

Influência da temperatura de transporte de ovários na maturação *in vitro* de oócitos caninos coletados em diferentes estágios do ciclo estral

Effect of transport temperature of ovaries on *in vitro* maturation of canine oocytes collected in different stages of the estrous cycle

Leda Maria Costa PEREIRA¹; Paulo Ricardo de Oliveira BERSANO^{2,3}; Maria Denise LOPES¹

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Botucatu – SP, Brasil

² Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza – CE, Brasil

³ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Centro Estudos em Venenos de Animais Peçonhentos, Botucatu – SP, Brasil

Resumo

Foi avaliada a influência do ciclo estral e temperatura de transporte de ovários na maturação *in vitro* de oócitos caninos. As cadelas foram categorizadas em dois grupos baseados no estágio do ciclo estral – anestro ou diestro. Um ovário por par coletado foi transportado em solução fisiológica 0,9% à 4°C enquanto o outro foi transportado a 37°C. Então, os ovários foram seccionados em PBS para a liberação dos complexos *cumulus* oócito (COCs). Um total de 345 COCs (n = 186 oócitos obtidos de cadelas em anestro e 159 em diestro) foi cultivado em TCM 199 suplementado com HEPES, piruvato de sódio, cisteína, hormônio folículo estimulante (FSH), gonadotrofina coriônica humana (hCG), estrógeno (E₂) e fator de crescimento epidermal (EGF). Após 72h de maturação, os COCs foram desnudados, fixados e corados para avaliação da maturação nuclear. O teste de Fisher foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 0,05. Os oócitos obtidos de cadelas em diestro transportados a 4°C apresentaram maior frequência de oócitos no estágio de metáfase II (21,1%) que os mantidos na temperatura de 37°C (p < 0,01). De forma similar, houve maior frequência de oócitos nos estágios de metáfase II (11,2%) nos ovários obtidos de cadelas em anestro e transportados a 4°C que nos ovários mantidos a 37°C (p < 0,05). Concluiu-se que a temperatura de transporte influencia os resultados de viabilidade oocitária canina e a maturação *in vitro*, independentemente do estágio reprodutivo da fêmea.

Palavras-chave: Maturação *in vitro*. Temperatura. Anestro. Diestro. Cadela.

Abstract

This study evaluated the influence of estrous cycle stage and transport temperature of ovaries on *in vitro* maturation of canine oocytes. The bitches were categorized into two groups based on stage of estrus cycle: diestrus or anestrus. One ovary of each pair collected was transported in saline solution at 4°C while the other was transported at 37°C. Thus, ovarian tissue was sliced in PBS to release *cumulus* oocyte complexes (COCs). A total of 345 COCs (n = 186 oocytes from ovaries of bitches in anestrus and 159 in diestrus) were cultivated in TCM 199 supplemented with HEPES, sodium pyruvate, cysteine, follicle stimulating hormone (FSH), human chorionic gonadotropin (hCG), estrogen (E₂) and epidermal growth factor (EGF). After 72h of maturation, the COCs were denuded, fixed and stained to assess nuclear maturation. The Fisher test was applied to examine the differences between the groups. The significance level adopted was 0.05. The oocytes obtained from the ovaries from bitches in diestrus transported at 4°C shown increased frequency of oocytes in metaphase II stage than those maintained at 37°C (p < 0.01). Similarly, there was increased frequency of oocytes in metaphase II (11.1%) stage from the ovaries of bitches in anestrus and transported at 4°C, than those maintained at 37°C (p < 0.05). It was concluded that transport temperature influences the results of canine oocyte viability and *in vitro* maturation, regardless of reproductive stage of the female.

Keywords: *In vitro* maturation. Temperature. Anestrus. Diestrus. Bitch.

Correspondência para

Leda Maria Costa Pereira
Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP-Botucatu),
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.
Distrito de Rubião Júnior, s/n – Caixa Postal 560

CEP 18618-970, Botucatu, SP, Brasil
e-mail: ledamcp@hotmail.com

Recebido: 29/09/2014

Aprovado: 13/04/2015

Introdução

A experiência com biotecnologias reprodutivas, especialmente a maturação *in vitro* (MIV) em cadelas, tem apresentado poucos resultados satisfatórios. O conhecimento envolvendo a MIV de oócitos caninos tem-se apoiado em experimentos realizados em outros mamíferos, e em vista disto os índices e a eficiência da maturação nesta espécie não são promissores. Em cadelas, a taxa de MIV tem demonstrado sucesso limitado, variando de 0 a 58% para oócitos maturados até a anáfase I e metáfase II (M-II) (NICKSON et al., 1993; HEWITT; ENGLAND, 1997). Esses índices baixos podem ser decorrentes da qualidade dos oócitos utilizados ou até mesmo da ausência de padrões para a suplementação dos meios de cultura com hormônios, proteínas ou vitaminas (FARSTAD, 2000).

A associação do estágio do ciclo estral com a competência oocitária ainda está sob investigação e os resultados atualmente disponíveis são controversos. Hewitt e England (1997) constataram ausência de diferença na taxa de maturação oocitária entre oócitos coletados de cadelas no período de anestro e diestro. No entanto, relataram que a obtenção de oócitos no final do proestro e início de estro é mais adequada, pois as concentrações de progesterona e estrógeno durante este período podem favorecer a maturação. Willingham-Rocky et al. (2003) afirmaram que o estágio do ciclo estral do doador é o fator-chave no critério de seleção para oócitos caninos meioticamente competentes. Nickson et al. (1993) verificaram que o número de oócitos coletados e a taxa de maturação *in vitro* são influenciados pela fase do ciclo estral. Pereira, Bersano e Lopes (2013) observaram que a configuração da cromatina em vesícula germinativa no momento de obtenção do oócito pode influenciar os índices de maturação e que este remodelamento da cromatina é influenciado pela fase do ciclo estral da doadora.

Apesar dos poucos estudos já realizados, tem sido aventada a hipótese de que a temperatura de transporte dos ovários também possa exercer influência

nos resultados finais da MIV, pois pode atuar preservando ou acelerando a degeneração oocitária. Ward et al. (2000) ressaltaram que o meio utilizado, a duração do transporte e a temperatura entre a coleta e a chegada dos oócitos ao laboratório, são fatores que podem afetar o desenvolvimento embrionário. Nesse cenário, as condições de temperatura, pressão osmótica, pH e da atmosfera devem ser controladas e são de suma importância no processo de MIV, desde a obtenção dos oócitos até o momento final do cultivo. Dessa maneira, serão oferecidas condições para que o oócito se desenvolva adequadamente e complete a sua maturação nuclear.

Quando os ovários são retirados do organismo vivo eles devem ser mantidos em condições apropriadas. Dessa maneira, diversos meios de preservação e transporte têm sido utilizados, tais como: solução salina a 35°C (OTOI et al., 2000), solução salina suplementada com gentamicina a 37°C (NICKSON et al., 1993), solução salina a 38°C (HAY et al., 1997), PBS (*phosphate buffer solution*) com penicilina e estreptomomicina e 39°C (HEWITT; ENGLAND, 1997), solução salina 0,9% suplementada com penicilina G sódica, sulfato estreptomomicina e anfotericina B (DURRANT et al., 1998) e refrigerada a 4°C (EVECEN et al., 2010).

Schwartz et al. (1998) verificaram que a temperatura de armazenamento pode exercer mais influência no desenvolvimento embrionário que o meio utilizado. Na espécie canina, é comum a recuperação de poucos oócitos com qualidade morfológica adequada para serem maturados. Muitos oócitos são de diâmetro muito inferior ao preconizado na MIV ou apresentam poucas camadas de células do *cumulus*. Desse modo, torna-se essencial que sejam desenvolvidas pesquisas para estudar alternativas destinadas a preservar ao máximo a viabilidade do oócito durante o transporte até o laboratório, já que a qualidade oocitária é um fator preponderante para a aquisição da competência meiótica.

O presente trabalho avaliou a influência do ciclo estral e temperatura de transporte (4°C e 37°C) de ovários na maturação nuclear de oócitos caninos.

Material e Métodos

Foram utilizadas 20 cadelas, das quais 11 em anestro e nove em diestro, sem raça definida (SRD), com pesos situados entre 3 kg e 28 kg e idades variando de seis meses a sete anos, submetidas à ovariário-histerectomia (OHE) eletiva na Unidade de Vigilância Ambiental (UVA) de São Manuel, São Paulo. O estudo teve o aceite da Câmara de Ética da FMVZ – UNESP *campus* de Botucatu com protocolo número 176/2011.

Um ovário por par foi transportado em solução fisiológica 0,9% a 4°C e o outro a 37°C. No Laboratório de Reprodução Animal de Pequenos Animais e Silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu, os ovários foram processados no prazo máximo de oito horas após a coleta. A identificação da fase do ciclo estral foi baseada na classificação proposta por Otoi et al. (2002) da fase de anestro (ovários com ausência de folículos ou corpo lúteo) e diestro (ovários com a presença de um ou mais corpos lúteos). Os ovários foram fatiados em solução aquecida 37°C de *phosphate buffer solution* (PBS) adicionada de 10% de soro fetal bovino (SFB). Os COCs foram identificados e quantificados sob lupa estereomicroscópica (Leica® MZ 12.5) e avaliados com relação à homogeneidade, coloração do citoplasma e número de camadas de células do *cumulus*, de acordo com os critérios morfológicos de Hewitt e England (1997). Desse modo, foram selecionados apenas os COCs grau 1, ou seja, aqueles com ooplasma homogêneo, escuro e rodeado completamente por uma ou mais camadas de células do *cumulus*. Após o processo de seleção, os complexos *cumulus*-oócito (COCs) foram lavados em meio *tissue culture medium* 199 (TCM-199) tamponado com 25 mM de HEPES, acrescido de solução de penicilina, 0,2 mM de piruvato de sódio e 5 mM de bicarbonato de sódio.

Os COCs selecionados, segundo a fase do ciclo estral, foram divididos conforme a temperatura de transporte (4°C e 37°C). Posteriormente, os COCs foram cultivados em meio TCM 199 suplementado com 25 mM de HEPES, 1,5 mM de piruvato de sódio, 0,6

mM de cisteína, 0,03 UI/mL de hCG, 0,5 µg/mL de FSH, 20 µg/mL de E2 e 10 ng/ml de fator de crescimento epidermal (EGF). As placas foram acondicionadas em estufa a 38°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, por um período de 72 horas.

Após o cultivo, os COCs foram colocados em placas de cultivo contendo 200 µl de solução de hialuronidase 0,2%, durante cinco minutos e aspirados repetidamente com a pipeta de 50 µl para a retirada completa das células do *cumulus*. Quando totalmente desnudos, os oócitos foram lavados em PBS/PVA para a inativação da enzima e transferidos para uma solução de PBS suplementado com paraformaldeído a 3,7% durante 20 minutos, para serem fixados. Posteriormente, foram lavados novamente no PBS e corados com 10 µg/mL de glicérol bisbenzimidaz (Hoechst 33342). Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula e avaliados em microscopia de luz e fluorescência Leica® DFC 310 FX. A classificação do estágio de maturação nuclear foi baseada na morfologia do DNA conforme Hewitt e England (1997).

O teste de Fisher (PROC FREQ, SAS 2009) foi empregado para a análise da associação entre as temperaturas de transporte (4°C e 37°C) de ovários nas fases de anestro e diestro e a maturação nuclear. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Os oócitos foram classificados de acordo com a morfologia do DNA em cinco estágios: vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (M-I) metáfase II (M-II) e degenerados ou não passíveis de identificação. Foram isolados 345 oócitos (186 oócitos obtidos de ovários em anestro e 159 oócitos em diestro), que foram classificados como grau I e utilizados para avaliação da maturação nuclear. Os oócitos selecionados foram divididos em dois grupos conforme a temperatura de transporte dos ovários (4°C ou 37°C).

A avaliação da maturação nuclear dos oócitos obtidos dos ovários em fase de anestro, transportados

a 37°C, revelou que catorze (11,1%) se apresentaram em VG, trinta e três (26%) em QVG, dezessete (13,4%) em MI, seis (4,7%) em MII e trinta e nove (50%) eram degenerados ou não passíveis de identificação. Enquanto nos oócitos obtidos dos ovários em diestro, transportados na mesma temperatura, oito (9%) estavam em VG, vinte e três (25,9%) em QVG, quinze (16,9%) em MI, um (1,1%) em MII e trinta e dois (47,2%) eram degenerados ou não passíveis de identificação. Os oócitos obtidos de ovários na fase de diestro apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao estágio de MII quando comparados aos oócitos obtidos de ovários na fase de anestro (Tabela 1), demonstrando melhor desenvolvimento meiótico, quando transportados na temperatura de 37°C.

Na avaliação da maturação nuclear dos oócitos obtidos de ovários na fase de anestro transportados a 4°C, seis (6,1%) apresentaram-se em VG, três (3%) em QVG, vinte (20,2%) em MI, onze (11,2%) em

MII e trinta e sete (44,6%) eram degenerados ou não passíveis de identificação. Enquanto nos oócitos obtidos dos ovários em diestro transportados na mesma temperatura, foram observados sete (7,8%) em VG, dezoito (20%) em QVG, dezessete (18,9%) em MI, dezenove (23%) em MII e dezenove (32,2%) degenerados ou não passíveis de identificação. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes fases reprodutivas com relação aos estágios de QVG e MII (Tabela 2). De forma similar, ao transporte na temperatura de 37°C, os oócitos obtidos de ovários na fase de diestro apresentaram maior índice de retomada da meiose e progressão da maturação nuclear.

Comparando-se o efeito de diferentes temperaturas (4°C ou 37°C) na maturação de oócitos obtidos de ovários em diestro, foi constatado que a temperatura de transporte a 4°C possibilitou maior porcentagem ($p < 0,05$) de oócitos no estágio de MII (21,1%) que a temperatura de 37°C (1,1%) (Tabela 3). O transpor-

Tabela 1 – Influência do estágio reprodutivo (anestro e diestro) na maturação de oócitos caninos obtidos de ovários transportados a 37°C – Botucatu – 2014

Grupo	Oócitos avaliados (n/%)				
	VG	QVG	M-I	M-II	DEG
Anestro	14 (11,1) ^a	33 (26,0) ^a	17 (13,4) ^a	06 (4,7) ^a	39 (50) ^a
Diestro	08 (9,0) ^a	23 (25,9) ^a	15 (16,9) ^a	01 (1,1) ^b	32 (47,2) ^a

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

Tabela 2 – Influência do estágio reprodutivo (anestro e diestro) na maturação de oócitos caninos obtidos de ovários transportados a 4°C – Botucatu – 2014

Grupo	Oócitos avaliados (n/%)				
	VG	QVG	M-I	M-II	DEG
Anestro	06 (6,1) ^a	3 (3,1) ^a	20 (20,2) ^a	11 (11,2) ^a	37 (44,6) ^a
Diestro	07 (7,8) ^a	18 (20,0) ^b	17 (18,9) ^a	19 (23,0) ^b	19 (32,2) ^b

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

Tabela 3 – Efeito de diferentes temperaturas (4°C e 37°C) na maturação in vitro de oócitos caninos obtidos das fases de diestro – Botucatu – 2014

Grupo	Oócitos avaliados (n/%)				
	VG	QVG	M-I	M-II	DEG
4°C	07 (7,8) ^a	18 (20,0) ^a	17 (18,9) ^a	19 (21,1) ^a	19 (32,2) ^a
37°C	08 (9,0) ^a	23 (25,9) ^a	15 (16,9) ^a	01 (1,1) ^b	32 (47,2) ^b

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

te de ovários em anestro a 4°C também possibilitou maior frequência de oócitos nos estágios de QVG e MII ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Discussão

O desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas na espécie canina é essencial para o avanço de programas visando à conservação de animais ameaçados de extinção. Entretanto, muitas etapas da MIV de oócitos caninos ainda não foram padronizadas e o pouco conhecimento acerca dos fatores que influenciam a competência oocitária resulta nos baixos índices de retomada da meiose nessa espécie. Diversos fatores podem afetar o desenvolvimento oocitário, tais como: a técnica de obtenção dos oócitos, o meio de cultivo utilizado, o diâmetro e a morfologia do oócito, a fase do ciclo estral da doadora, ou até mesmo a temperatura de transporte do local de coleta até o laboratório. Com o objetivo de promover o aumento dos índices de maturação na espécie canina, diversas suplementações no meio de cultivo vêm sendo adotadas, entretanto, independentemente das condições de cultivo, a porcentagem de oócitos que permanecem no estágio de vesícula germinativa (VG) é alta (PEREIRA; BERSANO; LOPES, 2013). Esses dados sugerem que a qualidade do oócito pode ser afetada antes mesmo da MIV, resultando em comprometimento da sua habilidade para se desenvolver e atingir os estágios finais da maturação nuclear.

A disponibilidade limitada de ovários de cadelas para a realização de estudos acerca de biotecnologias nessa espécie requer, muitas vezes, o seu transporte de longas distâncias. Esse tempo requerido para o trans-

porte aliado às condições variadas de temperatura acaba gerando efeitos deletérios para o oócito, fato que tem sido comprovado pelas altas taxas de degeneração rotineiramente presenciadas na MIV de oócitos caninos.

Bolamba et al. (2002) verificaram que o transporte e armazenamento dos ovários caninos, seja por duas a quatro horas, ou 24 horas, à uma temperatura de 4°C, possui efeito positivo, e não são afetados os índices de maturação nuclear. Evecen et al. (2010) constataram que o transporte de ovários à temperatura de 4°C foi mais positivo para a progressão da meiose, com taxas mais altas de M-I e M-II quando comparado ao transporte efetuado a temperatura de 37°C. No presente trabalho, foi observado que a temperatura de transporte a 4°C apresentou efeitos positivos na maturação nuclear quando comparada à de 37°C, independentemente da condição reprodutiva da fêmea. Esse fato foi comprovado pela diferença significativa ($p < 0,05$) nas taxas de M-II dos oócitos obtidos de ovários nas fases de anestro e diestro.

Lee, Yin e Kong (2006) observaram ausência de diferença significativa na viabilidade dos oócitos transportados, durante duas a quatro horas, sob as temperaturas de 4°C e 38°C, antes da MIV. Entretanto, na avaliação dos oócitos após 48h de maturação foi encontrada diferença significativa entre as temperaturas de 4°C (13,2%) e 38°C (77,8%). Admitiram que, baixas temperaturas apresentavam efeitos nocivos aos lipídeos da membrana plasmática de oócitos caninos. Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho são contraditórios aos achados de Lee, Yin e Kong (2006), pois após 72 horas de cultivo foi constatada

Tabela 4 – Efeito de diferentes temperaturas (4°C e 37°C) na maturação in vitro de oócitos caninos obtidos das fases de anestro – Botucatu – 2014

Grupo	Oócitos avaliados (n/%)				
	VG	QVG	M-I	M-II	DEG
4°C	06 (6,1) ^a	3 (3,1) ^a	20(20,2) ^a	11 (11,2) ^a	37 (44,6) ^a
37°C	14 (11,1) ^a	33(26) ^b	17(13,4) ^a	06 (4,7) ^b	39 (50,0) ^a

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

diferença significativa ($p < 0,05$) entre as temperaturas, e o transporte a 4°C foi mais benéfico à maturação nuclear dos oócitos. De fato, no presente trabalho, as melhores taxas de M-II foram obtidas nos oócitos coletados de ovários em diestro (21,1%) e anestro (11,2%) transportados a 4°C enquanto a 37°C os valores observados foram, respectivamente, 1,1% e 4,7%. O transporte de ovários à 4°C possibilitou a preservação dos oócitos, especialmente dos obtidos da fase de diestro, devido aos altos índices de M-II encontrados nesta fase do ciclo estral.

Lucci et al. (2004) observaram que os ovários de vacas zebuínas puderam ser armazenados com sucesso na temperatura de 4°C por até 18 horas, sem ocasionar danos morfológicos aos folículos pré-antrais. Entretanto, na temperatura de 20°C, esses ovários só puderam ser estocados por seis horas. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que baixas temperaturas de transporte possibilitaram a melhor preservação da viabilidade e qualidade dos oócitos, ampliando a sua habilidade para completar os estágios finais da maturação nuclear. Esses achados são comprovados pelas altas taxas de MI-MII dos oócitos obtidos da fase de diestro transportados a 4°C (40%) quando comparadas às observadas nos oócitos transportados a 37°C (18%). Os oócitos obtidos da fase de anestro transportados a 4°C também apresentaram melhores índices de MI-MII (31,3%) quando comparados aos oócitos transportados a 37°C (18,1%). Com base nessas contradições encontradas na literatura, pode-se inferir que a temperatura de transporte é preponderante para garantir a viabilidade dos oócitos até a sua manipulação, especialmente quando os ovários são transportados a grandes distâncias ou por longos períodos de tempo. Entretanto, outros fatores são essenciais nesse processo, tais como o meio que será utilizado no transporte e no cultivo desses oócitos, assim como a qualidade dos oócitos que serão selecionados para a MIV.

McEvoy et al. (2000) afirmaram que em suínos a sensibilidade ao resfriamento deve-se à grande quan-

tidade de lipídeo presente nos oócitos desta espécie. Os oócitos provenientes de cadelas são caracterizados morfológicamente pela grande quantidade de lipídeo em seu interior, o que lhes confere um aspecto escuro e está associado à sua qualidade e maturidade. No presente trabalho, foi constatado que a temperatura de transporte e estocagem dos oócitos a 4°C foi a que proporcionou melhores condições de desenvolvimento na MIV de oócitos caninos. Desse modo, na espécie canina, a presença de alto conteúdo lipídico parece não influenciar a viabilidade desse oócitos.

Variados fatores podem exercer danos ao oócito, especialmente o tempo de transporte dos ovários e o meio utilizado para a sua estocagem. Após o resfriamento, há a necessidade de o oócito ser transferido para um meio aquecido que seja rico em nutrientes, necessário para o restabelecimento adequado da sua atividade metabólica e para que se torne apto a desenvolver-se de forma eficaz durante a MIV. Aman e Parks (1994) verificaram que o retorno dos oócitos resfriados à temperatura fisiológica normal, após o resfriamento, proporcionou uma nova organização e polimerização das estruturas do fuso celular. Dessa maneira, o emprego de um meio bem definido é essencial para que a reestruturação ocorra de forma eficiente, minimizando possíveis danos causados à estrutura das células. No presente trabalho, foi proporcionado esse meio adequado com a adição do soro fetal bovino no PBS aquecido a 37°C. O soro fetal bovino é um suplemento proteico amplamente utilizado no cultivo *in vitro* e é composto por diversas substâncias, como proteínas, carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento e hormônios (PICTON et al., 2008). Desse modo, a suplementação com o soro no momento de liberação dos COCs dos ovários propiciou ambiente apropriado, garantindo a viabilidade e o desenvolvimento oocitário.

Em diversas espécies de animais, como bovinos, suínos e caprinos, diversas técnicas de transporte de ovários têm sido utilizadas, com os mais variados meios. Lucci et al. (2007) constataram que para a preservação

de folículos pré-antrais de suínos, a temperatura de 4°C foi a que se mostrou mais satisfatória, permitindo boa preservação por 18 ou 24 horas, enquanto na temperatura de 20°C os limites de tempo observados foram de quatro a seis horas, não afetando a habilidade para posterior desenvolvimento *in vitro*. Dessa maneira, a temperatura de 4°C, como demonstrado no presente trabalho, é a escolha mais favorável para o transporte mais demorado. Como a obtenção de oócitos de cadelas competentes para a maturação *in vitro* é escassa, geralmente busca-se a coleta de ovários de campanhas de castração realizadas em municípios, muitas vezes distantes. Desse modo, a escolha de um meio apropriado e de uma temperatura ideal, que proporcione ambiente adequado para o armazenamento desses ovários por um longo espaço de tempo, é de grande importância para a garantia do sucesso da MIV. Santos et al. (2004) ressaltaram que o objetivo da preservação dos oócitos é o de garantir que as células permaneçam com uma baixa taxa metabólica durante o período de estocagem, permitindo o seu resgate para continuar o desenvolvimento *in vitro*.

Wongsrikeao et al. (2005) ressaltaram que durante o transporte de ovários para o laboratório, a falta de aporte vascular impede o suprimento de oxigênio e de energia para os ovários. Essa privação acarreta uma alteração do metabolismo aeróbio para anaeróbio, sendo o ácido láctico o produto principal acumulado dentro da célula, resultando, assim, em uma redução do pH. A isquemia pode resultar em alterações na permeabilidade da membrana celular e estas modificações podem ocasionar o aumento de água intracelular e do volume celular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (BARROS; HERMOSILLA; CASTRO, 2001). Assim, visando à diminuição desses efeitos, a hipotermia causada por baixas temperaturas (4°C e 20°C) ocasiona uma redução no metabolismo celular, minimizando as necessidades

metabólicas e aumentando a resistência de folículos à redução de nutrientes e oxigênio durante a preservação *in vitro* (SILVA et al., 2003). Deve ser ressaltado que o transporte de ovários com a presença da bursa, como realizado no presente trabalho, é um fator que pode promover a proteção dos oócitos conservando-se a sua temperatura resfriada.

Celestino et al. (2007) verificaram que o metabolismo fisiológico (39°C) associado à baixa tensão de oxigênio *in vitro* provoca a degeneração folicular. Essas afirmações podem explicar os valores encontrados no presente trabalho das altas taxas de degeneração oocitária observadas em oócitos obtidos nas fases de anestro e diestro do ciclo estral. De fato, foram encontradas altas taxas de degeneração na fase de diestro (47,2%), nos ovários transportados a 37°C quando comparados com os oócitos transportados a 4°C (32,2%) ($p < 0,05$). Nos oócitos obtidos da fase de anestro também foram comprovados altos índices de degeneração oocitária, entretanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as diferentes temperaturas de transporte. Dessa maneira, pode-se observar que a temperatura de transporte é um fator que pode ocasionar sérios danos aos oócitos comprometendo, a sua habilidade para completar a maturação nuclear, e que a temperatura de 4°C é a mais indicada para proporcionar o desenvolvimento oocitário.

Conclusão

Concluiu-se que a temperatura de transporte influencia os resultados de viabilidade oocitária canina e a maturação *in vitro*, independentemente do estágio reprodutivo da fêmea.

Agradecimentos

Agradecimento à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (FAPESP 2013/21667-3).

Referências

- AMAN, R. R.; PARKS, J. E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 50, nA. 1, p. 103-110, 1994. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/50/1/103.full.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod50.1.103>.
- BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, n. 3, p. 401-409, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109564330100438X>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00438-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00438-X).
- BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K. D.; OLSON, M. A.; SANDLER, J. L.; DURRANT, B. S. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**, v. 58, n. 9, p. 1689-1703, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02010804>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01080-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01080-4).
- CELESTINO, J. J. H.; SANTOS, R. R.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Conservação de folículos pré-antrais bovinos em solução salina 0,9% ou TCM 199. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 591-599, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_artext&pid=S0102-09352007000300007>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000300007>.
- DURRANT, B. S.; PRATT, N. C.; RUSS, K. D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 917-932, 1998. Disponível em: <<http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X%2898%2900041-7/abstract>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00041-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00041-7).
- EVEGEN, M.; CIRIT, Ü.; DEMIR, K.; ÖZDAS, Ö. B.; TAŞ, M.; BIRLER, S.; PABUCCUOĞLU, S. Effects of estrous cycle stage and transport temperature of ovaries on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1-2, p. 160-165, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432009000645>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.03.004>.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 375-387, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843200001068>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00106-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00106-8).
- HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 91-108, 1997.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of the domestic bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 83-91, 1997.
- LEE, H. S.; YIN, X. J.; KONG, I. K. Sensitivity of canine oocytes to low temperature. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1468-1470, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X06000185>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.051>.
- LUCCI, C. M.; KACINSKIS, M. A.; LOPES, L. H. R.; RUMPF, R.; BÃO, S. N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (Bos indicus) ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 61, n. 6, p. 1101-1114, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X03002966>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.06.004>.
- LUCCI, C. M.; SCHREIER, L. L.; MACHADO, G. M.; AMORIM, C. A.; BÃO, S. N.; DOBRINSKY, J. R. Effects of storing pig ovaries at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 1, p. 76-82, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2006.00734.x/abstract;jsessionid=8B969A7311AA14D1FB4F575F5F484106.f01t04>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00734.x>.
- MCEVOY, T. G.; COULL, G. D.; BROADBENT, P. J.; HUTCHINSON, J. S. M.; SPEAKE, B. K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 163-170, 2000. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/118/1/163.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1180163>.
- NICKSON, D. A.; BOYD, J. S.; ECKERSALL, P. D.; FERGUSON, J. M.; HARVEY, M. J.; RENTON, J. P. Molecular biology methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, n. 12, 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, n. 4, p. 535-542, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X0000368X>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00368-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00368-X).
- OTOI, T.; WILLINGHAM, L.; SHIN, T.; KRAEMER, D. C.; WESTHUSIN, M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. **Reproduction**, v. 124, n. 6, p. 775-781, 2002. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/124/6/775.full.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1240775>.
- PEREIRA, L. M. C.; BERSANO, P. R. O.; LOPES, M. D. Influência das fases de anestro e diestro sobre a configuração da cromatina em vesícula germinativa de oócitos caninos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 6, 2013. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/55590>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v50i6p474-481>.
- PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 703-715, 2008. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/136/6/703>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/REP-08-0290>.
- SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Preservação de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes. **Ciência Animal**, v. 14, n. 1, p. 7-19, 2004.
- SCHWARTZ, J.; SCHNEIDER, M. R.; RODRIGUES, J. L.; REICHENBACH, H. D. Effect of short-term storage of bovine oocytes in different media and temperatures on the subsequent *in vitro* embryo development. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 217, 1998. Disponível em: <<http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X%2898%2900570-2/abstract>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)90570-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(98)90570-2).
- SILVA, J. R. V.; BRASIL, A. F.; SANTOS, R. R.; COSTA, S. H. F.; RODRIGUES, A. P. R.; FERREIRA, M. A. L.; MACHADO, V. P.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 913-919, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_artext&pid=S0103-84782003000500019>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782003000500019>.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. (SAS). **SAS/STAT user's guide**. Version 9.2. Cary: SAS Institute Inc., 2009.

WARD, F. A.; LONERGAN, P.; ENRIGHT, B. P.; BOLAND, M. P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 433-446, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00003605>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00360-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00360-5).

WILLINGHAM-ROCKY, L. A.; HINRICHS, K.; WESTHUSIN, M. E.; KRAEMER, D. C. Effects of stage of oestrus cycle and

progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v. 126, n. 4, p. 501-508, 2003. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/126/4/501.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1260501>.

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; KARJA, N. W. K.; AGUNG, B.; NII, M.; NAGAI, T. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 87-97, 2005. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/51/1/51_1_87/_article>. Acesso em: 17 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.51.87>.