Fujii M, Otoi T, Murakami M, Tanaka M, Une S, Suzuki T.** The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *J Vet Med Sci*, v.62, p.305-307, 2000.
- Funahashi H, Day BN.** Effects of the duration of exposure to hormone supplementa on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil*, v.8, p.179-185, 1993.
- Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, Zicarelli L.** Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*, v.65, p.275-287, 2006.
- Grazul-Bilska AT.** Effects of second messengers on gap junctional intercellular communication of ovine luteal cells throughout the estrous cycle. *Biol Reprod*, v.57, p.947-957, 1997.
- Guérin C.** Fécondation *in vitro* chez la chienne. Ou en est-on? *Prat Méd Chir Anim Comp*, v.33, p.151-161, 1998.
- Hatoya S, Sugiyama Y, Nishida H, Okuno T, Torii R, Sugiura K, Kida K, Kawate N, Tamada H, Inaba T.** Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. *Theriogenology*, v.71, p.560-567, 2009.
- Hewitt DA, England GCW.** Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. *Vet Rec*, v.144, p.237-239, 1999.
- Hewitt DA, England GCW.** The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology*, v.49, p.957-966, 1998.
- Hewitt DA, England GCW.** The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. *J Reprod Fertil Suppl*, n.51, p.83-91, 1997.
- Hewitt DA, Watson, PF, England GCW.** Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, v.49, p.1083-1128, 1998.
- Hossein MS, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Joo O, Kim JJ, Kang SK, Lee BC, Hwang WS.** Effect of thiol compounds on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from different reproductive stages. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.1213-1220, 2007.
- Kim MK, Fibiranto YH, Goo Jang HJO, Kim JJ, Lee EKS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS.** Effects of estradiol-17  $\beta$  and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.1342-1353, 2005.
- Knobil E, Neill JD.** *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1994.
- Kooistra HS.** Concurrents pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of estrous cycle and anestrus in beagle bitches. *Biol Reprod*, v. 60, p.65-71, 1999.
- Leavit WW, Bosley CG, Blaha GC.** Source of ovarion preovulatory progesterone. *Nat New Biol*, v.234, p.283-284, 1971.
- Lim JM, Hansel W.** Exogenous substances affecting development of *in vitro*- derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. *Theriogenology*, v.53, p.1081-1091, 2000.
- Lopes G, Sousa M, Luvoni GC, Rocha, A.** Recovery rate, morphological quality and nuclear maturity of canine cumulus-oocyte complexes collected from anestrous or diestrous bitches of different ages. *Theriogenology*, v.68, p.821-825, 2007.
- Luberda Z.** The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*, v.5, p.5-17, 2005.
- 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, Luciano AM, Modina S, Gandolf F.** Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. *J Reprod Fertil Suppl*, n.57, p.141-146, 2001.
- Machado MA.** Efeito do fator de crescimento IGF-I sobre a maturação *in vitro* de oócitos caninos (*canis familiares*): avaliação da maturação nuclear e citoplasmática. 2007. 78f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2007.



- Martins LR.** *Maturação nuclear de ovócitos de cadelas em estro e anestro submetidos à maturação in vitro.* 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2005.
- Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ, Renton JP.** Molecular biology methods of monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitch. *J Reprod Fertil Suppl*, n.47, p.231-240, 1993.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T.** Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*, v.54, p.535-542, 2000.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T.** Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod Fertil Dev*, v.11, p.387-390, 1999.
- Otoi T, Ooka A, Murakami M, Karja NWK, Suzuki T.** Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrus cycle. *J Fertil Dev*, v.13, p.151-155, 2001.
- Otoi T, Shin T, Kraemer DC, Westhusin ME.** Role of cumulus cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.184-189, 2007.
- Pires EA.** *Efeito da suplementação de cisteína e cisteamina sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (Canis familiaris) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia durante a fase pré-ovulatória do estro.* 2006. 66p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2006.
- Ribeiro, APC.** *Influência do estágio reprodutivo e suplementação do meio de cultivo com progesterona e/ou soro de cadela em estro, nas taxas de maturação in vitro de oócitos de fêmeas caninas.* 2007. 144p. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2007.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL.** Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dog. *Theriogenology*, v.60, p.59-66, 2003.
- Rodrigues BA, Santos LC, Rodrigues JL.** The effect of hialuronan concentrations in hST-supplemented TCM 199 on in vitro nuclear maturation of bitch cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology*, v.66, p.1673-1676, 2006.
- Saikhun J, Sriussadaporn S, Thongtip N, Pinyopummin A, Kitiyanant Y.** Nuclear maturation and development of IVM/IVF canine embryos in synthetic oviductal fluid or in co-culture with buffalo rat liver cells. *Theriogenology*, v.69, p.1104-1110, 2008.
- Scriban R.** Les biotechnologies de la reproduction animal. In: Biotechnologie. 5.ed. Paris: TEC et DOC, 1999. cap. 6.
- Songsassen N, Spindler R, Wildt DE.** Follicular size, but not stage of reproduction or season, influences meiotic maturation of domestic dog oocytes. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.282-283, 2004.
- Songsassen N, Wildt DE.** Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.72, p.113-119, 2005.
- Songsassen N, Yu I, Leibo SP.** Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol Reprod Dev*, v. 62, p.407-415, 2002.
- Strom Holst B, Larsson B, Rodrigues-Martinez H, Lagerstedt AS, Linde-Forsberg C.** Prediction of the oocytes recovery rate in the bitch. *J Vet Med*, v.48, p.587-592, 2001.
- Sutovsky P, Flechon JE, Motlik J, Peynot N, Chesne P.** Dynamic changes of gap-junctions and cytoskeleton during *in vitro* culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol Reprod*, v. 49, p.1277-1287, 1993.
- Tesoriero JV.** A morphologic, cytochemical and chromatographic analysis of lipid yolk formation in the in the oocytes of dogs. *Gamete Res*, v.6, p.267, 1982.
- Vannucchi CI.** *Estudo da maturação in vitro de oócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina.* 2003. 77p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.
- Vannucchi CI, Oliveira CM, Marques MG, Assumpção MEOA, Visintin JA.** In vitro canine oocyte nuclear maturation in homologous oviductal cell co-culture with hormone supplemented media. *Theriogenology*, v.66, p.1677-1681, 2006.
- Wassarman PM, Albertini DF.** The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). *The physiology of reproduction*. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. p.79-122.
- Willingham-Rocky LA, Hinrichs K, Westhusin ME, Kraemer DC.** Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. *Reproduction*, v.126, p.501-508, 2003.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y.** *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J Reprod Fertil Suppl*, 47, p.227-229, 1993.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y.** Maturation, fertilization and development of dog oocyte in vitro. *Biol Reprod*, v.46, p.853-858, 1992.
- Younis AI, Brackett BG, Fayerer-Hosken RA.** Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res*, v.23, p.189-201, 1989.