

MAYRA FONSECA ZERLOTINI

DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM FRAGMENTOS OVARIANOS DE CADELAS  
(*Canis lupus familiaris*) CULTIVADOS EM MEIOS “MEM” SUPLEMENTADO COM  
SORO DE CADELA NO PROESTRO E CADELA GESTANTE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magíster Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Z58d  
2016  
Zerlotini, Mayra Fonseca, 1986-  
Desenvolvimento folicular em fragmentos ovarianos de  
cadelas (*Canis lupus familiaris*) cultivados em meios “MEM”  
suplementado com soro de cadela no proestro e cadela gestante /  
Mayra Fonseca Zerlotini. – Viçosa, MG, 2016.  
xi, 38f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Tarcizio Antônio Rêgo de Paula.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.25-37.

1. Reprodução animal. 2. Cão - Reprodução. 3. *Canis lupus familiaris*. 4. Estro. 5. Ovários. 6. Folículos - Desenvolvimento.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.7

MAYRA FONSECA ZERLOTINI

DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM FRAGMENTOS OVARIANOS DE CADELAS  
(*Canis lupus familiaris*) CULTIVADOS EM MEIOS “MEM” SUPLEMENTADO COM  
SORO DE CADELA NO PROESTRO E CADELA GESTANTE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magíster Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2016

---

José Domingos Guimarães

---

Antônio Carlos Csermak Júnior

---

Tarcízio Antônio Rego de Paula  
(Orientador)

Dedico este trabalho a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e tanto me incentivaram para que eu pudesse realizá-los, meus queridos pais, Adhemar e Gal.

“Não há progresso sem esforço, vitória sem luta, aperfeiçoamento sem sacrifício, assim como não existe tranquilidade sem paciência.”

**(Chico Xavier)**

## AGRADECIMENTOS

Neste momento muito especial, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a chegar até aqui.

Aos meus pais, Adhemar e Maria das Graças, pela minha formação, pelo exemplo de caráter e dedicação à família e ao trabalho. Sem o apoio e incentivo de vocês, posso dizer, sem dúvidas que seria impossível a realização do meu sonho. Agradeço ainda, pela alegria e amor incondicional em todos os momentos. Não há palavras suficientes pra expressar a minha gratidão.

Aos meus irmãos Neto e Felipe, aos meus sobrinhos, Lelezinha e Lufe e à minha cunhada Virgínia. Grata pelo amor, carinho, amizade, dores e alegrias compartilhadas. E peço desculpas pelos inúmeros momentos de ausência.

Aos meus familiares que sempre estiveram por perto e sempre me fazem cada dia mais feliz, tios, primos e agregados. Aos meus avós paternos (*in memoriam*) e minha querida Vó Ivone que se faz presente em cada momento da minha vida. Todos vocês me proporcionam sempre bons momentos.

Aos meus dogs amigos e queridos, Nix e Ogum; Yusha e Any (*in memoriam*), que me ensinaram o verdadeiro sentido do amor incondicional e ainda pela companhia naqueles momentos em que, pessoas especiais nem sempre se faziam presentes!

Ao meu orientador, Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula, não só pela oportunidade de trabalho, mas pelo exemplo de profissionalismo, simplicidade, amor aos animais, paciência e persistência. Sou grata pela sua orientação, amizade, disponibilidade e por ter acreditado na minha capacidade, mais do que eu mesma.

À Profa. Moema Lopes, pela preciosa colaboração e coorientação (mesmo que não oficial). Por me colocar para frente nos momentos de tensão e me contagiar com seu entusiasmo pela pesquisa, sempre com profissionalismo e gosto pela ciência. Obrigada pelo carinho e amizade!

À todos os colegas de laboratório, Vini, Milene, Soraia, Nandinha, Letícia, Lina, Marcelo, Moema, Leanes, Grazi, Luana e Gê e aos estagiários Rebecca, Jorge e Gabi. Agradeço pelo esforço, disponibilidade, apoio, entusiasmo e atenção dedicados. Principalmente pelos divertidos dias de trabalho e confraternizações. Grata também pelas amizades que surgiram durante este árduo período.

Ao Prof. Cláudio Fonseca pela valiosa colaboração nos trabalhos, sendo solícito sempre que precisei. A sua gentileza, atenção e confiança fizeram a diferença.

Ao Dr Antônio Carlos Csermark pela disponibilidade e boa vontade em participar da qualificação deste documento, pelos esclarecimentos e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. José Domingos, pela dedicação e enriquecimento do meu conhecimento.

Ao Prof. Oswaldo, pela amizade e confiança, sempre me dando conselhos importantes.

Às Pós graduandas Milene, Moema e Soraia pelo valioso auxílio na construção e formatação deste documento.

Aos demais membros do REPAAS, que não estão presentes atualmente, mas que foram de fundamental importância para meu crescimento. Agradeço a colaboração, atenção e apoio concedidos. Obrigada pelos ensinamentos, convívio e cooperação.

A todos os animais e amigos que convivi no CETAS-UFV, vocês foram importantes e contribuíram para realização de um sonho em poder trabalhar de perto com animais silvestres.

Ao Laboratório de Biologia Estrutural, da Universidade Federal de Viçosa por ceder o espaço e equipamentos para realização de parte das análises. Grata ao Prof. Sérgio da Matta pela dedicação e atenção.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa por ceder o espaço e equipamentos para a realização das técnicas histológicas. Grata às técnicas de laboratório Aurora e Patrícia e demais professores e pós graduandos.

Às minhas primas e amigas Júlia, Camila, Tay e Paula, pelo carinho, apoio e boas risadas.

Aos amigos de longa data Bella, Hrick e João, que, apesar da distância, se fazem presentes nas conversas de incentivo. Agradeço pelos momentos divertidos proporcionados por vocês!

Às amigas da Turma QB\* pelo incentivo e torcida.

Aos amigos que conheci em Viçosa, que têm me acompanhado e me apoiado nessa jornada. Muitos de vocês estão ao meu lado desde o início da minha carreira acadêmica. Nem sei por onde começar a falar da importância que cada um de vocês representa em minha vida. Grata pelos diálogos, companheirismo e carinho.

À Sociedade Protetora dos Animais de Viçosa (SOVIPA), Sônia e Paula Rita, por terem disponibilizado os animais para realização das cirurgias de castração para obtenção do material para o experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida durante o período do mestrado.

Agradeço a Deus, pela vida. Pelos dias de chuvas e ainda pelos dias de Sol, ambos

existem por serem suas criações, e Ele não criaria nada que não tivesse sua utilidade.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho, agradeço de coração. Sem a colaboração de todos vocês com certeza a finalização dessa dissertação seria bem mais difícil! Muito obrigada!!!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	ix
<b>RESUMO.....</b>	x
<b>ABSTRACT.....</b>	xi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	3
2.1. O cão doméstico.....	3
2.1.1. Interação homem X cão doméstico.....	4
2.2. Biotécnicas reprodutivas.....	4
2.3. Fisiologia da cadela.....	5
2.4. Oogênese e desenvolvimento folicular.....	7
2.4.1.Folículos poliovular ou multi ovócitos (MOFs) .....	9
2.5. Utilização de hormônios.....	10
2.6. Classificação e desenvolvimento dos folículos.....	11
2.7. Cultivo ovocitário.....	13
2.8. Estado atual do cultivo ovocitário e perspectivas futuras.....	14
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	15
3.1. Local de execução e coleta de material .....	15
3.2. Protocolo experimental.....	15
3.3. Processamento e análise histológica ovariana.....	16
3.4. Análise estatística.....	17
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	17
4.1. Aspectos descritivos.....	17
4.2. Aspectos quantitativos.....	20
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	25
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvios padrão do percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento (folículos primário e secundário) em fragmentos ovarianos de cadelas, em diferentes meios de cultivo.....	22
Tabela 2. Médias e desvios padrão do percentual de folículos primordiais, primário e secundário em fragmentos ovarianos de cadelas, em diferentes meios de cultivo .....	22

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Cordões de células epitelioides dentro do estroma ovarino de cadelas .....	18
Figura 02. Folículos poliovular ou multi ovócitos (MOFs) na córtex ovariana de cadelas .....	29
Figura 03. Folículo primário (A) e folículo terciário (B) em ovário de cadela .....	20

## RESUMO

ZERLOTINI, Mayra Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016.  
**DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM FRAGMENTOS OVARIANOS DE CADELAS (*Canis lupus familiaris*) CULTIVADOS EM MEIOS “MEM” SUPLEMENTADO COM SORO DE CADELA NO PROESTRO E CADELA GESTANTE** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Avaliou-se o uso de diferentes protocolos de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos de cadelas domésticas adultas em anestro, em casuística de programa de controle populacional de animais errantes no município de Viçosa MG. Após a colheita dos ovários, foram obtidos fragmentos da zona parenquimatosa de cada ovário, um dos quais foi incluído fresco como controle, e os demais incubados por 48 horas em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de umidade relativa e temperatura de 39 °C, em diferentes tratamentos: T1: cultivados em Meio Essencial Mínimo (MEM); T2: cultivados em MEM associado a Soro de Cadela prenhe (MEM + SCpre) e T3: cultivados em MEM associado a Soro de Cadela no pró-estro (MEM + SCpro). Todos os fragmentos foram fixados por imersão em solução de Karnowsky por até 24 horas e processados segundo rotina para confecção de lâminas histológicas. Estas foram avaliadas quanto ao desenvolvimento folicular, sob microscópio de luz, em aumento de 100 vezes. A análise estatística foi feita pelo teste paramétrico de comparação de médias T Student. Todos fragmentos cultivados apresentaram aumento na proporção de folículos em desenvolvimento, assim conclui-se que o meio de cultivo utilizado associado à técnica de cultivo *in situ* foi suficiente para promover o desenvolvimento folicular em ovários de cadelas, sendo que a suplementação hormonal com SCpro e SCpre não influenciaram na taxa de desenvolvimento.

## ABSTRACT

ZERLOTINI, Mayra Fonseca, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **FOLLICULAR DEVELOPMENT IN OVARIAN FRAGMENTS OF FEMALE DOGS (*Canis lupus familiaris*) CULTIVATED IN “MEM” SUPPLEMENTED WITH PROESTRUS DOG SERUM AND PREGNANT.** Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

This present study evaluated different protocols of *in vitro* culture from ovarian fragments of domestic female dog (*Canis lupus familiaris*) in anestrus. For the study, ovaries from female dogs were used, obtained from the neutering of the stray animal population control of the municipal kennel program/ Veterinary Department - Universidade Federal de Viçosa (UFV). After the ovaries were collected, random fragments of the ovary parenchymal were obtained, one of them were used fresh as control, and the rest were incubated for 48 hours in 5 % of CO<sub>2</sub> atmosphere, 95 % of relative humidity and 39 °C temperature, in different treatments: T1 cultivated in Minimum Essential Medium (MEM); T2 cultivated in MEM associated with pregnant dog serum and T3 cultivated in MEM associated with proestrus dog serum. Those ovaries cultivated in treatments T1, T2 and T3, were fixed by Karnowsky immersion for up to 24 hours, and processed following the normal laboratorial procedures for making histological slides. They were then evaluated under light microscope, using the 100X objective lens. The statistical analysis was made by the Student T's parametric comparison measures test. All fragments of assessed ovaries showed a proportional increase of developing follicles, concluding that the culture medium used, associated to the *in situ* culture technique, was enough to promote the follicle development in dog's ovaries, being that the hormonal supplementation with proestrus serum and pregnant serum did not influence the development rate.

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse nos cães e o conhecimento de suas particularidades reprodutivas aumentaram, pois, além desses animais serem de companhia, são utilizados como modelos experimentais para outras espécies de canídeos e para o homem. Cerca de 10 a 30 anos atrás, os estudos realizados sobre a reprodução da espécie canina baseavam-se apenas na transferência de conhecimentos em outras espécies, porém muitos aspectos da fisiologia reprodutiva e do desenvolvimento embrionário em cães diferem dos modelos clássicos (CONCANNON e VERSTEGEN, 2005).

O interesse pela utilização das biotécnicas de reprodução por parte de criadores e proprietários de cães das mais variadas raças, a fim de obter progênes de cães de grande valor genético ou afetivo, que por alguma eventualidade encontram-se impossibilitados de se reproduzirem pela monta natural. O aprimoramento das técnicas de produção *in vitro* de embriões também se faz necessário para atender a demanda do mercado profissional veterinário de animais de companhia (SANTOS, 2005).

As biotécnicas reprodutivas têm sido desenvolvidas em carnívoros domésticos para a melhoria do desempenho reprodutivos desses, bem como para modelos experimentais para animais silvestres com algum grau de ameaça. As pesquisas nessa área representam potenciais contribuições para o estudo dos mecanismos básicos envolvidos na maturação, conservação e na interação entre os gametas. O ovário dos mamíferos possui grande reserva de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais que representam uma fonte potencial para a utilização desses na produção *in vitro* de embriões, transgenia e clonagem, porém, a grande maioria desses folículos irá involuir pelo processo natural de atresia (CELESTINO et al., 2009).

O aprimoramento das técnicas de produção *in vitro* de embriões caninos proporcionará incremento no aporte de informações científicas para projetos na área da transferência nuclear, tornando possível o nascimento de maior número de animais clone caninos, a exemplo do que já ocorre atualmente na espécie bovina e ovina (SANTOS, 2005).

A maturação de ovócitos *in vitro*, tem como objetivo reproduzir as condições fisiológicas requeridas durante o desenvolvimento pré-ovulatório do folículo ovariano e na tuba uterina após a ovulação *in vivo* (LUVONI, 2003). Especificamente os estudos em maturação ovocitária em cadelas apresentam fatores limitantes peculiares uma vez que as características do ciclo estral desta espécie juntamente com a baixa eficiência e pouco

conhecimento em relação aos meios de maturação *in vitro* induzem os índices de maturação e a baixa competência meiótica (WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003). Segundo FARSTAD (2000) na espécie canina, esta técnica ainda não é viável, devido aos baixos índices de maturação nuclear *in vitro* sendo necessária a sincronização das fêmeas para possibilitar melhores épocas de realização da coleta dos ovócitos maturados *in vivo*, por laparoscopia.

Uma etapa crucial para a realização da técnica de transferência nuclear é a maturação dos ovócitos em desenvolvimento 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., 2001; GOODROWE et al., 1991), fato que permite a obtenção de um número considerável de ovócitos para a reconstrução de banco de germoplasma e posterior transferência destes.

Os canídeos são considerados monoéstricos não sazonais, ou seja, apresentam um ou dois ciclos estrais por ano, caracterizados por extenso período de quiescência ovariana (WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003). Nas cadelas domésticas (*Canis lupus familiaris*) essas fases variam de acordo com as raças e idades, sendo influenciada por fatores ambientais e genéticos (FELDMAN e NELSON, 2004).

O ciclo reprodutivo da cadela, também denominado de ciclo estral, apresenta quatro fases bem distintas, denominadas: proestro, estro, metaestro/diestro e anestro (ANDERSEN e SIMPSON, 1973). Essas se caracterizam por alterações hormonais que induzem a transformações morfológicas, clínicas e citológicas nos diferentes segmentos dos órgãos genitais femininos (RODRIGUES e RODRIGUES, 2002).

Em cadelas, ocorre luteinização pré-ovulatória dos folículos, e a concentração plasmática de progesterona aumenta durante o proestro (CONCANNON et al., 1989), diferentemente de outras espécies de mamíferos domésticos, nas quais o estrogênio predomina no ambiente folicular pré-ovulatório (FARSTAD, 2000).

O desenvolvimento do ovócito canino necessita de um período total de 72 horas para retomada da meiose e progressão até metáfase II (MII), incluindo a maturação e fertilização dentro da tuba uterina, em condições fisiológicas *in vivo* (TSUTSUI, 1989; YAMADA, 1992). Cultivos *in vitro* de ovócitos isolados de cadelas, apresentam taxas de maturação que variam de zero a 58 % para retomada da meiose, e em média 20 % para progressão até metáfase II (FARSTAD, 2000).

Esforços têm sido concentrados em estudos que contribuam para uma melhor compreensão dos processos relacionados com o desenvolvimento dos folículos ovarianos,

especialmente na fase inicial. A biotécnica de Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA) surge como uma importante ferramenta para esse estudo, dando suporte necessário para a elucidação dos mecanismos envolvidos na foliculogênese.

Esse trabalho teve como objetivo estabelecer protocolos para cultivos de ovócitos *in situ* em fragmentos ovarianos de cadelas. Visa a avaliação, por meio de quantificação e classificação de folículos primordiais, primários e secundários, da influência do soro de cadela na fase de pró-estro e cadela gestante na maturação folicular *in situ* em fragmentos de ovários.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. O cão doméstico**

A hipótese mais aceita sob o ponto de vista evolutivo é de que o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) tenha se originado como uma sub espécie do lobo (*Canis lupus*), assim, descendente direto do lobo cinzento (WAYNE e VILA, 2001).

Pesquisas baseadas em achados arqueológicos sugerem que o cão doméstico tenha surgido há cerca de pelo menos 12.000 anos, contudo, existem suposições que isto tenha ocorrido de 10.000 a até 15.000 anos atrás. O processo de domesticação provavelmente ocorreu de forma concomitante ao surgimento da espécie, uma vez que os fósseis encontrados destes canídeos estiveram na maioria das vezes associados a fósseis de humanos (GRANDJEAN E VAISSAIRE, 2001; JOHNSTON et al., 2001; SHELLING et al., 2005).

Dentro da ordem Carnívora, uma das mais destacadas famílias é a Canidae à qual se integram 16 gêneros e 36 espécies largamente distribuídas pelo mundo (IUCN, 2004).

#### **2.1.1 Interação homem X cão doméstico**

A população de cães como animais de estimação vem crescendo em número e importância afetiva em todo o mundo. Esse crescente interesse na criação de animais de estimação reflete particularmente na cinofilia especializada (SOUZA et al., 2013).

Na sociedade moderna o termo animal de estimação tem integração familiar, com contato mais próximo ao homem, e o cão é a espécie que mais se destaca nesta convivência. O interesse por todas as áreas de saúde e bem estar caninos cresceu substancialmente nos últimos anos. Porém, a reprodução dos cães ainda não apresenta avanços compatíveis às necessidades do mercado, tais como desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas (ALVES, 2010).

No Brasil, mais de 31 milhões de cães e 15 milhões de gatos fazem a alegria não só de proprietários, mas também de fabricantes de rações, medicamentos e produtos destinados ao mercado pet, uma vez que o movimento anual recente deste mercado, gira em torno de R\$ 12,7 bilhões. O gasto médio de uma família brasileira com seu animal de estimação é de aproximadamente R\$ 800,00 por ano (LAMPERT, 2013). Paralelo a esta realidade, a exploração desenfreada do meio ambiente com conseqüente destruição de ecossistemas está entre as principais ameaças às espécies silvestres, principalmente os canídeos como o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*), a raposa-do-campo (*Lycalopex* sp.) e o cachorro vinagre (*Speothos venaticus*). O aumento populacional desordenado, o desenvolvimento da agricultura, a criação de gado de corte e a demanda por recursos naturais têm desencadeado a perda e a fragmentação dos habitats de inúmeras espécies, promovendo assim o desaparecimento ou o isolamento de populações remanescentes. A destruição contínua de uma extensa área, dividindo-a em um ou mais fragmentos, desencadeia, dentre vários efeitos deletérios, a diminuição da biodiversidade, uma vez que a taxa de extinção se torna maior que a especiação (PRIMACK E RODRIGUES, 2002).

## 2.2. Biotécnicas reprodutivas.

Nos últimos anos, tem-se observado um crescente interesse do mercado cinófilo por biotécnicas reprodutivas que possibilitem maior aproveitamento do material genético de cães com características fenotípicas superiores. O aperfeiçoamento dessas técnicas possibilita, principalmente, aumentar a variabilidade genética das raças caninas atuais, criadas e desenvolvidas sob intensa seleção endogâmica, para fenótipos desejáveis, como estético, comportamental ou habilidades específicas (corrida, pastoreio e agility) (LEPPANEN et al., 2000). A conseqüência prejudicial desse endocruzamento demonstra-se na alta incidência de doenças hereditárias. Mais de 400 doenças geneticamente herdadas foram observadas em diversas raças (PATTERSON, 1993).

Há necessidade de estudos de biotécnicas reprodutivas para otimizar a reprodução destes animais devido à carência de informações.

### 2.3. Fisiologia da cadela

Entre os animais domésticos, o cão apresenta uma biologia reprodutiva incomum. A cadela é monoéstrica, não sazonal, ovulando somente uma a duas vezes ao ano, com intervalos de 5 a 12 meses e possui um período de anestro de 120 dias, sendo submetida a longos períodos de influência progesterônica (JOHNSTON et al., 2001).

O ciclo estral é uma sequência coordenada de alterações ovarianas, útero- vaginais e comportamentais que ocorre nos mamíferos para assegurar o acasalamento, a produção e a fertilização de gametas e o desenvolvimento intrauterino do concepto (JEFFCOAT, 1998). Animais poliéstrais contínuos e não sazonais retornam ao estro a cada três ou quatro semanas quando não gestantes, mas na ocorrência da gestação há um substancial prolongamento devido às necessidades do crescimento intrauterino fetal (JEFFCOAT, 1998). Já na espécie canina a duração dos eventos cíclicos reprodutivos praticamente não se alteram com a presença da gestação pois os níveis de progesterona ainda continuam altos durante o terço inicial da gestação (CONCANNON et al., 1989).

De acordo com Concannon (1989) o ciclo estral das cadelas é dividido em fases distintas e estas se caracterizam por mudanças comportamentais, fisiológicas e hormonais. As fases podem ser identificadas por meio de avaliações comportamentais e análise colpocitológica.

- Anestro compreende um período de dois a dez meses de ausência de atividade reprodutiva, considerando aspectos clínicos, comportamentais e endocrinológicos;
- Pró – estro é caracterizado pelo evidente aumento das concentrações de estrógeno no sangue, incluindo características externas, tais como, atração pelo macho, progressivo aumento e turgidez da vulva e do períneo, descargas vaginais de sangue originadas pela diapedese do útero, esse período pode ser tão breve quanto três dias ou tão longo quanto três semanas, o tempo médio é uma semana;
- Estro é caracterizado por comportamento sexual receptivo ao macho, com reflexo de desvio de cauda e perimindo a monta, este período pode durar dois ou três dias ou pode persistir por três semanas ou mais.

- Metaestro e o diestro são períodos após o estro que estão sob influência da progesterona e sua definição ainda não é um consenso entre os autores pois alguns definem o período inicial pós estro como sendo o metaestro (EVANS e COLE, 1931; ANDERSEN E SIMPSON, 1973) e outros definem toda a fase progesterônica como diestro (MCDONALD, 1969; HOLST e PHEMISTER, 1974).

A fase lútea ou progesterônica, na cadela prenhe termina com o parto. (CONCANNON et al., 1989). Esta forma de apresentação cíclica e o período interestro de cinco a 12 meses fazem com que a fêmea canina seja referenciada na literatura como uma espécie monoéstrica não estacional, com ovulação ocorrendo, portanto, apenas uma ou duas vezes ao ano, entretanto, a interrupção do anestro e as alterações endócrinas relacionadas são eventos ainda não totalmente esclarecidos (CONCANNON et al., 1989; KOOISTRA, 1999).

Sugere-se que o desenvolvimento considerável dos folículos nesta espécie inicia-se aproximadamente 30 dias antes da ocorrência da ovulação, com ondas foliculares anteriores ao proestro (ENGLAND e HEWITT, 1999). Ao final do proestro, a queda da concentração de estradiol ocorre concomitantemente à elevação da concentração plasmática de progesterona, refletindo a maturação e luteinização folicular, vários dias antes da ovulação (FELDMANN e NELSON, 1997). A dominância da progesterona no ambiente folicular pré-ovulatório é característica peculiar e diferencia grandemente os canídeos de outros mamíferos domésticos (LEAVITT et al., 1971; FARSTAD, 2000).

Durante o ciclo estral, no período de transição do proestro e estro, há uma queda acentuada nas concentrações séricas de estrógeno e aumento gradativo nas concentrações séricas de progesterona, o que desencadeia uma onda de LH de 20 a 40 vezes em relação às concentrações prévias, sendo este o evento mais importante do ciclo reprodutivo da cadela, considerado como referência para os demais eventos (CONCANNON et al., 1977).

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

pré-ovulatória de LH). O exame citológico é de fácil realização, porém não determina o dia da ovulação (ENGLAND e CONCANNON, 2002).

Na espécie canina, a particular ciclicidade reprodutiva, o longo período de ovulação, a ovulação de ovócitos não maduros e sob influência de crescentes concentrações de progesterona e a maturação ovocitária intratubárica, são citados como alguns dos aspectos relacionados à fisiologia que podem ser referenciados como obstáculos para a reprodução *in vitro* nesta espécie.

#### 2.4. Ovogênese e desenvolvimento folicular

O folículo ovariano é considerado a unidade morfofuncional dos ovários dos mamíferos, responsável por promover um ambiente adequado para o crescimento e maturação do ovócito (GOSDEN et al., 1993).

O ovócito dos canídeos é único em suas características de desenvolvimento, quando comparado às diferentes espécies animais, atualmente estudadas. Sob aspectos gerais, os ovócitos imaturos são células diploides que iniciam o processo de mitose quando migram do saco vitelínico embrionário para o local de desenvolvimento gonadal, onde são denominados ovogônias (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994).

Em caninos, a formação da ovogônia pode ser reconhecida em fetos com 42 dias (pós-coito). Durante a fase final da gestação os lóbulos e cordões corticais ovarianos são compostos exclusivamente por ovogônias e células precursoras das células foliculares, e ao nascimento (63 dias após a fecundação) é comum a presença de ovogônias em mitose e ovogônias em degeneração (JEFFCOAT, 1998).

Os ovócitos primários são circundados por uma camada de 4 a 8 células foliculares, de formato pavimentoso, formando os folículos primordiais, iniciando assim a foliculogênese (FIGUEIREDO et al., 2008). Após a formação dos folículos primordiais, alguns podem ser estimulados a crescer imediatamente ou, na maioria destes, as células foliculares param de se multiplicar e entram num período de quiescência até receberem sinais para entrar no pool de crescimento (McGEE e HSUEH, 2000). Os ovócitos primários inclusos nesses folículos encontram-se na fase de prófase I da meiose. A progressão da divisão meiótica ocorre somente na puberdade, com a liberação do pico pré-ovulatório de FSH e LH, originando assim os ovócitos secundários ocorrendo uma nova parada, da meiose na fase de metáfase I. A

meiose será retomada somente após a penetração do ovócito pelo espermatozoide, originando o zigoto fecundado, marcando assim o fim da ovogênese (FIGUEIREDO et al., 2008).

O desenvolvimento dos folículos pré - antrais é caracterizado pela fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância do folículo pré-ovulatório. Os ciclos de recrutamento ocorrem em ondas e são acompanhados da seleção dos folículos pré - antrais, variando entre animais e de acordo com a espécie (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Em cadela, ovócitos ovulados medem  $82,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$  e apresentam-se em estado imaturo, na prófase da meiose I, ainda em estado de vesícula germinativa (VG), sendo também denominados ovócitos primários, não podendo, portanto, ser fecundados imediatamente após sua liberação (ENGLAND e CONCANNON, 2002).

A ativação do crescimento dos folículos em bovinos é caracterizada pela aquisição de uma camada completa de 11 a 20 células cubóides da granulosa, em torno do ovócito (FAIR, 2003). Na transição de folículos primordiais até secundários, os fatores derivados dos ovócitos (Ex.: Activina, Proteína morfogenética óssea (BUKOVSKY et al., 2005), Fatores de crescimento de fibroblasto, epidermal, diferencial (YOSHINAGA et al., 1993) e semelhante à IGF - 1 (MOORE e PERSAUD, 2008) e das células da granulosa (Ex.: Neurotrofina (FAIR, 2003), Andrógenos, Fator esteroideogênico (MOORE e PERSAUD, 2008), Fator de crescimento neural, semelhante à insulina (MOORE e PERSAUD, 2008) e epidermal) são responsáveis pela indução ou inibição do desenvolvimento dos folículos/ovócitos. Os mecanismos responsáveis pelo crescimento dos ovócitos/ folículos pré-antrais são ainda pouco conhecidos (FAIR, 2003; McNATTY et al., 1999; McNATTY et al., 2000; VAN DEN HURKE ZHAO, 2005).

O ovócito em estágio de vesícula germinativa (VG) completa a primeira divisão meiótica no período de 48 a 72 horas após a ovulação e permanece apto à fecundação por aproximadamente 108 horas (YAMADA, 1992). Os ovócitos em estágio de VG, após a ovulação requerem de dois a cinco dias para completar a maturação (OTOI et al., 2000).

Os folículos antrais são caracterizados pela formação de uma cavidade, o antro, que acumula líquido folicular no interior das multicamadas de células da granulosa. A produção deste líquido folicular é intensificada com aumento do tamanho dos folículos. Esse líquido serve como fonte importante de moléculas reguladoras, como as gonadotrofinas, os esteroides, os fatores de crescimento, as enzimas, as proteoglicanas e as lipoproteínas que são derivadas do sangue e das células que integram o folículo (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

#### 2.4.1. Folículos poliovulares ou multi ovócitos (MOFs)

Tradicionalmente, o folículo do ovário é uma unidade morfofuncional contendo uma célula germinal, é rodeado pelas células somáticas dispostas em uma única ou múltiplas camadas, de acordo com estágio de desenvolvimento do folículo. Na maioria dos casos, folículos ovarianos contém apenas uma célula germinal por folículo, e esta é a regra para os grandes folículos de animais domésticos. Folículos de ovócitos multi ovulares eram referidos como folículos poliovular, foram relatados ocorrendo em cadelas, coelhas e gatas, embora de significado ainda obscuro. De acordo com relatos anteriores, MOFs são mais frequentemente observadas em recém-nascidos e em animais jovens do que em animais adultos. (PAYAN-CARREIRA et al., 2008)

A origem de MOF é desconhecida. Tem sido proposto que pode derivar a partir de falha desagregação de células germinativas durante as fases iniciais de foliculogeneses, ou que a sua taxa de desenvolvimento é mais rápida do que a diferenciação das células somáticas circundantes, por conseguinte, resultando em a inclusão de várias células germinativas no interior de um folículo (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Na região externa do córtex do ovário, grande número de folículos primordiais se apresentam dispostos em ninhos ou estruturas em forma de cordão e menor número de folículos primários e secundários, e MOFs são facilmente perceptíveis (McDOUGALL et al., 1997). A prevalência MOFs mostra uma tendência a diminuir com a idade, como reportadas pelos autores McDougall et al., (1997) e Bristol-Gould e Woodruff (2006), isso parece ser particularmente verdade para animais idosos com mais de 8 anos de idade. Frequentemente encontra-se um animal que mostra diferentes tipos de MOFs, que pode conter de dois a cinco ou mais ovócitos por folículo. Adicionalmente, MOFs foram retirados em ambos os ovários. De acordo com Telfer e Gosden (1987) a probabilidade de observar MOF pré-antrais com mais do que cinco células germinais é remota, em comparação com a probabilidade de encontrar MOFs contendo dois a três oócitos. A hipótese é de que exista relação entre o potencial de prevalência MOF e a prolificidade, uma vez que a frequência de ocorrência é particularmente elevada em cadelas mestiças, que são geralmente muito mais férteis.

## 2.5. Utilização de hormônios

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

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

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

A indução do cio na cadela em anestro são práticas exógenas que tentam mimetizar as condições requeridas para o início do desenvolvimento folicular, assim essas técnicas deram resultados promissores mas a aplicação clínica das mesmas é limitada, outra alternativa disponível é a combinação de um composto estrogênico dietilestilbestrol (DES) e uma gonadotrofina (BOUCHARD et al., 1993). Combinação de Dietilestilbestrol (DES), Hormônio Luteinizante (LH) e Hormônio Folículo Estimulante (FSH) apresentou bastante êxito em induzir o estro em cadelas de corrida aposentadas da raça Greyhound (MOSES e SHILLE, 1988). Infelizmente, o composto LH não está mais disponível e os resultados foram desanimadores quando a gonadotrofina coriônica humana foi substituída pelo LH. Previamente, uma combinação de DES e FSH foi avaliada em fêmeas mestiças com ciclo mistos com resultados modestos (BOUCHARD et al., 1991). O FSH tem ação farmacológica prolongada que pode interferir com o processo de indução do estro. Esse tem sido apontado

como hormônio fundamental no meio de cultivo, por apresentar atividades como a regulação da expressão de diversos fatores de crescimento que, por sua vez, participam da ativação e do crescimento folicular. Todos esses eventos são imprescindíveis para a obtenção de ovócitos competentes durante o cultivo *in vitro*. Além disso, esse hormônio promove a proliferação das células da granulosa, a formação do antro e a inibição da atresia folicular (CALIMAN, 2014).

## 2.6. Classificação e desenvolvimento dos folículos

A classificação dos folículos baseia-se nas camadas de células da granulosa, pelas quais o ovócito encontra-se envolvido (YAMADA, 1992; NICKSON, 1993 e DURRANT, 1998). Os folículos primordiais possuem ovócitos circundados por uma camada de células da granulosa pavimentosa ou pavimentosa - cuboidal. Os folículos primários possuem uma única camada de células da granulosa, cuboidal ao redor do ovócito. Já os folículos secundários apresentam duas ou mais camadas de células da granulosa, cuboidais ao redor do ovócito, esses são considerados folículos préantrais, pois não há formação do antro (HULSHOF, 1994).

Uma das funções das células do cumulus é transferir aporte nutricional ao ovócito, mecanismo este de fundamental importância para a espécie canina, pois as células do cumulus mantêm-se ligadas ao zigoto até o estágio de mórula, manter as camadas de células do cumulus é vital para o desenvolvimento dos ovócitos e futuros embriões caninos (NICKSON, 1993).

Hewitt e England (1997) relataram que também é possível classificar os complexos cumulus ovócitos (CCO) em três graus distintos, em que grau I apresenta pigmentação escura e com uma ou mais camadas de células do cumulus; grau II apresenta pigmentação clara com camada incompleta de células do cumulus e grau III apresenta coloração pálida, sem formato definido e sem células do cumulus aderidas, são considerados ovócitos degenerados.

A primeira função dos fatores de transcrição derivados do ovócito é coordenar o desenvolvimento do folículo primordial. A influência do ovócito nas células da granulosa dos folículos pré-antrais pode estabelecer o programa para o desenvolvimento dos folículos antrais, à medida que os hormônios gonadotróficos exercem seus efeitos mais decisivos sobre os folículos (EPPI et al., 2002).

O fator de crescimento dos nervos (NGF) faz parte da família de proteínas das neurotrofinas (NT) (FAIR 2003; ALBERTS et al., 2004; HAFEZ 2004) que estão envolvidas na sobrevivência e diferenciação dos neurônios no sistema nervoso central e periférico. A síntese de NGF nas células da granulosa sugere outra função para as proteínas neurotrofinas no sistema endócrino reprodutivo. O NGF está envolvido no crescimento dos folículos primordiais, independentemente das gonadotrofinas hipofisárias (DISSEN et al., 2001). A expressão do receptor do hormônio folículo estimulante (FSHr) parece ser iniciada a partir dos folículos primários, os quais são responsivos ao FSH, embora os receptores do FSH sejam variáveis neste estágio de desenvolvimento (OKTAY et al., 1997; VAN DEN HURK et al., 1997).

A expressão do NGF (NT-4) nas células da granulosa tem ação regulatória no desenvolvimento dos ovócitos de mamíferos, por atuarem nos receptores da tirosina quinase B, bem como no desenvolvimento do estroma ovariano, pela interação com o receptor de neurotrofinas (ANDERSON et al., 2002). O silenciamento do gene que codifica o NGF resulta na deficiência do desenvolvimento do ovário, redução do número de folículos e aumento de ovócitos desnudos. O NGF também pode atuar nas células da teca que expressam os receptores tirosina quinase A, aumentando sua proliferação horas antes da ovulação (DISSEN et al., 2000; DISSEN et al., 2001).

Fatores que influenciam o desenvolvimento dos folículos secundários e terciários podem ser derivados dos ovócitos (Ex.: Proteína morfogenética óssea (BUKOVSKY et al., 2005), Fator de crescimento diferencial (YOSHINAGA et al., 1993) e Conexina (YOUNG e McNEILLY, 2010), das células da granulosa (Ex.: Fator de crescimento epidermal, Activina, Folistatina, Inibina) e das células da teca (Ex.: Fator de crescimento epidermal, Proteínas morfogenética óssea e Fator de crescimento semelhante a insulina II) (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Os folículos secundários são responsivos aos hormônios gonadotróficos e podem progredir para o estágio seguinte do desenvolvimento antral, com uma circulação mínima de FSH, mas o hormônio luteinizante (LH) parece ser mais importante para o crescimento dos folículos neste estágio do desenvolvimento, provavelmente porque as células da granulosa apresentam receptores para FSH pouco receptivos. Através dos receptores de LH nas células da teca, o hormônio desencadeia o processo de biossíntese de andrógenos tecais que podem estimular a formação de novos receptores de FSH nas células da granulosa. Deste modo o

FSH pode amplificar seu efeito sobre os folículos secundários (McGEE e HSUEH, 2000; VAN DEN HURK e ZHAO, 2005; YOUNG e McNEILLY, 2010).

## 2.7. Cultivo ovocitário

As pesquisas estão direcionadas para a otimização da taxa de maturação *in vitro* que se assemelham ao ambiente endócrino de maturação do ovócito *in vivo* (HEWITT et al., 1998; HEWITT e ENGLAND, 1999; BOLAMBA et al., 2002). De acordo com OTOI e colaboradores (1999) quando comparado o uso de soro de cadela no estro como componente do meio de cultivo, este, mostrou ser mais eficiente em proporcionar maturação *In vitro* até o estágio de metáfase II em relação ao uso de soro de cadela em anestro e diestro.

O objetivo principal da maturação *in vitro* de folículo ovariano pré-antral (FOPA) é permitir o desenvolvimento folicular assegurando o crescimento e maturação dos oócitos, bem como a multiplicação e posterior diferenciação das células da granulosa inclusas nesses folículos (FIGUEREDO e FREITAS, 2002). O cultivo de ovários tem sido usado para avaliar a importância da vascularização (FORTUNE et al., 2000), apoptose (FLAWS et al., 2001) e fatores de crescimento (ERICKSON, 2001) para desenvolvimento de folículos primordiais (O'BRIEN et al., 2003).

Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos (FORTUNE, 2003). Em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, não é possível utilizar esse modelo. Para esses animais, o cultivo é realizado utilizando-se pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais para avaliar a ativação e crescimento de folículos primários caprinos (SILVA et al., 2004), bovinos (BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997) e humanos (SCOTT et al., 2004; ZHANG et al., 2004).

O cultivo de pequenos fragmentos do córtex ovariano tem a vantagem de manter a integridade estrutural folicular, as interações entre as células e células do estroma, facilitando a perfusão do meio para o tecido ovariano (TELFER, 1996; ABIR et al., 2006).

A composição do meio de cultivo é um importante fator para o sucesso do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos e pode ser influenciada pela adição de diferentes substâncias, incluindo antibióticos, tampões, substratos nutricionais (lipídeos, proteínas, aminoácidos,

ácidos nucleicos, vitaminas, monossacarídeos), diferentes fontes proteicas, antioxidantes e diversos fatores de crescimento (FIGUEREDO et al., 2008). Dentre os meios de cultivo de base comumente utilizados para folículos preantrais, destacam-se o Meio Essencial Mínimo (MEM) simples (MATOS et al., 2007) ou alfa modificado (SILVA et al., 2011), o Meio de Cultivo Tecidual 199 (RAJARAJAN et al., 2006) e McCOY's (TELFER et al., 2008).

## 2.8. Estado atual do cultivo e perspectivas futuras

O estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais encontra-se em notável progresso em várias espécies. Em Gatas (JEWGENOW e STOLTE, 1996), Gambás (BUTCHER e ULLMAN, 1996) e Macacas (FORTUNE et al., 1998) já foi observado o crescimento de folículos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro*, porém sem a formação de antro. Nas espécies bovina (GUTIERREZ et al., 2000; McCAFFERY et al., 2000), ovina (CECCONI et al., 1999), caprina (HUAMIN e YONG, 2000) e humana (ROY e TREACY, 1993), folículos pré-antrais isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram até o estágio antral. Em suínos, folículos secundários crescidos *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (HIRAO et al., 1994), com desenvolvimento até o estágio de blastocisto (WU et al., 2001).

Apesar do grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com as referidas espécies, os resultados mais satisfatórios têm sido observados em animais de laboratório (Eppig e O'Brien, 1996). Os mesmos autores obtiveram o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro*. Entretanto, o rendimento referente à produção de oócitos maduros a partir de folículos pré-antrais é baixo e variável devido à inadequação dos meios de cultivo disponíveis.

O avanço das biotecnologias de reprodução assistida tem despertado grande interesse da comunidade científica no que concerne à preservação de espécies carnívoras ameaçadas de extinção. O desenvolvimento de biotecnologias utilizando animais domésticos filogeneticamente próximos, como modelo experimental, tem ganhado grande destaque. Neste cenário, o cão doméstico vem desempenhando importante papel, permitindo a pesquisa, o aprimoramento e a aplicabilidade dessas tecnologias às espécies silvestres ameaçadas (LUVONI et al., 2003). A perspectiva é de que estas técnicas possam ser facilmente aplicadas em programas de manejo e conservação de espécies silvestres como o lobo Guará

(*Chrysocyon brachyurus*), a Raposa-do-campo (*Lycalopex* sp.), o Cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) e o Cachorro-do-mato-de-orelhas-curtas (*Atelocynus microtis*) (GOBELLO e CORRADA, 2003; LUVONI et al., 2005).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local de execução e coleta de material**

O experimento foi conduzido no Canil Municipal localizado no Departamento de Medicina Veterinária, no Campus da Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa, Minas Gerais. Foram utilizados ovários de sete cadelas adultas, saudáveis, na fase de anestro e provenientes de castrações do programa de controle populacional de animais errantes do Canil Municipal/ DVT – UFV, mediante a autorização da Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV (CEUA) protocolo 94/2014, aprovado em 05/03/2015.

O processamento e as análises das amostras aconteceram no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Pequenos Animais e Animais Silvestres (REPAAS), e as análises histológicas foram feitas no Laboratório de Fisiologia Vegetal no Departamento de Biologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa. As amostras de sangue de cadelas no proestro e cadelas gestantes foram coletadas de animais da casuística de recebimento do Canil Municipal/ DVT – UFV. Os procedimentos clínicos e cirúrgicos foram desenvolvidos

#### **3.2. Protocolo experimental**

Imediatamente após a colheita cirúrgica, os ovários foram lavados com solução salina a 0,9 % previamente à manipulação em ambiente estéril em capela de fluxo laminar. Cada ovário foi seccionado com bisturi circular de 4mm para obtenção de quatro fragmentos

da região parenquimatosa. Um dos fragmentos foi encaminhado imediatamente para processamento histológico e utilizado como controle. Os demais fragmentos foram encaminhados para incubação em ambiente estéril por 48 horas em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de umidade relativa e 39 °C, em três diferentes tratamentos: T1: cultivados em 500 µL de Meio Essencial Mínimo (MEM); T2: cultivados em 500 µL de Meio Essencial Mínimo associado a 150 µL de Soro de Cadela gestante (MEM + SCpre) e T3: cultivados em 500 µL de Meio Essencial Mínimo associado a 150 µL de Soro de Cadela no proestro (MEM + SCpro). Após o cultivo os fragmentos foram encaminhados ao processamento histológico.

Os soros foram obtidos por meio de centrifugação de amostras de sangue, coletados por venopunção da veia cefálica de cadelas adultas, saudáveis, provenientes da casuística de atendimento no Canil Municipal/ DVT – UFV. Estas passaram por uma triagem e as cadelas que foram identificadas na fase de proestro ou gestantes foram selecionadas para colheita de sangue. A identificação da fase do ciclo estral foi realizada por meio de swab intravaginal, exame físico, histórico do animal e palpação transabdominal.

### 3.3. Processamento e análise histológica ovariana

Os fragmentos destinados à histologia foram fixados por imersão em solução de Karnowsky por até 24 horas. O material fixado foi desidratado em passagens sucessivas em soluções de álcool em concentrações crescentes (70 %, 80 %, 90 %, absoluto) por 2 horas, e infiltrados em banhos de resina glicol metacrilato e posteriormente incluídos por adição de catalisador. Foram obtidos cortes histológicos com 4 µm de espessura em micrótomo Spencer® com navalha de aço e corados por imersão em corante azul de toluidina por 20 segundos. Com o auxílio do microscópio óptico em aumento de 10x, foram contabilizados um total de 100 folículos, íntegros e com presença de núcleo visível, nos estágios primordial, primário e secundário, em área contínua da córtex ovariana. Para isso foi utilizada a

classificação histológica preconizada por Hulshof (1994), em que folículo primordial apresenta uma camada de célula da granulosa de forma pavimentosa ou pavimentosa cuboidal; folículos primários possuem uma única camada de células da granulosa cuboidal ao redor do ovócito e o folículo secundário apresenta duas ou mais camadas de células da granulosa, cuboidais ao redor do ovócito.

#### 3.4. Análise estatística

O número de folículos nos diferentes estádios em desenvolvimento e primordial foram analisados quanto a média, desvio padrão e coeficiente de variação, sendo comparadas entre os diferentes tratamentos pelo teste paramétrico de comparação de médias T Student. Os resultados foram considerados significativamente diferentes a 5 % de probabilidade de erro.

### **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### 4.1. Aspectos descritivos

Após o processamento histológico foram examinados ao microscópio de luz. A estruturação histológica ovariana da cadela apresentou características comuns a outras espécies, como a distribuição parenquimatosa em uma camada cortical contendo folículos ovarianos e uma medular ricamente vascularizada, assim como estruturas singulares como a presença de cordões de células epitelioides, dentro do estroma ovariano, descrito apenas em carnívoros domésticos (BACHA et al., 2003) (FIGURA 01). A quantidade volumétrica destas estruturas variou entre os fragmentos de ovários analisados. Segundo Zachary e McGavin (2013), os cordões de células epitelioides podem ser denominados glândulas intersticiais por apresentar características do tipo endócrino.

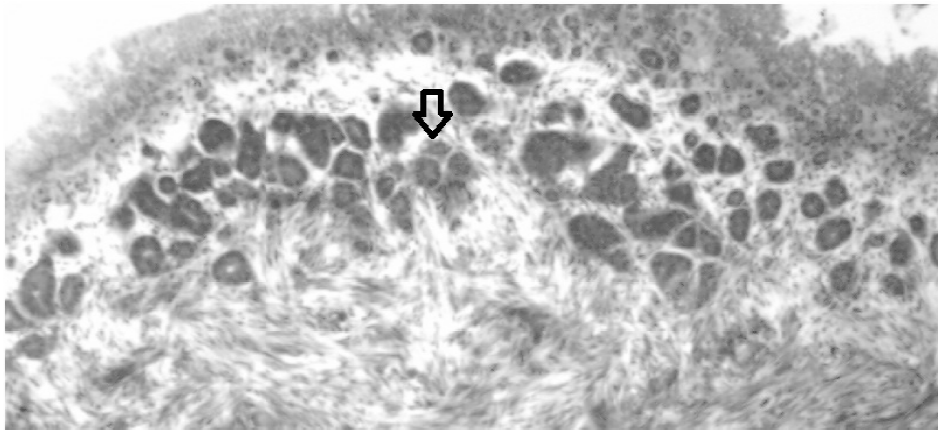


Figura 1: A ponta da seta indica os Cordões de células epitelioides dentro do estroma ovariano de cadelas.

Também, de forma singular, foram observadas a presença de folículos poliovular ou multi ovócitos (MOFs) na córtex ovariana na maioria dos animais estudados (FIGURA 02). Estes MOFs são formados por dois ou mais pequenos oócitos rodeadas por camadas de células da granulosa cubóides e finas, foram também descritas em gatas e coelhas (PAYAN-CARREIRA et al., 2008). Estes autores descrevem que a ocorrência de MOFs é maior em animais jovens decrescendo significativamente com o avançar da idade, e é definida nos primeiros estágios de desenvolvimento folicular, a partir de falhas na separação de células germinativas ou ainda que a taxa de desenvolvimento destas células é mais rápida que a diferenciação das células somáticas circundantes, resultando na inclusão de várias células germinativas no interior de um folículo. A presença das MOFs podem afetar o número de ovócitos recuperados durante aspiração folicular ou influenciar as taxas de ovulação em protocolos de reprodução assistida (PAYAN-CARREIRA et al., 2008).

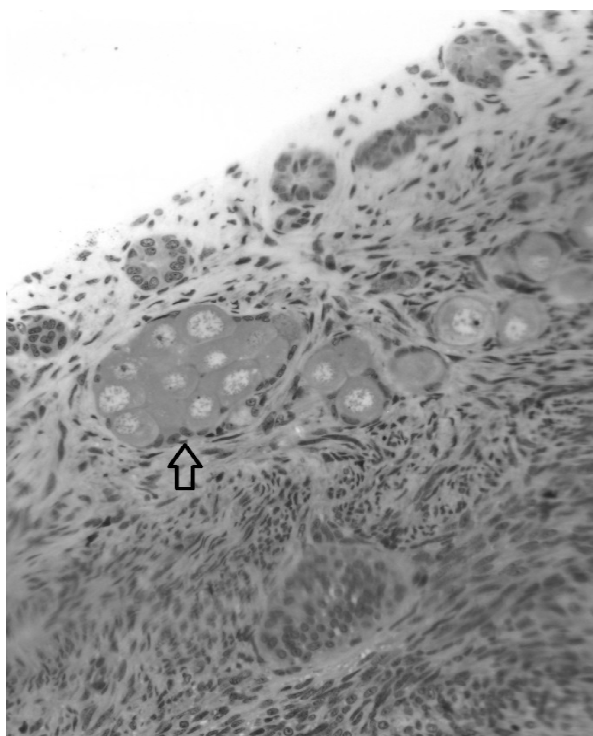


Figura 02. Folículos poliovular ou multi ovócitos (MOFs), na córtex ovariana de cadela

No parênquima ovariano foram observadas a presença de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo que folículos primordiais, primários e secundários frequentemente ocupavam posição mais superficial em relação aos folículos terciários e antrais (FIGURA 03). A partir do desenvolvimento do folículo secundário para terciário estes acumulam o líquido intersticial, passando a ser considerados como antrais. Barnett e colaboradores (2006) relacionam o evento de formação antral à organização das células da granulosa na produção de um fluido folicular contendo água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteroides. A síntese destes hormônios resulta na complexa regulação do desenvolvimento folicular (SKINNER, 2005). Assim todo o processo de desenvolvimento folicular pode ser dividido em uma fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento de folículos primários e secundários, e uma fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários e formação do folículo pré-ovulatório (SILVA et al., 2004a).

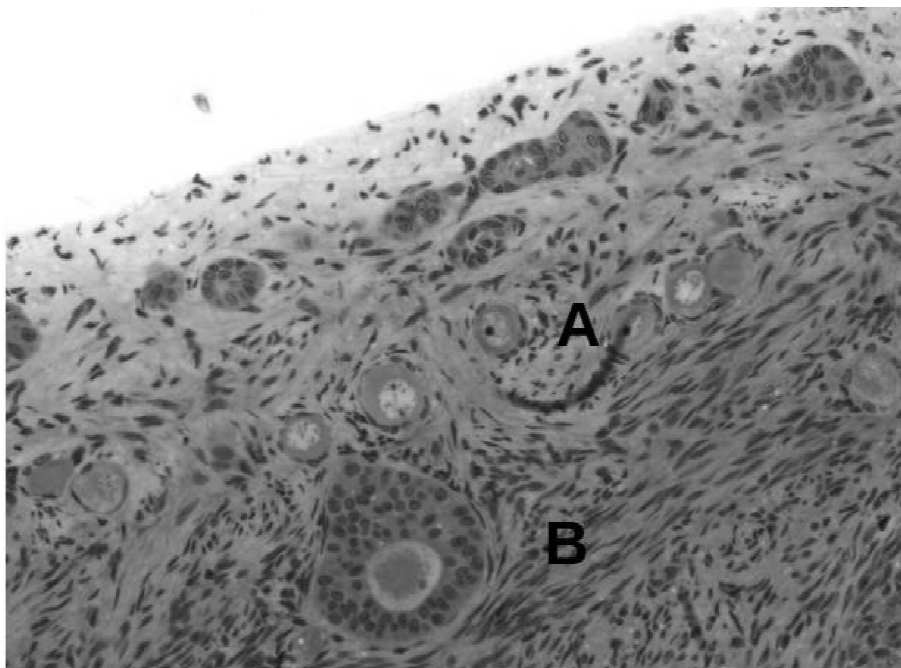


Figura 03. Folículo primordial (A) e folículo terciário (B) em ovários de cadela

#### 4.2. Aspectos quantitativos

Após as 48 horas de cultivo *in situ*, todos fragmentos de ovários avaliados, apresentaram desenvolvimento folicular, ou seja, o número de folículos em desenvolvimento (folículos primários e secundários) aumentaram significativamente em relação ao grupo controle (TABELA 1).

A metodologia mais empregada para o desenvolvimento ovocitário em condições laboratoriais é o cultivo *in vitro* de ovócitos removidos de ovários. Em animais domésticos esta prática é bastante difundida, com resultados variados, visto que vários fatores, que incluem a adição ou remoção de componentes do meio, como proteínas, gonadotropinas, hormônios e fatores de crescimento, fluido e/ou células de oviduto, assim como a seleção ovocitária com base na fase do ciclo estral da fêmea no momento da remoção ovariana, constituem aspectos explorados diferentemente para a maioria dos animais domésticos (RODRIGUES, 2003).

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

Diversos autores buscam avaliar o efeito dos eventos endócrinos pré- ovulatórios *in vivo* sobre os ovócitos da cadela e sua subsequente influência na maturação *in vitro* (HEWITT e ENGLAND 1997; LUVONI, 2000; OTOI et al., 2001; RODRIGUES e RODRIGUES, 2002; SONGSASEN et al., 2002; WILLINGHAM-ROCKY et al., 2003).

A eficácia de um meio de cultivo está vinculada à manutenção da morfologia (FIGUEIREDO et al., 2002); à preservação da viabilidade (JEWGENOW e PITRA, 1993); ao teor de DNA e à expansão do ovócito submetido ao cultivo (NUTTINCK et al., 1996).

Após longo período no interior do folículo, o ovócito deve adquirir competência à fecundação, denominada maturação, processo constituído por um conjunto de modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (SCRIBAN, 1999). De acordo com o mesmo autor, podem-se distinguir três tipos de maturação: a nuclear, que corresponde ao reinício da meiose e expulsão do primeiro corpúsculo polar pelo núcleo do ovócito; a citoplasmática, que é caracterizada pela capacidade do citoplasma descondensar o núcleo do espermatozoide e transformá-lo em pró-núcleo masculino, e a maturação de membrana que permite à zona pelúcida do ovócito reconhecer os espermatozoides de sua espécie. Mimetizar essa experiência *in vitro*, com a reconstituição de todas as etapas que envolvem a maturação *in vivo* dentro do ambiente laboratorial, é um objetivo comum, e uma das metodologias recentemente desenvolvidas, visa o desenvolvimento ovocitário *in situ*, ou seja cultivo de fragmentos ovarianos que poderiam fornecer os fatores necessários para o pleno desenvolvimento folicular e ovocitário.

De acordo com Silva et al., (2006) o cultivo de fragmentos ovarianos *in situ*, é uma estratégia viável para promover o crescimento de folículos primordiais de espécies domésticas e primatas, inclusive a cadela, embora sua fisiologia reprodutiva apresenta-se bastante diferente, dificultando a utilização de meios de cultivos já pré estabelecidos com sucesso em outras espécies.

Observou-se uma evolução do processo de desenvolvimento folicular, que consistiu na diminuição do número de folículos primordiais, com conseqüente aumento do número de folículos em desenvolvimento. Assim, na Tabela 1, pode-se observar que o número médio de folículos primordiais no grupo controle (67,62) reduziu em 65,6, 79,8 e 92,6 % em relação respectivamente aos tratamentos T1, T2 e T3 e o número de folículos em desenvolvimento no grupo controle aumentou 136, 166,7 e 193,4 % em relação aos tratamentos T1, T2 e T3 respectivamente. Porém nenhuma variação significativa foi observada entre os valores médios obtidos nos tratamentos T1, T2 e T3 respectivamente (TABELA 1).

Tabela 1. Médias, desvios padrão e coeficiente de variação da porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento (folículos primário e secundário) em fragmentos ovarianos de cadelas, em diferentes meios de cultivo.

Tratamento	Primordial	CV (%)	Em desenvolvimento	CV (%)
<b>Controle</b>	67,62 ± 10,84 <sup>b</sup>	16,09	32,37 ± 10,88 <sup>a</sup>	33,61
<b>T1</b>	23,25 ± 15,74 <sup>a</sup>	67,5	76,66 ± 15,74 <sup>b</sup>	20,53
<b>T2</b>	13,65 ± 8,92 <sup>a</sup>	65,41	86,34 ± 8,93 <sup>b</sup>	10,34
<b>T3</b>	5,02 ± 4,42 <sup>a</sup>	88,05	94,97 ± 4,42 <sup>b</sup>	4,66

Letras diferentes na mesma coluna representam médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Quando se avalia os diferentes tipos de folículos em desenvolvimento observa-se que o número médio de folículos secundários nos grupos cultivados, embora apresente aumento numérico em relação ao grupo controle, não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ). Já o número médio de folículos primários nos grupos cultivados, aumentou significativamente em relação ao grupo controle (TABELA 2). Assim, as 48 horas observadas de cultivo foram suficientes para que grande número de folículos primordiais iniciassem o seu desenvolvimento independente do meio de cultivo utilizado.

Tabela 2. Médias, desvios padrão e coeficiente de variação da porcentagem de folículos primordiais, primário e secundário em fragmentos ovarianos de cadelas, em diferentes meios de cultivo.

Tratamento	Primordial	CV (%)	Primário	CV (%)	Secundário	CV (%)
<b>Controle</b>	67,62 ± 10,84 <sup>b</sup>	16,09	15,3 ± 5,99 <sup>a</sup>	39,15	17,06 ± 11,13 <sup>a</sup>	65,22
<b>T1</b>	23,25 ± 15,74 <sup>a</sup>	67,5	43,6 ± 13,85 <sup>b</sup>	31,74	33,01 ± 12,80 <sup>a</sup>	38,78
<b>T2</b>	13,65 ± 8,92 <sup>a</sup>	65,41	53,9 ± 11,19 <sup>b</sup>	20,76	32,4 ± 4,28 <sup>a</sup>	13,21
<b>T3</b>	5,02 ± 4,42 <sup>a</sup>	88,05	47,4 ± 16,81 <sup>b</sup>	35,47	47,5 ± 19,57 <sup>a</sup>	41,15

Letras diferentes na mesma coluna representam médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

O meio Minimum Essential Eagle (MEM) foi suficiente para o cultivo *in situ* e desenvolvimento inicial de folículos primordiais. O MEM é composto por 21 aminoácidos essenciais, complexos de vitaminas B, vitaminas C e D e sais inorgânicos. Porém, sabe-se que a composição do meio é um fator de suma importância para o sucesso *in vitro* durante cultura de folículos pré-antrais, e diversos fatores podem ser acrescentado ao meio para favorecer

este desenvolvimento (CALIMAN et al., 2014). A inclusão de hormônios nos meios de cultivo tem como objetivo principal mimetizar o microambiente ao qual o oócito está submetido durante o período de maturação *in vivo* (UCHIVA, 2003).

Segundo CALIMAN et al., 2014 o Hormônio Folículo estimulante humano (hFSH) é capaz de promover a ativação de folículos primordiais e manter a integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in situ* por até sete dias. O FSH tem sido apontado como um hormônio fundamental no meio de cultivo, por apresentar atividades como a regulação da expressão de diversos fatores de crescimento que, por sua vez, participam da ativação e do crescimento folicular. Todos estes eventos são imprescindíveis para a obtenção de ovócitos competentes durante o cultivo *in vitro*, além disso, este hormônio promove a proliferação das células da granulosa, a formação do antro e a inibição da atresia folicular (CALIMAN 2014). De acordo com o mesmo autor, a adição de Fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF- I) ao meio cultivo ativa os folículos em desenvolvimento com um dia de cultivo. Além disso, a utilização de Tiroxina (T4) é eficaz na manutenção da sobrevivência, ativação e crescimento de folículos caprinos cultivados *in situ*, durante sete dias, sendo que a algumas combinações destes fatores em acréscimo ao meio MEM de cultivo, favorecem os aspectos de desenvolvimento folicular e ovocitário *in situ*.

Betteridge et al., (1989) em estudo de cultivo *in vitro* de ovócitos de bovinos e Magalhães et al., (2009) em estudos *in vitro* com cabras, também observaram que a adição de FSH a partir de um dia de cultura promove a ativação folicular, diminuindo a porcentagem de folículos primordiais em comparação com o controle.

Como é sabido, o LH é indispensável para o crescimento final dos folículos e para a maturação completa dos oócitos, na fase antral (MELO et al., 2004). Contudo, seu papel na fase inicial (folículos pré-antrais) não está claramente definida (SALVETTI et al., 2007).

O papel estabelecido pelo estrogênio em iniciar e orientar a foliculogenese na cadela foi sugerido por Richards (1980). O estradiol, aparentemente, habilita o FSH a induzir receptores de LH nas células da granulosa, o que resulta em uma maior responsividade para as concentrações basais de LH, promovendo um crescimento adicional folicular e produção adicional de estradiol. Em última análise, o desenvolvimento dos folículos pré-ovulatórios é sincronizado com a onda de LH por meio do aumento contínuo de estradiol resultante na ovulação (RICHARDS, 1980).

O acréscimo de soro de cadela no pró-estro (SCpro), visou a suplementação de estrógenos que poderiam influenciar o desencadeamento do desenvolvimento folicular *in situ*,

porém, sem a suplementação adicional de FSH e LH, não foram observadas diferenças significativas nas médias de folículos em desenvolvimento em relação ao tratamento não suplementado. Hormônios esteroides participam efetivamente do processo de maturação nuclear ovocitária na medida em que promovem modificações bioquímicas diretas no oócito ou na tuba uterina, esta constatação foi inicialmente descrita por NICKSON et al., (1993) que observaram efeito positivo da adição do soro de cadelas em estro ao meio de maturação em cultivos de ovócitos *in vitro*. OTOI et al., (1999) comparam os efeitos da suplementação com soro de cadelas em estro, metaestro e anestro e verificaram que um número significativo de oócitos atingiu os estágios de metáfase I e II da maturação nuclear em meio contendo soro de fêmeas em estro.

Sabe-se que na cadela, o principal hormônio esteróide envolvido nos mecanismos da ovulação, maturação ovocitária e fertilização é a progesterona, assim, a maturação ovocitária *in vivo* ocorre sob altas concentrações de progesterona, em um microambiente (tuba uterina) previamente modificado por ações estrogênicas (UCHIVA, 2003),

A progesterona exerce um efeito estimulador sobre a síntese de um fator promotor de maturação (MPF) no oócito, responsável pela quebra da vesícula germinativa (SALUSTRI et al., 1993). Evidencia-se, assim, um efeito benéfico da progesterona principalmente nos períodos mais avançados de maturação *in vitro* (UCHIVA, 2003).

De acordo com Concannon, Hansel e McEntee (1977), há uma relação intrínseca entre as concentrações de estrógeno e progesterona durante o ciclo estral na cadela, pois a queda brusca da relação estrógeno - progesterona parece ser a principal responsável pela liberação pré-ovulatória de LH. Desta maneira, o sinergismo existente entre estes dois esteroides no meio de maturação ovocitário pode contribuir tanto para o estímulo direto à célula germinativa como para criar condições propícias à atuação do LH nas células da granulosa (UCHIVA, 2003).

De acordo com Vanucchi (2003) o cultivo de ovócitos de cadela *in vitro* com suplementação de progesterona isoladamente foi benéfica à maturação nuclear até o estágio de metáfase II nas primeiras 48 horas de avaliação. Sabe-se que a síntese de progesterona na cadela ocorre mesmo anteriormente à ovulação, portanto, o soro de cadelas em estro apresenta concentrações elevadas de progesterona e proporcionou os melhores índices de maturação nuclear após 72 horas de cultivo (OTOI et al., 1999). É possível inferir que a progesterona pode acelerar o processo de maturação nuclear dos oócitos de cadela, pois, em

meios de maturação sem hormônios, também foi possível verificar oócitos em estágio de metáfase II porém, somente após 96 horas (UCHIVA 2003).

O acréscimo de soro de cadela prenhe (SCpre), visou a suplementação do meio MEM, com progesterona, para observar o comportamento do desenvolvimento inicial folicular *in situ*, não havendo diferença significativa do desencadeamento ou inibição do desenvolvimento folicular na cadela em relação ao meio suplementado com soro de cadela no pró estro ou no meio MEM.

## 5. CONCLUSÃO

Pode ser concluído que o meio de cultivo utilizado associado à técnica de cultivo *in situ* foi suficiente para promover o desencadeamento do desenvolvimento folicular em ovários de cadelas, sendo que a suplementação hormonal com soro de cadela no pró estro (SCpro) e soro de cadela prenhe (SCpre) não influenciaram na taxa de desenvolvimento.

## 5. REFERÊNCIAS

ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH, A.; FISCH, B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histology and Histopathology*, v. 21, p. 887-898, 2006.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artmed; 2010. 4. Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *AnimReprodSci*2003;78(3/4):203-16. 5. Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução animal*. Barueri: Manole; 2004.

ALVES, K. A. Isolamento e criopreservação de folículos pré-antrais caninos. 2010, 56 f., Dissertação - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2010.

ANDERSEN, A.C. E SIMPSON, M.E. The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). *Geron x Press, Los Altos, In: Journal of Reproduction and Fertility Supplement* v. 39 p. 3-25, 1973.

- ANDERSON RA, ROBINSON LL, BROOKS J, SPEARS N. Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab*; 87(2) 890-7, 2002
- BACHA Jr, W. J.; BACHA, L. M., Atlas colorido de histologia veterinária. 2 ed, Brasil: Roca, cap. 18, p. 355 – 389, 2003.
- BARNETT, K.R., SCHILLING, C., GREENFELD, C.R., TOMIC, D., FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update*, v. 12, p. 537-355, 2006.
- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P.; KING, W. A Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *In vitro*. *Journal of Reproduction & Fertility*, v. 38, p. 87-98, 1989.
- BOLAMBA, D. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology*. Los Altos. V. 58, p. 1689-1703, 2002.
- BOUCHARD , G.F. Oestrus induction in the bitch with the synthetic oestrogen DES. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, n.47, p. 515-516, 1993.
- BOUCHARD, G.F. Oestrus induction in the bitch using a combination diethylstilbestrol and FSH-P. *Theriogenology*, v.36, p. 51-65, 1991.
- BRAW-TAL, R. E YOSSEFI, S. Studies *In vivo* and *In vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fert*, v. 109, p. 165-171, 1997.
- BRISTOL-GOULD S, WOODRUFF TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 66: 5-13, 2006.
- BUTCHER, L. & ULLMANN, S. L. Culture of preantral ovarian follicles in the grey, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8:535-539, 1996.
- BUKOVSKY A, CAUDLE MR, SVETLIKOVA M, WIMALASENA J, AYALA ME, DOMINGUEZ R. Oogenesis in adult mammals, including humans: a review. *Endocrine* 26(3):301-16, 2005.

CALIMAN, S. L. C. hFSH, T4 e IGF-I no desenvolvimento *In vitro* de folículos pré-antrais caprinos., 2014, 223f. (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

CECCONI S, BARBONI B, COCCIA M, MATTIOLI M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. BiolReprod, 60:594–601, 1999.

CELESTINO JJH, MATOS MHT, SARAIVA MVA, Figueiredo JR. Regulation of ovarian folliculogenesis by Kit Ligand and the c-Kit system in mammals. Anim.Reprod, 6:431-439, 2009.

CONCANNON PW, MC CANN JP, TEMPLE M. Biology and Endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. J ReprodFertilSuppl, n.39, p.3-25, 1989.

CONCANNON PW, VERSTEGEN J. Some unique aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary practice. In: World Small Animal Veterinary Association, 30, 2005, Mexico. Proceedings Mexico: WSAVA, p.1-8, 2005.

CONCANNON, P.W.; HANSEL, W.; MCENTEE, K. Changes in LH, Progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. Biology of Reproduction. v. 17, n. 4, p. 604 – 613, 1977.

DISSEN GA, PARROTT JA, SKINNER MK, HILL DF, COSTA ME, OJEDA SR. Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. Endocrinol: 141(12), p. 4736-50, 2000.

DISSEN GA, ROMERO C, HIRSHFIELD AN, OJEDA SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. Endocrinol 142:2078-86, 2001.

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.

ENGLAND GCW, HEWITT DA. Follicular growth and ovulation in dogs. In: EVSSAR Annual Symposium, 1999, Lyon. Proceedings Lyon: EVSSAR, p.51, 1999.

ENGLAND, G.C.W.; CONCANNON, P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.;

LINDE-FORSBERG, C. (Eds.) Recent advances in small animal reproduction. Ithaca:International Veterinary Information Service, 2002.

EPPIG JJ, O'BRIEN MJ. Development *In vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. BiolReprod, 54:197-207, 1996.

EPPIG JJ, WIGGLES WORTH K, PENDOLA FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. ProcNatlAcadSci 99(5):2890-4, 2002.

EVANS, H.M. & COLE, H.H. Na introduction to study of oestrus cycle of the dog. Mem. Univ. Calif, v. 9 p. 65-103, 1931.

FAIR T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. AnimReprodSci 78(3/4):203-16, 2003.

FARSTAD W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. AnimReprodSci, v.60, n.1, p.375- 387, 2000.

FELDMAN EC, NELSON RW. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: Feldman EC, Nelson RW. Canine and feline Derussi e Lopes. Fisiologia da ovulação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial na cadela. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.33, n.4, p.231-237, Oct./Dez. 2009.

FELDMAN EC, NELSON RW. The ovarian cycle & vaginal cytology in the bitch. In: Di Bryden (Ed). Internal medicine. Sydney: The Post-Graduate Foundation in Veterinary Science of the University of Sydney, p.273-288, 1997.

FIGUEIREDO, J.R, RODRIGUES, A.P.R, AMORIM, C.A, SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal, Roca: São Paulo, 2 ed., p.303-327, 2008.

FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Livraria Varela, p. 227-256, 2002.

FLAWS, J.A., HIRSFIELD, A.N., HEWITT, J.A., BABUS, J.K., FURTH, P.A. Effects of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. BiolReprod, v. 64, p. 1153-1159, 2001.

- FORTUNE JE, KITO S, WANDJI SA, SRSEN. Activation of bovine and baboon primordial follicles *In vitro*. *Theriogenology* 49:441-49, 1998.
- FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. v. 78, p. 135-163, 2003.
- FORTUNE, J.E., CUSHMAN, R.A., WAHL, C.M., KITO, S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*, v. 163, p. 53-60, 2000.
- GIER J. Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch. *Theriogenology*, v.66, p.141-142, 2006.
- GOBELLO, C. & CORRADA, Y. Biotechnology in canine reproduction: an update. *Acta Veterinaria*, v. 23, n. 1, p. 30-37, 2003.
- GOODROWE, K.L.; HAY, M.; KINGK, W.A. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes *In vitro*. *Biology of Reproduction*. Champaign. v. 45, p. 466-470, 1991.
- GOSDEN RG, BOLAND NI, SPEARS N, MURRAY AA, CHAPMAN M, WADE JC, ZOHDY NI. The biology and technology of follicular oocyte development *In vitro*. *Reprod Med Rev*, v.2, p.29-152, 1993.
- GRANDJEAN, D. & VAISSAIRE, J. J. Enciclopédia do cão Royal Canin. 1a ed. 2001.
- GUTIERREZ CG, RALPH JH, TELFER EE, WILMUT I, WEBB R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *BiolReprod*, 62:1322-28, 2000.
- HAFEZ ESE, HAFEZ B. Reprodução animal. Barueri: Manole; 2004.
- HEWITT D.A., ENGLAND G.C.W., The canine oocyte penetration assay; its use as indicator of dog spermatozoal performance *In vitro*. *Animal Reproduction Science*, v. 50, n. 1 /2, p. 123-139, 1997.
- HEWITT, D.A.; WATSON, P.F.; ENGLAND, G.C.W. Nuclear staining an culture requirements from *In vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*. Los Altos. v. 49, p. 1083-1101, 1998.

- HEWITT D.A., ENGLAND G.C.W., Influence of gonadotrophin supplementation on the *In vitro* maturation of bitch oocytes, *Vet. Rec.* p. 237–239, 1999.
- HIRAO Y, NAGAI T, KUBO M, MIYANO T, MIYAKE M, KATO S. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J ReprodFertil*; 100:333–339, 1994.
- HOLST, PA E PHEMINSTER, R.D. Onset of diestrus in the Beagle bitch: definition and significance. *Am. J. Vet. Res.* V. 35, p. 401-406, 1974.
- HUANMIN, Z., & YONG, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology* , v. 54, p. 641-650, 2000.
- HULSHOF SCJ, FIGUEIREDO JR, BEKERS JF, BEVERS MM, VAN DEN HURK R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Quart*, v.2, n.16, p.78-80, 1994.
- IUCN – The World Conservation Union. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs – Status Survey and Conservation Action Plan. Canid Specialist Gtroup., 2004.
- JEFFCOAT, I. Physiology and endocrinology of the bitch. In: ENGLAND, G.C.W.; HARVEY, M. (Eds.) *Manual of small animal reproduction and neonatology*, 1 ed. Hampshire:Fusion Design, Cap. 11, p. 113-126, 1998.
- JEWGENOW, K.N. & STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from non domestic cats – viability and ultra structural investigations. *AnimReprodSci*, v. 44, p. 183-193, 1996.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, MVR.; OLSON, PNS. The canine estrous cycle. In: JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia:W.B. Saunders Company, p.16-31, 2001.
- KOOISTRA HS, OKKENS AC. Role of chances in the pulsatile secretion pattern of FSH in initiation of ovarian folliculogenesis in bitches. *J ReprodFertilSuppl*, n.57, p.11-14, 2001.
- KOOISTRA HS. Concurrents pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of estrous cycle and anestrus in beagle bitches. *BiolReprod*, v. 60, p.65-71, 1999.

KUSTRITZ MV. Use of commercial luteining hormone and progesterone assay. Kits in canine breeding management. In: Concannon, P.W. et al. Recent advances in small animal reproduction. Ithaca, 2001.

LAMPERT, A. Animais de estimação inspiram mercado bilionário. Jornal do Comercio. 2013. Disponível em: <http://jcrs.uol.com.br/site/noticia.php?codn=117804>. Acesso em: 25/10/2013.

LEAVIT WW, BOSLEY CG, BLAHA GC. Source of ovarion preovulatory progesterone. Nat New Biol, v.234, p.283- 284, 1971.

LEPPANEN, M; MAKI, K. SALONIEMI, H. Estimation of heritability of hip dysplasia in German Shepherd Dogs in Finland.J. Ani. Breed. Geneti., v. 117, p. 97-103, 2000.

LÉVY, X; FONTBONNE, A. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. *Rev Bras ReprodAnim*, v.31, p.128-134, 2007.

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

LUVONI, G.C., KALCHSCHIMIDT, E., LEONI, S., RUGGIERO, C. Conservation of feline semen – part I: cooling and freezing protocols. *J. Feline Med. Surg.*, v.5, p.203-8, 2003.

LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D. Factors involved *In vivo* and *In vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, v.63, n.1, p.41-59, 2005.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *In vitro*, *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 46, p. 378-386, 2009.

MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.A., MAIA Jr., J.E.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.; MARTINS, F.S.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *In vitro*. *Zygote*, v. 15, p. 173-182, 2007.

McDONALD, L.E. Reproductive patterns of dogs. In: *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Ed. L. E. McDonald. Lea &Febiger, Philadelphia, p. 377-385, 1969.

MCDOUGALL K, HAY MA, GOODROWE KL, GARTLEY CJ, KING WA. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. J ReprodFertil Suppl. 51: 25-31, 1997.

McGEE EA, HSUEH AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 2000;21(2):200-14. 37. Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. Reproduction 140:489-504, 2010.

McCAFFERY, F. H.; Leask, R. Riley, S. C & Telfer, E. E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. Biology of Reproduction, v. 63, p. 267–273, 2000.

McNATTYKP, FIDLER AE, JUENGEL JL, QUIRKE LD, SMITH PR, HEATH DA, et al. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. Mol Cell Endocrinol 163(1/2):11-20, 2000.

McNATTY KP, HEATH DA, LUNDY T, FIDLER AE, QUIRKE L, O'CONNELL A, et al. Control of early ovarian follicular development. J ReprodFertil. 54:3-16, 1999.

MELO, D.S.; FERREIRA, M.M.G.; MONTEIRO, F.M.; NOGUEIRA, M.F.G.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Manutenção de níveis sub-luteais de progesterona, após tratamento super estimulatório, pode diminuir a taxa de recuperação de embriões. Acta Sci Vet., v.32, p.208, 2004.

MOORE KL, PERSAUD TVN. Embriologia Basica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

MOSES, D.L. & SHILLE, V.M. Journal of The American Veterinary Association. v. 192, p. 1541-1544, 1988.

NICKSON D.A., BOYD J.S., ECKERSALL P.D., FERGUSON J.M., HARVEY M.J.A., RENTON J.P., Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *In vitro* fertilization in bitches, J. Reprod. Fertil.Suppl. p. 231–240, 1993.

NUTTINCK, F.; COLLETE, L.; MASSIP, A.; DESSY. Histologic and autoradiographic study of the *In vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles: preliminary investigation. Theriogenology, v. 45, p. 1235-1245, 1996.

O'BRIEN, M.J., PENDOLA, J.K., EPPIG, J.J. A revised protocol for *In vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *BiolReprod*, v. 68, p. 1682-1686, 2003.

OKTAY K, BRIGGS D, GOSDEN RG. Ontogeny of follicle- stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J ClinEndocrinolMetab* 82(11):3748-51, 1997.

OTOI, T. Effect of serum on the *In vitro* maturation of canine oocytes. *Reproduction Fertility and Dvelopment*. Coolingwood. V. 11, p. 387-390, 1999.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOAKA, A.; SUZUKI, T., Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*, v. 54, n. 4, p. 535 – 542, 2000.

OTOI, T.; OOAKA, A.; MURAKAMI, M.; KARJA, N. W. K.; SUZUKI, T., Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitches ovaries at various stages of the oestrus cycle. *Reproduction and Fertility Development*. v. 13, n. 2/3, p. 151 – 155, 2001.

PATTERSON, D. F. Understanding and controlling inherited diseases in dog and cat. *Tidjschr. Diergeneeskd.*, n. 118, p. 23-27, 1993.

PAYAN-CARREIRA, R.; PIRES, M.A. Multioocyte follicles in domestic dogs: A survey of frequency of occurrence. In: *Theriogenology*, p. 1 – 13, 2008.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Planta, p. 327, 2002.

RAJARAJAN K, RAO BS, TAMILMANI RGG, ARUNAKUMARI MS, AMARNATH D, NAIK BR, RAO VH. Effect of various growth factors on the *In vitro* development of goat preantral follicles. *Small Rumin Res*, 63:204–12, 2006.

REYNAUD K, FONTBONNE,A, MARSELOO, N, THOUMIRE, S,ChebrouM, Viaris de LesegnoC, Chasten-MaillardS. *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embrionary development in the bitch. *Reproduction*, v.130, p.193-201, 2005.

RICHARDS, J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* 60, 51-89 1980.

RODRIGUES BA, RODRIGUES JL. Endocrinologia reprodutiva na cadela. *ClínVet*, v.7, n.40, p.50-58, 2002.

ROGRIGUES, B. A. Maturação e fecundação "*In vitro*" de ovócitos de caninos domésticos (*canis familiaris*). 2003, 119 f., Tese - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul Faculdade De Veterinária Programa De Pós-Graduação Em Ciências Veterinárias. Porto Alegre, 2003.

ROY SK, TREACY BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *FertilSteril*, 59:83-79, 1993.

SALUSTRI, A.; HASCALL, V. C.; CAMAIONI, A.; YANAGUICHITA, M. Oocyte-granulosa cell interactions. In: ADASHI, E.Y.; LEUNG, P. C., *The ovary*. New York: Raven Press, p. 687, 1993.

SALVETTI, P.; THEAU-CLÉMENT, M.; BECKERS, J. F.; HURTAUD, J.; GUÉRIN, P. NETO, V.; FALIÈRES, J.; JOLY, T. Effect of the luteinizing hormone on embryo production in super ovulated rabbit does. *Theriogenology*, v. 67, p. 1185-1193, 2007.

SANTOS, L. C. Maturação *In vitro* De Ovócitos De Cães Domésticos (*Canis Familiaris*) Em Meio Adicionado De Hidroxipirrolidina. 2005. 35 f. Dissertação - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2005.

SCHELLING, C.; GAILLARD, C.; DOLF, G. Genetic variability of seven dog breeds based on micro satellite markers. *J Anim Breed Genet*, 122, 71-77, (2005).

SCOTT, J.E., CARLISSON, I.B., BAVISTER, B.D., HOVATTA, O. Human ovarian tissue cultures: Extra cellular matrix composition coating density and tissue dimensions. *Reprod. Biomedicine On line.*, v. 9, p. 287-293, 2004.

SCOTT, J.E., CARLISSON, I.B., BAVISTER, B.D., HOVATTA, O. Human ovarian tissue cultures: Extra cellular matrix composition coating density and tissue dimensions. *Reprod. Biomedicine On Line.*, v. 9, p. 287-293, 2004.

SCRIBAN, R. Les biotechnologies de la reproduction animal. In: *Biotechnologies*, 5 ed. Paris:TEC et DOC, Cap. 6, 1999.

SILVA JRV, THARASANIT T, TAVERNE MAM, VAN DER WEIJDEN GC, SANTOS RR, FIGUEIREDO JR, VAN DEN HURK R. The activin-follistatin system and *In vitro* early follicle development in goats. J Endocrinol, v.189, p.113-125, 2006.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *In vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. Theriogenology, v. 61, p. 1691-1704, 2004.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FIGUEIREDO, J.R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *In vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. Theriogenology, v. 61, p. 1691-1704, 2004a.

SILVA C.M.G., CASTRO S.V., FAUSTINO L.R., RODRIGUES G.Q., BRITO I.R., SARAIVA M.V.A., ROSSETTO R., SILVA T.F.P., CAMPELLO C.C. & FIGUEIREDO J.R. Moment of addition of LH to the culture medium improves *In vitro* survival and development of secondary goat pre-antral follicles. Reproduction in Domestic Animals. 46(4): 579-584, 2011.

SKINNER, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. HumReprod Update, v. 5, p. 461-471, 2005.

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.

SOUZA, T. D. D., PAULA, T. A. R. D., GUIMARÃES, J. D., COSTA, E. P. D., CSERMAK JUNIOR, A. C., & PEIXOTO, J. V. Efeito da adição de um quelante de cálcio sobre a qualidade do sêmen descongelado de cães. Universidade Federal de Viçosa, 2013.

TELFER E, GOSDEN RG.A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). J ReprodFertil 81: p. 137-47, 1987.

TELFER EE, MCLAUGHLIN, M., DING C. JOO THONG. K. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod*,23:1151–58, 2008.

TELFER, E.E.The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. *Theriogenology*, 45:101-110, 1996.

TSUTSUI T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dog. *J ReprodFertilSuppl*, v.39, p.269-275, 1989.

VAN DEN HURK R, BEVERS MM, BECKERS JF. In-vivo and *In vitro* development of preantral follicles. *Theriogenol* 47(1) p. 73-82, 1997.

VAN DEN HURK R, ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenol* 63(6) p. 1717-51, 2005.

VANNUCCHI, C. I. Estudo da maturação nuclear *In vitro* de oócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina. 2003. 77f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

WASSARMAN PM, ALBERTINI DF. THE mammalian ovum. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). *The physiology of reproduction*.2.ed. New York: Raven Press, p.79-122, 1994.

WAYNE, R. K. & VILA, C. Phylogeny and origin of the domestic dog. In: *The genetics of the dog*, Eds. A. Ruvinsky, J., Sampsom, CAB International. p. 1- 13, 2001.

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

WU J, EMERY BR, CARRELL DT. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantralfollicles. *Biol Reprod*,64: p. 375–381, 2001.

YAMADA, S. et al., Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *In vitro*. *Biology of Reproduction*. Champaign, v. 46, n. 5, p. 853-858, 1992.

YOSHINAGA K, NAKAMURA M, UKESHIMA A. Ultra structural characteristics of primordial germ cells in the quail embryo. *Anat Rec* 236(3) p. 547-52, 1993.

YOUNG JM, MCNEILLY AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 140 p. 489-504, 2010.

ZACHARY, J.F.; MCGAVIN, M. D. In: *Bases da Patologia em Veterinária*. 5 ed. Elsevier Editora, 2013.

ZHANG, P.; LOUHIO, H.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; HEINSSON, J.; TELFER, E.E.; HOVATTA, O. *In vitro* effect of cyclic adenosine 3',5'-Monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. *Journal Assisted Reproduction Genetic*. v. 21, p. 301-306, 2004.

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 92/2014, intitulado “Avaliação do desenvolvimento folicular em fragmentos ovarianos de cadelas cultivados em diferentes meios contendo soro de cadela no diestro e soro de cadela na transição pró estro/estro”, coordenado pelo professor Tarcizio Antônio Rêgo de Paula do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 05/03/2015, com validade de 12 meses.

## CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 92/2014, named “Evaluation of follicular development in ovarian fragments grown bitches in different media containing serum bitch bitch in estrus and serum pro in estrus / estrus transition”, is in agreement with the actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on March 05, 2015 valid for 12 months.



Prof.<sup>a</sup> Átima Clemente Alves Zuamon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV