

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

MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS DE CÃES DOMÉSTICOS (*CANIS
FAMILIARIS*) EM MEIO ADICIONADO DE POLIVINIL-PIRROLIDONA

LUCILA CARBONEIRO DOS SANTOS

PORTO ALEGRE

2005

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

MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS DE CÃES DOMÉSTICOS (*CANIS
FAMILIARIS*) EM MEIO ADICIONADO DE POLIVINIL-PIRROLIDONA

Lucila Carboneiro dos Santos

Médica Veterinária

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

PORTO ALEGRE

2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Rodrigues pelo apoio, confiança, incentivo, ensinamentos e pela oportunidade de realizar este projeto.

A Profa. Dra. Berenice de Ávila Rodrigues pelos ensinamentos e ajuda durante a realização dos experimentos.

A colega e amiga Fabiana Forell pelo companheirismo e apoio profissional e pessoal nos momentos de dificuldade.

Aos colegas de pós Graduação, bolsistas e estagiários do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução Arnaldo Diniz Vieira, Luiz Felipe Steigleder, Rafael Rodrigues, Claudia Briani Antonioli, Alexandre Vaz, Mateus da Costa Lange, Cristiano Feltrin, Natália Arruda, Leandro Franke Gonçalves, Eduardo Allix, Felipe Ongarato, Tathiany Cavallieri, Luis Fernando Sesti.

Aos funcionários João Roberto Lopes Moraes e Leda Gomes Mendes pela amizade e apoio técnico.

Aos professores, residentes e funcionários do Hospital de Clínicas Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a toda a equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Prefeitura Municipal de Porto Alegre e aos colegas da Clínica Veterinária do Vale pela atenção dispensada na coleta dos ovários utilizados no experimento.

Aos amigos Eliana Franco Lopes, Alexandre Tavares Duarte de Oliveira, Ubirajara da Costa, Julia Forell da Costa, Kátia Bamberg, Sérgio Pereira Correa da Silva pelo apoio e companheirismo.

Aos meus familiares, especialmente a minha mãe Leanete, meu padrasto Ênio, minha irmã Raquel e meu pai Alexandre pelo incentivo, amizade e carinho.

Ao meu marido Paulo Godoy Jr. pelo amor, incentivo e paciência, que tanto me ajudaram durante o período do mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE TABELAS.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3 ARTIGO	
<i>IN VITRO</i> NUCLEAR MATURATION OF BITCH OOCYTES IN PRESENCE OF POLYVINYL-PYRROLIDONE.....	19
ABSTRACT.....	19
INTRODUCTION.....	20
MATERIALS AND METHODS.....	22
Ovaries and oocyte retrieval.....	22
<i>In vitro</i> maturation.....	22
Assessment of meiotic stage.....	23
Statistical analysis.....	24
RESULTS.....	24
DISCUSSION.....	25
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	29
REFERÊNCIAS.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	microgramas
µL	microlitros
AI	anáfase
BSA	albumina sérica bovina
CCOs	complexo <i>Cumulus-oophorus</i>
CMRL 1066	Connaught Medical Research Labs Medium 1066
COCs	<i>Cumulus</i> -oocyte complexes
DME/F-12	Dulbecco's Modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 Ham's medium
ECS	estrus cow serum (soro de vaca em estro)
FCS	fetal cow serum (soro fetal bovino)
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
GV	germinal vesicle (vesícula germinativa)
GVBD	germinal vesicle breakdown (quebra da vesicular germinativa)
hCG	gonadotrofina coriônica humana
hST	somatotrofina humana
IVC	<i>in vitro</i> culture (cultivo <i>in vitro</i>)
IVF	<i>in vitro</i> fertilization (fertilização <i>in vitro</i>)
IVM	<i>in vitro</i> maturation (maturação <i>in vitro</i>)
IVP	<i>in vitro</i> production (produção <i>in vitro</i>)
LH	hormônio luteinizante
mg	miligramas
MIV	maturação <i>in vitro</i>
MI	metáfase I
MII	metáfase II
mL	mililitros
mM	milimolar
MPF	maturation promoting factor (fator promotor da maturação)
PBS	phosphated buffered saline (solução salina fosfatada)

PIV	produção <i>in vitro</i>
PVP	polivinil-pirrolidona
SCE	soro de cadela em estro
SFB	soro fetal bovino
SOF	synthetic oviduct fluid (fluido sintético de oviduto)
TCM 199	tissue culture medium 199 (meio de cultivo tecidual 199)
VG	vesícula germinativa

LISTA DE TABELAS

TABLE 1. General description of donor oocyte's population..... 24

TABLE 2. Evaluation of the nuclear status in oocytes after culture period in the
different groups..... 25

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório realizado pelo Ministério do Meio Ambiente em 2004, dez espécies de mamíferos da ordem Carnívora, nativos do território brasileiro encontram-se ameaçados de extinção. Entre os canídeos, a lista apresentada por este órgão governamental inclui duas espécies: o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*). Mundialmente, até o presente momento, nove espécies selvagens da família Canidae são consideradas em risco de extinção (LUVONI, 2000).

Frente a essa realidade, o desenvolvimento de técnicas de conservação de gametas e produção *in vitro* (PIV) de embriões de canídeos, utilizando o cão doméstico (*Canis familiaris*) como modelo experimental, poderia vir a ser uma ferramenta útil para a manutenção dessas espécies ameaçadas de extinção, contribuindo assim para a conservação da biodiversidade da fauna brasileira e mundial.

A clonagem interespecie constitui uma alternativa que poderá se tornar viável na tentativa da manutenção de espécies em risco de extinção. Gómez *et al.* (2004) relataram o nascimento de 17 filhotes clones de gato selvagem africano (*Felis silvestris lybica*) obtidos através da reconstituição de ovócitos de uma gata doméstica (*Felis catus*), que serviram de citoplasma receptor das células somáticas da espécie selvagem.

Uma etapa crucial para a realização da técnica de transferência nuclear, é a maturação dos ovócitos que servirão de citoplasma receptor. Na espécie felina, trabalhos com maturação *in vitro* obtiveram em torno de 40% a 60% de taxa de maturação nuclear (JOHNSTON *et al.*, 1989; GOODROWE *et al.*, 1991), fato que permite a obtenção de um número considerável de ovócitos para a reconstrução e posterior transferência. Na espécie canina, esta técnica ainda não é viável, devido aos baixos índices de maturação nuclear *in vitro* (FARSTAD, 2000), sendo necessária a sincronização das fêmeas e a coleta dos ovócitos maturados *in vivo* por laparoscopia.

Nesse ano, pesquisadores da Coreia do Sul relataram o nascimento do primeiro clone de um cão doméstico produzido a partir de células somáticas de um macho adulto da raça Afghan hound. Esse estudo foi um marco para o meio científico em função das dificuldades encontradas tanto na manutenção dos ovócitos *in vitro*, como na transferência de embriões para a obtenção de um clone nessa espécie. Para a realização do experimento,

foram transferidos 1.095 ovócitos maturados *in vivo*, reconstruídos por micromanipulação e transferidos para 123 receptoras, porém nasceram apenas dois filhotes, sendo que um deles morreu 22 dias após o parto, em decorrência de uma pneumonia por aspiração (LEE *et al.*, 2005).

O aprimoramento das técnicas de produção *in vitro* de embriões caninos proporcionará um incremento no aporte de informações científicas para projetos na área da transferência nuclear, tornando possível o nascimento de um maior número de animais clone caninos, a exemplo do que já ocorre atualmente na espécie bovina e ovina.

Atualmente, observa-se igualmente, por parte de criadores e proprietários de cães das mais variadas raças, o interesse pela utilização das biotécnicas de reprodução, a fim de obter progênes de cães de grande valor genético ou afetivo, que por alguma eventualidade se encontrem impossibilitados de se reproduzirem pela monta natural. O aprimoramento das técnicas de produção *in vitro* de embriões, nesse caso, também se faz necessária para atender essa futura demanda do mercado profissional veterinário de animais de companhia.

Outro aspecto que justifica a realização de experimentos e o aprimoramento da produção *in vitro* de embriões caninos é a ampliação dos conhecimentos da fisiologia reprodutiva da espécie que poderão servir de aporte para a prevenção, tratamento e diagnóstico de patologias ligadas ao aparelho reprodutor, além do desenvolvimento de métodos contraceptivos em substituição à ovariectomia ou ao uso de hormônios anticoncepcionais.

Durante a década de 70, Mahi e Yanagimachi (1976) realizaram os primeiros experimentos de maturação e penetração espermática *in vitro* de ovócitos caninos, a fim de obter dados referentes aos eventos envolvidos na maturação e fecundação *in vitro* nessa espécie. Desde então, vários pesquisadores têm direcionado seus estudos aos eventos da fisiologia reprodutiva canina, com o objetivo de estabelecer condições de cultivo *in vitro* apropriadas para maturação de ovócitos de cadelas (YAMADA *et al.*, 1993, DURRANT *et al.* 1998, BOLAMBA *et al.*, 1998, HEWITT e ENGLAND, 1998, OTOI *et al.*, 2000a, SONGSASEN *et al.*, 2002, BOGLIOLO *et al.*, 2002, LUVONI *et al.*, 2003, RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a, KIM *et al.*, 2005).

Na maioria destes experimentos, os meios de maturação utilizados foram adaptações aos protocolos estabelecidos para as demais espécies domésticas. Entretanto, apesar dos

esforços, os resultados médios nas taxas de maturação nuclear obtidos nos estudos com maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos caninos foram em torno de 20%. Este percentual é baixo quando comparado aos valores obtidos na espécie bovina, por exemplo, onde a taxa de MII é de 80% a 90% (SAEKY *et al.*, 1991, OYAMADA *et al.*, 2004).

Estes dados comparativos das taxas de maturação nuclear, juntamente com as particularidades referentes aos eventos pré e pós-ovulatórios da espécie canina, levam ao questionamento sobre a necessidade de uma adequação das condições de cultivo, procurando suprir as exigências da espécie, a fim de obter melhores resultados.

Uma forma de melhor controlar o ambiente de maturação *in vitro*, é a utilização de meios quimicamente definidos, isto é, meios de cultivo onde não é acrescido soro ou albumina sérica bovina (BSA). O soro apresenta desvantagens na sua utilização, entre as quais podemos citar as possíveis contaminações virais, a presença de promotores e inibidores do crescimento celular e a impossibilidade de padronização dos experimentos devido às variações de componentes entre as partidas, tornando difícil a comparação de resultados de experimentos realizados com lotes distintos ou estudos realizados em diferentes laboratórios (FRESHMY, 2000).

Até o presente momento apenas dois trabalhos com maturação de ovócitos caninos, testaram um meio sem fonte proteína e obtiveram resultados semelhantes nas taxas de maturação nuclear de ovócitos mantidos em meio suplementado com soro, sugerindo que a supressão de fonte protéica não interfere na maturação nuclear ovocitária em cadelas (SONGSASEN *et al.*, 2002 e BOLAMBA *et al.*, 2002).

O objetivo desse experimento foi determinar as taxas de maturação nuclear de ovócitos mantidos em meio TCM199 suplementado com polivinil-pirrolidona (PVP).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo Sirard (2001), a maturação ovocitária pode ser didaticamente dividida em 3 aspectos funcionais: (1) maturação nuclear que representa a modificação da cromatina da condição de vesícula germinativa (VG) para o estágio de metáfase II (MII); (2) maturação citoplasmática que está relacionada a todas as modificações na distribuição e organização das organelas desde a VG até a MII; (3) maturação molecular que é considerada o conjunto de instruções acumuladas pelo ovócito durante o estado de VG e que controla tanto a progressão dos eventos nucleares quanto citoplasmáticos. Todas essas etapas são igualmente importantes e devem ocorrer de maneira ordenada a fim de que haja uma adequada fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário.

Na maioria dos mamíferos domésticos, a maturação nuclear é automaticamente programada para ser iniciada após a liberação do ovócito de seu folículo. O início da maturação nuclear induz a parada da transcrição e imediatamente limita a programação molecular requerida para a transcrição maternal do zigoto (MZT). Esse dado evidencia que os eventos que levam a modificações na programação molecular dos ovócitos devem ocorrer antes da retomada da meiose, com o rompimento da vesícula germinativa (SIRARD, 2001).

Nas fêmeas canídeas, a ovulação ocorre no início do estro, um a dois dias após o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) e a luteinização dos folículos se inicia antes da ovulação, expondo os ovócitos a altas concentrações de progesterona, diferentemente do que ocorre nos demais mamíferos domésticos, onde há um predomínio do estradiol durante o desenvolvimento dos folículos pré-ovulatórios (FARSTAD, 2000).

Outra particularidade na fisiologia reprodutiva da cadela consiste em que, no momento da ovulação, os ovócitos se encontram imaturos, no início do estágio de prófase da primeira divisão meiótica. A maturação nuclear ovocitária é finalizada na porção distal do oviduto, dois a três dias após a ovulação, quando os ovócitos atingem o estágio de MII (CONCANNON *et al.* 1989; TSUTSUI, 1989).

No momento da ovulação, as células do *Cumulus oophorus* que circundam o ovócito são compactas e compostas por diversas camadas e o ooplasma é uniforme e escuro devido a seu alto conteúdo lipídico. Após a maturação ovocitária, ocorre a expansão das

células do *Cumulus oophorus*, porém a camada mais interna se encontra aderida ao zigoto até o estágio de mórula (RENTON *et al.*, 1991).

Apesar dos esforços de alguns grupos de pesquisadores, os trabalhos realizados em maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos de cadelas apresentam taxas de maturação nuclear em torno de 20% (FARSTAD, 2000). Esses índices refletem o desconhecimento em relação aos fatores que desencadeiam a retomada e a progressão da meiose dos ovócitos caninos.

Reynaud *et al.* (2005) observando os eventos *in vivo* de fisiologia reprodutiva na cadela, concluíram que a fecundação ocorre seguindo os mesmos padrões que nos demais mamíferos, porém a maturação possui aspectos peculiares no que se refere à retomada da meiose que ainda não foram totalmente identificados.

Apesar das particularidades em relação aos eventos envolvidos na maturação dos ovócitos caninos, um trabalho realizado por Saint-Dizier *et al.* (2004) buscando a caracterização da maturação ovocitária nas cadelas, acompanhando as modificações ocorridas na cromatina e nos microtúbulos e quantificando a atividade do fator promotor da maturação (MPF) e da MAP quinase, concluíram que o citoesqueleto, a organização da cromatina e a atividade das quinases são semelhantes a dos observados nos ovócitos dos demais mamíferos domésticos.

Em relação aos estudos de MIV e FIV de ovócitos de canídeos selvagens, até o presente momento, foram publicados três estudos, dois com a raposa azul (*Alopex lagopus*) (FARSTAD *et al.*, 1993 e SRSEN *et al.*, 1998) e um com o cão de raccon (*Nyctereutes procynoides Gray*) (FENG *et al.*, 1995). Nesses experimentos, foi observado um padrão de maturação ovocitária e de fecundação *in vitro* semelhante ao relatado nos experimentos de PIV nas cadelas. Estes dados reforçam a necessidade da adequação dos sistemas de MIV nos cães domésticos (*Canis familiaris*), a fim de constituir um modelo experimental para estudos de produção *in vitro* de embriões e para a conservação de gametas de canídeos selvagens.

A maioria dos estudos envolvendo a maturação *in vitro* de ovócitos caninos utiliza o TCM 199 como meio básico acrescido normalmente de antibióticos, hormônios, piruvato e fonte protéica (HEWITT e ENGLAND, 1998, OTOI *et al.*, 1999, FUJII *et al.*, 2000, SAINT-DIZIER *et al.*, 2001, BOGLIOLO *et al.*, 2002, LUVONI *et al.*, 2003, KIM *et al.*, 2004, HISHINUMA *et al.*, 2004, KIM *et al.*, 2005). Porém, levando em consideração os

eventos ocorridos *in vivo*, em relação à retomada e a progressão da meiose na porção distal do oviduto, após a ovulação, Hewitt e England (1999a) testaram a maturação nuclear de ovócitos caninos em meio SOF, a fim de tornar as condições de cultivo *in vitro* mais semelhantes às fisiológicas. Entretanto, os resultados de MI/AI/MII obtidos no grupo de ovócitos cultivados por 48 horas em meio SOF suplementado com diferentes concentrações de BSA (0,3 e 4%) foram de 5% a 7% respectivamente, não diferindo dos mantidos em meio TCM 199 com 0,3% de BSA (6%).

Hewitt e England (1998), em um único experimento relacionando a idade da fêmea doadora dos ovócitos a MIV nos caninos concluíram, através de seus resultados, que os ovócitos provenientes de cadelas jovens (de 1 a 7 anos) têm um potencial mais elevado de atingir a maturação nuclear que aqueles recuperados de ovários retirados de fêmeas mais velhas.

Alguns trabalhos relataram a relação entre o diâmetro ovocitário e a maturação *in vitro* em canídeos (HEWITT e ENGLAND, 1998, SRSEN *et al.*, 1998 e OTOI *et al.*, 2000a). Com relação a este parâmetro observa-se um consenso entre os grupos de pesquisadores em afirmar que ovócitos com o diâmetro superior que 100 μ m têm maior competência meiótica, quando comparados aos de diâmetro inferior. Hewitt e England (1998) obtiveram resultados de MI/AI/MII de 20% (9/47) de ovócitos com diâmetro superior a 100 μ m, sendo essas taxas significativamente maiores comparativamente aos ovócitos com diâmetro igual (10%, 15/152) ou menor (4%, 5/130) a 100 μ m. Otoi *et al.* (2000a) relataram taxas superiores de MII (21,5%, 22/104), quando os ovócitos selecionados mediam em torno de 120 μ m de diâmetro, comparativamente aos ovócitos com diâmetro inferior (5%, 11/225). Neste experimento, nos ovócitos com diâmetro inferiores a 100 μ m não foram observados resultados de MII.

Songsasen e Wildt (2005), avaliando a relação entre o tamanho dos folículos e a taxa de MII de ovócitos caninos provenientes deles, concluíram que o tamanho dos folículos influencia significativamente na MIV, mostrando que em torno de 80% dos ovócitos provenientes de folículos > 2 mm atingiram MII.

Apenas um experimento investigou a concentração de oxigênio do sistema de MIV, a fim avaliar o efeito da atmosfera gasosa na maturação nuclear de ovócitos caninos (SONGSASEN *et al.*, 2002). Os resultados desse estudo revelaram que as concentrações de

oxigênio de 5% e 20%, durante a MIV de ovócitos em meio TCM 199 ou meio CMRL 1066, conferiram resultados semelhantes nas taxas de MII (em média 6,3%).

Em relação à temperatura do sistema de cultivo, os ovócitos caninos têm sido maturados *in vitro* em temperaturas que variam de 37°C a 39°C (HEWITT *et al.*, 1998, BOGLIOLO *et al.*, 2002, RODRIGUES e RODRIGUES, 2003a, SONGSASEN e WILDT, 2005), provavelmente a partir de adaptações aos protocolos estabelecidos nas demais espécies domésticas. Apenas um trabalho até o momento, foi realizado objetivando avaliar o efeito de diferentes temperaturas de incubação (37°C e 39°C) de CCOs caninos submetidos a três tempos de cultivo (48, 72 e 96 horas) em meio TCM 199 (RODRIGUES e RODRIGUES, 2004). Os resultados obtidos nesse experimento não revelaram diferenças nas taxas de MII entre os ovócitos mantidos a 37°C (6,8%) ou a 39°C (5,9%) nos diferentes tempos de maturação, mostrando que as duas temperaturas podem ser adotadas como padrão para a MIV de ovócitos de cadelas.

Durrant *et al.* (1998) e Bolamba *et al.* (1998) realizaram os primeiros experimentos de maturação *in vitro* de ovócitos caninos provenientes de folículos pré-antrais e antrais recentes recuperados pelo método de digestão enzimática, obtendo taxas de maturação nuclear semelhantes aos trabalhos utilizando ovócitos coletados pelo método de escarificação ovariana (FUJII *et al.*, 2000). Desde então alguns estudos têm sido realizados a fim de estabelecer um sistema de cultivo que proporcione índices satisfatórios de maturação nuclear, avaliando os efeitos do cultivo em meio SOF sem a adição de soro (BOLAMBA *et al.*, 2002) e da suplementação do meio DME/ F-12 com fator de crescimento epitelial (EGF) e com gonadotrofinas e esteróides (BOLAMBA *et al.*, 2006), porém os resultados não diferiram da média obtida na maioria dos demais experimentos realizados.

A utilização do sistema de co-cultivo em células epiteliais de oviduto de cadelas para a maturação de CCOs caninos foi testada primeiramente por Hewitt e England (1999a) na tentativa de proporcionar aos ovócitos um ambiente *in vitro* o mais semelhante possível das condições *in vivo*. O resultado obtido por esses pesquisadores foi que o cultivo em meio TCM199 suplementado com 0,3% de BSA na presença de células de oviduto proporcionou maiores taxas de MI/AI/MII (9%), em comparação ao cultivo em gotas (0%), quando mantidos em cultivo por 96 horas. Bogliolo *et al.* (2002) testaram a influência do co-cultivo

com células epiteliais retiradas das porções infundibular e ampolar do oviduto de cadelas em estro em comparação com o cultivo em meio TCM 199. Como conclusão esse pesquisadores relataram que o co-cultivo com células coletadas tanto da porção infundibular quanto da ampolar, exerceram uma influência positiva na retomada e progressão da meiose de ovócitos caninos após 48h de cultivo, obtendo taxas de MII de 18,5% (7/104) e 23,2% (20/96) respectivamente, quando comparadas às taxas obtidas no meio controle (6%, 4/86). Luvoni *et al.* (2003) realizaram um trabalho de MIV de ovócitos caninos em oviduto aberto ou fechado (por ligadura) em comparação com o sistema de cultivo em gota e observaram que os ovócitos maturados no oviduto fechado alcançaram maiores índices de maturação nuclear (31,9%, 15/47). Esses autores justificam os resultados obtidos em função das prováveis interações fisiológicas muito próximas entre os ovócitos e o oviduto que promovem efeitos positivos para a MIV de ovócitos nessa espécie. Porém, é importante salientar que o uso do método de co-cultivo está longe de ser satisfatório na produção de modelos acurados de MIV.

A influência da fase do ciclo estral em que se encontra a fêmea canina doadora dos ovários nos índices de maturação nuclear dos ovócitos ainda não está definida e os trabalhos referentes a estes dados são controversos. Alguns estudos indicam que a maturação nuclear não é influenciada pelo status reprodutivo da fêmea doadora (HEWITT e ENGLAND, 1997, FUJII *et al.*, 2000, RODRIGUES e RODRIGUES, 2003b, SONGSASEN e WILDT, 2005). Entretanto, outros autores consideram que a fase do ciclo estral da fêmea doadora constitui um fator importante no critério de seleção para que se consiga atingir a competência meiótica de ovócitos submetidos a MIV, sendo encontradas maiores taxas de MII nas cadelas em que se apresentam em pró-estro e estro fisiológico ou estimulado hormonalmente (OTOI *et al.*, 2000a, LUVONI *et al.*, 2001, WILLINGHAN-ROCKY *et al.*, 2003).

Em relação ao efeito da adição de soro ou BSA ao meio de maturação, vários estudos têm sido realizados com o intuito de estabelecer uma fonte protéica que confira melhores resultados na MIV de ovócitos de cães. Otoi *et al.* (1999) realizaram um estudo avaliando diferentes concentrações (5%, 10% e 20%) de soro de cadelas em anestro, estro ou metaestro em comparação com a suplementação com 0,3% de BSA. Os resultados desse trabalho mostraram que a suplementação com soro de cadela em estro (SCE) a 10%

conferiu melhores índices de maturação nuclear (12,4%, 17/108), comparativamente aos resultados de MII obtidos quando o meio foi suplementado com 10% de soro de cadela em anestro (5,3%, 7/132). Porém, um estudo realizado por Rodrigues e Rodrigues (2003a), comparando as taxas de maturação nuclear com meio TCM 199 acrescido de 10% de SCE (0%), 10% de SVE (2,1%, 3/143) ou 0,4% de BSA (1,3%, 2/150), mostraram que não houve diferença nos índices de maturação nuclear em relação ao tipo de fonte protéica utilizada. Por outro lado, Songsasen *et al.* (2002) e Bolamba *et al.* (2002) relataram a MIV de ovócitos caninos na ausência de suplementação protéica sem que houvesse prejuízo nos resultados de MII, sendo observados índices de MII de 16,1% (9/56) e 12,2% (9/74) respectivamente.

Tomando como base os eventos hormonais envolvidos na maturação ovocitária, vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de identificar hormônios que adicionados ao meio de maturação proporcionem um nível de MII satisfatório para a PIV de embriões caninos, porém ainda não existe um consenso em relação à real necessidade da inclusão de gonadotrofinas e esteróides ao sistema de cultivo. Hewitt e England (1997) testaram o efeito da progesterona e do estradiol na maturação de ovócitos caninos e observaram que a suplementação desses esteróides ao meio de cultivo ovocitário não conferiram um aumento nas taxas de maturação nuclear, obtendo, tanto nos grupos com a adição hormonal, quanto no controle, índices médios de MI/AI/MII de 15%. Esses mesmos autores realizaram um segundo estudo a fim de verificar as taxas de MI/MII de ovócitos maturados em meio com gonadotrofinas, entretanto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos onde houve a suplementação hormonal com FSH (5%, 3/56), LH (4%, 2/47) ou a combinação dessas gonadotrofinas (2%, 1/59) e o controle (0%), indicando que não há necessidade da adição de gonadotrofinas ao meio de maturação de ovócitos de cadelas (Hewitt e England, 1999b).

Num recente trabalho realizado por Bolamba *et al.* (2006) também foi demonstrado que as gonadotrofinas e o estradiol não exercem influência nas taxas de MII de ovócitos provenientes de folículos pré-antrais em estágio avançado e folículos antrais recentes. Willingham-Rocky *et al.* (2003), avaliaram as taxas de maturação nuclear de ovócitos caninos cultivados em meio suplementado com diferentes concentrações de progesterona. Nesse estudo foi constatado que adição de progesterona ao meio de MIV não interferiu nas

taxas de MII dos ovócitos nessa espécie, obtendo índices médios de MII de 9,9% nas diferentes concentrações e 14,7% no grupo sem a adição de progesterona.

Entretanto, Kim *et al.* (2005) avaliando o efeito da progesterona e do estradiol na MIV de ovócitos de cadelas, afirmaram que a suplementação isolada tanto de estradiol (14,7%) quanto de progesterona (10,8%) aumentaram significativamente os índices de MII, comparativamente ao controle (2,9%). Além disso, esses autores observaram que a suplementação de progesterona em adição a de estradiol pode proporcionar tanto um aumento quanto uma redução nas taxas de MII, quando comparada a suplementação somente de estradiol, dependendo da concentração de progesterona adicionada ao meio de MIV.

Reyes *et al.* (2005) avaliaram o efeito da suplementação de hCG durante diferentes tempos de maturação na MIV de ovócitos caninos e constataram que os melhores resultados de MII (43,4%) foram observados após 96 horas de cultivo, quando 10 UI/mL de hCG foram adicionadas ao meio somente durante as primeiras 48 horas do cultivo.

O experimento de Wood *et al.* (1995) é o único relato em carnívoros sobre a utilização de uma macromolécula sintética em substituição à suplementação de soro ou BSA como fonte protéica na MIV. Nesse trabalho, ovócitos de gatas domésticas foram submetidos a MIV em diferentes fontes protéicas (SFB e BSA), álcool-polivinílico (PVA), gonadotrofinas e estradiol. Os resultados obtidos nesse estudo indicaram que os ovócitos cultivados em meio suplementado tanto com BSA (50,8%, 27/65) quanto com PVA (41,5%, 31/61) apresentaram taxas de MII superiores aos ovócitos mantidos em meio suplementado com SFB (25,9%, 15/58). Esses dados são importantes na consideração da adoção de meios sem fonte protéica suplementados com macromoléculas sintéticas com o PVA ou o PVP na maturação *in vitro* de ovócitos caninos, a fim de proporcionar resultados com uma maior repetibilidade e com dados mais exatos em relação aos testes envolvendo a adição de vários suplementos aos meios de maturação.

Até o presente momento poucos pesquisadores obtiveram sucesso na produção de embriões caninos fertilizados *in vitro*. As taxas de clivagem e de blastocistos ainda são pouco expressivas na espécie. Yamada *et al.* (1992) produziram 15 embriões de 2 a 8 células a partir 45 ovócitos, recuperados de cadelas que haviam recebido tratamento superovulatório, maturados, fertilizados e cultivados *in vitro*, obtendo uma taxa de

clivagem de 33,3%. Otoi *et al.* (2000b) relataram taxas de clivagem de 15,7% (34/217) e 1 blastocisto (0,5%) utilizando ovócitos maturados em meio TCM199 com co-cultivo com células do *Cumulus oophorus* bovinas. England *et al.* (2001) relataram pela primeira vez, resultados de prenhez após a transferência de 90 ovócitos maturados e fecundados *in vitro*, sendo constatado, por ultra-sonografia aos 20 dias de gestação, a presença de 3 botões embrionários, porém, não houve o nascimento em função da reabsorção embrionária sem causa determinada. Rodrigues *et al.* (2004) foram os primeiros pesquisadores latino-americanos a apresentar resultados de clivagem de embriões caninos produzidos *in vitro* até o estágio de 8 células obtendo uma taxa de 10,1% (27/267).

3 ARTIGO

***IN VITRO* NUCLEAR MATURATION OF BITCH OOCYTES IN PRESENCE OF POLYVINYL-PYRROLIDONE**

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

ABSTRACT

At moment, the main limitation to successful produce dog embryos *in vitro* is the low oocyte maturation rate to the metaphase II stage. The objective of this experiment was to determine the rates of nuclear maturation of dog oocytes cultured in TCM 199 medium supplemented with 4 mg/mL polyvinyl-pirrolidone (PVP) or 10% estrus cow serum (ECS). Ovaries were collected from 21 healthy bitches by ovariectomy. Females were at various stages of the estrous cycle at the moment of ovary retrieval. The oocytes were selected and classified subjectively according to their morphology and size, and matured for 48 hours at 37°C, in atmosphere of 5% of CO₂ in air. Oocytes were randomly distributed in three treatment groups: (A) TCM 199 supplemented with 4 mg/mL PVP + hST; (B) TCM 199 with 10% ECS + hST; (C) TCM 199 supplemented with 10% ECS, oestradiol + FSH + LH + hST (control). There were not significant differences in metaphase II rates among treatments A (4.7%, 8/170), B (3.52%, 6/183) e C (4.70%, 8/172), ($P > 0,05$). In conclusion, the present study demonstrated that *in vitro* nuclear maturation of domestic dog oocytes can be achieved in TCM 199 supplemented only with PVP at similar proportions that a medium added with serum, gonadotropins and estradiol.

Keywords: canine oocyte maturation, PVP, gonadotropins, estradiol, serum-free media.

INTRODUCTION

The development of *in vitro* production (IVP) techniques, using canine oocytes as an experimental model, may be a powerful tool in gamete rescue programmes, which are important to preserve the existence of various endangered canid species, as the lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) and the cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) in South American (Brazilian list of the Ministério do Meio Ambiente, in 2004). Moreover, this technology can be used for understanding the basic mechanisms related with gamete development in carnivores and also may be useful in clone production, which requires matured oocytes as a cytoplasm receptor for the somatic cell by nuclear transfer.

In vitro maturation (IVM) of oocytes has become a critical step in IVP of canine embryos and, for this reason, several studies have been carried out to test different culture conditions. Nevertheless, the results of nuclear maturation remain low, with a percentage of oocytes at metaphase II stage ranging from 0% to 31.9% (YAMADA *et al.*, 1993, BOLAMBA *et al.*, 1998, HEWITT and ENGLAND, 1999b, FUJII *et al.*, 2000, SAINT-DIZIER *et al.*, 2001, BOGLIOLO *et al.*, 2002, SONGSASEN *et al.*, 2002, LUVONI *et al.*, 2003, RODRIGUES and RODRIGUES, 2003a, and KIM *et al.*, 2005). At the present time, a few researchers have had success and have obtained canine embryo development *in vitro* (YAMADA *et al.*, 1992, OTOI *et al.*, 2000b, ENGLAND *et al.*, 2001, RODRIGUES *et al.*, 2004).

Many protocols use serum as a source of protein to culture oocytes and embryos in canids (SRSEN *et al.*, 1998, BOLAMBA *et al.*, 1998, OTOI *et al.*, 2000a, LUVONI *et al.*, 2003, RODRIGUES *et al.*, 2004). Two articles reported that serum was not needed as supplement to *in vitro* mature dog oocytes (SONGSASEN *et al.*, 2002, BOLAMBA *et al.*, 2002). The disadvantages to utilize serum, or any kind of protein supplementation in the IVP medium are: (1) the inclusion of uncertain substances, that could be harmful to oocyte maturation and subsequent embryo development; (2) the variability between batches, which despite selected as similar, will never be identical to the first one; (3) the difficulties to determine batch's valid period; (4) the need to test a new batch with the aim to ensure that the replacement is as close as possible to the previous one, and (4) the risk to transmit contamination to culture (FRESHMY, 2000).

Many studies have been done in order to determine a more appropriate hormonal supplementation in the culture medium, which could promote an increase in the results of nuclear maturation *in vitro* of canids oocytes. Some of these experiments have shown a positive influence of estradiol and progesterone (KIM *et al.*, 2005), bovine somatotropin (SRSEN *et al.*, 1998), human somatotropin (RODRIGUES and RODRIGUES, 2003a), equine chorionic gonadotropin (HANNA *et al.*, 2004), human chorionic gonadotropin (REYES *et al.*, 2005) in medium. However, two studies performed by Hewitt and England (1997, 1999b) did not show a positive effect in *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes, when the culture medium was supplemented with gonadotropins and steroids hormones. A recent study performed by Bolamba *et al.* (2006) and in which the authors tested the addition of gonadotropins and steroids on IVM medium in oocytes, collected by preantral and early antral follicles, confirmed these observations.

Polyvinyl-pyrrolidone (PVP) is a synthetic polymer used as a supplement in culture medium. Hirao *et al.* (2004) reported that PVP could change the adhesion properties between granulosa cells and oocytes, influencing *Cumulus*-oocyte complexes (COCs) organization and behavior through diffusion of paracrine or autocrine factors produced and secreted by the COCs, which are considered essential to the oocyte growth and development. These factors are constituted by macromolecules and their movement is affected by interactions with others macromolecules as the PVP. When the culture medium is supplemented with a high concentration of macromolecules, this paracrine and autocrine factors produced by *Cumulus oophorus* cells complexes become less mobile, increasing the chance for these factors to find their receptors.

The present study was performed to determine nuclear maturation rates of dog oocytes cultured in TCM199 medium supplemented with 4mg/mL PVP or 10% ECS.

MATERIALS AND METHODS

Ovaries and oocyte retrieval

Ovaries were retrieved from 21 healthy pubertal and adult bitches aged 11 months to 9 years old (mean age was 3 years). Purebred (n=5) and Crossbred (n=16) bitches have had their ovaries categorized according to the stage of estrus cycle by subjectively identification of reproductive ovarian tissue morphology in anoestrus n=6 (ovaries without follicles or luteal tissue), estrus n=4 (one or more visible follicles) and dioestrus n=11 (one or more pronounced corpora lutea) (HEWITT *et al.*, 1998). Ovaries were obtained by routine and elective ovariohysterectomy n=16 or after caesarean section operation n=5, following anesthesia with the purpose of neutering at the Veterinary Hospital of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), at Zoonoses Control Center of Porto Alegre, and at local private clinics. Both ovaries from each bitch were brought to the laboratory in phosphate-buffered saline (PBS) solution at ambient temperature within 1 hour after removal. The *Cumulus*-oocyte-complexes were recovered by slicing of ovaries tissue in 37°C PBS supplemented with 1% fetal calf serum (FCS). *Cumulus*-oocytes-complexes were recovered and morphologically classified in grades as: (1) darkly pigmented and completely surrounded by one or more layers of *Cumulus* cells, and (2) lightly pigmented with incomplete layers of *Cumulus* cells (HEWITT *et al.*, 1998). From a total of 2.420, 623 morphologically classified as grade I COCs were selected for *in vitro* maturation. The medium used to maintain the COCs before maturation was TCM-hepes-buffered, constituted by TCM 199 (Sigma, M2520) supplemented with 4.2 mM NaHCO₃ (Sigma, S5761), 50 µg/mL gentamicin (Sigma, G1264), 1 mg/mL BSA (Gibco, 11018-017), 14.3 mM Hepes (Sigma, H3375).

In vitro maturation

The COCs were divided randomly and cultured in 100 µL drops (four drops per dish) under mineral oil (Sigma), at 37°C in a humidified atmosphere, with 5 % CO₂ in air for 48 hours. Oocytes were submitted to three treatments: (A) TCM 199 supplemented with 25 mM Hepes/l (v/v) (Sigma, M2520, St Louis, MO), with 50 µg/mL gentamicin (Sigma, G1264), 2.2 mg/mL sodium bicarbonate (Sigma, S5761), 22 µg/mL pyruvic acid (Merk,

1.06619.0050, Darmstadt, Germany), 1 µg/mL hST (Lilly, FF1D44C, France) and 4 mg/mL polyvinyl-pyrrolidone (Sigma P0930), (B) TCM 199 supplemented with 25 mM Hepes/l (v/v) (Sigma, M2520, St Louis, MO), with 10% heat inactivated ECS, 50 µg/mL gentamicin (Sigma, G1264), 2,2 mg/mL sodium bicarbonate (Sigma, S5761), 22 µg/mL pyruvic acid (Merk, 1.06619.0050, Darmstadt, Germany) and 1 µg/mL hST (Lilly, FF1D44C, France); (C) TCM 199 supplemented with 25 mM Hepes/l (v/v) (Sigma, M2520, St Louis, MO), with 10% heat inactivated ECS, 50 µg/mL gentamicin (Sigma, G1264), 2,2 mg/mL sodium bicarbonate (Sigma, S5761), 22 µg/mL pyruvic acid (Merck, 1.06619.0050, Darmstadt, Germany), 20 µg/mL estradiol (Sigma, E8875), 0.5 µg/mL FSH (Foltropin-V, Vetrepharm, Inc., Ont., Canada), 0.03 IU/mL hCG (Profasi HP, Serono) and 1 µg/mL hST (Lilly, FF1D44C, France) (control group).

Assessment of meiotic stage

After the *in vitro* culture interval, oocytes were transferred into 400µL of PBS solution and stripped performing the removal of *Cumulus* cells by mechanical displacement with gently mouth pipetting with a small-bore glass pipette. After that, oocytes were permeabilized and fixed in paraformaldehyde 3.7% in Triton X solution for 15 minutes. Oocytes were then submitted to additional 15 minutes in a 2% polyvinyl-pyrrolidone in PBS solution. Groups of 5 oocytes were placed on a slide with a minimum amount PVP solution, stained with 3 µL of Hoescht 33342 (Sigma St Luis, MO, USA) solution in glycerol (10 µg/mL) and overlaid with a coverslip supported by four small peaces of baton glue. The coverslip was than sealed with nail. The bis-benzimide (Hoescht 33342) is a DNA-specific fluorochrome. It allows the evaluation of chromatin configuration in oocytes. The oocytes were observed under fluorecence to allow the evaluation of the cells nuclear maturation stage. By this method, oocytes were classified as intact germinal vesicle (GV), when nucleolus and very fine filaments of chromatin were identified; germinal vesicle breakdown (GVBD), when different patterns of chromatin condensation were present or when the chromosomes appeared coiled up and no individual chromosomes were visible; metaphase I (MI), anaphase I (AI), metaphase II (MII), once the formation of bivalents was completed and appeared one or two sets of chromosomes and degenerated or unclassified

(others), when the oocytes presented ooplasm characteristic of non-viable cells, and those which chromatin was unidentifiable or not visible.

Statistical analysis

The percentages of various nuclear maturation stages in oocytes among the different treatments groups were analysed by chi-square analysis. A confidence level of $P < 0.05$ was considered statistically significant. This study composed 15 replicates.

RESULTS

After slicing, 2,420 COCs were obtained from 21 bitches. The mean number of oocytes recovered from individual bitches was 115. A total of 623 (25.7%) healthy-looking *cumulus*-oocyte complexes were classified as grade 1, and were used in the experiment (44 COCs per female) (Table 1). Ninety-eight oocytes (15.7%) were lost during the processes of removal of *Cumulus* cells, fixation or preparation of staining (35 oocytes in treatment A, 29 in treatment B and 34 in control group).

Table 1. General description of donor oocyte's population.

	Mean	Range
Age (months)	38	11 to 108
Number of COCs	115.23	27 to 266
Number of grade I COCs	44	6 to 73
Donor weight (Kg)	9.89	4 to 15.7
Ovary weight/donor (g)	1.7965	0.617 to 3.513

The nuclear morphology was evaluated in 525 oocytes, which were fixed and stained after 48 h culture in their respective groups. One hundred thirty-two oocytes were classified as degenerated or as possessing unidentifiable nuclear material. Oocyte degeneration was characterized by nuclear pycnosis, unidentifiable intracytoplasmic structures, or loss of the cytoplasmic membrane. As exhibit in table 2, there were not

significantly differences among treatment groups in any stage of nuclear maturation (VG, VGBD, MI/AI and MII) in oocytes. Results of development to meiosis were similar among treatments A: (41/170, 24.10%), B: (43/183, 25.37%) and C: (40/172, 23.52%). At the end of *in vitro* maturation period it was not observed parthenogenetic activation by the oocytes.

Table 2: Evaluation of the nuclear status in oocytes after culture period in the different groups.

Treatment	N	GV (%)	VGBD (%)	MI/AI (%)	MII (%)	Others
Control*	172	84 (49.41)	17 (10.00)	15 (8.81)	8 (4.70)	48 (28.23)
TCM 199 + ECS + hST	183	98 (57.64)	23 (13.52)	14 (8.23)	6 (3.52)	42 (24.70)
TCM199 + PVP + hST	170	86 (50.58)	21 (12.35)	12 (7.05)	8 (4.70)	42 (24.70)

*Control: TCM 199 + ECS + FSH + hCG + E₂ + hST

GV: germinal vesicle; VGBD: germinal vesicle breakdown; MI: metaphase I; AI: anaphase I; MII: metaphase II; Others: degenerated or unclassified.

Chi-square analysis $P > 0.05$.

DISCUSSION

The results of the present study indicate that supplementation of TCM 199 medium with PVP, without serum and gonadotropins and estradiol supplementation provides a rate of nuclear maturation at the same proportion of that from the oocytes cultured with gonadotropins, steroids and serum. Our finds are in agreement with a study accomplished by Songsasen *et al.* (2002), in wich canine oocytes could be successfully matured *in vitro* in a protein-free medium at comparable rates of that using medium supplemented with protein. Despite suboptimal rates of maturation, Hewitt *et al.* (1998) showed that canine oocyte maturation is possible in serum-free medium. In other specie as the cat (*Felis catus*), *in vitro* maturation and subsequent fertilization were not affected by absence of protein supplementation in medium (WOOD *et al.*, 1995). Also, results presented by Saeky *et al.* (1991), showed that frequency of *in vitro* nuclear maturation of bovine oocytes did not differ among media supplemented with either fetal cow serum (FCS), or with 0,3% PVP, exclusively.

In the present experiment, treatment of oocytes with 4mg/mL PVP provided a similar rate of nuclear maturation to the maturation percentage observed when comparison was established among groups. This observation shows that PVP can be used as a substitute of animal surfactant macromolecules present in serum, which are routinely used in *in vitro* maturation systems for dogs. According to Hirao *et al.* (2004), macromolecules as PVP and polyvinylalcohol (PVA) provide a colloid osmotic pressure and are useful for preventing loss of oocytes due to sticking of plastic surface to the Petri dish.

Otoi *et al.* (1999) observed that the addition of serum to maturation medium contributes with a high number of canine oocytes with unidentified nuclear material after staining. In the present experiment, the percentage of degenerated oocytes or those with unidentified nuclear material was not different among treatments, showing that the presence or absence of serum does not influence the incidence of oocytes with those abnormalities.

Some authors (LEIBFRIED-RUTLEDGE *et al.*, 1986, YOUNIS *et al.*, 1989, SCHELLANDER *et al.*, 1990) have shown that the inclusion of serum on IVM medium improves the maturation of bovine oocytes and their subsequent development to embryos mainly because serum contains a range of substances such as hormones, growth factors, amino acids and binding proteins and these substances are involved with cell maturation. In the mouse, addition of serum to medium has been shown to prevent zona pellucida hardening and enhances fertilization rates, as well as embryonic development (EPPIG, 1986). However, it is also known that serum has a potential risk to disseminate disease, mainly when it is contaminated by virus (GORDON, 2003). Another negative point for using serum as a source of protein in IVM medium is the major variability in the results when different batches of serum are used. This variability can be attributed to differences among lots (BAVISTER, 1995). In the present experiment, the batches of ECS were prepared by exposing the cow serum to 56 to 60°C for 30 minutes with the aim to deactivate immunoglobulins and other components such as protein hormones. This process probably reduces the interference of gonadotropins but not the steroids content in the serum submitted to this kind of treatment (ISACHENKO *et al.*, 1994).

The majority of reports in IVM of canine oocytes refer the use of gonadotropins and steroids hormones as supplement in medium, what is a kind of adaptation from protocols used in other species. However, there are few and controversial studies certifying if the use

of these types of supplementation improves the quality of medium (HEWITT and ENGLAND, 1997, 1999b, WILLINGHAN-ROCKY *et al.*, 2003, RODRIGUES and RODRIGUES, 2003a, KIM *et al.*, 2005, REYES *et al.*, 2005). Some arguments in favor of supplementation of the maturation media with estradiol is that this hormone act as a co-stimulator for FSH-induced follicular growth, by the expression of LH receptors in granulosa cells and by promoting the production of insulin-like growth factor I and II (SMITZ *et al.*, 2001). The addition of gonadotropins in the maturation medium difficult the comparison and the results obtained by different studies testing protein and hormones in medium, because there are differences in concentrations and variations of purity of batches (CHOI *et al.*, 2001, REYES *et al.*, 2005). However, it is well established that gonadotropins added to maturation medium for bovine oocytes play an important role, triggering the resumption of meiosis and the expansion of *Cumulus* cells (GORDON, 2003).

In the present study, the rate of nuclear maturation in oocytes in medium with ECS + FSH + hCG + E₂ + hST was similar to that one observed in treatment with ECS + hST or PVP + hST. These findings are in agreement with previous reports (HEWITT and ENGLAND, 1997, 1999b, BOLAMBA *et al.*, 2006) in which the addition of gonadotropins and steroid hormones in the maturation medium was not sufficient to enhance the percentage of MII of canine oocytes matured *in vitro*. Also, Rodrigues and Rodrigues (2003a) tested the addition of FSH and estradiol on the IVM medium and did not find a positive effect. In another study with Blue fox oocytes, the addition of FSH to the maturation medium was observed not improve the rate of nuclear maturation *in vitro* (SRSEN *et al.*, 1998). However, a recent report by Kim *et al.* (2005) showed that E₂ improved the nuclear maturation *in vitro* of canine oocytes only when the ovaries of bitches were retrieved from the follicular phase of oestrus cycle. Reyes *et al.* (2005), testing TCM199 with different periods of exposure of hCG for IVM of canine oocytes, concluded that the percentage of oocytes that had reached MII was highest in the group matured with hCG for only the first 48 hours after a period of culture of 96h, showing that the time of exposure of canine oocytes to this hormone influenced *in vitro* nuclear maturation.

Maturation of oocytes *in vitro* involves changes in the surrounding *Cumulus* cells. It is believed that *Cumulus* cells expansion are stimulated by gonadotropins in order to produce and secret hyaluronic acid (HA), which results in the expansion process (GORDON, 2003).

FSH apparently promotes maturation by regulating cAMP concentration that are associated with enhance *Cumulus* cell expansion (SALUSTRI *et al.*, 1985). Several reports *in vitro* maturation of bovine oocytes (LONERGAN *et al.*, 1996, PAULA LOPEZ *et al.*, 1998, CHOI *et al.*, 2001) have questioned the role of *Cumulus* expansion during IVM in supporting subsequent embryo development. Similarly to what was reported in bovine, we also were not able to define a relationship between the degree of *Cumulus* cells expansion and the nuclear maturation of canine oocytes. Further investigations are required to determine the degree of *Cumulus* expansion possible related to both nuclear and cytoplasmic oocyte maturation.

In the present study, a total of 2.420 oocytes were recovered by slicing of ovaries, from which 623 (25%) were classified morphologically as grade 1 oocytes. This rate of recovery is in agreement with the previous reports from Nickson *et al.* (1993) and from Fujji *et al.* (2000) who found an individual rate of 0 to 50% good quality oocytes of canine ovaries. The rate again, of total COCs and good quality oocytes varied among donors in this study, showing that individual factors influence the rates of recovery, but not the MII rates. Thus, the only factor identified at the moment, influencing the oocyte maturation *in vitro* is the inherent quality of the oocyte itself (HEWITT and ENGLAND, 1998, OTOI *et al.*, 2000a). Moreover, donor's stage of the estrus cycle has been shown as useless to MII achievement in the dog (RODRIGUES and RODRIGUES, 2003b, SONGSASEN and WILDT, 2005).

In conclusion, the data presented in this experiment indicate that the dog oocyte nuclear *in vitro* maturation rates was similar using modified TCM 199 supplemented with 0,4% PVP or 10% ECS.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Levando em consideração as particularidades da espécie canina, no que tange à maturação ovocitária e os eventos pré e pós ovulatórios, e avaliando os resultados ainda pouco expressivos nas taxas de maturação nuclear, obtidos até o presente momento pelos pesquisadores, consideramos de fundamental importância a necessidade da adequação e aprimoramento das técnicas de cultivo *in vitro* de ovócitos utilizados com esta espécie. Deve-se procurar identificar fatores que contribuam para um aumento dos índices de MIV, a fim de alcançar taxas satisfatórias que tornem possível a produção *in vitro* de embriões das espécies de canídeos.

No presente estudo, foi demonstrado que ovócitos caninos podem ser maturados *in vitro* em meio TCM 199 suprimido da adição de fonte protéica, gonadotrofinas e esteróides, adicionando ao meio uma macromolécula surfactante sintética, a polivinil-pirrolidona.

A adoção de um meio quimicamente definido padrão para a maturação de ovócitos caninos, composto por substâncias totalmente identificadas, como o meio de cultivo apresentado nesse experimento, confere inúmeras vantagens quando comparados aos meios suplementados com soro (indefinidos) ou aos adicionados com BSA (semidefinidos) como, por exemplo, a supressão do risco de contaminação viral e das variações existentes entre diferentes partidas, maior exatidão e repetibilidade dos resultados experimentais e a inexistência de fatores inibitórios que possam estar presentes entre as substâncias componentes do soro.

Na realização de futuros experimentos, testando diferentes suplementações ao sistema de cultivo, objetivando aumentar as taxas de maturação *in vitro* de ovócitos caninos, sugerimos que a adição de 4mg/mL de PVP ao meio de cultivo seja considerada como uma alternativa na maturação *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- BAVISTER BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**. Oxford, v. 1 n. 2, p. 91-148, 1995.
- BOGLIOLO L, ZEDDA MT, LEDDA S, LEONI G, NAITANA S, PAU S. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction Nutrition and Development**. Nouzilly. v. 42, p. 265-273, 2002.
- BOLAMBA D, RUSS KD, DURRANT BS. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**. Los Altos. v. 49, p. 933-942, 1998.
- BOLAMBA D, RUSS KD, OLSON MA, SANDLER JL, DURRANT BS. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**. Los Altos. v. 58, p. 1689-1703, 2002.
- BOLAMBA D, RUSS KD, HARPER SA, SANDLER JL, DURRANT BS. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of oocytes *in vitro*. **Theriogenology**. Los Altos. v. 65, n. 6, p. 1037-1047, 2006
- CHOI YH, CARNEVALE EM, SEIDEL GE, SQUIRES EL. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM 199. **Theriogenology**. Los Altos. v. 56, p. 661-670, 2001.
- CONCANNON PW, MC CANN JP, TEMPLE M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. Cambridge. v. 39, p. 3-25, 1989.
- DURRANT BS, PRATT NC, RUSS KD, BOLAMBA D. Isolation and characterization of canine advanced preantral follicles. **Theriogenology**. Los Altos. v. 49, p. 917-932, 1998.
- ENGLAND GCW, VERSTEGEN JP, HEWITT DA. Pregnancy following *in vitro* fertilization of canine oocytes. **Veterinary Record**. London. v. 148, p. 20-22, 2001.
- EPPIG JJ, SCHROEDER AC. Culture systems for mammalian oocyte development progress and prospects. **Theriogenology**. Los Altos. v. 27, p. 267-279, 1986.
- FARSTAD W, HYTTEL P, GRONDAHL C, KROGENAES A, MONDAIN-MONVAL M, HAFNE AL. Fertilization *in vitro* of oocytes matured *in vivo* in the blue fox (*Alopex lagopus*). **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. Cambridge. v. 47, p. 219-226, 1993.
- FARSTAD W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**. Los Altos. v. 53, p. 175-186, 2000.

- FENG HL, WENG XH, ZHANG RC. *In vitro* fertilization of Raccoon Dog (*Nyctereutes procynoides* Gray). **Theriogenology**. Los Altos. v.43, n. 1, p. 211, 1995. Abstract.
- FRESHMY RI. Serum-Free Media. In: **Culture of animal cells. A manual of basic Techniques**. Chapter 9. 4th ed. 2000.
- 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. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 62, n. 3, p. 305-307, 2000.
- GÓMEZ MC, POPE CE, GIRALDO A, LYONS LA, HARRIS RF, COLE A, GODKE A, DRESSER BL. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. **Cloning and Stem Cells**. v. 6, n. 3, p. 247-258, 2004.
- GOODROWE KL, HAY M, KING WA. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 45, p. 466-470, 1991.
- GORDON IR. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. Biotechnology in Agriculture Series, n. 27, 2nd edition, CABI Publishing, 2003.
- HANNA CB, WESTHUSIN ME, KRAEMER DC. The effects of ECG and Estradiol on canine oocytes during *in vitro* maturation. Proceedings of the annual conference of IETS, Portland, Oregon. v. 16, n. 12, p. 275, 2004.
- HEWITT DA, ENGLAND GCW. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. **Journal of Reproduction and Fertility** Supplement. Cambridge. v. 51, p. 83-91, 1997.
- HEWITT DA, ENGLAND GCW. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. **Theriogenology**. Los Altos. v. 49, p. 957-966, 1998.
- HEWITT DA, WATSON PF, ENGLAND GCW. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**. Los Altos. v. 49, p. 1083-1101, 1998.
- HEWITT DA, ENGLAND GCW. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**. Amsterdã. v. 55, p. 63-75, 1999a.
- HEWITT DA, ENGLAND GCW. Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. **Veterinary Record**. London. v. 144, p. 237-239, 1999b.
- HIRAO Y, ITOH T, SHIMIZU M, IGA K, AOYAGI K, KOBAYASHI M, KACCHI M, HOSHI H, TAKENOUCI N. *In vitro* growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone

concentration in culture medium. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 70, p. 83-91, 2004.

HISHINUMA M, MINAMI S, OKAMOTO Y, MIYATAKE K, SEKINE J. Recovery, morfological quality, and *in vitro* maturation of follicular oocytes from bitches with piometra. **Theriogenology**. Los Altos. v. 62, p. 1652-1662, 2004.

ISANCHENCO VV, OSTASHKO FI, ISACHENKO EF, SOLER C, PEREZ F. Effect of heat-inactivated and non-inactivated estrous cow sera on maturation of bovine oocytes. **Journal of Endocrinology Supplement**. v. 140, p. 212, 1994.

JOHNSTON LA, O'BRIEN SJ, WILDT DE. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. **Gamete Research**. v. 24, n. 3, p. 343-356, 1989.

KIM MK, FIBRIANTO YH, OH HJ, JANG G, KIM HJ, LEE KS, KANG SK, LEE BC, HWANG WS. Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 5, n. 3, p. 253-258, 2004.

KIM MK, FIBRIANTO YH, OH HJ, JANG G, KIM HJ, LEE KS, KANG SK, LEE BC, HWANG WS. Effects of estradiol-17 β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**. Los Altos. v. 63, p. 1342-1353, 2005.

LEE BC, KIM MK, JANG G, OH HJ, YUDA F, KIM HJ, SHAMIM MH, KIM JJ, KANG SK, SCHATTE G, HWANG WS. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature**. v. 436, n. 4, p. 641-642, 2005.

LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, CRISTER ES, FIRST NL. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 35, p. 850-857, 1986.

LONERGAN P, CAROLAN C, LANGENONCKT AV, DONNAY I, KHATIR H, MERMILLOD P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 54, p. 1420-1429, 1996.

LUVONI GC. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. **Reproduction Nutrition and Development**. Nouzilly. v. 40, p. 505-512, 2000.

LUVONI GC, LUCIANO AM, MODINA S, GANDOLFI F. Influence of different stages of the oestrus cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects of the efficiency of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. Cambridge. v. 57, p. 141-146, 2001.

- LUVONI GC, CHIGIONI S, ALLIEVI E, MACIS D. Meiosis resumption of oocytes cultured in the isolated oviduct. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlin. v. 38, p. 410-414, 2003.
- MAHI CA, YANAGIMACHI R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. **Journal Exp. Zool.** v. 196, p. 189-196, 1976.
- NICKSON DA, BOYD J, ECKERSALL PD, FERGUSON JM, HARVEY MJA, RENTON JP. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. Cambridge. v. 47, p. 231-240, 1993.
- OTOI T, FUJII M, TANAKA M, OOKA A, SUZUKI T. Effect of serum *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction Fertility Development**. Coolingwood. v. 11, p. 387-390, 1999.
- OTOI T, FUJII M, TANAKA M, OOKA A, SUZUKI T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**. Los Altos. v. 54, p. 535-542, 2000a.
- OTOI T, MURAMAKI M, FUJII M, OOKA A, SUZUKI T, UNE S. Development of canine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Veterinary Record**. London. v. 146, p. 52-53, 2000b.
- OYAMADA T, IWAYAMA H, FUKUI Y. Additional effect of epidermal growth factor during *in vitro* maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. **Zygote**. v. 12, p. 143-150, 2004.
- PAULA-LOPES FF, DE MORAES AAS, EDWARDS JL, JUSTICE JE, HANSEN PJ. Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1 β . **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 59, p. 1406-1412, 1998.
- RENTON JP, BOYD JS, ECKERSALL PD, FERGUSON JM, HARVEY MJ, MULLANEY J, PERRY B. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 93, n. 1, p. 221-231, 1991.
- REYES M, LANGE J, MIRANDA P, PALOPMINOS J, BARROS C. Effect of human chorionic gonadotropin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**. Los Altos. v. 64, p. 1-11, 2005.
- REYNAUD K, FONTBONNE A, MARSELLO N, DUMASY M, CHASTANT-MAILLARD S. *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**. Cambridge. v. 130, n. 2, p. 193-201, 2005.

- RODRIGUES BA, RODRIGUES JL. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlim. v. 38, p. 58-62, 2003a.
- RODRIGUES BA, RODRIGUES JL. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. **Theriogenology**. Los Altos. v. 60, p. 59-66, 2003b.
- RODRIGUES BA, DOS SANTOS LC, RODRIGUES JL. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken. v. 67, p. 215-223, 2004.
- RODRIGUES BA, RODRIGUES JL. Effect of two temperatures on *in vitro* nuclear maturation of bitch oocytes: relation to time culture intervals. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. Niteroi. v. 11, p. 37-39, 2004.
- SAEKY K, HOSHI M, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, FIRST NL. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 44, p. 256-260, 1991.
- SAINT-DIZIER M, RENARD JP, CHASTANT-MAILLARD S. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility** Supplement. v. 121, p. 97-105, 2001.
- SAINT-DIZIER M, REYNAUD K, CHASTANT-MAILLARD S. Chromatin, microtubules, and kinases activities during resumption in bitch oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. Hoboken. v. 68, p. 205-212, 2004.
- SALUSTRI A, PETRENGARO S, DE FILICI M, CONTI M, SIRACUSA G. Effect of follicle stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse *cumulus* cells enclosed oocytes cultured *in vitro*. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 33, p. 797-802, 1985.
- SCHELLANDER K, FUHRER F, BRACKETT BG, KORB H, SCHLEGER W. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. **Theriogenology**. Los Altos. v. 33, p. 477-485, 1990.
- SIRARD MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**. Los Altos. v. 55, p. 1241-1254, 2001.
- SMITZ J, NOGUEIRA D, ALBANO C, CORTVRINDT R, DEVROEY P. Improving *in vitro* maturation of oocytes in the human taking lessons from experiences in animal species. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlim. v. 36, p. 11-17, 2001.

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

SONGSASEN N, WILDT DE. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. **Molecular Reproduction Development**. Hoboken. v. 72, n. 1, p. 113-119, 2005.

SRSEN V, KALOUS J, NAGYOVA E, SUTOVSKY P, KING WA, MOTLIK J. Effects of follicle-stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes *in vitro*. **Zygote**. v. 6, p. 299-309, 1998.

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

WILLINGHAM-ROCKY LA, HINRICHS K, WESTHUSIN ME, KRAEMER DC. Effects of stage of oestrus cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. **Reproduction**. Cambridge. v. 126, p. 501-508, 2003.

WOOD TC, BYERS AP, JENNETTE BE, WILDT DE. Influence of protein and hormone supplementation on *in vitro* maturation and fertilization of domestic cat eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge. v. 104, p. 315-323, 1995.

YAMADA S, SHIMAZU Y, AWAJI H, NAKAZAWA M, NAITO K, TOYODA Y. Maturation, fertilization and development of dog oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**. Champaign. v. 46, p. 853-858, 1992.

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

YOUNIS AI, BRACKETT BG, FAYRER-HOSKEN RA. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Gamete Research**. v. 23, n. 2, p. 189-201, 1989.