

INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL NO DIÂMETRO OOCITÁRIO EM CADELAS

Leda Maria Costa Pereira¹
Paulo Ricardo Oliveira Bersano²
Maria Denise Lopes³

RESUMO

A baixa competência meiótica de oócitos caninos quando submetidos às condições artificiais de cultivo é considerada um grande obstáculo para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas nessa espécie. As baixas taxas de MIV podem estar associadas ao tamanho dos oócitos recuperados das diferentes fases do ciclo estral. Assim, o objetivo desse trabalho é avaliar a relação entre as fases do ciclo estral – fase luteal e anestro, com o diâmetro oocitário de cadelas. Foram utilizadas 41 fêmeas caninas, com idades entre 6 meses e 7 anos, submetidas à ovariosalpingohisterectomia eletiva no Ambulatório de Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu. Os ovários foram fatiados e selecionados apenas os COCs grau I, sendo submetidos à solução de hialuronidase a 2% para a retirada das células do *cumulus*. Após esse processo, os oócitos foram corados com 10 µg/ml de Hoechst 33342 para avaliação do diâmetro oocitário, sem a zona pelúcida. Os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os oócitos obtidos das fases de anestro e luteal (77.62 µm x 78.64 µm). Dessa forma, há a necessidade de novos estudos para que seja possível uma compreensão adequada de quais os fatores que possam estar interferindo na competência oocitária, não devendo-se considerar apenas um fator determinante já que a ação coordenada de diversos fatores contribui para o crescimento e desenvolvimento do oócito

Palavras-chave: oócito, cadelas, diâmetro, ciclo estral.

INFLUENCE OF THE ESTROUS CYCLE BITCHES IN DIAMETER OOCYTE

ABSTRACT

The low meiotic competence of canine oocytes when subjected to conditions of artificial culture is considered a major obstacle to the development of reproductive biotechnologies in this species. Low rates of IVM may be linked to the size of oocytes recovered from different phases of the estrous cycle. The objective of this study is to evaluate the relationship between the phases of the estrous cycle - luteal phase and anestrus, with oocyte diameter of bitches. A total of 41 female dogs, aged 6 months to 7 years, subject to ovariosalpingohysterectomy elective in the Clinic of Small Animal Reproduction, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu. Ovaries were sliced and selected only those COCs grade I, being subjected to the solution of 2% hyaluronidase to remove cumulus cells. After this process, the oocytes were stained with 10 / ml of Hoechst 33342 for assessment of oocyte diameter without the zona pellucida. The results showed no statistically significant difference between the oocytes from

¹ Médica Veterinária, Mestranda em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho- UNESP- Botucatu, Contato principal para correspondência.

² Médico Veterinário, Doutor em Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho- UNESP- Botucatu

³ Professora Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho- UNESP- Botucatu

anestrous and luteal phases (77.62 μm x 78.64 μm). Thus, there is a need for further studies to be able to have a proper understanding of the factors that may be interfering with oocyte competence and should not be considered only a determining factor since the coordinated action of several factors contributing to the growth and developing oocyte.

Keywords: oocyte, bitches, diameter, estrous cycle.

INFLUENCE DEL CICLO ESTRAL EN DIÁMETRO DE LOS OVOCITOS EN HEMBRAS

RESUMEN

La baja competencia meiótica de ovocitos caninos cuando se someten a condiciones de cultivo artificial se considera un obstáculo importante para el desarrollo de biotecnologías reproductivas de esta especie. Las bajas tasas de IVM puede estar relacionado con el tamaño de los ovocitos recuperados de las diferentes fases del ciclo estral. El objetivo de este estudio es evaluar la relación entre las fases del ciclo estral - fase lútea y anestro, con un diámetro de ovocitos de hembras. Un total de 41 hembras, con edades entre 6 meses a 7 años, conforme a ovariosalpingohisterectomy el trabajo electiva en la Clínica de Reproducción de Pequeños Animales, Departamento de Reproducción Animal y Radiología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNESP, Botucatu. Los ovarios fueron cortados y seleccionar sólo aquellos COCs grado I, se someten a la solución de 2% de hialuronidasa para eliminar las células del cumulus. Después de este proceso, los ovocitos se tiñeron con 10 g / ml de Hoechst 33342 para evaluar diámetro de los ovocitos sin zona de los ovarios pelúcida. Os rodajas y se selecciona sólo aquellos AOC grado I, siendo sometidos a solución de hialuronidasa de 2% para la retirada de los células del cumulus. Después de este proceso, los ovocitos se tiñeron con 10 g / ml de Hoechst 33342 para la evaluación del diámetro del ovocito sin la zona pelúcida. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los ovocitos de las fases lútea y en anestro (77,62 x 78,64 mm microm). Por lo tanto, hay una necesidad de más estudios para ser capaz de tener una adecuada comprensión de los factores que pueden interferir con la competencia de ovocitos y no debe considerarse simplemente un factor determinante ya que la acción coordinada de varios factores que contribuyen al crecimiento y desarrollo de los ovócitos

Palabras clave: ovocito, perras, diámetro, ciclo estral.

INTRODUÇÃO

Oócitos caninos reiniciam a meiose no interior das tubas uterinas 56 a 72 horas após a ovulação *in vivo*. Por razões práticas a maturação *in vitro* (MIV) nas cadelas é frequentemente realizada com oócitos coletados do anestro ou diestro, após ovariohisterectomia (OSH), entretanto, menos de 20% desses oócitos atingem o estágio de metáfase I (MI) ou metáfase II (MII) (1). As baixas taxas de MIV podem estar associadas ao tamanho dos oócitos recuperados dessas fases do ciclo estral.

Otoi et al.(2) ao classificarem os oócitos em três grupos de diferentes diâmetros (>100 μm ; 100 μm ; <100 μm), observaram que apenas oócitos maiores que 100 μm de diâmetro atingiram o estágio de Metáfase II (20%), comparativamente aos oócitos com diâmetro inferior (4-10%). Songsasen e Wildt (3), estudando a relação entre o tamanho dos folículos e a taxa de MII de oócitos caninos, concluíram que o tamanho dos folículos influencia

significativamente a maturação oocitária *in vitro*, e demonstraram que 80% dos oócitos provenientes de folículos maiores que 2 mm atingiram a MII.

De acordo com Hewitt e England (4), quanto maior o oócito maior é a habilidade dessa célula em transpor à fase de quebra da vesícula germinativa (QVG) atingindo as fases de metáfase I, anáfase I e metáfase II. Os oócitos com diâmetro superior a 120µm apresentaram maior competência para evoluir para os estágios finais da maturação.

A taxa de MIV também pode ser influenciada pela fase do ciclo estral da fêmea doadora. Segundo OTOI et al. (5), as melhores taxas de MIV de oócitos obtidos durante a fase de proestro e estro, podem ser explicadas como consequência de um diâmetro oocitário maior encontrado na fase folicular do ciclo estral. Esses mesmos autores, em um estudo realizado sobre a distribuição dos oócitos conforme as fases do ciclo estral observaram que ovários em fase folicular (17,8%) apresentaram uma porcentagem mais baixa de oócitos com diâmetro inferior a 110µm quando comparados aos ovários de cadelas na fase de anestro (69,7%) e diestro (58,3%). A porcentagem de oócitos com diâmetro maior do que 120µm em ovários em fase folicular foi significativamente mais alto que aqueles encontrados em ovários na fase de anestro (5,5%) e diestro (13,3%).

A baixa competência meiótica de oócitos caninos quando submetidos às condições artificiais de cultivo é considerada um grande obstáculo para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas nessa espécie, como a fecundação *in vitro*, a produção *in vitro* de embriões e a criopreservação (6). As pesquisas conduzidas sobre a maturação oocitária *in vitro* na espécie canina apresentam resultados contraditórios com taxas de maturação entre 0 e 58% (7). Em vista do exposto o objetivo desse trabalho é avaliar a relação entre as fases do ciclo estral – fase luteal e anestro, com o diâmetro oocitário de cadelas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 41 fêmeas caninas (29 cadelas em fase de anestro e 12 em fase luteal), de diversas raças, com idades entre 6 meses e 7 anos, submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva no Ambulatório de Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu.

Os ovários foram isolados asépticamente, imersos em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e transportados a uma temperatura de 4°C para o Laboratório de Reprodução Animal de Pequenos Animais e Silvestres, onde foram processados no prazo máximo de 4 horas após a remoção. Posteriormente, os ovários foram fatiados em solução aquecida de PBS adicionada de 10% de soro fetal bovino, lavados e os COCs selecionados em meio TCM-199 HEPES, acrescido de solução de amicacina, 0,2mM de piruvato e 5mM de bicarbonato de sódio. Apenas os COCs grau I, apresentando citoplasma escuro, homogêneo e com duas ou mais camadas de células do *cumulus* foram utilizados.

Os COCs selecionados foram submetidos, durante 5 minutos, à solução de hialuronidase a 2% para a retirada das células do *cumulus*. Quando necessário os oócitos foram transferidos para *ependorfs* e colocados no vórtex durante 3 minutos e em seguida submetidos a várias pipetagens, para a retirada das células do *cumulus*.

Após esse processo, os oócitos foram lavados em solução de PBS-PVA suplementado com 3,7% de paraformaldeído, sendo lavados novamente no PBS-PVA e corados com 10 µg/ml de Hoechst 33342 para avaliação do diâmetro oocitário, sem a zona pelúcida. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula e avaliados pelo microscópio de fluorescência Leica DFC 310 FX, sendo o diâmetro mensurado pelo software Leica e Byo System View.

A análise de variância (PROC GLM, SAS Institute, 2009) (8) foi usada para comparar o diâmetro médio de oócitos entre as fases do ciclo estral (anestro e luteal).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao diâmetro dos oócitos nas fases lútea e de anestro encontram-se na tabela 1. Os oócitos foram mensurados antes do processo de maturação *in vitro* e pela medição realizada (figura 1, 2, 3 e 4) observa-se que apesar dos oócitos obtidos de cadelas em fase luteal quando comparados aos oócitos de cadelas em fase de anestro apresentaram uma diâmetro médio maior 78.64 μm x 77.62 μm , esses resultados não foram estatisticamente significativos.

Tabela 1. Média e desvio padrão, tamanho máximo e mínimo do diâmetro dos oócitos nas fases lútea e de anestro em cadelas. Botucatu, 2012

Fase	Nºoócitos	Média do diâmetro (μm)	Desvio padrão	Tamanho mínimo (μm)	Tamanho máximo (μm)
Anestro	169	77.62	7.94	59.58	120.33
Luteal	54	78.64	8.12	62.51	125.40

Valores expressos na tabela não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$)



Figura 1. Oócito de cadela na fase de anestro antes do processo de maturação *in vitro*.

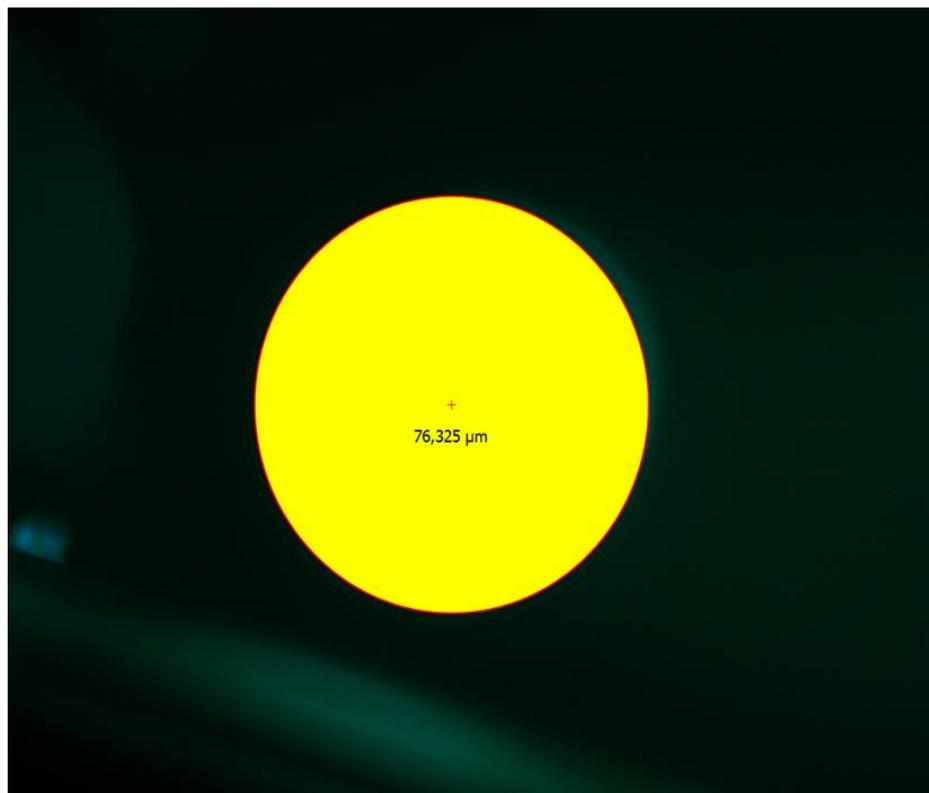


Figura 2. Mensuração do diâmetro do oócito sem a zona pelúcida na fase de anestro.

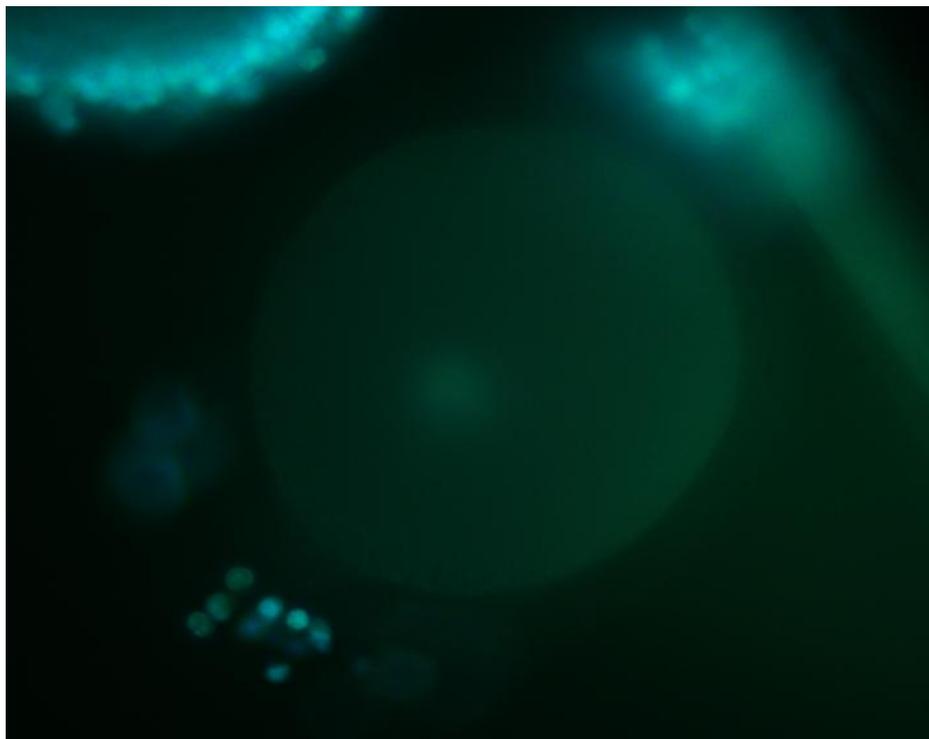


Figura 3. Oócito de cadela na fase luteal antes do processo de maturação *in vitro*.

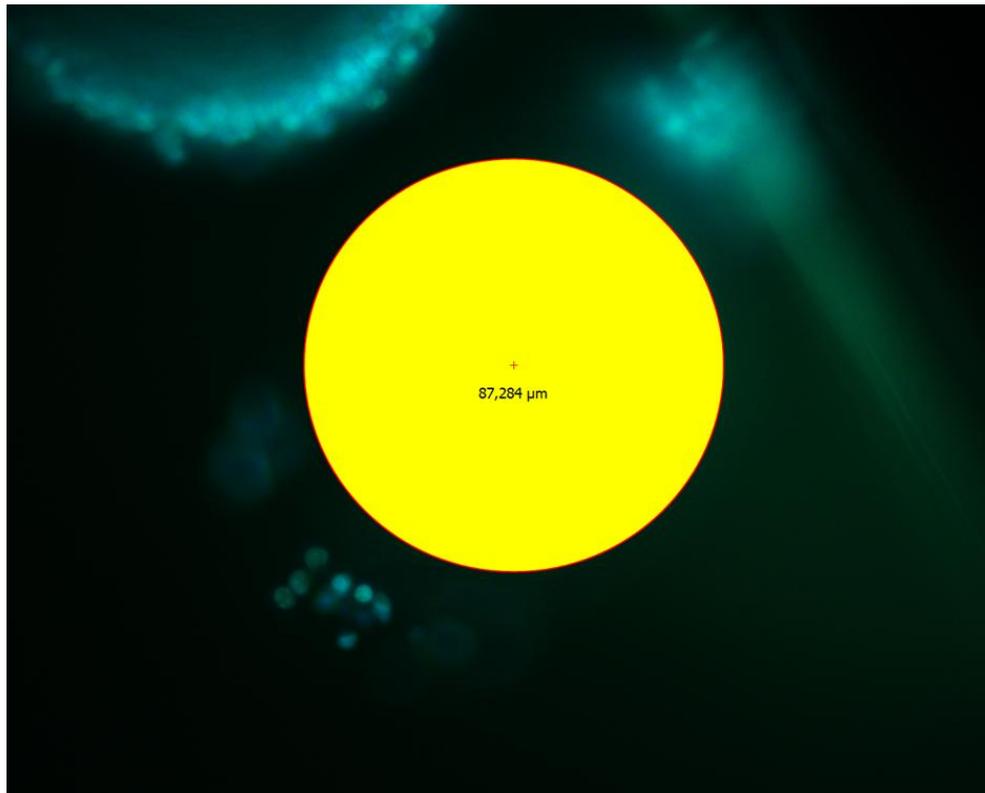


Figura 4. Mensuração do diâmetro do oócito sem a zona pelúcida na fase luteal.

Vários fatores influenciam a competência dos oócitos, contribuindo para a obtenção de taxas maiores ou menores de maturação nuclear e citoplasmática, dentre esses fatores, a morfologia, o diâmetro oocitário e a fase do ciclo estral da fêmea doadora.

A aquisição da competência meiótica é um processo coordenado que inclui alterações morfológicas, ultraestruturais e de transcrição no compartimento nuclear e citoplasmático do oócito. De acordo com Romão et al. (9), a competência meiótica é adquirida durante a fase de crescimento do folículo, quando ocorrem as modificações citoplasmáticas essenciais para o desenvolvimento do embrião, como a síntese e o armazenamento de proteínas e RNA, desenvolvimento de mecanismos que regulam o transporte de cálcio intracelular, redistribuição de organelas citoplasmáticas, e modulação da atividade das proteínas quinase.

A maturação oocitária é iniciada quando os oócitos são removidos do ambiente folicular. Entretanto, de acordo com Mermillod (10), nem todos os oócitos recuperados dos ovários tem a habilidade de progredir para um embrião viável, já que a retomada da meiose pelo oócito somente é possível a partir de um determinado estado do seu crescimento. Esse estado de competência meiótica, segundo esse autor, corresponde igualmente a um determinado tamanho folicular, variável entre as espécies.

Otoi et al.(11) sugerem que o diâmetro ideal para o oócito ser selecionado para a maturação *in vitro* e conseqüentemente se desenvolver até os estágios finais da maturação, seria de aproximadamente 110 μ m. De acordo com esses autores, o diâmetro poderia ser um dos fatores a serem considerados para explicar as baixas taxas de maturação *in vitro* encontradas na cadela, já que com base nos achados desse estudo, a média do diâmetro dos oócitos encontrados não reflete a condição ideal para a uma maturação adequada.

Segundo Wit et al.(12), o oócito para ser fertilizado *in vivo* é doado por um folículo saudável, durante uma fase específica do ciclo estral. Os oócitos obtidos para a produção *in vitro* são obtidos de folículos em diferentes etapas do desenvolvimento e em fases distintas do

ciclo estral sendo, assim, expostos a diferentes concentrações de estradiol, progesterona, LH e FSH.

Nossos resultados não demonstraram diferença significativa entre os oócitos obtidos das fases de anestro e luteal (77.62 μm x 78.64 μm), mas em ambas as situações o tamanho médio obtido é inferior aquele considerado ideal para a retomada da meiose (110 μm); além disso, o tamanho mínimo observado foi de 59.58 μm e 62.51 μm , muito inferior ao necessário para obtenção de taxas de maturação ideais. Desta forma, mesmo quando se consideram fases específicas do ciclo estral temos que considerar uma população heterogênea do ponto de vista de diâmetro oocitário, o que talvez influencie de forma significativa a taxa de maturação.

Apesar de diversos estudos (5, 13, 14) demonstrarem a relação do diâmetro oocitário com a condição reprodutiva da cadela, ainda há controvérsias com relação a essa questão. Em um estudo realizado por Ribeiro (13) observou-se uma porcentagem de oócitos com diâmetro inferior a 110 μm de 31,57%, 26,34% e 31,53%, respectivamente, para os ovários obtidos da fase de anestro, estro e estro induzido e uma porcentagem de oócitos com diâmetro superior a 110 μm de 68,42%, 73,65% e 68,46% para as mesmas fases. Segundo esse autor não houve diferença significativa entre as diferentes condições reprodutivas quando se compara classe de oócitos com o mesmo diâmetro. Entretanto, quando se analisa proporções de oócitos com diâmetros maior e menor do que 110 μm , dentro da mesma condição reprodutiva, verifica-se diferença significativa.

Lee et al. (14) ao avaliar o diâmetro de oócitos com e sem a zona pelúcida em diferentes fases do ciclo reprodutivo (fase folicular, lútea, anestro e oócitos ovulados *in vivo* coletados da tuba uterina) observaram que apenas os oócitos ovulados *in vivo* possuíam diâmetros significativamente maiores quando comparados às demais fases. Esses achados corroboram os resultados encontrados nesse estudo, no qual apesar de haver uma diferença entre as médias dos diâmetros oocitários obtidos de cadelas em fase luteal e anestro (78,64 μm x 77,62 μm), essa diferença não se mostrou significativa estatisticamente.

Segundo Reynaud et al. (15), a expansão das células do *cumulus* ocorre dentro do folículo após o pico de LH. Entretanto, a capacidade de resposta à onda pré-ovulatória de LH apenas é adquirida quando os folículos atingem 50 a 60% do diâmetro ovulatório.

De acordo com Songsasen e Wildt (3) apesar dos estudos relatarem que apenas os oócitos com diâmetro superior a 110 μm sejam capazes de retomar a meiose este não deve ser o único fator limitante do sucesso na MIV na espécie canina já que, em média, apenas 20% dos oócitos com diâmetro maior do que 110 μm atingem a fase de MII quando cultivados em diferentes meios de maturação. Dessa forma, não se deve atribuir a competência oocitária à apenas um fator determinante já que a ação coordenada de diversos fatores contribui para o crescimento e desenvolvimento do oócito. A idade da cadela doadora, a morfologia e o diâmetro do oócito, a fase do ciclo estral, o meio e o tempo de cultivo utilizado, a as secreções das tubas uterinas, são fatores que de forma conjunta ou isoladamente podem influenciar na maturação oocitária.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados pode-se inferir que não há uma associação entre o diâmetro oocitário e a as fases de diestro e anestro na cadela. Essa contradição encontrada na literatura mostra a necessidade de novos estudos para que seja possível uma compreensão adequada de quais os fatores que possam estar interferindo na competência oocitária, resultando nas baixas taxas de maturação encontradas nessa espécie.

REFERÊNCIAS

1. Chastant-maillard, S.; Saint-Dizier, M.; Chebrou, M.; Thoumire, S.; Reynaud, K. Contribution of the oocyte quality to low rates of in vitro maturation in the bitch. In: International Symposium on Canine and Feline Reproduction, ISCFR; 2012. p.35.
2. Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*. 2000; 54: 535-42.
3. 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. *Mol Reprod Dev*. 2005; 72: 113-19.
4. Hewitt. DA; England GCW. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell co-culture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim Reprod sci*; 1999. 55: 63-5.
5. Otoi T, Ooka A, Murakami M, Karja NWK, Suzuki T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrus cycle. *J Fertil Dev*. 2001; 13:151-5.
6. Farstad, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod sci*; 2000. 60: 375-87.
7. Aparicio-Ferreira M. Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática in vitro de oócitos de cadelas (*canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia [dissertação]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2006.
8. SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.
9. Romão GS, Araujo MCPM, Melo AS, Navarro PAAS, Ferriani RA, Reis RM. Oocyte diameter as a predictor of fertilization and embryo quality in assisted reproduction cycles. *Fertil Steril*. 2010, 93: 621-5.
10. Mermillod P. Croissance et maturation de l'ovocyte in vivo et in vitro. In: Thibault C; Lévassour M. *La Reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: Ellipses Édition Marketing; 2001. p.348-66.
11. Otoi T, Yamamoto K, Koyoma N, Tachikawa S, Suzuki T. Bovine oocyte diameter in relation to development competence. *Theriogenology*. 1997; 48: 769-74.
12. Wit AAC; Wurth YA; Kruip AM. Effect of ovarian and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J. Animal Sci*. 2000; 78: 1277-83.
13. Ribeiro APC. Influência do estágio reprodutivo e suplementação do meio de cultivo com progesterona e/ou soro de cadela em estro, nas taxas de maturação in vitro de oócitos de fêmeas caninas. [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2007.

14. Lee, H.S, Yin, X.J, Jin, Y.X, Kim, N.H; Cho, S.G, Bae, I.H, Kong, I.K. Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine. *Anim Reprod sci.* 2008; 103: 336-47.
15. Reynaud K, Viaris de Lesegno C, Chebrou M, Thoumire S, Chastant-Maillard, S. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology.* 2009; 72: 1120-31.

Recebido em: 17/09/2012

Aceito em: 12/09/2014