



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ- UECE
FACULDADE DE VETERINÁRIA-FAVET
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS -
PPGCV

MICHELLE KAREN BRASIL SERAFIM

**Cultivo de folículos pré-antrais caninos em diferentes concentrações de
hormônio folículo estimulante**

FORTALEZA - CEARÁ

Dezembro, 2009

MICHELLE KAREN BRASIL SERAFIM

Cultivo de folículos pré-antrais caninos em diferentes concentrações de hormônio folículo estimulante

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva

Co-orientador: Dr. José Ricardo de Figueiredo

FORTALEZA, CEARÁ

Outubro, 2009

Universidade Estadual do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho: Cultivo de folículos pré-antrais caninos em diferentes concentrações de hormônio folículo estimulante

Autora: Michelle Karen Brasil Serafim

Defesa em: 10/12/2009

Conceito obtido: Satisfatório

Nota obtida: 9,0

Banca Examinadora

Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo
Universidade Estadual do Ceará
Co-Orientador

Profa. Dra. Ana Kelen Felipe Lima
Universidade Estadual do Ceará (FECLI)
Examinadora

DEDICATÓRIA

“...E não me venha com choro! Olhe, quando eu jogava futebol e era fim de campeonato, todos ficavam nervosos e com medo. Eu ficava no meu canto, esperava entrar em campo. E quando eu entrava, derrubava logo dois ou três, mandavam eles pra o banco, e eu metia a cara no jogo. Minha filha, na vida tem que ser assim, entrar de CARA NO JOGO...”

Damião Serafim (meu PAI)

Aos homens de minha vida, meu avô (José Serafim) meu sábio pai (Damião Serafim), meu irmão (Diego Brasil) e meu sobrinho (Diego Filho).

HOMENAGEM

Às mulheres da minha vida, minha mãe (Mazé Brasil), minha irmã (Karol Brasil), minha sobrinha (Mariana Brasil), minha avó (Maria Santíssima), e todas minhas tias e mulheres da família Brasil.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos inicialmente são destinados a força maior que nos guia, nos da determinação, luz e um motivo real para agradecer a cada amanhecer o direito de viver, por tanto, agradeço a Deus, ao meu anjo protetor e aos espíritos de luz ao meu redor, obrigada.

Aos seres maravilhosos que foram escolhidos por Deus para serem meus guias, protetores, conselheiros, amigos e acima de tudo, PAI e MÃE. Minha mãe (Maria José Brasil), uma mistura refinada de garra, elegância, simpatia, sabedoria e força; e meu pai (Damião Serafim), um conjunto de bom humor, otimismo, humildade, fé e perseverança. Obrigada Deus por me proporcionar conviver nesta vida com pessoas tão espetaculares.

Agradeço a minha melhor amiga e irmã mais nova, Karol Brasil, por sua fidelidade, amor e confiança. À Diego Brasil, meu irmão e cúmplice tão amado, obrigada pela força, humor inigualável e companhia em todos os momentos, minha cunhada (Miscelânia Brasil), pelo carinho e compreensão, e aos meus sobrinhos queridos (Diego Filho e Mariana Brasil), por amarem tanto a “Nenem” deles, de uma maneira tão intença.

Para meus familiares, especialmente à família Brasil, destino agradecimentos pelo amor e apoio incondicional, e por me permitirem saber o significado da palavra FAMÍLIA de forma concreta, estável e inabalável. Em especial os meus tios Aiene Brasil, Rui Figueira, Fátima Brasil, Salete Brasil (*in memorian*), João José Brasil (*in memorian*), todos meus primos e primas, em especial a Laura Brasil Batista e Leonides F. de Holanda Junior e aos meus avós paternos, José Serafim e Maria Santíssima Serafim.

Aos meus professores da Universidade Federal Rural do Semi-árido, Prof. Dr. Alexandre Rodrigues da Silva e ao Prof. Dr. e amigo Carlos Iberê Alves Freitas,.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, pela oportunidade de ingressar no meio científico. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela bolsa de estudos que foi concedida.

A todos que compõem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), em especial às secretárias Adriana Albuquerque, Cristina Sabóia do Nascimento, e ao tão atencioso César.

À mulher por quem tenho admiração, respeito e adoro muito, minha orientadora Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva, obrigado por ter acreditado em mim, me possibilitado entrar na “família” LRC, me fornecer os maiores aprendizados de minha vida e acima de tudo, por estar comigo no início da caminhada para a realização de um sonho, creio que não existe melhor companhia. Muito abrigada por tudo, Chefinha.

Aos membros do LRC, pela paciência, companheirismo, aceitação, amizade e por fazerem de alguém que mora sozinha em uma cidade estranha, se sentir sempre tão amparada. Principalmente a Médica veterinária Henna Roberta Quinto (que tantas vezes me salvou, e me apoiou, te adoro muito), Dra. Ticiane Pereira Franco da Silva (minha fada madrinha), Antônio Cavalcante Mota Filho, Iraína Campos, Bárbara Sucupira Pereira, Cláudia da Cunha Barbosa, Cynthia Levi Baratta Monteiro, Daniel Couto Uchoa, Janaína de Fátima Cardoso, Juliana Araújo, Luana Azevedo de Freitas, Ricardo Parente Jucá, Víctor Leão Hitzschky Madeira, Herlon Rodrigues Carlos Henrique Andrade Teles e Teresa D’avila Aguiar.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo, por ter aceitado ser meu co-orientador, ter disponibilizado o LAMOFOPA, pelas tão sábias e valiosas palavras, e por fazer de suas reuniões semanais o ensinamento necessário a qualquer pós-graduando que deseja vencer na vida científica.

À família LAMOFOPA, que não só pelo auxílio no experimento, como por fazerem uma “carnívora” se sentir completamente à vontade em um laboratório de caprinos. Em especial, quero agradecer ao Prof .Dr. Cláudio Cabral Campello, Jamily Bezerra Bruno, Cláudio Afonso Pinho Lopes, Ana Beatriz Graça Duarte, Anderson Pinto Almeida, Roberta Nogueira Chaves, Patrícia Magalhães, Valesca Luz, Anelise Maria C. V. Alves, Viviane Alves Saraiva, Juliana Jalles de Holanda Celestino, Diego Diógenes Fernandes, Cleidson Silva, Isabel Bezerra Lima-Verde, e a todos que compõem a família LAMOFOPA..

Ao Centro de Controle de Zoonoses (CE) e a todos seus funcionários, sempre tão educados e solícitos, que me ajudaram tanto. Muito obrigada a todos. Aos animais, utilizados em todo o experimento, meu mais sincero respeito e agradecimento.

Às professoras Doutoras Berenice Ávila Rodrigues, Fabiana Ferreira de Souza e Camila Infantsi Vannucchi, por terem sido tão atenciosas e pacientes com minhas dúvidas sobre a MIV e teste de ligação. Meu imenso obrigado.

E aos meus maravilhosos anjos que me auxiliaram durante todo o mestrado, seja de forma científica ou fornecendo aquilo que para mim é tão sagrado quanto à família: AMIZADE VERDADEIRA. Meu muito obrigado à Valdevane Rocha Araújo, Gerlane Modesto Silva, Liduína Modesto Silva, Cláudio Ferro, Ana Kelen Felipe Lima, Liliam Mara Trevisan Tavares, Karina Busato, Renata Cepinho, Roberto “Justus” Maia Junior, Suely Lemos, Rochele Falcão, Thiago Vasconcelos, à família Pensionato Nossa Senhora de Fátima, nas pessoas de Sr. Lúcio Gurgel e Dona. Ilma Gurgel, Sanelly Lourenço da Costa, Virgínia Peres Rego, Nathalie Ommundsen, à minha cadelinha Lulu (*in memorian*) e a minha alma gêmea Daniel Ferreira de Carvalho (*in memorian*).

RESUMO

O maior obstáculo no desenvolvimento de técnicas reprodutivas na espécie canina consiste na diferença na fisiologia reprodutiva da cadela comparada a de outras fêmeas de mamíferos domésticos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de FSH em diferentes concentrações e períodos no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados caninos. Folículos pré-antrais secundários foram isolados e destinados ao cultivo em meio α -MEM suplementado em que foram comparados os seguintes tratamentos: CONTROLE (somente meio de base); FSH100 (concentração fixa de 100 ng/ml de FSHrec durante todo de cultivo) e FSH SEQUENCIAL (FSHSeq – adição de FSHrec de forma sequencial (100, 500 e 1000 ng/ml) nos dias 0, 6 e 12 do cultivo) o cultivo celular foi realizado a 39°C e 5% de CO₂ em ar, com troca de meio realizada a cada dois dias. Os parâmetros avaliados foram viabilidade, formação de antro, diâmetro e taxa de crescimento folicular. Para verificar a viabilidade folicular, foram utilizados os marcadores fluorescentes Calceína-AM (4 μ M) e Etídio-Homodímero-1 (2 μ M) para vivos e mortos, respectivamente. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA seguida dos testes *t* de Student e Kruskal-Wallis para os parâmetros de diâmetro folicular e taxa de crescimento, respectivamente. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (MD $\pm$ SEM). Para os parâmetros viabilidade e formação de antro utilizou-se o qui-quadrado ($P < 0,05$). Todos os folículos submetidos à fluorescência (100%, $P < 0,05$) apresentaram-se corados em verde pela calceína-AM ao fim do cultivo (D18; $P < 0,05$). No tratamento FSHSeq, o diâmetro folicular foi significativamente superior a partir do D12 ($398,07 \pm 12,06$) quando comparado ao grupo controle ($343,11 \pm 8,61$) ($P < 0,05$). Enquanto que no D18, no FSHSeq ($439,80 \pm 14,08$) apresentou-se significativamente superior aos demais tratamentos ($P < 0,05$). Com relação às taxas de crescimento folicular diária (μ m/dia), estas foram significativamente superiores no tratamento FSHSeq ($6,47 \pm 0,55$) quando comparada ao controle ($3,67 \pm 0,32$) e FSH100 ($4,47 \pm 0,38$). Para a formação de antro, os tratamentos FSH100 e FSHSeq apresentaram-se significativamente superiores quando comparados ao grupo CONTROLE no D12 de cultivo. Quando comparado os dias de tratamento, no D112 o FSHSeq apresentou taxa de extrusão significativamente superior quando comparado ao CONTROLE ($P < 0,05$). Diante destes resultados, pode-se concluir que a adição de FSH de forma sequencial ao meio de cultivo mantém a sobrevivência de folículos pré-antrais isolados caninos.

Palavras-chave: Canino, folículo pré-antral, cultivo, FSH

ABSTRACT

The biggest obstacle in the development of reproductive techniques in dogs is the difference in reproductive physiology of the bitch compared to other female domestic mammals. The objective of this study was to evaluate the effect of FSH at different concentrations and for different lengths of time in the *in vitro* cultivation of isolated canine preantral follicles. Secondary follicles ($>200\text{ }\mu\text{m}$) were isolated by microdissection and subsequently cultured for 18 days in supplemented α -Minimum Essential Medium (α -MEM), in the absence (control medium) or presence of different concentrations of FSH (ng/ml), FSH100 (fixed concentration of 100 ng/ml throughout the whole culture period), and sequential FSH (FSHSeq – added sequentially – 100, 500 and 1,000 ng/ml). The parameters evaluated were survival, follicular growth, oocyte extrusion and the rate of antrum formation. At the end of cultivation, all of the follicles from all of the treatments (100%, $P<0.05$) were able to maintain their viability, which was marked green by calcein-AM. Furthermore, the FSHSeq treatment on day 18 ($D18-439.80 \pm 14.08\text{ }\mu\text{m}$) was better than the other treatments ($P<0.05$). In regard to the daily follicular growth rates ($\mu\text{m}/\text{day}$), the FSHSeq treatment was significantly better (6.47 ± 0.55) than control (3.67 ± 0.32) and FSH100 treatment (4.47 ± 0.38). Furthermore, the FSH100 and FSHSeq treatments showed a significantly higher rate of antrum formation when compared to the control group on D12 of cultivation. When comparing the treatments after D12, FSHSeq showed a significantly higher rate of extrusion when compared to the control ($P<0.05$). Therefore, we concluded that the sequential addition of FSH to the culture media maintained the survival of isolated canine preantral follicles, as well as promoted an increased rate of follicular growth and antrum formation.

Keywords: Canine, Preantral Follicles, Culture, FSH.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	: Porcentagem
µg	: Micrograma
µL	: Microlitro
µm	: Micrômetro
<	: Menor
>	: Maior
±	: Mais ou menos
°C	: Graus Celsius
ANOVA	: Análise de variância
BSA	: <i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CCZ	: Centro de Controle de Zoonoses
CIV	: Cultivo <i>in vitro</i>
<i>et al.</i>	: <i>et alii</i> (e colaboradores)
FAVET	: Faculdade de Veterinária
FIV	: Fecundação <i>in vitro</i>
FOPA	: Folículo ovariano pré-antral
FSH	: <i>Follicle stimulating hormone</i> (Hormônio folículo estimulante)
FUNCAP	: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
g	: Gramas
h	: Horas
l	: Litros
LAMOFOPA	: Laboratório de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré Antrais
LH	Hormônio Luteinizante
LRC	: Laboratório de Reprodução de Carnívoros
MEM	: Meio Essencial Mínimo
MII	Metáfase II
MIV	: Maturação <i>in vitro</i>
mL	: Mililitros
MOIFOPA	: Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais
n	: número de amostras
ng	: Nanograma

SFB : Soro fetal bovino
TCM 199 :Meio de cultivo de tecido 199
UECE : Universidade Estadual do Ceará

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figuras	Pág.
Figure 1: Viable canine ovarian follicles (stained green with calcein-AM) cultured <i>in vitro</i> for 18 days in the absence of FSH (control, A and B), presence of FSH at a fixed concentration (FSH100, C and D) or FSH added sequentially (FSHSeq, E and F). The scale bars represent 100 μ m.	37
Figure 2: Mean $\pm$ Standard Error of the Mean (SEM) of the follicular diameter after <i>in vitro</i> culture, in the presence or absence of different concentrations of FSH (100 ng/ml or sequential) for 18 days. The capital letters are the comparison between treatments (^{A,B}) and the lowercase letters are the comparison between days (^{a,b,c,d}).	38
Figure 3: Percentage of antrum formation in follicles cultured <i>in vitro</i> in the presence or absence of different concentrations of FSH (100 ng/ml or sequential) for 18 days. The capital letters are the comparison between treatments (^{A,B}) and the lowercase letters are the comparison between days (^{a,b,c}).	39
Figure 4: The extrusion rate of follicles cultured <i>in vitro</i> in the presence or absence of different concentrations of FSH (100 ng/ml or sequential) for 18 days. The capital letters are the comparison between treatments (^{A,B}) and the lowercase letters are the comparison between days (^{a,b}).	40

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Ovário mamífero.....	16
2.2 Oogênese.....	16
2.3 Foliculogênese e atresia folicular.....	18
2.4 Aplicações e importância da biotécnica de MOIFOPA.....	20
2.5 Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento folicular in vitro.....	21
2.6. Hormônio Folículo Estimulante (FSH)	23
3. JUSTIFICATIVA.....	25
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	26
5. OBJETIVOS.....	26
5.1 Geral.....	26
5.2 Específico.....	26
6. CAPÍTULO 1. Folículos pré-antrais caninos cultivados em diferentes concentrações de hormônio folículo estimulante (FSH) e em diferentes períodos....	27
7. CONCLUSÕES.....	46
8. PERSPECTIVAS.....	46
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas em tecnologias reprodutivas como a maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo de embriões *in vitro* (CIV) são conduzidas em cadelas na tentativa de elucidar a biologia reprodutiva de canídeos, bem como ampliar tais conhecimentos para auxiliar na conservação de espécies selvagens em extinção (SONGSASEN *et al.*, 2007). Porém, o maior obstáculo para a aplicabilidade e desenvolvimento dessas biotécnicas consiste nas diferenças da fisiologia reprodutiva da cadela e na baixa eficiência da MIV em oócitos caninos, comparadas a outras espécies de mamíferos (FARSTAD *et al.*, 2000).

Esta baixa eficiência pode ser devido às diferenças na maturação oocitária, onde os oócitos caninos são espontaneamente ovulados no estágio de vesícula germinal como oócitos primários, enquanto que na maioria dos mamíferos a maturação oocitária somente ocorre dentro dos folículos. Na cadela, a transição de meiose para a metáfase dois ocorre no oviduto e requer um período mais extenso, de 2 a 5 dias após a ovulação (DE LOS REYES *et al.*, 2005).

Uma vez que é baixo o rendimento da MIV de oócitos caninos oriundos de folículos antrais, torna-se limitada a aplicabilidade desta biotécnica. Tal entrave pode ser solucionado através da utilização de oócitos oriundos de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* (TELFER, 2001). Desta forma, a biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) torna-se uma alternativa viável, visto que os folículos pré-antrais constituem o *pool* de reserva dos gametas femininos, sendo da ordem de milhares a milhões dependendo da espécie. A MOIFOPA tem como objetivo principal recuperar folículos pré-antrais do ambiente ovariano para o posterior cultivo *in vitro* até o estágio de maturação, prevenindo-os do processo de atresia, que ocorre naturalmente *in vivo* (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o crescimento e o desenvolvimento folicular *in vitro* são subsidiados utilizando-se meios de cultivo ricos em sais inorgânicos, vitaminas, substratos energéticos, aminoácidos dentre outras substâncias (TELFER, 2001). Diversas substâncias podem ser adicionadas ao meio de cultivo, influenciando o crescimento folicular. Dentre essas, destacam-se a albumina sérica bovina (BSA) utilizada como fonte protéica, substratos energéticos e antioxidantes como o ácido ascórbico, e a combinação de insulina, transferrina e selênio (ITS). Além disso, vários estudos têm sido desenvolvidos visando verificar a

influência de fatores de crescimento e/ou hormônios adicionados aos meios incluindo gonadotrofinas como hormônio folículo estimulante (FSH) (HARTSHORNE *et al.*, 1994).

Nesse sentido, estudos *in vitro* têm demonstrado que a adição de FSH ao meio de cultivo de folículos pré-antrais é benéfica por promover o crescimento folicular, bem como a formação de antro em muitas espécies (murinos: McGEE *et al.*, 1997, SPEARS *et al.*, 1998; humanos: WRIGHT *et al.*, 1999; bovinos: GUTIERREZ *et al.*, 2000; ovinos CECCONI *et al.*, 1999, ZHOU e ZHANG, 2005; suínos (MAO *et al.*, 2002) e caprinos (SILVA *et al.*, 2009).

Em caninos, por sua vez, Bolamba *et al.* (1998) utilizaram meios suplementados com FSH, hCG, estradiol para cultivar oócitos de folículos pré-antrais avançados e antrais precoces. O procedimento acarretou porcentagem muito pequena de oócitos que progrediram de MI à MII. Além de que, os autores não avaliaram os fatores envolvidos no crescimento ou desenvolvimento folicular.

Tal fato evidencia a necessidade de maiores estudos que possam contribuir para elucidar os mecanismos da foliculogênese inicial de cadelas. Tendo em vista que poucos estudos relatam sobre um sistema de cultivo *in vitro* para folículos pré-antrais caninos. E somando-se a isso, se tem a necessidade de estudos mais aprofundados acerca da influência do FSH no cultivo de folículos pré-antrais caninos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de FSH em diferentes concentrações e períodos no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caninos isolados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovário mamífero

O ovário é considerado o órgão reprodutivo primário da fêmea. Realiza duas funções primordiais: (1) formar a célula germinativa feminina e (2) produzir os hormônios sexuais e diferentes peptídeos. É formado por duas regiões: a medular e a cortical, sendo totalmente estabelecida em torno de 40 dias de desenvolvimento fetal, no que se refere a espécie canina (RODRIGUES, 2003).

O ovário é constituído pelo córtex e pela medula. No córtex ovariano estão os folículos em diferentes fases de desenvolvimento, corpo lúteo, corpo hemorrágico ou corpo *albicans* (dependendo da fase reprodutiva do indivíduo) e na porção medular, formada por tecido de sustentação, estão os vasos sanguíneos e linfáticos e os nervos. A porção externa do córtex tem uma camada de tecido conjuntivo denso, chamada túnica albugínea ovariana, localizada entre a porção externa do córtex e o epitélio germinativo, cuja denominação, embora em uso, é inadequada, uma vez que o epitélio germinativo nada mais é do que um segmento do epitélio do peritônio modificado e não tem função de produção de células germinativas, ao contrário do que a nomenclatura faz crer (NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

Os ovários caninos são estruturas de formato ovalado, envoltos pela *bursa ovarica* e suspensos pelo ligamento mesovário. Estão localizados à altura das 3ª e 4ª vértebras lombares, em situação caudal aos rins (RODRIGUES, 2003). Apresentam um comprimento médio de 20 mm e possuem uma largura de aproximadamente 15 mm. As medidas orgânicas estão relacionadas ao tamanho corporal, à idade e ao estágio do ciclo estral; no anestro as dimensões são inferiores a 1,5x 1,0x 0,8 cm (ENGLAND e HEWITT, 1999).

2.2. Oogênese

De acordo com Figueiredo *et al.* (2002), a oogênese pode ser definida como o processo de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais das fêmeas, culminando com a formação do oócito haplóide fecundado. Nos mamíferos, esse evento tem início durante a vida fetal e desenvolve-se por meses a anos nos animais adultos.

Segundo Bristol-Gould e Woodruff (2006), a oogênese tem início nos estádios embrionários do desenvolvimento ovariano, com a migração das células germinativas primordiais (CGM) oriundas do saco vitelínico para a crista gonadal. Imediatamente após a diferenciação das gônadas, ocorre a transformação das CGP em oogônias mitoticamente ativas e, então, em oócitos primários. As oogônias são células grandes e arredondadas que migram e colonizam a crista, perdendo a motilidade e iniciando a gametogênese por meio de divisões mitóticas. Quando a mitose é cessada, inicia-se a meiose que ocorre em momentos distintos de acordo com a espécie animal.

Na cadela, esta fase de multiplicação se encerra, pouco após o nascimento. Considerando-se que o ovário nessa espécie não apresenta por ocasião do nascimento nenhum folículo primordial. No período correspondente às duas semanas após o nascimento, as oogônias começam a se dividir, ingressam na meiose I no estágio de pré-leptóteno e evoluem para oócitos primários (RODRIGUES, 2003). Em seguida, uma camada de células somáticas planas conhecidas como células da pré-granulosa, originárias do epitélio celômico, circundam os oócitos primários formando os folículos primordiais e dando início à foliculogênese (LOPES, 2008).

A partir desse evento, os oócitos primários passam para a segunda etapa da meiose compreendida pelos sucessivos estádios da prófase I, conhecidos como leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e dictoteno (vesícula germinativa), constituindo assim os folículos primordiais que são observados nos caninos, três semanas após o nascimento. Alguns meses após o nascimento, todos os folículos primordiais com o número definitivo de oócitos já terão se formado (BUCCIONE *et al.*, 1990, ENGLAND e HEWITT, 1999). Após a formação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram num período de quiescência. Os oócitos primários inclusos nesses folículos encontram-se na fase de prófase I da meiose. (LOPES, 2008).

Com a puberdade, ocorre a liberação do pico pré-ovulatório de FSH e do hormônio luteinizante (LH), que promove a progressão da divisão meiótica, formação do oócitos secundários e outra parada na fase de metáfase II. A meiose será retomada novamente após a fecundação do oócito pelo espermatozóide, originando o oócito haplóide fecundado e finalizando a oogênese (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Vale salientar, que na espécie canina, de acordo com Luvoni *et al.* (2005), os oócitos apresentam como particularidade o fato de serem ovulados imaturos, em estágio de vesícula germinativa, enquanto as outras espécies ovulam oócitos em metáfase II (MII). Assim, nos canídeos, o oviduto sustenta por longo período oócitos imaturos e é o sítio da evolução à MII, bem como da fecundação e desenvolvimento a blastocisto. Onde é necessário um período de dois a cinco dias de permanência no oviduto para completar a maturação meiótica do oócito.

2.3. Foliculogênese e atresia folicular

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais), e desempenha duas funções principais que são interdependentes; uma endócrina (produção e liberação de hormônios esteróides e outros peptídios) e a outra exócrina ou gametogênica. Nesta última função, o folículo é um elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária, para assegurar o crescimento e maturação de oócitos primários ou imaturos e, finalmente, para liberar um oócito maduro no processo de ovulação (FIGUEIREDO *et al.*, 2002).

Dessa forma, de acordo com Hafez (2004), o processo de formação, crescimento e maturação folicular pode ser definido como a foliculogênese, que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo maduro ou pré-ovulatório. Na cadela, a foliculogênese inicia-se com a formação dos folículos primordiais após o nascimento, em um intervalo situado entre duas e 12 semanas, podendo também persistir até a puberdade, sendo evidenciada pela presença de oogônias em diferenciação ainda no primeiro estro (MC DOUGALL *et al.*, 1997).

A população folicular presente no ovário é bastante heterogênea e localiza-se no córtex ovariano. De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em folículos pré-antrais ou não cavitários que representam cerca de 90% da população folicular, constituídos pelos folículos primordiais, primários e secundários; e folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários e os folículos de *De Graaf*. Estes últimos são também denominados de folículos maduros ou pré-ovulatórios (FIGUEIREDO, 1995).

Os folículos primordiais, presentes nos ovários caninos ao redor da 3ª semana pós-nascimento, abrigam pequenos oócitos de 1ª ordem (com cerca de 25 µm de diâmetro) com

uma única camada de células da granulosa (RODRIGUES, 2003). A partir do momento que esta única camada formada por células pavimentosas sofre diferenciação tornando-se cubóides, os folículos primordiais evoluem para folículos primários. Em alguns folículos primordiais estão presentes tanto células pavimentosas quanto cúbicas, dando origem à classe de folículos de transição (VAN DEN HURK *et al.*, 1997).

Em continuidade à foliculogênese, através de divisões mitóticas celulares, o folículo primário com um diâmetro de 30 a 100 µm, circundado por uma camada cuboidal de células da granulosa, evolui para secundário, que é constituído por diversas camadas adicionais de células da granulosa (CUNNUNGHAM, 2004). Na cadela, o diâmetro de um folículo secundário situa-se entre 102 e 148,9µm (RODRIGUES, 2003).

Para que os folículos progridam além do estágio pré-antral, a granulosa e a teca desenvolvem receptores para gonadotrofinas FSH e LH, respectivamente, e ocorre um aumento das concentrações séricas de progesterona (REYNAUD *et al.*, 2006). O início da fase antral é marcado pelo surgimento do fluido que começa a dividir a granulosa (o líquido folicular). Esse produto secretório da granulosa aglutina-se para formar uma cavidade fluida ainda maior, o antro. Na fase final de desenvolvimento do folículo antral, o oócito permanece envolvido por uma camada de células da granulosa denominadas *cumulus oophorus* que é fixada à parede dos folículos por um pequeno pedúnculo de células da granulosa (SWENSON, 2006). As células do *cumulus* são, portanto, uma subpopulação de células da granulosa cuja função é fornecer nutrientes aos oócitos durante seu crescimento, participar na formação da zona pelúcida e sintetizar a matriz extracelular composta por proteínas e pelo polissacarídeo ácido hialurônico, de importância no transporte e na atração dos espermatozoides no oviduto (BREDFORD e KIM, 1993; TOSHIMORI, 2000)

Um achado comum observado nos ovários de cadelas é a presença de folículos que contêm mais de um oócito, chamados folículos poliovulares. Apesar de sua origem ser desconhecida, acredita-se que possa resultar de falhas oriundas da divisão das células germinativas durante os estádios iniciais da foliculogênese ou que as taxas de desenvolvimento sejam superiores à diferenciação das células somáticas circundantes, resultando dessa forma de várias células germinativas dentro de um único folículo (PAYAN-CARREIRA e PIRES, 2008). Segundo Reynaud *et al.* (2006), os folículos poliovulares são mais observados em pequenos folículos em crescimento e raramente em grandes folículos pré

antrais, sendo desconhecido se esses folículos podem alcançar a ovulação e liberar um ou mais oócitos viáveis.

Com início do crescimento folicular, os folículos podem vir a ser encaminhados ao desenvolvimento atingindo a ovulação (recrutamento), evento esse que se destina ao um número mínimo de folículos; ou podem sofrer morte celular, por atresia (LIMA, 2006). Na atresia, os folículos ovarianos passam por mudanças degenerativas durante as quais sua integridade é perdida. A maior parte dos oócitos é perdida em estádios diversos de crescimento, bem como em estádios diversos do ciclo ovariano. Tais perdas ocorrem mais frequentemente em estádios avançados do crescimento folicular. A atresia está associada a uma série de mudanças morfológicas, bioquímicas e histológicas, que variam de acordo com o estágio do crescimento folicular e também com a espécie animal (CUNNUNGHAM, 2004).

Dessa forma, a atresia pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica. A via degenerativa é causada por isquemia, que resulta em algumas alterações na permeabilidade da membrana celular e consequente degeneração. Já a apoptótica, ocorre quando o ambiente parácrino ou endócrino não é apropriado para suportar o crescimento folicular e/ou diferenciação das células da granulosa (SILVA *et al.*, 2002). De acordo com Figueiredo et al. (2002), cerca de 99,9% dos folículos não atinge a ovulação, pois são eliminados por atresia, fazendo com que o desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório a partir de um folículo primordial seja um evento biológico extremamente raro.

2.4. Aplicações e importância da biotécnica de MOIFOPA

Durante muito tempo, as pesquisas na área de biotecnologia da reprodução se restringiram a estudos com animais de produção e somente a partir da década de 90, com o interesse da comunidade científica pela preservação da biodiversidade é que a espécie canina mereceu atenção. Esse aspecto deveu-se ao fato de a fêmea canina constituir-se modelo experimental para canídeos ameaçados de extinção, dentre eles o cachorro vinagre (*Spheothos venaticus*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), que são espécies da fauna brasileira (RIBEIRO, 2007).

Além disso, com o crescimento da cinofilia, o intercâmbio entre os criadores profissionais de cães (*Canis familiaris*) em todo o mundo tem favorecido uma maior cobrança

quanto ao aperfeiçoamento de biotecnologias que melhorem o potencial reprodutivo nesta espécie, como também permitam o aproveitamento de reprodutores que apresentem doenças adquiridas e que não estejam aptos a realizar a monta natural havendo também uma demanda para de preservação de germoplasma das cadelas domésticas de características zootécnicas superiores ou de raças raras (DURRANT *et al.*, 1997; RODRIGUES, 1997; STRÖM, 1997).

Dentre as biotécnicas estudadas, a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) surgiu como uma via alternativa para o desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas, tais como a produção *in vitro* de embriões (PIV), a clonagem e a transgenia, no intuito de resgatar os FOPA antes que estes se tornem atrésicos, além de consistir em uma das principais ferramentas utilizadas atualmente para a elucidação da foliculogênese inicial. A MOIFOPA pertence ao grupo das biotécnicas fundamentais ligadas à reprodução, que se encontra em franco desenvolvimento, e compreende três fases: o resgate de FOPA, a conservação dos mesmos através do resfriamento e/ou criopreservação, e o cultivo *in vitro* até o estágio de maturação folicular (FIGUEIREDO *et al.*, 1999).

Assim, no futuro, será possível obter, a partir de um único ovário, milhares de FOPA que, cultivados e submetidos a outras biotécnicas da reprodução como a fecundação *in vitro* e a clonagem, viabilizarão a PIV. Destes, um número de crias saudáveis significativamente maiores do que aquele obtido através da reprodução natural também poderá ser alcançado (LOPES, 2008).

2.5. Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento folicular *in vitro*

Segundo Silva *et al.* (2004a,b), no desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente é essencial que ocorra um controle irrestrito de todas variáveis que possam afetar direta ou indiretamente, tais como, temperatura, CO₂, tensão de oxigênio, controle de contaminações fúngicas e bacterianas, e fatores referentes ao meio de cultivo como a presença de nutriente e suplementos.

Dessa forma, a composição do meio é uma importante ferramenta para a obtenção do sucesso do cultivo de FOPA *in vitro*. Visto que, é no meio de cultivo que os folículos encontrarão subsídios necessários para dar suporte ao seu crescimento (TELFER *et al.*, 2000). Assim, muitos autores têm investigado o efeito de vários componentes no meio de cultivo *in*

vitro de FOPA, tanto de animais de laboratórios, como animais domésticos (DANFORTH *et al.*, 2003; MATOS *et al.*, 2007).

Nesse sentido, diversas substâncias podem compor o meio de cultivo e influenciar no crescimento folicular (TELFER *et al.*, 2000). Segundo Guérin (1998), a composição de um meio deve obedecer a requisitos, como: conter produtos que se assemelhem aos de células tubáricas como exemplo o meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199) ou o fluido sintético ovudutário (SOF); ser suplementado com albumina sérica bovina (BSA) ou soro fetal bovino (SFB); conter elementos capacitadores como a heparina, taurina, hipotaurina; e dentre outros, conter hormônios e fatores de crescimento como as gonadotrofinas e o fator de crescimento epidermal (EGF).

Em relação à espécie canina de forma geral, as pesquisas conduzidas utilizam meios de cultivo semelhantes aos empregados para as outras espécies (GUÉRIN 1998). Bolamba *et al.* (1998) realizaram o cultivo de FOPA avançados em Meio Essencial Mínimo Dulbelco's (DMEM) suplementado, e concluíram que é possível obter-se retomada de meiose em oócitos recuperados de FOPA avançados. Já para Bolamba *et al.* (2002), o cultivo de FOPA de cadelas em meio SOF foi suficiente para maturação de uma menor proporção de oócitos caninos e que tanto o SFB, quanto o BSA não foram efetivos quando adicionados ao meio de cultivo.

No entanto, sabe-se que a suplementação do meio com BSA ou SFB é benéfica por ser uma importante fonte de proteína, suprimindo as necessidades de aminoácidos essenciais, fornecendo energia oriunda de carboidratos e funcionando também como uma fonte de íons dióxido de carbono para manutenção de um pH ideal. Além disso, o acréscimo de BSA aos meios pode facilitar a aderência de fatores de crescimento e evitar decréscimo na concentração de oxigênio do meio (HEWIT e ENGLAND, 1999).

Vale salientar que na composição do meio de cultivo também é aconselhável a adição compostos antioxidantes (LUVONI *et al.*, 2004). Nesse sentido, suplementos como a combinação de insulina, transferrina e selênio (ITS), podem ser utilizados para o fim acima descrito (AUGUSTIN *et al.*, 2003). Assim como a utilização do ácido ascórbico nos meios de cultivo, que age como um potente antioxidante, podendo reduzir os danos causados pela ação de espécies reativas de oxigênio e complexos metal-oxigênio ao DNA, proteínas, carboidratos, lipídios e membranas celulares (SIES *et al.*, 1992).

Vários estudos têm sido desenvolvidos visando verificar a influência de fatores de crescimento e/ou hormônios adicionados aos meios incluindo gonadotrofinas como o FSH (HARTSHORNE, 1997).

2.6. Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

Sabe-se que *in vivo* o hormônio gonadotrófico FSH é crucial para a manutenção da função ovariana. Sua atuação é mais direcionada às células da granulosa e resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação celular, síntese de esteróides e expressão de receptores para EGF e LH (FORTUNE, 2003). Somando-se a isso tem-se o fato de que após a seleção folicular, as gonadotrofinas são necessárias para o desenvolvimento de folículos antrais, não estando claro ainda se o FSH afeta a proliferação de pequenos folículos pré-antrais (MATOS *et al.*, 2007).

O FSH regula a produção de vários fatores de crescimento que agem de forma crítica na ativação e crescimento folicular, atuando por ligação aos receptores expressos nas células da granulosa. Embora os receptores de FSH sejam expressos nos folículos primários avançados, pode vir a causar um efeito indireto no desenvolvimento precoce dos folículos, por fatores liberados por folículos maiores ou pelas células do estroma ovariano (OKTAY *et al.*, 1997; MEDURI *et al.*, 2002).

O uso do FSH no meio de cultivo *in vitro* dos FOPA de animais domésticos, ainda apresenta resultado contraditórios (FORTUNE, 2003). Como demonstrado por Braw-Tal e Yossefi (1997), cultivando folículos bovinos *in vitro*, concluíram que a presença de FSH no meio não apresentou nenhum efeito no crescimento desses folículos. Já Nuttinck *et al.* (1996), trabalhando com a mesma espécie, afirmaram que a presença do FSH no meio foi responsável pela indução da degeneração de oócitos em folículos pré-antrais.

Contraditoriamente, outros estudos *in vitro* têm demonstrado o efeito benéfico da adição de FSH ao meio de cultivo de FOPA, em que foi observado que o FSH promove o crescimento folicular bem como a formação de antro em muitas espécies (murinos: McGEE *et al.*, 1997, SPEARS *et al.*, 1998; humanos: WRIGHT *et al.*, 1999; bovinos GUTIERREZ *et al.*, 2000; ovinos CECCONI *et al.*, 1999, ZHOU e ZHANG, 2005; suínos, MAO *et al.*, 2002; e caprinos, SILVA *et al.*, 2009).

Em caninos, por sua vez, Bolamba *et al.* (1998) utilizaram além do FSH, a Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) e o estradiol para cultivar folículos pré-antrais avançados e antrais precoces. Nesse experimento, foi observado que a adição de tais substâncias promoveu maiores taxas de crescimento e desenvolvimento folicular. Entretanto, apenas uma pequena taxa de oócitos progrediu ao estágio de MII. Este resultado, portanto, mostra que são necessários estudos mais aprofundados acerca da influência do FSH no cultivo de folículos pré-antrais caninos.

3. JUSTIFICATIVA

As biotécnicas reprodutivas apresentam um grande potencial para contribuir na conservação de espécies de canídeos selvagens em extinção, principalmente com a utilização do cão doméstico como modelo (RODRIGUES, 2003). Porém um fator limitante para o desenvolvimento e eficiência dessas biotécnicas é a ausência de um número satisfatório de oócitos a serem fertilizados (TELFER, 2001). Este problema pode vir a ser solucionado por meio do uso de uma grande fonte de oócitos inclusos em FOPA, obtidos com a técnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) (FIGUEIREDO *et al.*, 1999).

Além de que, o uso da MOIFOPA pode vir a auxiliar na solução de inúmeras incógnitas que ainda existem em relação à foliculogênese na espécie canina, assim como a ação dos fatores envolvidos no crescimento, bem como diferenciação e seleção folicular. Tendo em vista que o folículo ovariano pré-antral é o precursor da população de folículos antrais que chegarão ao estágio ovulatório, faz-se necessário o seu estudo para elucidar os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento dessa grande fração da população ovariana.

Dentre outros fatores, na literatura pouco é relatado sobre o cultivo *in vitro* de FOPA caninos, assim como a ação hormonal no meio de cultivo. A ação de gonadotrofinas como o FSH ou LH já foi indiretamente avaliada por Bolamba *et al.* (1998), que por sua vez, utilizaram meios suplementados com FSH, hCG e estradiol para cultivar oócitos de folículos pré-antrais avançados e antrais precoces. O procedimento acarretou porcentagem muito pequena de oócitos que progrediram de MI à MII, além de não ter elucidado a concentração ideal no meio de cultivo para os hormônios utilizados.

Nesse sentido, observa-se a necessidade do desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* eficiente para o cultivo de FOPA caninos com suplementação de hormônios e suas ações na foliculogênese.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

A utilização do FSH no cultivo de folículos pré-antrais caninos mantém a viabilidade folicular e pode influenciar positivamente o crescimento *in vitro* após cultivo de longa duração.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

- ✓ Avaliar o efeito do FSH no meio de cultivo de FOPA caninos.

5.2 Específicos

- ✓ Avaliar o período ideal de cultivo dos FOPA;
- ✓ Durante o cultivo, avaliar o crescimento folicular e a formação de antro;
- ✓ Após o cultivo, analisar a viabilidade dos folículos.

6. CAPÍTULO 1.

Folículos pré-antrais caninos cultivados em diferentes concentrações de hormônio folículo estimulante (FSH) e em diferentes períodos

Michelle Karen Brasil Serafim, Anderson Pinto Almeida, Ana Beatriz Graça Duarte, Gerlane Modesto Silva, Valdevane Rocha Araújo, Roberta Nogueira Chaves , Lúcia Daniel Machado da Silva, José Ricardo de Figueiredo, Cláudio Cabral Campello, Cláudio Afonso Pinho Lopes

Artigo submetido em 20 de outubro de 2009 ao periódico “**Theriogenology**”, classificada como **QUALIS A2** e fator de impacto **2,041** (JCR 2008).

From: esubmission@elsevier.com
To: lucia.daniel.machado@hotmail.com; lucia.daniel@pq.cnpq.br
Date: Tue, 20 Oct 2009 20:09:56 +0100
Subject: Submission Confirmation

Dear Dr. Silva,

Your submission entitled "Canine preantral follicles culture at different concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH)" has been received by Theriogenology.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/therio/>.

Your username is: Lucia Daniel

Your password is: *****

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Theriogenology

Canine preantral follicles culture at different concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH).

Michelle Karen Brasil Serafim^a, Anderson Pinto Almeida^b, Ana Beatriz Graça Duarte^b
Gerlane Modesto Silva^b, Valdevane Rocha Araújo^b, Roberta Nogueira Chaves^b, Lúcia Daniel
Machado da Silva^b, José Ricardo de Figueiredo^b, Cláudio Cabral Campello^b, Cláudio Afonso
Pinho Lopes^b

^aFaculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Carnivore Reproduction (LRC), State
University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil

^bFaculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral
Follicles (LAMOFOPA), PGCV, State University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil

*Corresponding address:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)

Laboratório de Reprodução de Carnívoros (LRC)

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi.

Fortaleza – CE – Brazil. CEP: 60740-000

Tel.: +55.85.3101.9859, Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: michellekarenbs@hotmail.com (Michelle K.B. Serafim)

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of FSH at different concentrations and for different lengths of time in the *in vitro* cultivation of isolated canine preantral follicles. Secondary follicles ($>200\text{ }\mu\text{m}$) were isolated by microdissection and subsequently cultured for 18 days in supplemented α -Minimum Essential Medium (α -MEM), in the absence (control medium) or presence of different concentrations of FSH (ng/ml), FSH100 (fixed concentration of 100 ng/ml throughout the whole culture period), and sequential FSH (FSHSeq – added sequentially – 100, 500 and 1,000 ng/ml). The parameters evaluated were survival, follicular growth, oocyte extrusion and the rate of antrum formation. At the end of cultivation, all of the follicles from all of the treatments (100%, $P<0.05$) were able to maintain their viability, which was marked green by calcein-AM. Furthermore, the FSHSeq treatment on day 18 ($D18-439.80 \pm 14.08\text{ }\mu\text{m}$) was better than the other treatments ($P<0.05$). In regard to the daily follicular growth rates ($\mu\text{m/day}$), the FSHSeq treatment was significantly better (6.47 ± 0.55) than control (3.67 ± 0.32) and FSH100 treatment (4.47 ± 0.38). Furthermore, the FSH100 and FSHSeq treatments showed a significantly higher rate of antrum formation when compared to the control group on D12 of cultivation. When comparing the treatments after D12, FSHSeq showed a significantly higher rate of extrusion when compared to the control ($P<0.05$). Therefore, we concluded that the sequential addition of FSH to the culture media maintained the survival of isolated canine preantral follicles, as well as promoted an increased rate of follicular growth and antrum formation.

Keywords: Canine, Preantral Follicles, Culture, FSH.

1. INTRODUCTION

Research into reproductive technologies, such as *in vitro* embryo maturation (IVM), fertilization (IVF) and culture (IVC), are conducted in female dogs in an attempt to elucidate the reproductive biology of dogs, as well as expand the available knowledge that can be applied to help in the conservation of endangered species [1] (SONGSASEN et al., 2007). However, the greatest obstacle to the applicability and development of these biotechnologies is the differences in the reproductive physiology of the female dog, and the low efficiency of IVM for canine oocytes, compared to other mammalian species [2] (FARSTAD et al., 2000).

In most mammals, oocyte maturation occurs within the ovarian follicle, with one or more mature oocytes being ovulated. In dogs, the female gamete shows peculiar characteristics [3] (DE LOS REYES et al., 2005), such as the fact that the oocyte is immature when ovulated and remains in the oviduct until it reaches maturation three to five days between the third and fifth day after ovulation. Furthermore, the canine oocyte has a high lipid content, which results in a dark uniform cytoplasm, with extremely compact cumulus and corona radiata cells [4] (KIM et al., 2005).

Since the IVM yield of canine oocytes is low, the applicability of this biotechnology is limited. However, this obstacle can be solved by using oocytes that are derived from preantral follicles grown *in vitro* [5] (TELFER, 2001). Consequently, the biotechnology of the manipulation of oocytes enclosed in preantral follicles (MOEPF) becomes a viable alternative, since the preantral follicles constitute a reserve pool of female gametes, with thousands to millions in number, depending on the species. The main objective of MOEPF is to recover preantral follicles from the ovaries for subsequent *in vitro* cultivation until the maturation stage, and to prevent the process of follicular atresia that occurs naturally *in vivo* [6] (FIGUEIREDO et al., 2008).

Nevertheless, the development of an *in vitro* culture system that supports the growth of the preantral follicle in domestic species is ambitious. This growth is supplemented by using culture media enriched with inorganic salts, vitamins, energetic substrates and amino acids, among other substances [5] (TELFER et al., 2000). According to [7] Guérin (1998), research conducted on canine species generally uses culture media similar to those used for other species.

Several substances that influence follicular growth can be added to the culture media. Among these substances, the following stand-outs are bovine serum albumin (BSA), which is used as a protein source, energetic substrates and antioxidants, such as ascorbic acid, and the combination of insulin, transferrin and selenium (ITS). Moreover, several studies have been developed to examine the influence of growth factors and/or hormones added to the culture media, including gonadotropins such as follicle-stimulating hormone (FSH) [8] (HARTSHORNE et al., 1994).

In vitro studies have shown a positive effect of adding FSH to the culture media of preantral follicles. It has been shown that FSH promotes follicular growth, as well as antrum

formation in many species, murine ([9] McGEE et al., 1997, [10] SPEARS et al., 1998), human [11] (WRIGHT et al., 1999), bovine [12] (GUTIERREZ et al., 2000), ovine [13] (CECCONI et al., 1999, [14] ZHOU and ZHANG, 2005), swine [15] (MAO et al., 2002) and caprine [16] (SILVA et al., *in press*).

In canines, [17] Bolamba et al. (1998) used, in addition to FSH, human chorionic gonadotropin (hCG) and estradiol, to cultivate advanced preantral follicles and early antral follicles. In this experiment, only the reference parameters for the maturation of oocytes derived from advanced preantral follicles were observed after *in vitro* culture, while follicular development or growth were not evaluated. This fact highlights the need for further studies that may help elucidate the mechanisms of early folliculogenesis in the female dog, especially since an *in vitro* culture system for canine preantral follicles has never been tested. Moreover, more in-depth studies about the influence of FSH in culturing canine preantral follicle are needed. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of adding FSH at different concentrations and for different lengths of time to the *in vitro* culture of isolated canine preantral follicles.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Collection and transport of ovaries

Ovaries (n=60) from female dogs, without a defined breed and in different stages of the estrous cycle, were collected immediately after euthanasia in the Center for Zoonosis Control in Fortaleza, Ceará, Brazil. After collection, the ovaries were washed once in 70% alcohol for 10 seconds and twice in HEPES-buffered Minimum Essential Medium (MEM) plus penicillin (100 µg/mL) and streptomycin (100 µg/mL). The ovaries were then transported to the laboratory in less than one hour at 4°C [18] (LOPES et al., 2009).

2.2. Isolation of canine advanced preantral follicles

In the laboratory, after removing the ovarian bursa and other adjacent tissues and ligaments, the ovarian cortex was fragmented into slices approximately 1 mm thick. Then, secondary preantral follicles greater than 200 µm in diameter were manually isolated by

microdissection, using 26 G needles attached to 1-ml syringes (MAO et al., 2004) under a stereomicroscope dissecting microscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan). After isolation, the follicles were immersed in drops of culture media and were washed three times before being transferred into culture plates. Only follicles considered morphologically normal, that is having a centrally located spherical and dark oocyte, surrounded by two or three compact layers of granulosa cells, and with no apparent damage to the basal membrane, were selected for cultivation [19] (DURRANT et al., 1998).

2.3. *In vitro* culture

The follicles were cultured in 100 μ l drops of media under mineral oil, using 60-mm diameter Petri dishes. The culture media was composed of α -MEM supplemented with BSA (3 mg/mL), glutamine (2 mM), hypoxanthine (2 mM) and ITS (insulin 6.25 μ g/mL, transferrin 6.25 μ g/mL and selenium 6.25 ng/mL), ascorbic acid (50 μ g/ml) and recombinant FSH (FSHrec) at different concentrations. In this study, the following groups were tested: control (basic media); FSH100 (fixed concentration of 100 ng/ml throughout the whole culture period); and sequential FSH (FSHSeq – added sequentially – 100, 500 and 1,000 ng/ml beginning at 0, 6 and 12 days of cultivation). The follicles were incubated at 39°C with 5% CO₂, and the media was changed every two days.

Before, during and after cultivation, parameters such as the viability, diameter, follicular growth rate and the rate of antrum formation were evaluated. To evaluate growth, the follicles were measured every 6 days using an ocular micrometer attached to a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan), using the average of two measurements (vertical + horizontal/2). To evaluate the rate of antrum formation, the emergence of a translucent cavity filled with follicular fluid was observed visually while changing the culture media, and the diameter of the follicle was measured.

2.4. Analysis of follicular survival

To verify follicular viability at the end of the culture period, the fluorescent markers calcein-AM (4 μ M) and ethidium homodimer-1 (2 μ M) were used for staining live and dead follicles, respectively. The follicles were incubated at 37°C for 15 minutes, washed three

times in HEPES-buffered TCM199, mounted between a slide and a coverslip, and then evaluated with an epifluorescence microscope (Leica, Germany). The follicles were considered to be viable when the cytoplasm of their cells was stained green (calcein-AM) and the nuclei were not stained red (ethidium homodimer-1) [18] (LOPES et al., 2009).

2.5. Statistical Analysis

At the end of the culture period, the data obtained were submitted to ANOVA followed by the Student's t-test and the Kruskal-Wallis test for follicular diameter and growth rate analysis, respectively. The data were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (mean $\pm$ SEM). For the viability and antrum formation parameters, the Chi-square was used. The differences were considered to be statistically different when $P > 0.05$.

3. RESULTS

The rate of recovery of canine preantral follicles with a diameter $> 200 \mu\text{m}$, as seen by microdissection, was satisfactory; more than 100 follicles from each set of ovaries were obtained. This study used a total of 306 preantral follicles that were randomly distributed among the treatments.

3.1. Follicular viability

At the end of the 18 day cultivation, all of the follicles were submitted to a viability analysis with the fluorescent markers calcein-AM and ethidium homodimer-1 for live and dead cell staining, respectively. All of the follicles (100%, $P < 0.05$) were stained green by calcein-AM, confirming that all of the treatments were able to maintain follicular viability until the end of cultivation (D18; $P < 0.05$) (Figure 1).

3.2. Follicle diameter and follicular growth rate

The average initial diameter of the follicles, before being cultured (D0), for the control, FSH100 and FSHSeq was $298.96 \pm 7.02 \mu\text{m}$, $286.00 \pm 5.87 \mu\text{m}$ and $275.39 \pm 6.55 \mu\text{m}$, respectively ($P > 0.05$). Figure 2 shows that as the culture progressed, there was a significant ($P < 0.05$) increase in the follicle diameter for all of the treatments when all of the different culture periods were compared. Furthermore, FSHSeq treatment significantly increased the follicle diameter beginning at day 12 of culture (D12) ($398.07 \pm 12.06 \mu\text{m}$) when compared to the control group ($343.11 \pm 8.61 \mu\text{m}$) ($P < 0.05$). The FSHSeq treatment did not differ from FSH100 ($P > 0.05$) on days 0, 6 and 12 whereas, on D18, FSHSeq ($439.80 \pm 14.08 \mu\text{m}$) was significantly larger than the other treatments ($P < 0.05$) (Figure 2).

The daily rate of follicular growth ($\mu\text{m/day}$) was significantly higher ($P < 0.05$) in follicles on FSHSeq treatment ($6.47 \pm 0.55 \mu\text{m/day}$) than that of the control ($3.67 \pm 0.32 \mu\text{m/day}$) and FSH100 ($4.47 \pm 0.38 \mu\text{m/day}$).

3.3. Antrum formation

Immediately after isolation, the preantral follicles had a spherical shape, with an oocyte surrounded by at least two layers of granulosa cells without antrum, and with an intact basal membrane. After the first six days of cultivation, all of the treatments had follicles with an antral cavity, with the rate of antrum formation being 40.78%, 46.67% and 44.90% for the control, FSH100 and FSHSeq, respectively. Moreover, the FSH100 and FSHSeq treatments showed a significantly higher rate of antrum formation than the control group on D12 of cultivation. On D18, the maximum rates of antrum formation were observed for all of the treatments (control: 82.52%; FSH100: 90.48% and FSHSeq: 89.80%) ($P > 0.05$) (Figure 3).

3.4. Follicular Extrusion

All of the follicles that were used showed an intact basal membrane on D0. However, when the different culture periods were compared, the rate of follicular extrusion significantly increased from D0 to D6 in all of the treatments ($P < 0.05$). When the treatments were compared with each other beginning at D12, FSHSeq showed a significantly higher extrusion rate than did the control ($P < 0.05$) (Figure 4).

4. DISCUSSION

This is the first study to evaluate the *in vitro* development of canine preantral follicles by examining the effect of different concentrations of FSH and different culture periods.

We chose to use the method of mechanical isolation by microdissection, using 26 G needles attached to syringes, to recover canine preantral follicles. The mechanical isolation method has been used before for other animals, wild cats [20] (JEWGENOW et al., 1996); swine [15] (MAO et al., 2004), mice [21] (PARK, et al., 2005), humans [22] (ABIR et al., 1999), caprine [16] (SILVA et al., *in press*), buffalo [23] (SHARMA et al., 2009), ovine [24] (TAMILMANI et al., 2005), bovine [12] (GUTIERREZ et al., 2000). [19] Durrant et al. (1998) also recovered preantral follicles from female dogs using an enzymatic isolation method and, despite having obtained follicles at various stages of development, these authors found high rates of degeneration. Further investigation of the enzymatic isolation method in murine's preantral follicles showed that there was more disruption of the basal membrane in addition to greater degeneration ([25] DEMEESTERE et al. 2000, [21] PARK et al. 2005).

Follicular viability was evaluated at the end of cultivation (D18) by using the fluorescent probes calcein-AM and ethidium homodimer-1 for live and dead cell staining, respectively. We observed that 100% ($P < 0.05$) of the follicles were viable in all of the treatments. This methodology was used successfully to evaluate the viability of preantral follicles of dogs [18] (LOPES et al., 2009) and sheep [16] (Silva et al., *in press*).

The media used for the cultivation of canine preantral follicles in this study was supplemented α -MEM. This media was used successfully by [16] Silva et al. (*in press*) for the cultivation of caprine preantral follicles, with the addition of a fixed concentration of FSH (1,000 ng/ml), and a reduction in the survival rate at the end of cultivation was obtained. This result was probably due to the concentration of FSH that was used, which may have caused an increase in the rate of follicular extrusion, characterized by rupture of the basal membrane. Similar results were found in this study when canine preantral follicles were cultured in media supplemented with FSH (FSH100 and FSHSeq), promoting a high extrusion rate on day 6 of cultivation, when compared to the control. The presence of this hormone may have overstimulated follicular growth, as well as the increase of the antral cavity, without the

concomitant remodeling of the basal membrane. On the other hand, the use of ascorbic acid in the composition of the basic media (control) favors the integrity of the basal membrane of the follicle, which results in remodeling, and consequently, allows for the maintenance of follicular viability for long culture periods.

In regard to the culture period, the literature reports three days for the cultivation of canine follicles. However, in this study, the initiation of antrum formation with the accumulation of follicular fluid between the oocyte and the granulosa cells was observed after the sixth day. This shows that three days is an insufficient period of time for follicular development with antrum formation and for adequate growth. In addition, the follicles had a variable diameter between 373.33 and 439.80 μm at the end of the 18 days of cultivation in all of the treatment groups. In this experiment, a reasonable growth of canine preantral follicles was observed, which has never been reported before in the literature. This fact increases the possibility that this methodology may be used in the future, with the objective of obtaining viable oocytes that are destined to mature *in vitro*. Furthermore, [26] Rodrigues et al. (2009) described that the rate of degeneration of canine oocytes that had matured *in vitro* is still very high, and there was limited success with the rates of maturation up to metaphase II, with only 20% in some cases [2] (FARSTAD, 2000).

In this study, the follicles were cultured individually in 100 μl drops of media under mineral oil, directly on plastic petri dishes. Also in canines, other authors report the culturing of follicles in groups of 5-10/ml/well [27] (BOLAMBA et al., 2002) or of 2-12/750 μl /well [17] (BOLAMBA et al., 1998), using 24-well plates. However, [8] Hartshorne et al. (1997) asserted that the method of cultivation of individual follicles is more appropriate when you wish to evaluate follicular metabolism, steroidogenesis, oocyte development or even the hormonal influence on the cultivation of follicles. Furthermore, when follicles are culture individually, they achieve excellent growth, and have successful antrum formation and subsequent development [28] (PEDERSEN, 1970).

With regard to follicular diameter, in this experiment we observed that the group treated with FSHSeq had a significantly larger diameter ($439.80 \pm 14.08 \mu\text{m}$) at the end of the 18 days of cultivation when compared to the control ($373.33 \pm 10.39 \mu\text{m}$). The presence of FSH in the culture media allows for the use of glucose and production of estradiol, and it can also stimulate the follicles to grow by increasing their cellular density [29] (HIRSHFIELD,

1994). This hormone is known to stimulate follicular growth and maintain granulosa cell integrity in swine [30] (HIRAO et al., 1994), ovine [13] (CECCONI et al., 1999), [31] humans (ROY & TREACY, 1993) and bovine [32] (SAHA et al., 2000). In this study, the growth rate was faster for the FSHSeq treatment (6.47 ± 0.55 , $P < 0.05$), when compared to the other treatments. This result may be due to an increase in the number of FSH receptors as the follicle develops, which becomes increasingly sensitive to this stimulus [33] (CUNNINGHAM, 2004). Therefore, the increasing concentrations of FSH used in this study (FSHSeq) mimic what occurs *in vivo*, considering that there is an increase in the number of receptors that will support the higher concentrations during the final phases of follicular growth.

Coupled with follicular growth, FSH can be involved in antrum formation [29] (HIRSHFIELD, 1994), since this was observed when preantral follicles from swine [30] (HIRAO et al., 1994), ovine [13] (CECCONI et al., 1999), caprine [34] (HUANMIN & YONG, 2000, [16] SILVA et al., *in press*), human [31] (ROY & TREACY, 1993) and bovine [12] (GUTIERREZ et al., 2000, [35] ITOH et al., 2002) were cultured *in vitro*. Similar results were obtained in this study, in which the treatments with an addition of FSH (FSH100: 83.81%; FSHSeq: 82.65%) showed a significantly greater rate of antrum formation than that of the control group (70.87%), after day 12 of cultivation.

From these results, it can be concluded that the sequential addition of FSH to the culture media maintains the survival of isolated canine preantral follicles. Furthermore, FSH increases the rates of follicular growth and antrum formation during long periods of cultivation. The cultivation system described in this study is an important step in the production of potentially viable oocytes that will be used for maturation, fertilization and subsequent *in vitro* production of embryos.

Aknowledgments

5. REFERENCES

- [1] Songsasen N, Wildt DE. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Anim Reprod Sci* 2007; 98:2–22.
- [2] Farstad W, Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 2000; 53:175–86.

- [3] De Los Reyes M, Langea JDE, Miranda P, Palominos J, Barros C. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005; 64:1–11.
- [4] Kim MK, Fibrianto Y H, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Effects of estradiol-17b and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005;.63:1342–1353.
- [5] Telfer EE. In vitro development of pig preantral follicles. *Reprod. Suppl* 2001; 58: 81–90.
- [6] Figueiredo JR. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote* 2007; 15:173-182.
- [7] Guérin C. Fecondation in vitro chez la chienne.Ou en est-on? *Pratique Médicale et Chirurgicale des.Animaux de Compagnie* 1998; 33:151-161.
- [8] Hartshorne GM, Sargent IL, Barlow DH. Meiotic progression of mouse oocytes throughout follicle growth and ovulation in vitro. *Human Reproduction* 1994a; 9:352-359.
- [9] McGEE E, Spears N, Minami S, Hsu SY, Chun SY, Billig H, Hsueh AJW. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1997; 138: 2417-2424.
- [10] Spears N, Murray AA, Alisson V, Boland NI, Gosden RG. Role of gonadotrofins and ovarian steroids in the development of mouse follicles in vitro. *J. Reprod. Fertil* 1998; 113:19–26.
- [11] Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston RML, Franks S, Hardy K. Effects of follicle-stimulating hormone and serumsubstitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Human Reprod* 1999; 14: 1555–62.
- [12] Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro *Biol Reprod.* 2000; 62:1322–1328.
- [13] Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M. In vitro development of sheep preantral follicles. *Biol. Reprod.* 1999; 60:594–601.
- [14] Zhou H, Zhang Y. Regulation of in vitro growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domest. Anim. Endoc* 2005; 28:235–42.
- [15] Mao J, Wu G, Smith MF, Mccauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN. Effects of culturemedium, serumtype, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biol. Reprod.* 2002; 67:1197–1203.

- [16] Silva CMG, Matos MHT, Rodrigues GQ, Faustino LR, Pinto LC, Chaves RN, Araújo VR, Campello CC, Figueiredo JR. In vitro survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Animal Reproduction Science* (2009).
- [17] Bolamba D, Borden-Russ KD, Durrant BS. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultures in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 1998; 49, 5: 933-942.
- [18] Lopes CAP, Santos RR, Celestino JJH, Melo MAP, Chaves RN, Campello CC, Silva JRV, Bao SN, Jewgenow K, Figueiredo JR. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Animal Reproduction Science*, 2009; 115:201–214.
- [19] Durrant BS, Pratt NC, Russ KD, Bolamba D. Isolation and characterization of canine advanced, preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 1998; 49:917-932.
- [20] Jewgenow K, Stolte M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats -viability and ultrastructural investigations. *Animal Reproduction Science* 1996; 44:183- 193.
- [21] Park KS, Lee TH, Park YK, Song HB, Chun SS. Effects of isolating methods (mechanical or enzymatical) on structure of pre-antral follicles in mouse. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2005; 22: 9-10.
- [22] Abir R, Roizman P, Fisch B, Nitke S, Okon E, Orvieto R, Ben RZ. Pilot Study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 h. *Hum. Reprod.* 1999; 14:1299–1301.
- [23] Sharma GT, Dubey PK, Meur SK. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. *Livestock Science* 2009; 123: 300-305.
- [24] Tamilmani G, Rao BS, Vagdevi R, Amarnath D, Naik BR, Mutharao M, Rao VH. Nuclear maturation of ovine oocytes from sheep preantral follicles cultured in vitro. *Small Rumin.* 2005; 60: 95–305.
- [25] Demeestere I, Delbaere A, Gervy C, Englert Y. Effect of pre-antral follicle isolation technique on follicular growth, oocyte maturation and fertilization in vitro in the mouse. *Hum. Reprod.* 2000; 15:89-90.
- [26] Rodrigues BA, Silva AEF, Rodriguez P, Cavalcante LF, Rodrigues JL. Cumulus cell features and nuclear chromatin configuration of in vitro matured canine COCs and the influence of *in vivo* serum progesterone concentrations of ovary donors. *Zygote* 2009; 1:13.
- [27] Bolamba, D, Borden-russ KD, Durrant BS. In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicle in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essencial. *Theriogenology* 2002; 58:1689-1703.

- [28] Pedersen T. Determination of follicle growth rate in the ovary of the immature mouse. *Journal of Reproduction and Fertility* 1970; 21:81–93.
- [29] Hirshfield AN. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biology of Reproduction* 1994; 50:421–428.
- [30] Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M, Kato S. In vitro growth on maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1994; 100:333-339.
- [31] Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long term culture of human preantral follicles. *Fertil. Steril.* 1993, 59:783-790.
- [32] Saha S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 63:27-39.
- [33] Cunnungham J. *Veterinary Physiology*, Revised Edition. Guanabara Koogan, 2004.
- [34] Huanmin Z, Yong Z. In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology* 2000; 54:641-650.
- [35] Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol. Reprod.* 2002; 67:1099-1105.

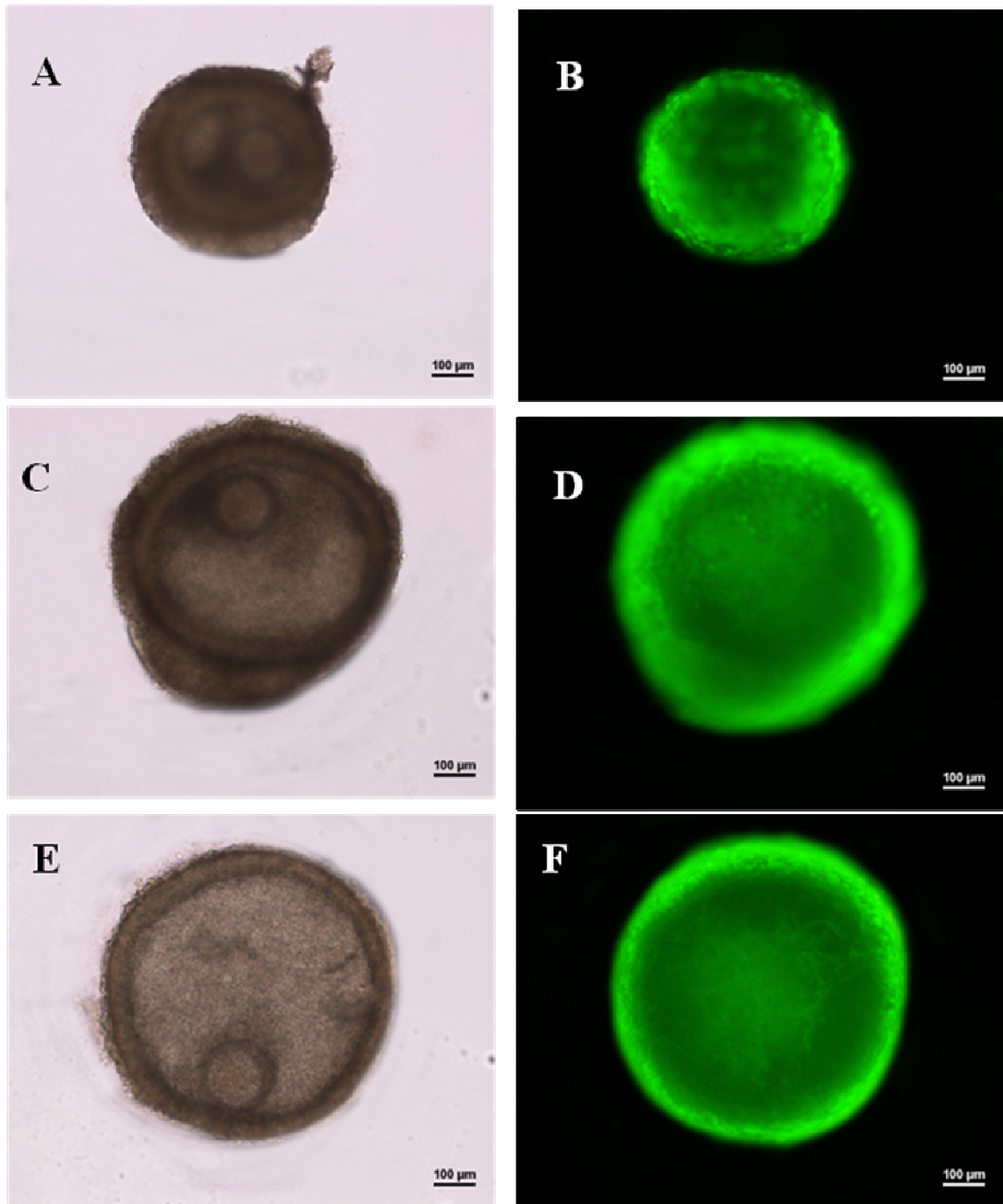


Figure 1: Viable canine ovarian follicles (stained green with calcein-AM) cultured *in vitro* for 18 days in the absence of FSH (control, A and B), presence of FSH at a fixed concentration (FSH100, C and D) or FSH added sequentially (FSHSeq, E and F). The scale bars represent 100 μm .

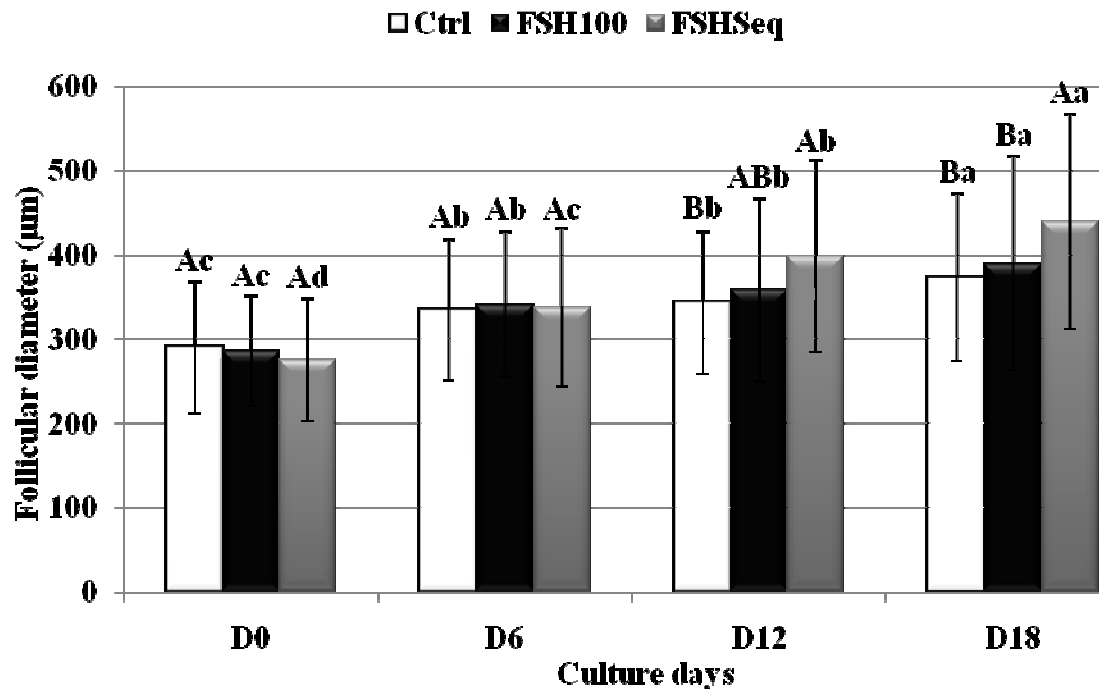


Figure 2: Mean $\pm$ Standard Error of the Mean (SEM) of the follicular diameter after *in vitro* culture, in the presence or absence of different concentrations of FSH (100 ng/ml or sequential) for 18 days.

The capital letters are the comparison between treatments (^{A,B}) and the lowercase letters are the comparison between days (^{a,b,c,d}).

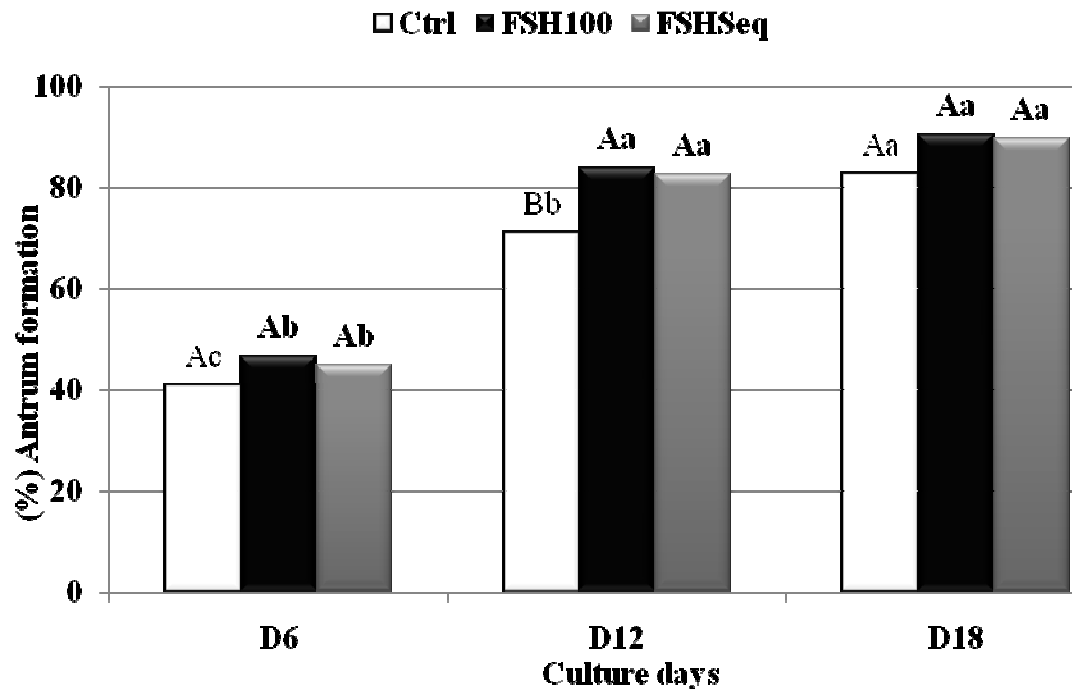


Figure 3: Percentage of antrum formation in follicles cultured *in vitro* in the presence or absence of different concentrations of FSH (100 ng/ml or sequential) for 18 days.

The capital letters are the comparison between treatments (^{A,B}) and the lowercase letters are the comparison between days (^{a,b,c}).

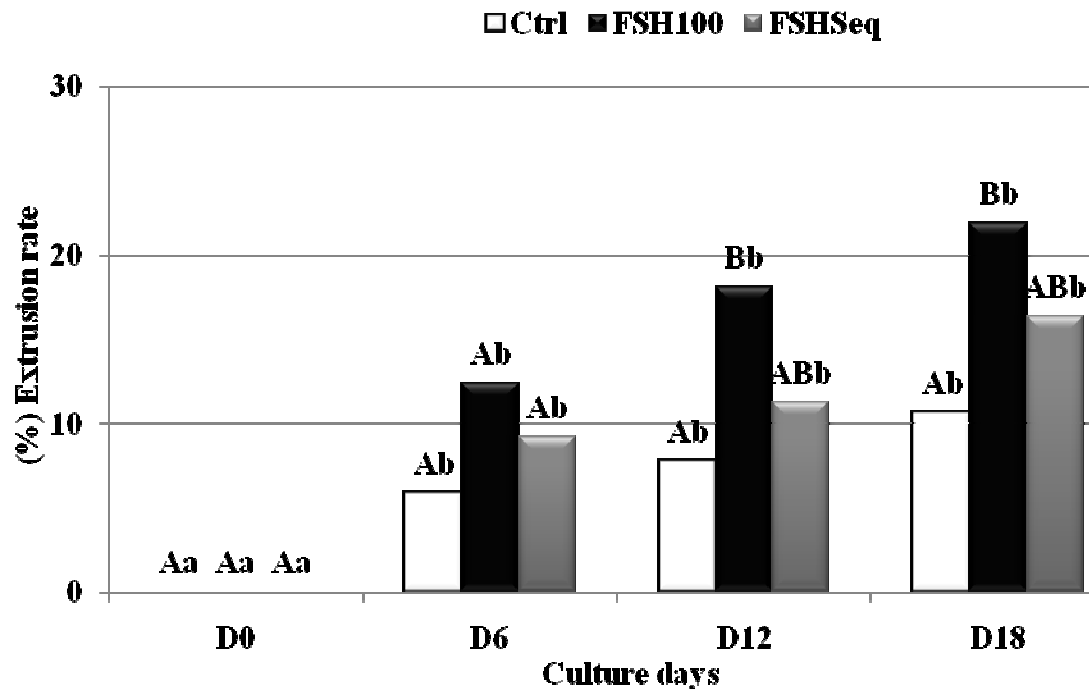


Figure 4: The extrusion rate of follicles cultured *in vitro* in the presence or absence of different concentrations of FSH (100 ng/ml or sequential) for 18 days.

The capital letters are the comparison between treatments (^{A,B}) and the lowercase letters are the comparison between days (^{a,b}).

7. CONCLUSÃO

Este trabalho foi pioneiro na análise do crescimento e desenvolvimento folicular na espécie canina, em que se pode concluir que a adição de FSH de forma sequencial ao meio de cultivo mantém a sobrevivência de folículos pré-antrais caninos isolados. Além disso, promove aumento nas taxas de crescimento folicular e formação de antro por um longo período de tempo de cultivo.

8. PERSPECTIVAS

As biotécnicas reprodutivas como a manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA), maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), produção de embriões *in vitro* (PIV) e transferência de embriões (TE) são essenciais na manutenção da biodiversidade por meio da preservação do material genético e desenvolvimento de pesquisas que poderão permitir o uso desses métodos de reprodução assistida nos animais de valores comerciais e afetivos. Somando-se a isso, temos ainda o fato de que as pesquisas em biotécnicas aplicadas nos caninos domésticos abrem a perspectiva de serem adaptadas à preservação de espécies canídeas ameaçadas de extinção.

Nesse sentido, temos como principal perspectiva em relação ao nosso trabalho, a idéia de que novos estudos referentes a cultivo *in vitro* de FOPA caninos devem ser realizados objetivando complementar os dados obtidos em nosso experimento. Em futuros experimentos podem ser testados a adição de novos componentes ao meio de cultivo (hormônios, fatores de crescimento, antioxidantes), um tempo de cultivo maior para o crescimento do oócito, dentre outros pontos. O importante é que com tais estudos, possa-se implantar um método eficiente do cultivo de FOPA caninos que permita o crescimento e maturação com posterior FIV, e finalizando com o objetivo principal da técnica MOIFOPA, a obtenção de embriões viáveis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR, R., ROIZMAN, P., FISCH, B., NITKE, S., OKON, E., ORVIETO, R., BEN RAFAEL, Z., PILOT, Study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 h; *Hum. Reprod.*, v.14, p.1299–1301, 1999.

ANDERSEN, A. C.; SIMPSON, M.E. **The ovary and Reproductive Cycle of the dog (Beagle)**. Los Altos: Geron- X, Inc., 1973.

ANDERSEN, A.C. Reproductive System. B/Female. In: ANDERSEN,A.C.; GOOD, L.S. (Eds): *The beagle as an experimental dog*. Iowa: Iowa State University Press, p.321-326,1970.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; FICHER, B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.91-99, 2003.

AVELINO, K.B. **Efeito da estimulação e inibição da síntese de glutatona durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária**. 2004. 82f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) . Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias , Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004

BARBER, M.R. *et al.* Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. **Theriogenology**. Los Altos. v. 55, n. 8, p. 1705-1917, 2001.

BEARDEN, H. J. & FUQUAY, J. W. **Applied Animal Reproduction**. 4^a ed. Prentice Hall. 351p. 1997.

BEDFORD, J.M.; KIM, H.H. Cumulus oophorus as sperm sequestering device *in vivo*. **Journal of Exp. Zoologica**. v. 265, p. 321-328, 1993.

BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K.D.; DURRANT, B.S. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicle in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essencial. **Theriogenology**, v.58, p.1689-1703, 2002.

BOLAMBA,D.; BORDEN-RUSS, K. D.; DURRANT, B. S. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultures in advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v. 49, n.5, p. 933-942, 1998.

BRAW-TAL R. , 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, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5–13, 2006

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interation between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 543-547, 1990.

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

CONCANNON, P.W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **J Reprod Fertil** 1993;47 (Suppl):3-27

CONCANNON, P.W. Reproduction in the dog and cat. In: Cupps P.T. **Reproduction in Domestic animals**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1991, p.517-554.

CONCANNON, P.W.; DIGREGÓRIO, G.B. Canine vaginal cytology. In: T.J. BURKE (ed). **Small Animal Reproduction and Fertility**. Ed. Philadelphia: Lea and Febiger, , p. 96-111,1986.

CUNNUNGHAM J. **Veterinay Fiolology**, Revised Edition. Guanabara Koogan, 2004.

DANFORTH, D.R.; ARBOGAST, L.K.; GHOSH, S.; DICKERMAN, A.; ROFAGHA, R.; FRIEDMAN, C.I. Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Preantral Follicle Growthin the Rat Ovary, **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1736–1741, 2003.

DE LOS REYES M., LANGEA J. DE, MIRANDA P., PALOMINOS J., BARROS C.; Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes, **Theriogenology**, v.64 ,1–11, 2005.

DURRANT B. S; PRATT, N. C., RUSS; K. D.; BOLAMBA D.; Isolation and characterization of canine advanced, preantral and early antral follicles, **Theriogenology** 49:917-932, 1998.

ENGLAND, G.C.W.; HEWITT, D.A. Follicular growth and ovulation in dogs. In: **EVSSAR Annual Symposium**. Lyon , p. 51, 1999.

FARSTAD W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v.53, p.175–86, 2000.

FARSTAD, W., Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Aniaml Reproduction Science**, v. 60-61, p.375-387, 2000.

FIGUEIREDO J.R., Isolement, earaetérisation et culture de fomentes pré-antraux ehez lês bovins. Université de Liege, Belgique, 113 p. Tese de doutorado. Universitéde Liege, 1995.

FIGUEIREDO J.R, AMORIM CA, LUCCI CM, GONÇALVES PBD. Isolation and *in vitro* culture of ruminant preantral follicles. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 27, p. 11-31, 1999.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. 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**. São Paulo: Livraria Varela, p. 227-256, 2002.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J.F. Extracellular matrix proteins and basementmembrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 43, p. 845-858, 1995.

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. (Eds). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Editora Roca, São Paulo, p.303-327, 2008.

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.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CAB international, p. 1-640, 1994.

GUÉRIN, C. Fecondation *in vitro* chez la chienne.Ou en est-on? **Pratique Médicale et Chirurgicale des.Animaux de Compagnie**, v.33, p.151-161,1998.

GUTIERREZ, C.G., RALPH, J.H., TELFER, E.E., WILMUT, I.,WEBB, R., Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*, **Biol Reprod**.v. 62, p.1322–1328, 2000.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7ª ed., São Paulo, Manole, 513p. 2004.

HARTSHORNE GM, SARGENT IL AND BARLOW DH, Meiotic progression of mouse oocytes throughout follicle growth and ovulation *in vitro*. **Human Reproduction** 9 352-359, 1994a.

HIRSHFIELD AN Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats **Biology of Reproduction** 50 421–428, 1994.

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproductionand Fertility** V. 34 (suppl), p. 39-54, 1987

JEWGENOW K.; STOLTE M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations; **Animal Reproduction Science**, v. 44, p.: 183-193; 1996

K. REYNAUD ,A. FONTBONNE , N.MARSELOO ,C. V. LESEGNO , M. SAINT-DIZIER, S. CHASTANT-MAILLARD, *In vivo* canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review, **Theriogenology** v.66 , p.1685–1693, 2006.

KARLSON, P., GEROK, W., GROSS, W., HOXTER, G. **Patobioquímica**, 1ª ed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 321p., 1982.

KIM, M. K., FIBRIANTO Y. H, OH H. J., JANG G., KIM H. J., LEE K. S., KANG S. K., LEE B. C., HWANG. W. S.; Effects of estradiol-17b and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes, **Theriogenology** v.63,p. 1342–1353, 2005.

LIM, J.M.; HANSEL, W. Exogeneous substances affecting development of *in vitro* derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. **Theriogenology**, v.53, p.1081-1091, 2000.

LIMA, ANA KELEN FELIPE; **Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos incluídos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica**, Fortaleza, 2006 75 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

LIU, J., VAN DER ELST, J., VAN DEN BROECK, R., DHONT M. Live offspring by *in vitro* oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 171-178, 2001.

LOPES, C. A. P.; SANTOS R. R.; CELESTINO, J. J. .H.; MELO M. A. P., CHAVES R.N.; CAMPELLO C. C.; SILVA J. R.V.; BAO S. N.; JEWGENOW K.; FIGUEIREDO J. R.; Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time, **Animal Reproduction Science**, in press, 2009. 115, 201–214, 2009.

LUVONI G.C., CHIGIONI S., ALLIEVI E., MACIS D., Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes **Theriogenology**, v.63:41:59, 2004.

MAO, J., WU, G., SMITH, M.F., MCCAULEY, T.C., CANTLEY, T.C., PRATHER, R.S., DIDION, B.A. & DAY, B.N. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. **Biol. Reprod.**, 67, 1197–203, 2002.

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.

Mc DOUGALL, K.,. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. Cambridge. v. 51, p. 25-31, 1997.

McGEE E, Spears N, Minami S, Hsu SY, Chun SY, Billig H, Hsueh AJW. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**; v. 138: 2417-2424, 1997.

MEDURI, G., CHARNAUX, N., DRIANCOURT, M.-A., COMBETTES, L., GRANET, P., VANNIER, B., LOOSFELT, H. & MIGROM, E., Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes?, **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.87, p. 2266–76, 2002.

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

OKTAY, K., BRIGGS, D. & GOSDEN, R.G. . Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles, **J. Clin. Endocrinol. Metab.**v. 82, 3748–51, 1997.

PARK, K. S.; LEE, T. H.; PARK, Y. K.; SONG, H. B.; CHUN, S. S.; Effects of isolating methods (mechanical or enzymatical) on structure of pre-antral follicles in mouse, **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 22, Nos. 9/10, 2005.

RIBEIRO, Ana Paula Coelho; **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 (Doutorado em Cirurgia Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias,São Paulo,Jaboticabal, 2007.

RODRIGUES B.A, SILVA A.E.F., RODRIGUEZ P., CAVALCANTE L.F, RODRIGUES J.L Cumulus cell features and nuclear chromatin configuration of *in vitro* matured canine COCs and the influence of *in vivo* serum progesterone concentrations of ovary donors **Zygote**: p. 1 v.13, 2009.

RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado**. 176p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Reproductive endocrinology in the bitch, **Clínica Veterinária**, VII, v.40, p.50-58, 2002

RODRIGUES, BERENICE DE ÁVILA; **Maturação e fecundação "in vitro" de ovócitos de caninos domésticos (*canis familiaris*)** Tese de doutorado em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal PORTO ALEGRE 2003

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatômica**, v. 24, p. 77-92, 1983.

RÜSSE, I.; SINOWATZ, F. Gametogenesis. In: **Lehrbuch der Embryologie der Haustiere**. Berlin: Parey, 1991, p. 42-92.

SHARMA G. T.; DUBEY P. K.; MEUR, S.K. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles, **Livestock Science**, v. 123, p. 300-305, 2009,

SIES H., STAHL W., SUNDQUIST A.R.; Antioxidant functions of vitamins. **Ann NY Acad Sci**, v. 669, p. 7-20, 1992.

SILVA, C.M.G., MATOS, M.H.T., RODRIGUES, G.Q., FAUSTINO, L.R., PINTO, L.C., CHAVES, R.N., ARAÚJO, V.R., CAMPELLO, C.C., FIGUEIREDO, J.R., *In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions, **Animal Reproduction Science**, Animal Reproduction Science v.117, p.83–89,2009.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science** v. 81, p. 273-286, 2004a.

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, 2004b.

SILVA, J.R.V, FERREIRA, M.A.L., COSTA, S.H.F., SANTOS, R.R., CARVALHO, F.C.A, RODRIGUES, A.P.R., LUCCI, C.M., BÁO, S.N., FIGUEIREDO, J.R. Degeneration rate of

preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 203-209, 2002.

SONGSASEN N, WILDT DE. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog, **Anim Reprod Sci**; v.98, p.2–22, 2007.

SWENSON, M.J. Dukes: **Fisiologia dos animais domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 946p.

SPEARS, N., MURRAY, A.A., ALISSON, V., BOLAND, N.I. & GOSDEN, R.G. Role of gonadotrofins and ovarian steroids in the development of mouse follicles *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.** ,n: 113, 19–26. 1998

STRÖM B., ROTA A., LINDE-FORSBERG C., *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p.247-256, 1997.

TAMILMANI, G., RAO, B.S., VAGDEVI, R., AMARNATH, D., NAIK, B.R., MUTHARAO, M., RAO, V.H., Nuclear maturation of ovine oocytes from sheep preantral follicles cultured *in vitro*. **Small Rumin. Res.** 60, 295–305, 2005.

TELFER, E.E. *In vitro* development of pig preantral follicles. **Reprod. Suppl.** 58, 81–90, 2001

TOSHIMORI, K. Sperm plasma membrane modifications associated associated with fertilization in mammals. **Journal of Reproduction and Development**, v.46, n.2, p. 65- 78, 2000.

TOSHIMORI, K. Sperm plasma membrane modifications associated with fertilization in mammals **Journal of Reproduction and Development**. Coolingwood. v. 46, n. 2, p. 65-78, 2000.

VAN DEN HURK R.; BEVERS, M. M.; BECKER, J. F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, p. 73-82, 1997.

WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. & NEIL, J. **The physiology of reproduction**. Raven Press, New York, p. 69-101, 1988.

WILLINGHAM-ROCKY, L.A.; HINRICHS, K.; WESTHUSIN, M.E.; KRAEMER, D.C. 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.

WRIGHT, C.S., HOVATTA, O., MARGARA, R., TREW, G., WINSTON, R.M.L., FRANKS, S. & HARDY, K. (1999). Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Human Reprod.** 14, 1555–62.

YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Maturation, fertilization and development of dog oocyte *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.46, n.5, p. 853-858, 1993.

ZHOU, H. & ZHANG, Y. (2005). Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. **Domest. Anim. Endoc.** 28, 235–42.