

Influência do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) adicionado ao meio fluido sintético de tuba uterina (SOF) sobre a maturação *in vitro* de oócitos caninos (*Canis familiaris*)

The effect of the synthetic oviductal fluid medium (SOF) supplemented with insulin-like growth factor-I (IGF-I) on *in vitro* maturation of canine oocytes (*Canis familiaris*)

Marco Antonio Machado^{1*}; Gilson Hélio Toniollo²; Kellen Oliveira¹

Resumo

O conhecimento da regulação do crescimento folicular e da maturação oocitária é de grande importância no desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas biotecnologias como a fecundação *in vitro* e a transferência nuclear. Considerando-se a necessidade de elucidação dos mecanismos básicos envolvidos na maturação oocitária na espécie canina, a presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar o efeito do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), adicionado ao meio fluido sintético de tuba uterina (SOF), sobre a maturação de oócitos caninos. Foram utilizadas 37 cadelas submetidas à ovariectomia, eletivas e terapêuticas, como doadoras dos complexos *cumulus* oócitos grau I (n=875) que foram alocados em três grupos: M0 (coloração no momento da colheita), Controle (72 h no meio SOF) e Experimental (72h no meio SOF + 100 ng de IGF-I). Após 72 horas de maturação dos oócitos o estágio de maturação nuclear foi avaliado, por meio de coloração com Hoechst 33342. Os maiores índices de recuperação das estruturas foram obtidos daquelas doadoras com raças definidas, fêmeas jovens, nulíparas e em estro. Não houve diferenças estatísticas entre os dados analisados quanto à maturação nuclear entre os grupos controle (SOF) e experimental (IGF-I).

Palavras-chave: Maturação *in vitro*, oócito, cadela, IGF-I, SOF, maturação nuclear

Abstract

The follicular growth and oocyte maturation knowledge are very important to the development and improvement of new biotechnologies such as *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. In order to the necessity of clarify the basic mechanisms related to canine oocyte maturation, this investigation focuses on the evaluation of the effect of insulin-like growth factor-i (IGF-I), added to synthetic oviductal fluid medium (SOF) on the *in vitro* maturation of domestic dog oocytes. Thirty-seven bitches undergoing ovariectomy for castration or due to pathological conditions of the uterus were selected as oocytes' donors (n=875). The oocytes were allocated in the following groups: M0 (stained in the collection's time), Control (72h in SOF) and Experimental (72h in SOF plus 100 ng IGF-I). After 72 hours of maturation the oocytes' nuclear status were assessed by Hoechst 33342 dye. The best results in terms of oocyte harvest were observed in those juvenile donors, females in estrus, nuliparous and pure breeds. No significant differences were observed between treatments control (SOF) or experimental (IGF-I).

Key words: IVM, nuclear maturation, oocyte, bitch, IGF-I, SOF

¹ Alunos do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal- SP. E-mail: mmachado@uel.br.

² Professor Doutor, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal- SP.

* Autor para correspondência

Introdução

A maturação de oócitos (MIV), e posterior produção *in vitro* (PIV) e a transferência de embriões, apresentam limitações na indústria canina que em grande parte são devidas às baixas demandas comerciais, reduzidos índices de maturação dos oócitos e a diferentes aspectos técnicos.

Em um estudo sobre as biotécnicas reprodutivas em canídeos Farstad (2000), descreveu uma variação de 0 a 58% nas taxas de maturação, usualmente em torno de 20%, em diferentes sistemas de cultivo e meios, o que demonstra que os sistemas de cultivo são modelos inadequados em relação ao ambiente fisiológico, necessitando modificações e adaptações. E, segundo Rodrigues e Rodrigues (2006), alguns grupos de pesquisa atribuem à melhoria nas taxas de meiose *in vitro* em cães aos efeitos da inclusão de gonadotrofinas, esteróides, hormônios, fatores de crescimento e suplementos protéicos ao meio de maturação. Por outro lado, outros pesquisadores sugerem que a maturação nuclear do oócito ocorreria *in vitro* independentemente da suplementação com soro ou proteína ao meio de cultivo.

Apesar das necessidades de cultivo dos oócitos ainda não estarem bem determinadas, a maioria dos estudos de maturação de oócitos em cães utiliza o meio TCM 199 (meio de cultivo de tecidos), modificado ou não, sob condições de temperatura e umidade variáveis (NICKSON et al., 1993; HEWITT; ENGLAND, 1997; HEWITT; ENGLAND, 1998; OTOI et al., 2000; OTOI et al., 2001). Além do TCM são descritos os meios TYH (Krebs-Ringer bicarbonato modificado), TALP (tyrode modificado) e BWW (Biggers-Whitten-Whittingham) que podem ser suplementados com proteína, hormônios, soro e células da tuba uterina (LUVONI, 2000; BOGLIOLO et al., 2002).

Hewitt, Watson e England (1995), estudaram os meios suplementados com FSH, hCG e estradiol para cultivar oócitos em folículos pré antrais avançados e antrais precoces. A pesquisa resultou em percentagem reduzida de oócitos alcançando os

estádios de MI a MII. Outro grupo de pesquisa avaliou meios de maturação semelhantes nos quais, além da suplementação com gonadotrofinas, foi adicionado EGF e observou aumento significativo da expansão das células do *cumulus* e maturação nuclear dos oócitos caninos (RUSS et al., 1998).

Os resultados de Hewitt; England, 1999, sugerem que o cultivo de oócitos caninos em meio SOF (fluido sintético tubárico) melhorou a percentagem de oócitos que reiniciaram a maturação *in vitro* após 96 horas, mas não afetou a proporção de oócitos com quebra da vesícula germinativa após 48 horas de cultivo. Segundo estes autores as diferenças observadas seriam atribuídas as concentrações de BSA (albumina sérica bovina), alta e baixa, nos tratamentos.

Para Bolamba et al. (2002), o cultivo de folículos pré-antrais de cadelas em meio SOF foi suficiente para maturação de uma menor proporção de oócitos caninos e que tanto SFB (soro fetal bovino) quanto BSA foram inefetivos quando adicionados ao meio de cultivo.

A composição do meio SOF para as cadelas pode ser adaptada, diferindo daquela utilizada em outras espécies, tais como: níveis protéicos, carboidratos e íons bicarbonato como fonte de dióxido de carbono para manutenção do pH. A alta taxa protéica no meio de maturação oocitária em cadelas pode ser a chave para o melhor desenvolvimento embrionário, pois se verifica que concentrações crescentes de BSA melhoram a taxa de desenvolvimento oocitário. O acréscimo de BSA aos meios de maturação pode facilitar a aderência de fatores de crescimento e evitar decréscimo na concentração de oxigênio do meio (HEWITT; ENGLAND, 1999).

Rota e Cabianca (2004), compararam os meios TCM 199 e SOF adicionando o EGF (fator de crescimento epidermal) ou ITS (insulina, transferrina e selênio) e obtiveram alta percentagem de retomada da meiose dos oócitos cultivados, porém com baixos índices de MII. Os autores consideraram que os percentuais de QVG (quebra de vesícula germinativa) não diferiram estatisticamente entre os meios testados e que o SOF reduziu a progressão dos oócitos além

de QVG e que o EGF reduziu o percentual de oócitos com núcleos que não puderam ser identificados.

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF I e II) são peptídeos com similaridades estruturais à pró-insulina, conhecidos como somatomedinas. Eles podem participar na maturação do oócito, ovulação, implantação e embriogênese. Estes fatores são hormônios peptídicos com baixo peso molecular e características estruturais e atividade metabólica semelhantes à pró-insulina (YOSHIMURA, 2003). Localmente, produzem efeitos parácrinos e autócrinos sobre a proliferação celular. Em mamíferos, os fatores de crescimento estão envolvidos na estimulação das células foliculares e também na maturação do oócito (LORENZO et al., 2002).

Kitiyant, Saikhun e Pavasuthipaisit (2003), pesquisaram os efeitos estimulatórios do IGF-I sobre as taxas de maturação *in vitro* em felinos (*Felis catus*) objetivando a utilização dos oócitos para estudos de transferência nuclear. A maturação dos oócitos de grau 1 foi melhorada com a adição de IGF-I ao meio DMEM (meio dulbecco eagle modificado) quando comparadas aos demais graus (2 a 4).

Quetglas et al. (2001), avaliaram os efeitos do IGF-I sobre a maturação de oócitos e a produção de embriões *in vitro* de bovinos. Naqueles oócitos submetidos à maturação com a adição do IGF-I foi observado um aumento na taxa de clivagem dos embriões quando o meio não recebeu gonadotrofinas. Os autores concluíram que o IGF-I não apresentou efeitos benéficos observáveis na MIV e na PIV.

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito do fator de crescimento (IGF-I) adicionado ao meio SOF sobre as taxas de maturação nuclear de oócitos caninos.

Material e Métodos

As fêmeas doadoras de ovários foram agrupadas conforme as raças, definidas (Boxer, Labrador, Pit Bull, Teckel, Terrier Brasileiro, Pastor Alemão,

Pinscher e Poodle) e sem raças definidas; a idade, em peri-púberes (6 a 10 meses) e adultas (> 10 meses de idade); a condição reprodutiva (nulípara, primípara e múltipara), e a fase do ciclo estral, através de citologia vaginal.

Foram selecionados ovários de 37 cadelas, provenientes de ovariectomia eletivas e terapêuticas realizadas no Setor de Obstetrícia do Hospital Veterinárias Governador Laudo Natel, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

Os ovários foram liberados das bolsas ovarianas, lavados em solução salina (NaCl a 0,9%) e acondicionados em frascos estéreis contendo solução salina a 0,9% a 37 °C para o transporte ao Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal e processados dentro de um período de 1 hora após as cirurgias, mantendo-se a temperatura de 37 °C. No laboratório os ovários foram acondicionados em frascos plásticos estéreis contendo solução de PBS (salina fosfato tamponada) acrescida de 10% de SFB, estabilizada em estufa de CO₂ a 37,5 °C.

Nesta mesma solução, os ovários foram fatiados com lâminas de bisturi dentro de placas de Petri estéreis de 35 mm contendo PBS em espaços de aproximadamente 2 mm para liberação dos oócitos.

Foram selecionados 875 complexos *cumulus*-oócitos (COCs) classificados como grau 1, ou seja, aqueles COCs com ooplasma uniformemente escuro, com zona pelúcida intacta, circundado por uma ou mais camadas de células do *cumulus* (Figura 1), lavados em solução de PBS + 10% SFB e posteriormente em meio TCM 199 – HEPES.

Os COCs foram alocados ao acaso nos grupos M0 (momento da colheita), Controle com SOF (C) e Experimental (E) que recebeu 100 ng/ml de IGF-I adicionado ao meio SOF.

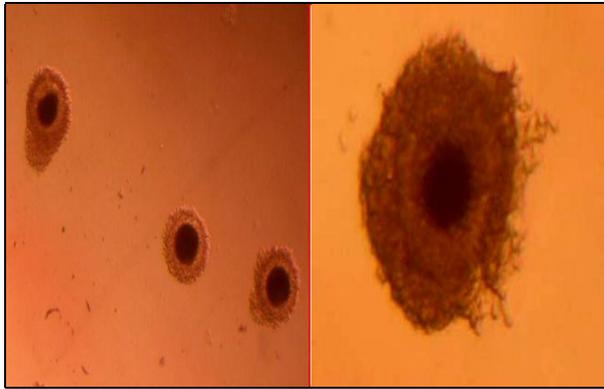


Figura 1. Complexos *cumulus* oócitos classificados como Grau-I selecionados para maturação *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2006.

Os oócitos que fizeram parte do grupo M0 foram corados no mesmo dia da colheita. Os protocolos, descritos abaixo, são os mesmos para os grupos Controle e Experimental com maturação de 72 h em estufa.

Padronizou-se que no máximo 15 COCs dos grupos Controle e Experimental fossem colocados em 500ml do meio SOF (acrescido ou não de IGF-I de acordo com o tratamento) em placas de cultivo celular com 4 cavidades (Nunc) de 1ml cada.

Os COCs dos grupos Controle e Experimental foram mantidos em estufa de 5% de CO₂ e 95% de umidade a 37,5 °C por 72 horas, quando foram retirados, lavados (3x) em meio 199-HEPES, passados por hialuronidase 0,2% para remoção das células do *cumulus*. Após esse procedimento os oócitos foram novamente lavados (3x) em meio TCM 199-HEPES.

Os oócitos desnudos foram colocados em solução de formaldeído 3% por 30 minutos e posteriormente lavados em solução de PBS + PVA (álcool polivinílico). Após a lavagem os oócitos foram corados por 15 minutos em ambiente escuro com o corante Hoechst 33342 (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich B-2261) diluído em glicerol e PBS e, em seguida, transferidos para lâminas de microscopia e recobertos por lamínulas, para observação dos estádios de maturação nuclear em microscópio de

epifluorescência (Olympus 081, Japan) no comprimento de onda 330-385 nm.

Os oócitos avaliados em lâminas foram divididos em quatro categorias, conforme Hewitt e England (1997):

Vesícula Germinativa Intacta (VG) – núcleo definido, com ou sem nucléolo, sem condensação da cromatina;

Quebra de Vesícula Germinativa (QVG) – cromatina descondensada, fora do centro celular;

Cromatina Condensada (MI/MII) – nenhuma membrana nuclear e formações distintas de cromatina compacta;

Oócitos sem Cromatina ou Não Passíveis de Identificação (NPIN)

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o teste não paramétrico de comparação de médias Mann-Whitney quando comparadas duas médias e Kruskal-Wallis quando comparado mais de três médias, utilizando o nível de significância inferior a 0,05.

Os dados encontrados foram listados em tabelas contendo números absolutos e relativos das frequências observadas nos grupos estudados.

Resultados e Discussão

Raça das doadoras

As raças definidas (n=12) representaram 32,4% e as sem raças definidas (n=25) 67,6% do total das doadoras de ovários. Aparentemente o fator racial não exerceu influência sobre o número total de oócitos recuperados com a técnica de fatiamento utilizada neste experimento. Esta observação concorda com os resultados obtidos por Reynaud et al. (2005), que não encontraram diferenças significativas sobre a influência do fator etário e do fator racial, nem observaram interação entre estes fatores sobre o número de estruturas colhidas. Por outro lado, Durrant

et al. (1998), utilizando a técnica de digestão enzimática de ovários encontraram um número significativamente maior de folículos de animais sem raça definida quando comparados aos com raça definida.

Idade das doadoras

A idade da doadora é um fator que afeta a quantidade e a qualidade dos oócitos de boa qualidade e as taxas de maturação *in vitro* (NICKSON et al., 1993; THEISS, 1997; RODRIGUES; RODRIGUES, 2003).

Strom Holst et al. (2001), pesquisando a taxa de recuperação de óocitos em cadelas encontraram uma redução de 4,7 células por ano.

Hewitt e England (1998), compararam cadelas com idades variando de 1 a 6 anos com outras em idades de 7 anos ou superior. Os autores concluíram que as doadoras mais jovens apresentaram um maior potencial de maturação

in vitro dos oócitos quando comparado ao grupo de animais mais velhos.

Nesta pesquisa foi observada uma maior distribuição de COCs entre as fêmeas adultas, aquelas com idade superior a 10 meses, quando comparadas àquelas fêmeas com idade entre 6 a 10 meses, classificadas como peri-púberes. Não foi avaliado o efeito da idade sobre a MIV.

Condição reprodutiva das doadoras

A distribuição das freqüências de condição reprodutiva e COCs estão descritas na Tabela 1.

Fase do Ciclo Estral das Doadoras

Os valores relativos às colheitas dos COCs nas diferentes fases do ciclo estral, o caso indeterminado e os casos de piometra estão representados na Tabela 2.

Tabela 1. Distribuição de freqüências de condição reprodutiva das doadoras dos complexos *cumulus*-oócitos caninos. Jaboticabal- SP, 2006.

Condição Reprodutiva	Doadora/Total (%)	COCs/Doadora (%)
Nulípara	15/37 (40,54)	676/15 (45,06) ^a
Primípara	16/37 (43,24)	559/16 (34,93) ^a
Multípara	6/37 (16,21)	239/6 (39,83) ^b
Total	37/37 (100,00)	1474/37 (39,84)

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

Tabela 2. Distribuição de freqüências das doadoras e dos complexos *cumulus*-oócitos caninos nas diferentes fases do ciclo estral e piometra. Jaboticabal-SP, 2006.

Diagnóstico	Doadora/Total (%)	COCs/Doadora
Anestro	7/37 (18,91)	266/7 (38) ^a
Diestro	20/37 (54,05)	784/20 (39,2) ^b
Estro	2/37 (5,40)	118/2 (59) ^a
Proestro	5/37 (13,51)	181/5 (36,2) ^a
Piometra	2/37 (5,40)	80/2 (40) ^a
Indeterminado	1/37 (2,70)	45/1 (45) ^a
Total	37/37 (100,00)	1474 (257,4)

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

A influência da fase do ciclo estral das cadelas e, conseqüentemente, dos eventos endócrinos pertinentes a cada período, sobre a taxa de recuperação de oócitos e os índices de maturação ainda é controversa, visto que, os poucos trabalhos publicados apresentam dados contrapostos.

Alguns estudiosos afirmam que o número de oócitos viáveis colhidos e a taxa de maturação em oócitos cultivados *in vitro* parecem ser afetados pelo ciclo estral (NICKSON et al., 1993; YAMADA et al., 1993) enquanto outros, não encontraram influência da fase do ciclo estral sobre os índices de maturação oocitária dos oócitos de cadelas no período de anestro e diestro (HEWITT; ENGLAND, 1997). Por outro lado, Martins (2005), estudando a maturação nuclear de oócitos obtidos no estro e no anestro, encontrou 52,09% dos COCs classificados como grau 1 em anestro e 43,17% das cadelas em fase de estro.

Os COCs classificados como grau 1 foram recuperados de todas as 37 cadelas e de um total de 875 células, obteve-se uma média de 23,7 COCs por doadora. Estes valores médios de oócitos classificados

como Grau-I estão aquém daqueles encontrados por Vannuchi (2003), (32,46 COCs/fêmea) e por Ferreira (2006), com uma média de 49,8.

Do número total de COCs grau 1 selecionados, 173 foram destinados para compor o grupo M0 e foram avaliados 75 oócitos após coloração, demonstrando um aproveitamento de 43,35%. No grupo controle, foram alocados 333 COCs e restaram para avaliação pós-coloração 124 oócitos, resultando em 37,23% de aproveitamento. No grupo experimental foram alocados 369 COCs e restaram 143 oócitos após processo de coloração, com um índice de aproveitamento de 38,75%.

Essas perdas são atribuídas aos processos de maturação, retirada da camada de células do *cumulus*, retirada da zona pelúcida, passagem pela solução ácida e várias outras lavagens em soluções que são necessárias para os processos de coloração nuclear descritos na metodologia.

A Tabela 3 demonstra freqüência dos oócitos grau 1 nos diferentes grupos.

Tabela 3. Distribuição das freqüências dos oócitos classificados como grau 1, avaliados pela coloração nuclear (Hoechst 33342). Jaboticabal- SP, 2006.

Grupos (n)	Coloração Nuclear
	Oócitos/total (%)
Momento da Colheita (173)	75/173 (43,35)
Controle (333)	124/333 (37,23)
Experimental (369)	143/369 (38,75)
Total (875)	342/ 875 (39,10)

Avaliação do Estádio de Maturação Nuclear nos Diferentes Grupos

Vesícula germinativa (VG)

Em valores totais, somando os grupos M0, C e E, 34 oócitos foram encontrados em estágio de VG em números relativos esse valor corresponde a 7,34% do número total avaliado.

Considerando cada grupo separadamente, não foi encontrada diferença estatística ($P < 0,05$) nos valores do M0 em relação aos grupos C e E, e também não houve diferenças estatísticas entre os grupos C e E, maturados por 72 horas em meio SOF acrescidos ou não de 100 ng/ml de IGF-I de acordo com o tratamento (Tabela 4). A Figura 2 demonstra um oócito em estágio de VG.

Tabela 4. Distribuição de frequências dos oócitos caninos em estágio de vesícula germinativa (VG) maturados *in vitro* entre os grupos experimentais. Jaboticabal- SP, 2006

Grupos	Oócitos em VG/Total (%)
Momento da Colheita	13/106 (12,26)
Controle	11/167 (6,58)
Experimental	10/190 (5,26)
Total	34/463 (7,34)

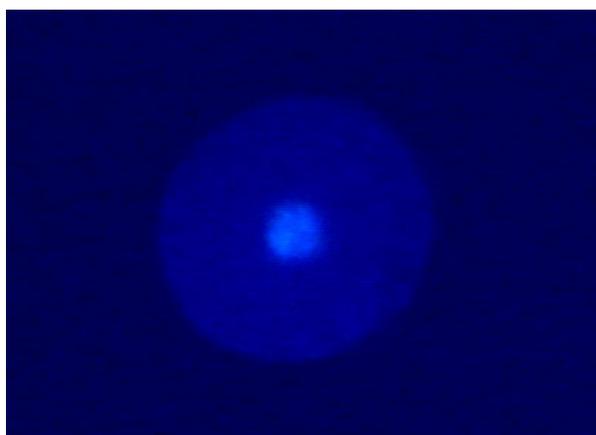


Figura 2. Oócito canino em estágio de vesícula germinativa (VG). Jaboticabal-SP, 2006

Tabela 5. Distribuição de frequências dos oócitos caninos em estágio de quebra de vesícula germinal (QVG) entre os grupos experimentais na maturação *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2006.

Grupos	QVG/oócitos avaliados (%)
Momento da Colheita	27/106 (25,47)
Controle	23/167 (13,77)
Experimental	22/190 (11,57)
Total	72/ 463 (15,55)



Figura 3. Oócito canino em estágio de quebra de vesícula germinativa (QVG). Jaboticabal-SP, 2006.

Quebra de vesícula germinativa (QVG)

O número total de oócitos em estágio de QVG foi de 72, em valores relativos corresponde a 15,55 do total de oócitos avaliados.

Assim como no estágio de VG, não houve diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos M0 em relação aos C e E, resultado igualmente encontrado entre os grupos maturados (C e E) por 72 horas em meio SOF acrescidos ou não de 100 ng/ml de IGF-I de acordo com o tratamento. A distribuição de QVG nos diferentes grupos está demonstrada na Tabela 5.

Para Martins, 2005, a QVG em oócitos maturados em meio SOF foi semelhante entre as doadoras em estro (23%) e em anestro (23,6%) O estágio de QVG está ilustrado na Figura 3.

Metáfase I (MI)

Foram encontrados 14 oócitos em MI (Tabela 6), o que corresponde a 3,03% do número total de oócitos avaliados.

Tabela 6. Distribuição de frequências dos oócitos caninos em estágio de metáfase I (MI) entre os grupos experimentais na maturação *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2006

Grupos	Oócitos em MI/Grupo
Momento da Colheita	3/106 (2,83)
Controle	7/167 (4,19)
Experimental	4/190 (2,10)
Total	14/ 463 (3,02)

Igualmente aos achados anteriores, não houve diferenças estatísticas entre o grupo M0 e os demais e entre os grupos maturados (C e E) por 72 horas em meio SOF acrescidos ou não de 100hg/ml de IGF-I de acordo com o tratamento.

No grupo M0, não foi encontrado oócitos em MI (Figura 4) oriundos de cadelas em anestro e, por outro lado, foram encontrados 15,34% de oócitos provenientes de fêmeas em estro. Já nos grupos maturados em SOF por 24 horas encontrou 9,72% em doadoras em anestro e 58% em doadoras em estro (MARTINS, 2005).

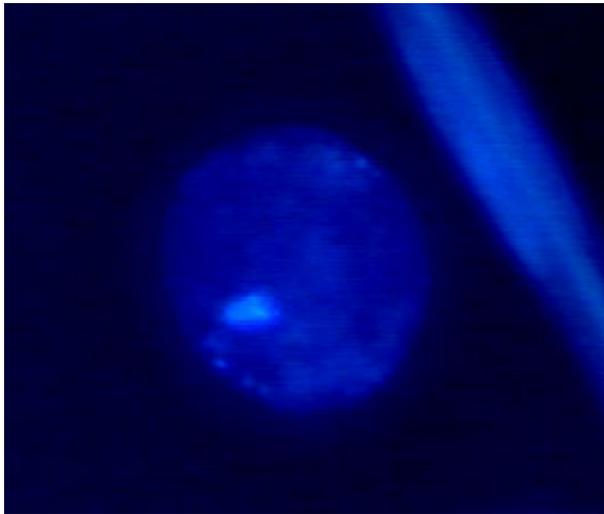


Figura 4. Oócito canino em metáfase I (MI). Jaboticabal-SP, 2006.

Não Passível de Identificação Nuclear (NPIN)

Foram encontrados 342 oócitos não passíveis de identificação nuclear, isso corresponde a 74,02% do número total de oócitos avaliados.

Houve diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os grupos M0 e C, e M0 e E. Não houve diferenças entre os grupos maturados C e E, conforme demonstra a Tabela 6.

Martins (2005), encontrou no momento da colheita 36,36% de oócitos NPIN oriundos de cadelas em anestro e 19,63% de cadelas em estro. Para os grupos maturados em SOF por 24 horas observou 41,67% em doadoras em anestro e 15% em doadoras em estro.

A Figura 5 demonstra um oócito não passível de identificação nuclear.

Tabela 7. Distribuição de frequências dos oócitos caninos não passíveis de identificação nuclear (NPIN) entre os grupos experimentais na maturação *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2006.

Grupos	Oócitos em NPIN/ Oócitos por grupo
Momento da Colheita	63/106 (59,43) ^a
Controle	126/167 (75,44) ^b
Experimental	153/190 (80,52) ^b
Total	342/463 (6,91)

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).



Figura 5. Oócito canino não passível de identificação (NPIN). Jaboticabal-SP, 2006.

Conclusões

Considerando os objetivos propostos e os resultados obtidos no presente estudo, sob as condições anteriormente descritas, foi possível concluir que:

Os maiores índices de recuperação das estruturas (COCs) foram obtidos daquelas doadoras com raças definidas, fêmeas adultas, nulíparas e em estro.

A suplementação do meio SOF com o IGF-I não apresentou efeitos benéficos sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos caninos.

Sugerem-se mais estudos para aprimorar este sistema de cultivo para a maturação e fecundação de oócitos caninos.

Agradecimentos

À FAPESP pelo apoio financeiro. (Processo Fapesp nº 2005/51349-7).

Referências

- BOGLIOLO, L.; ZEDDA, M. T.; LEDDA, S.; LEONI, G.; NAITANA, S.; PAU, S. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction Nutrition Development*, Paris, v.42, n.3, p.265-273, may/jun. 2002.
- BOLAMBA, D.; RUSS, K. D.; OLSON, M. A.; SANDLER, J. L.; DURRANT, B. S. In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology*, Los Altos, v.58, n.9, p.1689-1703, dec. 2002.
- DURRANT, B. S.; PRATT, N. C.; RUSS, K. D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, Los Altos, v.49, n.5, p.917-932, apr. 1998.
- FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canids species. *Theriogenology*, Los Altos, v.53, n.1, p.175-186, jan. 2000.
- FERREIRA, M. A. *Suplementação com hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática in vitro de oócitos de cadelas (Canis familiaris) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia nas diferentes fases do ciclo estral*. 2006. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Influence of gonadotrophin supplementation on the in vitro maturation of bitch oocytes. *Veterinary Record*, London, v.144, n.9, p.237-239, 1999.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The effect of oocyte size and bitch age upon nuclear maturation in vitro. *Theriogenology*, Los Altos, v.49, n.5, p.957-966, apr. 1998.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The effect of pre-ovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of the domestic bitch. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.51, p.83-91, 1997. Suplemento.
- HEWITT, D. A.; WATSON, P. F.; ENGLAND, G. C. W. Effect of concentration of serum on in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility: Abstrac Series*, Cambridge, v.15, p.66-67, 1995.
- KITIYANANT, Y.; SAIKHUN, J.; PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. *Theriogenology*, Los Altos, v.59, n.8, p.1775-1786, apr. 2003.
- LORENZO, P. L.; LIU, I. K. M.; ILLERA, J. C.; SILVAN, G.; CARNEIRO, G.; ILLERA, M. J.; MUNRO, C. J.; ILLERA, M. Steroid response in mare oocytes matured in vitro with growth factors. *Theriogenology*, Los Altos, v.57, n.1, p.363, 2002.
- LUVONI, G. C. Current progress in assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reproduction Nutrition and Development*, Les Ulis Cedex A, v.40, n.5, p.505-512, 2000.
- MARTINS, L. R. *Maturação nuclear de oócitos de cadelas em estro e anestro submetidas à maturação in vitro*. 2005. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- NICKSON, D. A.; BOYD, J.; ECKERSALL, P. D.; FERGURSON, J. M.; HARVEY, M. J. A.; RENTON, J. P. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.47, p.231-240, 1993. Suplemento.
- OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*, Los Altos, v.54, n.4, p.535-542, sep. 2000.
- OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI, M.; KARJA, K. N. W.; SUZUKI, T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, Melbourne, v.13, n.2/3, p.151-155, 2001.
- QUETGLAS, M. D.; COELHO, L. A.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA FILHO, E. B.; ESPER, C. R. Effect of insulin-like growth factor-1 during in vitro oocyte maturation and in vitro culture of bovine embryos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.53, n.2, p.207-211, apr. 2001.
- REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHASTANT-MAILLARD, S. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, Cambridge, v.130, n.2, p.193-201, aug. 2005.
- RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. Responses of canine oocytes to in vitro maturation and in vitro fertilization outcome. *Theriogenology*, Los Altos, v.66, n.6/7, p.1667-1672, oct. 2006.

- RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*, Los Altos, v.60, n.1, p.59-66, jun. 2003.
- ROTA, A.; CABIANCA, G. In vitro maturation rates of canines oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reproduction, Nutrition, Development*, Paris, v.44, n.2, p.105-109, mar./apr. 2004.
- RUSS, K. D.; BOLAMBA, D.; HARPER, S. A.; SANDLER, J. L.; DURRANT, B. S. Effects of epidermal growth factor and hormones on cumulus expansion and nuclear maturation of cultured dog oocytes. *Biology of Reproduction*, New York, v.58, n.supl.2, p.147, 1998.
- STROM HOLST, B.; LARSSON, B.; RODRIGUES-MARTINEZ, H.; LAGERSTEDT, A. S.; LINDEFORSBERG, C. Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. *Journal of Veterinary Medicine. A*, Berlin, v.48, n.10, p.587-592, dec. 2001.
- THEISS, T. *Investigation on the collection, in vitro maturation and fertilization of dog oocytes in the domestic bitch*. 1997. Dissertationen Veterinarmedizinischen (Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik) – Universität München, München.
- VANNUCHI, 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. Tese (Doutorado em Reprodução animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ Universidade de São Paulo, São Paulo.
- YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWANO, Y.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, Oxford, v.47, p.227-229, 1993. Suplemento.
- YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors and their binding proteins: potential relevance to reproductive physiology. *Reproductive Medicine and Biology*, Boston, v.2, p.1-24, 2003.