

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Avaliação da qualidade de oócitos de cadelas e gatas em diferentes faixas etárias submetidas à ovariosalpingohisterectomia.

ARTUR DA NÓBREGA CARREIRO

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Avaliação da qualidade de oócitos de cadelas e gatas em diferentes faixas etárias submetidas à ovariosalpingohisterectomia.

ARTUR DA NÓBREGA CARREIRO

Graduando

Prof^a. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo

Orientadora

Prof^a. Dr. Otávio Brilhante de Sousa

Co-orientador

Patos, Outubro de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

C314a Carreiro, Artur da Nóbrega

Avaliação da qualidade de oócitos de cadelas e gatas em diferentes fases do ciclo estrol submetidas à ovariosalpingohisterectomia / Artur da Nóbrega Carreiro – Patos, 2014.

36f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

“Orientação: Profª. Dra. Norma Lúcia de Sousa Araújo”

“Coorientação: Prof. Dr. Otávio Brilhante de Sousa”

Referências.

1. coletas. 2. ovários. 3. reprodução. 4. slicing.

I. Título.

CDU 636.082

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ARTUR DA NÓBREGA CARREIRO
Graduando

Monografia submetida ao Curso de
Medicina Veterinária como requisito
parcial para obtenção do grau de
Médico Veterinário

Aprovado em: ____/____/____

Média: _____

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo

Nota: _____

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro

Nota: _____

Prof. Mse. Nara Geanne de Araújo Medeiros

Nota: _____

**“Aquele que se esforça seriamente por melhorar
assegura para si a felicidade já nesta vida”**

(Allan Kardec)

Dedicatória

Minha Família que tem se mostrado cada dia mais
companheira e fiel a mim, nas lutas e desafios
impostos pela vida.

Agradecimentos

Norma Lúcia de Souza Araújo, professora orientadora, que em todos os momentos soube confiar, ajudar e, assim, estimular ao estudo e ao trabalho árduo.

Otávio Brilhante de Sousa, professor co-orientador, que se mostrou desde o início do trabalho disponível para me ajudar e assim orientar-me nos procedimentos laboratoriais.

Ao **LCGA-UFERSA**, pessoas que me capacitaram com as técnicas empregadas no trabalho, onde firmei verdadeiros laços de amizade.

Aos meus amigos irmãos do **Rancho da Veterinária**: José Renan, Thyago Araújo Gurjão, Tiago Tavares, amigos que quero levar pro resto dessa e de outras vidas

A minha amiga, colega e namorada **Gabriela Dantas**, por me acalmar, me ajudar, me incentivar frente as dificuldades deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Gráficos	iii
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Dinâmica folicular e ovulação em cadelas e gatas	13
2.2 A coleta de oócitos e a maturação <i>in vitro</i>	16
2.3 Avaliação da qualidade oocitária	17
2.4 A citologia vaginal	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Local do experimento	19
3.2 Animais utilizados	19
3.3 Metodologia	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÃO	30
6 REFERÊNCIAS	31
ANEXO	35

RESUMO

CARREIRO, ARTUR NÓBREGA. Avaliação da qualidade de oócitos de cadelas e gatas em diferentes faixas etárias submetidas à ovariosalpingohisterectomia. Patos – Paraíba, UFCG. 2014. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade de oócitos de cadelas e gatas em diferentes faixas etárias submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH) no Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande. Foram utilizadas 12 cadelas e 12 gatas com idades entre um a oito anos e sete meses a três anos de idade, respectivamente. Para cada espécie, os animais foram divididos em dois grupos etários, sendo as cadelas com um grupo composto de animais abaixo de 5 anos e outro com animais acima de 5 anos, enquanto que, para as gatas, os grupos foram constituídos de animais com idades abaixo de 2 anos e outro com animais com idade acima de 2 anos. Após a OSH os ovários foram coletados, em seguida dissecados, pesados e mensurados. Os oócitos foram coletados através da técnica do “fatiamento” ou *slicing*. Foi avaliada a quantidade e a qualidade de oócitos de ambos os ovários, e os resultados dessas avaliações foram comparadas à faixa etária dos animais das diferentes espécies. Para detecção da fase do ciclo estral, foi feita a citologia vaginal em ambas as espécies. Foram coletados um total de 1.018 oócitos de gatas e 1.277 oócitos de cadelas. Nas cadelas obteve-se uma média de $13,7 \pm 11,6$ oócitos de Grau 1 (G1), $12,7 \pm 10,5$ oócitos de Grau 2 (G2) e $28 \pm 18,2$ oócitos de Grau 3 (G3). Nas gatas, obteve-se uma média de $11,4 \pm 7,9$ oócitos Grau 1(G1), $10,2 \pm 6,3$ oócitos de Grau 2(G2), $21,1 \pm 13,5$ oócitos Grau 3(G3). Os resultados indicaram uma aumento na quantidade de oócitos de Grau 3 (G3) nas cadelas com idade superior a 5 anos em relação as cadelas com idade inferior a 5 anos de idade. A média de oócitos de Grau 3 (G3) recuperados nos ovários das gatas com idade inferior a 2 anos em relação aos de gatas maiores de 2 anos de idade foi semelhante. Por outro lado, observou-se uma tendência de aumento na média de oócitos de Grau 3 (G3) recuperados nos ovários nessa espécie. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que a idade influencia na qualidade dos oócitos coletados em cadelas e gatas, no entanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar a influência de outros fatores na qualidade de oócitos nessas espécies.

Palavras-Chaves: coletas, ovários, reprodução, *slicing*.

ABSTRACT

CARREIRO, ARTUR NÓBREGA. Evaluation of quality of oocytes dogs and cats of different ages undergoing ovariosalpingohysterectomy Patos – Paraíba, UFCG. 2014. Monograph (Undergraduate Veterinary Medicine) .

The objective of this study was to evaluate the quality of oocytes bitches and cats of different ages undergoing ovariohysterectomy (OSH) at the Veterinary Hospital of the Center for Rural Health and Technology , Federal University of Campina Grande. 12 bitches and 12 cats aged one to eight years and seven months to three years old, respectively, were used. For each species, the animals were divided into two age groups, with bitches with a group composed of animals less than 5 years and with other animals over five years, while for the cats, the groups consisted of animals aged below 2 years and another with animals over the age of 2 years. OSH after the ovaries were collected, then dissected, weighed and measured. The oocytes were collected through the technique of "slicing " or slicing . The quantity and quality of oocytes from both ovaries was evaluated, and the results of these evaluations were compared to the age group of animals of different species. To detect the phase of the estrous cycle, vaginal cytology was performed in both species. A total of 1,018 oocytes cats and 1,277 dogs oocytes were collected. In bitches we obtained an average of 13.7 ± 11.6 oocytes from Grade 1 (G1), 12.7 ± 10.5 oocytes from Grade 2 (G2) and 28 ± 18.2 oocytes Grade 3 (G3). In cats, we obtained an average of 11.4 ± 7.9 oocytes Grade 1 (G1), 10.2 ± 6.3 oocytes Grade 2 (G2), 21.1 ± 13.5 oocytes Grade 3 (G3). The results indicated an increase in amount of oocyte Grade 3 (G3) in dogs older than 5 years for female dogs under 5 years of age. The average number of oocytes Grade 3 (G3) recovered from the ovaries of female cats under 2 years of age compared to cats of greater than 2 years of age was similar. On the other hand, there was an increasing trend in the average oocyte Grade 3 (G3) recovered in the ovaries that Espécia. Based on the results obtained in the present study, we can conclude that age influences the quality of oocytes collected from dogs and cats, however, more studies should be performed to evaluate the influence of other factors on the quality of oocytes in these species.

Key - words: collections, ovaries, reproduction, slicing.

Lista de Tabelas

Tabela1-Qualidade dos oócitos coletados em cadelas submetidas a Ováriosalpingohisterectomia no HV/CSTR/UFCG com suas respectivas características clínicas.....25

Tabela2-Qualidade dos oócitos coletados em gatas submetidas à Ováriosalpingohisterectomia no HV/CSTR/UFCG com suas respectivas características clínicas.....26

Lista de Figuras

Figura 1-Kit Panótico rápido utilizado na coloração de lâminas para o exame de citologia vaginal de cadelas e gatas submetidas à ovariosalpingohisterectomia no HV/CSTR- UFCG.....	19
Figura 2-Tubo contendo ovário recém-coletado de gata.....	20
Figura 3-Acondicionamento dos tubos com ovários recém coletados.....	21
Figura 4-Balança de precisão para pesagem dos ovários de cadelas e gatas submetidas a OSH no HV/CSTR- UFCG.....	21
Figura 5-Ovários de Cadela em solução fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9%.....	22
Figura 6-Lupa estereomicroscópica para visualização dos oócitos de cadelas e gatas submetidas a OSH no HV/CSTR- UFCG.....	22
Figura 7-Oócito de cadela Grau 1 (G1) com pigmentação escura com uma ou mais camadas de células do cumulus.....	23
Figura 8-Oócito de cadela Grau 2 (G2) com pigmentação clara com camadas incompletas de células do cumulus.....	23
Figura 9-Oócito de cadela Grau 3 (G3) com pigmentação pálida, sem formato definido e sem células do cumulus aderidas.....	24

Lista de Gráficos

Gráfico 1-Quantidade de oócitos de Grau 1 (G1) e grau 3 (G3) coletados em cadelas submetidas à OSH no HV/CSTR-UFCG, de acordo com a idade.....27

Gráfico 2-Quantidade de oócitos de Grau 1 (G1) e grau 3 (G3) coletados em gatas submetidas à OSH no HV/CSTR-UFCG, de acordo com a idade.....28

1 INTRODUÇÃO

A Biotecnologia da Reprodução tem trazido inúmeras contribuições à Medicina Veterinária, dentre elas, o manejo reprodutivo assistido que tem sido uma grande ferramenta para o desenvolvimento e aprimoramento do conhecimento a respeito da fisiologia da reprodução. No manejo reprodutivo assistido, podemos destacar a fecundação *in vitro*, a qual proporciona uma análise mais detalhada dos mecanismos fisiológicos reprodutivos, da capacidade reprodutiva, além da possibilidade de intervir com técnicas e substâncias a serem testadas.

Para que se faça a fecundação *in vitro*, é de fundamental importância o emprego de técnicas eficientes de coleta de gametas, como a coleta de oócitos, a qual pode ser feita através de punção, digestão ovariana e o fatiamento ovariano, este último, conhecido como *Slicing*. Todas estas técnicas têm por objetivo único obter o maior número de oócitos integros e aptos para a fertilização *in vitro*.

Em canídeos, os folículos ficam localizados na região cortical do tecido ovariano, tornando-se aparentes poucos dias antes do momento da ovulação. Isto dificulta o uso da técnica de aspiração folicular, método rotineiramente aplicado em outras espécies (HEWITT et al., 1998; OTOI et al., 2000 *apud* PIRES, 2006).

Assim, a técnica empregada para a obtenção de oócitos caninos é o *Slicing* ou fatiamento, que permite a liberação de maior número de oócitos quando comparada à aspiração folicular (NICKSON et al., 1993 *apud* PIRES, 2006).

Neste contexto, constituem-se como objetivos, realizar um estudo da qualidade dos oócitos nas diferentes faixas etárias em cadelas e gatas submetidas a Ovário Salpingo Histerectomia (OSH) no Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande verificando possíveis diferenças na qualidade dos oócitos coletados pela técnica *Slicing* nas duas espécies.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os canídeos são monoéstricos, embora na maioria das raças de cães a sazonalidade não seja óbvia, exceto para a raça Basenji, cujas fêmeas apresentam estro no outono. Na cadela, cada fase do ciclo estral é longa, quando comparadas aos animais de produção, sendo que o proestro e estro duram em média nove dias, o diestro e o anestro em torno de 125 dias (CONCANNON, 1989 *apud* MACHADO, 2007).

A gata doméstica é classificada como poliéstrica estacional, apresentando ciclo estral associado ao fotoperíodo positivo e, apesar da influência de diferentes latitudes e raças, o período de luz por dia tem um impacto maior no desencadeamento e duração da atividade ovariana nesta espécie (DAWSON, 1941; SHILLE et al., 1979; HURNI, 1981; STABENFELDT, 1983; LEVYA et al., 1989 *apud* VILLAVARDE, BALBIN, 2003).

Os estudos sobre a maturação de oócitos e conseqüentemente sobre a fecundação *in vitro* (FIV) e produção *in vitro* de embriões (PIV) na espécie canina representam uma valiosa contribuição para a melhoria dos índices de desenvolvimento embrionário nesta espécie, e também para os canídeos em vias de extinção, portanto, vem despertando o interesse da comunidade científica nos últimos anos (MACHADO, 2007).

2.1 Dinâmica folicular e ovulação em cadelas e gatas

A oôgenese é caracterizada por produção de oócitos por células germinativas primordiais (oôgonias) e pela proliferação mitótica de células epiteliais internas originadas de uma interação de diversos tipos celulares, ainda na fase pré-natal. Nos mamíferos, a oôgenese inicia-se durante a vida fetal e desenvolve-se por meses ou anos nos animais adultos. Diferentemente de outras espécies, a oôgenese na cadela pode ocorrer até dois meses após o nascimento, pois células em proliferação já foram observadas na região do córtex ovariano (FAYER-HOSKEN et al., 2000 *apud* DERUSSI e LOPES 2009).

Os oócitos da maioria dos animais são células gigantes, contendo reservas de todos os componentes necessários para o desenvolvimento inicial do embrião até o estágio no qual o novo indivíduo possa começar a se alimentar. Antes desse estágio, essa célula sofre clivagens em muitas células menores, mas sem ocorrer crescimento efetivo (ALBERTS, et al., 2004).

O citoplasma do oócito contém reservas de nutrientes na forma de gema, que é rica em lipídeos, proteínas e polissacarídeos e que está geralmente contida dentro de estruturas delicadas, chamadas grânulos da gema. Nos oócitos que se desenvolvem como grandes animais fora do corpo da mãe, a gema pode ocupar mais de 95% do volume da célula. Nos mamíferos, cujos embriões são em grande parte nutridos pelas mães, há pouca, ou nenhuma gema (ALVARENGA e BICUDO, 1997 *apud* DERUSSI, LOPES, 2009).

O revestimento do oócito é outra peculiaridade dessas células. É uma forma especializada de matriz extracelular que consiste, em grande parte, de moléculas de glicoproteínas, algumas secretadas pelo o oócito e outras depositadas sobre ele pelas células que o circundam. Em muitas espécies, o revestimento principal é a camada imediatamente em torno da membrana plasmática do oócito; nos oócitos de animais não mamíferos, tais como ouriços-do-mar e galinhas, ela é chamada de camada vitelina, enquanto que nos oócitos de mamíferos é chamada de Zona Pelúcida. Essa camada protege o oócito de lesões mecânicas e, em muitos oócitos, também atua como uma barreira espécie-específica para o espermatozóide, admitindo apenas a entrada daqueles da mesma espécie ou de espécies intimamente relacionadas. (ALBERTS. et al., 2004)

Oócitos de mamíferos e suas células da granulosa intimamente associadas, denominadas células do *cumulus*, são interconectados por uma rede extensiva de canais transmembranais conhecidos como junções *GAP*. Estas células exercem um papel crucial durante o crescimento e desenvolvimento do oócito incluso no folículo e, posteriormente, durante sua maturação e fertilização (TANGHE et al., 2003). As Junções *GAP* atuam no suporte metabólico do oócito, uma vez que permitem a transferência bidirecional de moléculas de baixo peso molecular, íons e aminoácidos, os quais atuam como nutrientes e mensageiros (LOEWENSTEIN, 1987 *apud* GOTTARD, et al., 2012).

Na cadela os oócitos liberados medem $82,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$ e apresentam-se em um estado imaturo, no início da primeira divisão meiótica, ainda em estado de vesícula germinativa (VG), sendo também denominados de oócitos primários, não podendo ser fecundados imediatamente após a sua liberação (ENGLAND, CONCANNON, 2002 *apud* BICUDO, 2008).

Nos oócitos primários, as mitocôndrias estão em número crescente, refletindo um aumento natural da atividade metabólica (SONGSASEN e WILDT, 2007 *apud* DERUSSI e LOPES, 2009). Os grânulos lipídicos aumentam em quantidade durante todo o processo da oogênese, fato que resulta em uma aparência escura marcante do oócito canino, diferentemente de outras espécies de mamíferos. A função fisiológica destes grânulos não é conhecida. Sabe-se que ocupam 5% da área citoplasmática e acredita-se que sejam importantes como reserva nutricional durante o processo e desenvolvimento embrionário, já que o período anterior à implantação é relativamente prolongado (ALVARENGA e BICUDO, 1997 *apud* DERUSSI e LOPES, 2009).

Os folículos secundários ou pré-antrais contêm oócitos com diâmetro acima de $100 \mu\text{m}$ e citoplasma escuro devido à presença dos grânulos lipídicos. Folículos antrais foram evidenciados em cadelas jovens, a partir dos seis meses de idade, durante o proestro (CONCANNON et al., 1989 *apud* DERUSSI, LOPES, 2009). Com a liberação da onda pré-ovulatória de hormônio luteinizante (LH), os folículos se desenvolvem rapidamente de 4 a 13 mm e são denominados de folículos pré-ovulatórios (CONCANNON, FAYRER-HOSKEN et al., 2000, SONGSASEN e WILDT, 2007 *apud* DERUSSI e LOPES, 2009).

Uma característica da gametogênese na cadela é o elevado índice de folículos poliovulatórios (11%); uma taxa consideravelmente maior do que o da mulher (4%), da gata (3%) e dos primatas (2%). Essa porcentagem alta dos folículos poliovulatórios nas cadelas talvez esteja relacionada a uma grande densidade de folículos primordiais, presentes no córtex ovariano da cadela jovem, que acabam se coalescendo (LUVONI et al., 2005 *apud* DERUSSI e LOPES, 2009).

Oócitos em estágio de vesícula germinativa estão presentes nas tubas uterinas 44 horas após a ovulação, ou 2 dias após a onda pré-ovulatória de LH. A fase de metáfase I ocorre dentro de 44 a 48 horas da ovulação, sendo

caracterizada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar. Na metáfase II, há a formação completa do segundo corpúsculo polar, observada 54 horas após a ovulação (LUVONI et al., 2006 *apud* BICUDO, 2008). A maturação nuclear nas cadelas está completa após 48 a 72 horas das ovulações, na presença de elevados níveis de progesterona (CONACANNON et al., 1989; REYNAUD et al., 2005 *apud* BICUDO, 2008), quando os oócitos atingem a porção média das tubas uterinas.

Concannon e Verstegen (2005) descreveram a maturação oocitária completa; nesse estudo a ocorrência das ovulações foi observada após 60 horas do surgimento da onda pré-ovulatória de LH, ou seja, no final da fase do proestro até a metade do estro. Houve uma correlação entre a ocorrência da ovulação e as alterações de comportamento. O processo da ovulação na maioria das cadelas completa-se com 24 horas, podendo, em algumas fêmeas, se completar em apenas 12 horas (FONTBONE e MALANDAIN, 2006 *apud* BICUDO, 2008).

2.2 A coleta de oócitos e a maturação *in vitro*

O oócito canino é distinto pela presença de grande quantidade de material lipídico em seu interior, que lhe confere um aspecto escuro e homogêneo conforme descrito anteriormente. Essa síntese lipídica é incrementada em oócitos em crescimento e caracteriza um dos aspectos da maturação oocitária (TESORIERO, 1982 *apud* RIBEIRO, 2007).

A coleta pode ser feita em animais de diferentes idades, pré-púberes, púberes, adultos e senis; e nas mais diversas condições reprodutivas tais como: animais gestantes (até o 4º meses de gestação), animais com problemas reprodutivos adquiridos, fêmeas que não respondem aos processos normais de superovulação, dentre outras causas (MARTINS, 2007 *apud* RODRIGUES et.al., 2009).

Em canídeos, os folículos ficam localizados na região cortical do tecido ovariano, tornando-se aparentes poucos dias antes do momento da ovulação. Isto dificulta o uso da técnica de aspiração folicular, método rotineiramente aplicado em outras espécies (HEWITT et al., 1998; OTOI et al., 2000 *apud* PIRES, 2006).

Assim, a técnica empregada para a obtenção de oócitos caninos é o “*slicing*” ou fatiamento, que permite a liberação de maior número de oócitos quando comparada à aspiração folicular” (NICKSON et al., 1993 *apud* PIRES, 2006).

Outra técnica que tem sido utilizada é o método de digestão ovariana, com o intuito de aumentar a recuperação de folículos ovarianos post-mortem (DURRANT et al., 1998 *apud* Pires, 2006). Por este método os ovários são colocados em solução enzimática, geralmente composta por colagenase e dnase, por uma hora em 37°C (DURRANT et al., 1998; BOLAMBA et al., 2002 *apud* PIRES, 2006).

2.3 Avaliação da qualidade oocitária

A morfologia nuclear e das células do *cumulus*, assim como o diâmetro oocitário são os critérios mais utilizados para selecionar oócitos aptos à maturação *in vitro* (LUVONI et al., 2005 *apud* MARICY, 2010).

Experimentos evidenciaram que somente oócitos com duas ou mais camadas de células do *cumulus* continuam a se desenvolver em cultivo, enquanto oócitos com somente uma camada se degeneram após 48 horas de cultura (NICKSON et al., 1993 *apud* MARICY, 2010). Este fato descreve a importância das células do *cumulus* na manutenção oocitária, uma vez que são responsáveis não somente pela transferência de nutrientes da granulosa para o oócito durante seu crescimento, como também por permanecerem, na espécie canina, após a fecundação até o estado de mórula (RENTON et al., 1991; NICKSON et al., 1993 *apud* MARICY 2010).

No entanto, este critério não deve ser analisado isoladamente, mas sim, associado à avaliação do aspecto citoplasmático do oócito, o qual deve ser escuro e homogêneo, caracterizando a grande quantidade de lipídio em seu interior. Sendo assim, tem sido proposta a classificação dos complexos oócito-*cumulus* (COCs) em três graus, levando em consideração esses dois aspectos morfológicos: grau I (pigmentação escura com uma ou mais camadas de células do *cumulus*), grau II (pigmentação clara com camadas incompletas de células do *cumulus*), grau III (pigmentação pálida, sem formato definido e sem células do

cumulus aderidas), sendo considerados degenerados (HEWITT e ENGLAND, 1997 *apud* MARICY, 2010).

2.4 A citologia vaginal

Essa técnica é baseada na avaliação de alterações nas características morfológicas e de coloração das células durante o período do ciclo estral, que ocorre devido à influência hormonal, principalmente do estrogênio (FELDMAN; NELSON, 1996 *apud* TUCHOLSKI, et al., 2008).

A mucosa vaginal e as células epiteliais vaginais sofrem alterações morfológicas sob a ação das concentrações crescentes de estrogênios. Estes estimulam a proliferação do epitélio vaginal, que passa de uma espessura de poucas camadas celulares no anestro para uma espessura de 20 a 30 (até 100-150) camadas de células no fim do pró-estro. O afastamento das células epiteliais da membrana basal epitelial reflete um processo degenerativo de morte celular associado a queratinização (cornificação) citoplasmática (ALVES et al., 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário e no Laboratório de Microscopia da UAMV do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande.

3.2 Animais utilizados

Foram utilizadas 12 cadelas e 12 gatas que foram submetidas a ovariosalpingoestectomia (OSH) no Centro Cirúrgico do Hospital Veterinário do Centro de Saúde Tecnologia Rural Universidade Federal Campina Grande.

3.3 Metodologia

Previamente à cirurgia, foram coletados os dados do histórico clínico do animal em uma ficha (anexo 1). Em seguida, realizou-se o exame de citologia vaginal através do esfregaço com um swab estéril em lâmina microscópica corada pelo Panótico rápido (Figura 1) para análise e identificação da fase do ciclo estral do animal.



Figura 5- Kit Panótico rápido utilizado na coloração de lâminas para o exame de citologia vaginal de cadelas e gatas submetidas à ovariosalpingohisterectomia no HV/CSTR- UFCG

Após a cirurgia, os ovários esquerdo e direito foram dissecados e conduzidos em tubos do tipo Falcon de 15 mL contendo solução fisiológica de

Cloreto de Sódio a 0,9% (Figura 2) e imediatamente conduzidos em caixa de isopor (figura 3) ao Laboratório de Reprodução Animal e ao laboratório de Microscopia da UAMV.

No laboratório, os ovários foram pesados em balança de precisão da marca AAKERBS 3000A Bivolt- Bioprecisa® (Figura 4). E em seguida medidos quanto à largura e comprimento com o auxílio de um paquímetro. Após isso, mantidos em placas de Petri com solução fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9%, (Figura 5) para serem “fatiados” com lâminas de bisturi nº 24 em cortes com 1 a 2 mm de espessura, com auxílio de uma lupa estereomicroscópica (Figura 6) para melhor visualização dos oócitos.

Em seguida, os oócitos foram coletados com o auxílio de uma micropipeta e repassados para outra placa com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% e em seguida, avaliados quanto à sua qualidade.



Figura 6- Tubo contendo ovário recém coletado de gata.



Figura 7- Acondicionamentos dos tubos com ovários recém coletados.

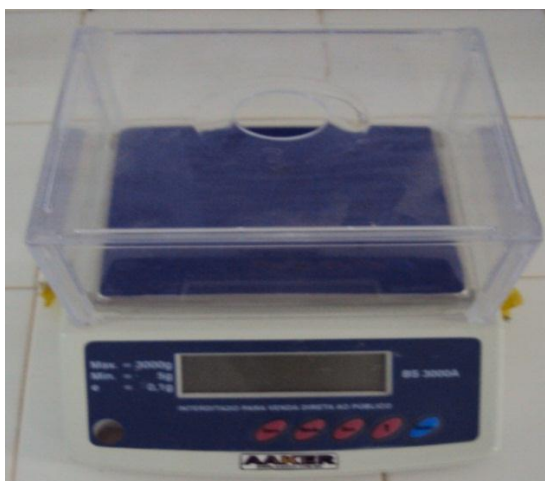


Figura 4- Balança de precisão para pesagem dos ovários de cadelas e gatas submetidas a OSH no HV/CSTR- UFCG



Figura 5- Ovários de Cadela em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%.



Figura 6- Lupa estereomicroscópica para visualização dos oócitos de cadelas e gatas submetidas a OSH no HV/CSTR- UFCG

O critério avaliativo utilizado foi a qualidade dos oócitos coletados com relação a morfologia do Complexo *cumulus oóforos* (COCS), sendo classificados em Grau 1(G1) com pigmentação escura com uma ou mais camadas de células do *cumulus* (Figura 7), Grau 2 (G2) com pigmentação clara com camadas

incompletas de células do *cumulus* (Figura 8), Grau 3 (G3) com pigmentação pálida, sem formato definido e sem células do *cumulus* aderidas (Figura9), além da quantidade de oócitos coletados por ovário (HEWITT e ENGLAND, 1997).

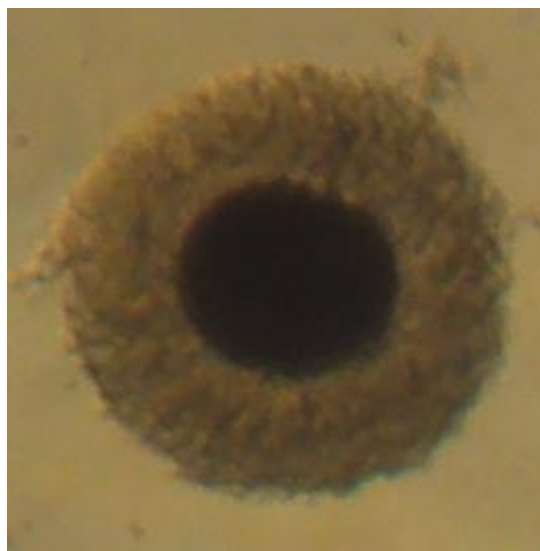


Figura 7- Oócito de cadela Grau 1 (G1) com pigmentação escura com uma ou mais camadas de células do cumulus

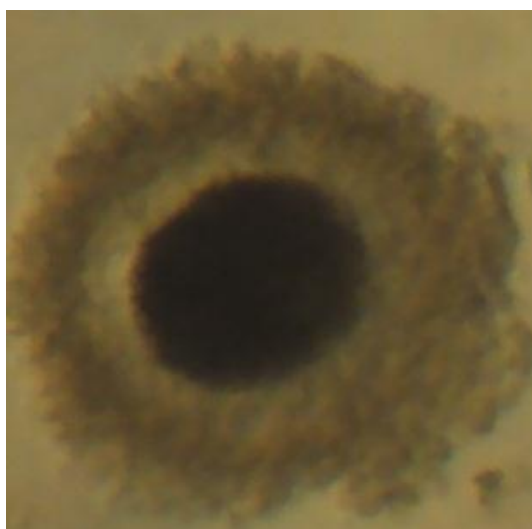


Figura 8- Oócito de cadela Grau 2 (G2) com pigmentação clara com camadas incompletas de células do cumulus



Figura 9- Grau 3 (G3) com pigmentação pálida, sem formato definido e sem células do cumulus aderidas

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes à qualidade dos oócitos coletados em cadelas submetidas a Ovariosalpingohisterectomia no HV/CSTR/UFCG com suas respectivas características clínicas estão representados na Tabela 1.

Tabela 1- Qualidade dos oócitos coletados em cadelas submetidas a Ovariosalpingohisterectomia no HV/CSTR/UFCG com suas respectivas características clínicas.

Animal	PESO (Kg)	IDADE (anos)	RAÇA	Histórico Clínico	PARTOS	AC	FASE DO CICLO	OVÁRIO	G1	G2	G3	TOTAL
01	28	3	Rotweiler	S/A	0	Não	Anestro	E	0	4	10	14
								D	1	2	9	12
02	9,6	4	Pinscher	Piometra	0	Sim	Diestro	ESQ.	21	37	43	101
								O. DIRT.	25	34	53	102
Cad.03	9	4	Poodle	Distocia	1	Não	Diestro	O. ESQ.	6	8	7	21
								O. DIRT.	6	9	4	19
Cad.04	5,75	10	Poodle	Piometra	0	Sim	Diestro	O. ESQ.	7	3	19	29
								O. DIRT.	5	4	20	29
Cad.05	3,95	2	SRD	P. distócico	1	Não	Diestro	O. ESQ.	18	14	12	44
								O. DIRT.	6	4	6	16
Cad.06	16,6	7,8	SRD	Sim	0	Não	Anestro	O. ESQ.	37	9	29	75
								O. DIRT.	40	15	13	68
Cad.07	10	2	SRD	Piometra	0	Sim	Diestro	O. ESQ.	18	34	46	98
								O. DIRT.	35	17	60	112
Cad.08	6,7	6	SRD	Hiperp. Mam.	1	Não	Anestro	O. ESQ.	25	12	51	88
								O. DIRT.	15	21	44	80
Cad.09	14	8	Poodle	Piometra	1	Sim	Diestro	O. ESQ.	3	7	37	47
								O. DIRT.	10	4	25	39
Cad.10	11,5	1,1	SRD	P. distócico	1	Não	Diestro	O. ESQ.	7	2	7	16
								O. DIRT.	4	1	10	15
Cad.11	6	4	Pinscher	Piometra	0	Sim	Diestro	O. ESQ.	10	22	44	76
								O. DIRT.	19	13	52	84
Cad.12	11,1	7	SRD	Piometra	0	Sim	Diestro	O. ESQ.	7	19	32	38
								O. DIRT.	4	10	40	54
Média	11,02±6,45	4,91	0,50						13,71	12,71	28,04	53,21
		2,81							11,67	10,57	18,23	33,37

Ov: Ovário
D: Ovário Direito
E: Ovário Esquerdo
G1: Oócitos de Grau1
G2: Oócitos de Grau2
G3: Oócitos de Grau3
Pi: Piometra
Dtc: Distocia
S/A: Sem Alterações
SRD: Sem Raça Definida

Di: Diestro
Hm: Hiperplasia mamária
An: Anestro
HC: Histórico Clínico
AC: Uso do Anticoncepcional
FC: Fase do Ciclo Estral
D.P: Desvio Padrão
P(Kg): Peso do animal em Kg

De acordo com a tabela 1 pode-se observar que, das 12 cadelas utilizadas neste estudo, seis apresentavam Piometra. Isso ocorreu devido ao fato de os animais serem trazidos ao HV mais frequentemente apenas quando apresentam

histórico de enfermidade. Na sua grande maioria, os casos de piometra estão associados ao uso de anticoncepcionais de forma indiscriminada.

Quanto aos oócitos coletados, ainda de acordo com a tabela 1, obteve-se uma média de $28 \pm 18,2$ oócitos de Grau 3 (G3), refletindo mais que o dobro em relação as médias de oócitos de Grau 1 (G1) ($13,7 \pm 11,6$) e Grau 2 (G2) ($12,7 \pm 10,5$). A alta variabilidade de oócitos coletados entre as cadelas pôde ser constatada pelo valor do desvio padrão (DP) obtido para esse parâmetro.

No tocante à fase do ciclo estral, a maioria das cadelas encontrava-se nas fases de anestro e diestro. Nos casos onde houveram distocias, neste trabalho, a fase do ciclo estral foi classificada como diestro gestacional e, nas demais, por apresentarem quadro de piometra, sendo uma enfermidade específica da fase de Diestro.

Tabela 2-Qualidade dos oócitos coletados em gatas submetidas à Ováriosalpingohisterectomia no HV/CSTR/UFMG com suas respectivas características clínicas.

Animal	P(Kg)	Idade (anos)	Raça	HC	Partos	A.C	FC	Ov	G1	G2	G3	TOTAL
01	3	1,6	SRD	S/A	0	N	Na	E.	12	17	28	57
								D	7	14	14	35
02	2,8	2	SRD	S/A	0	N	Di	E.	16	9	29	54
								D	6	13	27	46
03	2,6	2	SRD	S/A	1	N	Di	E.	7	10	14	31
								D	4	7	13	24
04	3,1	1,8	SRD	S/A	1	N	Di	E.	0	3	6	9
								D	7	5	9	21
05	2,8	0,7	SRD	S/A	0	N	Na	E.	10	12	16	38
								D	5	10	26	41
06	3,5	3	SRD	S/A	0	S	Na	E.	8	7	10	25
								D	11	9	14	34
07	2,1	0,9	SRD	Pi	0	N	Di	E.	13	18	39	70
								D	2	2	7	11
08	4,25	4	SRD	S/A	3	S	Di	E.	26	25	53	104
								D	36	25	60	121
09	2,6	2	SRD	Dtc	1	S	Di	E.	13	6	14	33
								D	15	4	20	39
10	5,2	1,5	SRD	S/A	0	S	Na	E.	12	6	25	33
								D	17	8	17	42
11	3,8	4	SRD	S/A	1	S	Na	E.	22	15	18	55
								D	8	12	22	42
12	5	3	SRD	Pi	0	S	Di	E.	6	8	17	31
								D	11	1	10	22
Média±	3,40±0	3,41±2							11,42±	10,25±	21,17	42,42±2
D. P	,98	,35							7,96	6,37	±13,5	5,93
											0	

Ov: Ovário

D: Ovário Direito

E: Ovário Esquerdo

G1: Oócitos de Grau1

G2: Oócitos de Grau2

G3: Oócitos de Grau3

Pi: Piometra

Dtc: Distocia

Di: Diestro

An: Anestro

HC: Histórico Clínico

AC:Uso do Anticoncepcional

FC: Fase do Ciclo Estral

D.P: Desvio Padrão

P(Kg): Peso do animal em Kg

S/A: Sem Alterações

SRD: Sem Raça Definida

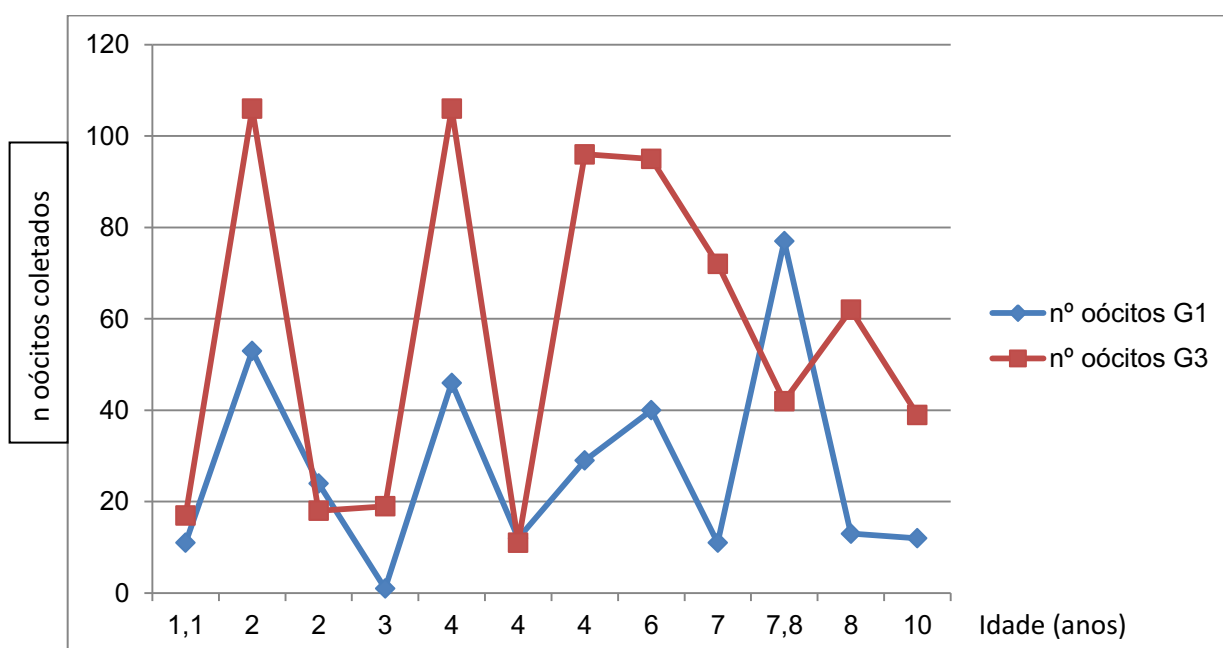
A quantidade de gatas sem alterações clínicas (S/A), conforme os dados contidos na tabela 2, foi maior quando comparado com a quantidade de cadelas saudáveis demonstrada na tabela 1. Esse resultado pode ser devido ao fato de os proprietários das gatas estarem mais atentos quanto à necessidade de se realizar a OSH eletiva para evitar a prenhez indesejada nessa espécie.

A média da quantidade total de oócitos Grau 3 (G3) ($21,1 \pm 13,5$) nas gatas foi superior a quantidade de oócitos Grau 1 (G1) ($11,4 \pm 7,9$) e Grau 2 (G2) ($10,2 \pm 6,3$), semelhantemente ao que ocorreu nas cadelas.

Os valores de desvio padrão obtidos neste estudo revelam uma grande variação na quantidade de oócitos coletados, estando de acordo com Lopes et al., (2004) onde, em um trabalho sobre a avaliação da maturação nuclear in vitro de oócitos de gatas domésticas pré-púberes e púberes constatou uma variação muito alta do número de oócitos coletados (de três a 72 oócitos) entre as fêmeas.

Os resultados relativos à quantidade de oócitos de grau 1 (G1) e grau 3 (G3) coletados em cadelas, submetidas à OSH no HV/CSTR-UFCG de acordo com a faixa etária, estão demonstrados no gráfico 1.

Gráfico 1- Quantidade de oócitos de Grau 1 (G1) e grau 3 (G3) coletados em cadelas submetidas à OSH no HV/CSTR-UFCG, de acordo com a idade.



O.E: Ovário Esquerdo
O.D: Ovário Direito

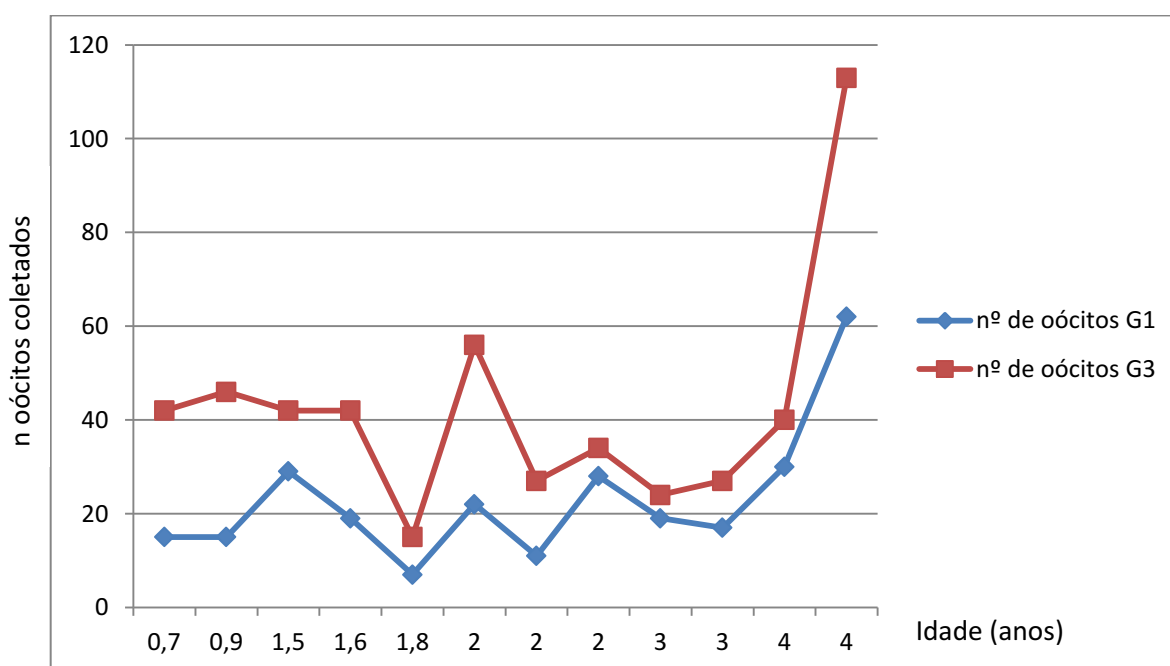
Pode-se constatar que, numericamente, houve um discreto aumento no número de oócitos de grau 1 coletados nas cadelas com idade superior a cinco anos neste experimento, em relação ao mesmo tipo de oócito em cadelas com idade inferior a cinco anos. Por sua vez, houve um maior número de oócitos de grau 3 (G3) em cadelas com menos de cinco anos de idade.

Ao comparar os oócitos G1 e G3, observa-se uma maior quantidade de oócitos de Grau 3 (G3) nas cadelas em quase todas as faixas etárias avaliadas neste estudo.

Songsasen e Wildt, (2007) afirmaram que a melhor idade para a obtenção de oócitos de boa qualidade cadelas é entre 1 e 6 anos e que fêmeas de raça pura apresentam significativamente um menor número de oócitos viáveis do que fêmeas cruzadas entre raças diferentes.

Os resultados relativos à quantidade de oócitos de grau 1 G (1) coletados em gatas, submetidas à OSH no HV/CSTR-UFCG de acordo com a faixa etária, estão demonstrados no gráfico 2.

Gráfico 2- Quantidade de oócitos de Grau 1 (G1) e grau 3 (G3) coletados em gatas submetidas à OSH no HV/CSTR-UFCG, de acordo com a idade.



O.E: Ovário Esquerdo
O.D: Ovário Direito

Observa-se que, segundo os resultados demonstrados no gráfico 2, houve, em termos numéricos, uma maior quantidade dos oócitos G2 coletados nas gatas com idade a partir de 2 anos em relação às gatas com idade inferior a 2 anos.

Lopes et al., 2007, em seu estudo sobre a qualidade morfológica do oócito concluíram que as gatas com idade entre um e três anos são doadoras mais aptas para coleta de oócitos de boa qualidade. No presente trabalho, conforme os dados do gráfico 2, as gatas não apresentaram diferença na quantidade de oócitos Grau 1 (G1), sendo que os oócitos tipo 3 G(3), apresentaram-se em maior quantidade que os G1 nas duas faixas etárias avaliadas neste estudo, resultado semelhante ao encontrado nas cadelas.

Ainda de acordo com os resultados relativos à quantidade de oócitos G1, G2 e G3 coletados em cadelas e em gatas, os mesmos foram numericamente semelhantes entre os ovários esquerdo e direito nas duas espécies.

No presente trabalho obtivemos uma média de 52,14 oócitos para cadelas abaixo de 5 anos e 54,71 oócitos para cadelas acima de 5 anos. Esses números diferem dos obtidos por Tucholski, et al., (2008) que, avaliaram a quantidade de oócitos obtida em fêmeas caninas de diferentes faixas etárias em diestro e anestro, com um grupo composto de cadelas de 1 a 2,5 anos de idade (jovens) e outro grupo composto por cadelas com 3 a 8 anos de idade (adultas) e obteve um total de 70 oócitos, com média de 12,6 para o grupo de cadelas jovens e um total de 68 oócitos para o grupo de cadelas adultas. Esse resultado, provavelmente ocorreu pela forma como as faixas etárias foram divididas no presente trabalho.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e segundo as condições deste estudo, pode-se concluir que:

Observou-se variação numérica entre a quantidade de oócitos de grau 1 (G1), grau 2 (G2) e grau 3 (G3) de oócitos obtidos nas diferentes faixas etárias das cadelas e gatas avaliadas neste estudo;

Aparentemente, a fase do ciclo estral não influenciou na qualidade e quantidade de oócitos coletados nas duas espécies estudadas;

O estado de saúde das fêmeas avaliadas neste estudo, aparentemente, não influenciou a qualidade e a quantidade de oócitos coletados;

Não houve diferença entre a quantidade e a qualidade de oócitos coletados entre os ovários direito e esquerdo das cadelas e gatas utilizadas neste trabalho;

Mais estudos são necessários para avaliar a influência de outros fatores na qualidade de oócitos coletados de cadelas e gatas.

6 REFERÊNCIAS

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J. et al., **Biologia Molecular da célula** 4ª edição 2004 Artmed cap. 20 pag.1142- 1143

ALVES, I. et al., Monitorização do ciclo estral da cadela para inseminação artificial ou cruzamento. In: Congresso de Ciências Veterinárias, 2002. **Anais**. SPCV, Oeiras, 10-12 Out., p. 177-182.

CONCANNON, 1989 *apud* MACHADO, A. M., **Efeito do Fator de Crescimento IGF-I sobre a Maturação *in vitro* de oócitos caninos (*Canis familiaris*): Avaliação da Maturação Nuclear e Citoplasmática**. 2007. 64 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Reprodução Animal) Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2007.

CONCANNON et al., 1989; FAYRER-HOSKEN et al., 2000, SONGSASEN e WILDT, 2007 *apud* DERUSSI A.A.P., LOPES M.D., 2009
Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.231-237, Out./Dez. 2009.

CONCANNON et al., 1989 *apud* A.A.P. DERUSSI, M.D. LOPES 2009, Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.231-237, Out./Dez. 2009.

CONACANNON et al., 1989; REYNAUD et al., 2005 *apud* BICUDO, A.L.C., 2008.
Avaliação ultrassonográfica convencional e dopplerfluxométrica de ovário de cadelas, durante a fase folicular do ciclo estral. Botucatu, 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina. Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005.

DAWSON, 1941; SHILLE et al., 1979; HURNI, 1981; LEVYA e STABENFELDT, 1983; LEVYA et al., 1989 *apud* VILLAVERDE, B. A. I. S., **Comparação entre dois métodos de inseminação artificial utilizando sêmen congelado em gatos domésticos**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, 2007.

DURRANT et al., 1998; BOLAMBA et al., 2002 *apud* PIRES, A. E., 2006. **Efeito da Suplementação de Cisteína e Cisteamina sobre a Maturação Nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*Canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingohisterectomia durante a fase Pré-Ovulatória do Estro**. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu. 2006. 52 f. 2006.

ENGLAND e CONCANNON, 2002 *apud* BICUDO, A. L.C. 2008. **Avaliação ultrassonográfica convencional e dopplerfluxométrica de ovário de cadelas, durante a fase folicular do ciclo estral.** Dissertação (Mestrado). 78 f. Faculdade de Medicina. Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

FAYER-HOSKEN et al., 2000 *apud* DERUSSI A.A.P., LOPES M.D., 2009. Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.231-237, Out./Dez. 2009.

FELDMAN e NELSON, 1996 *apud* TUCHOLSKI, Â. P. et al., 2008. Quantidade de oócitos obtidos em fêmeas caninas de diferentes faixas etárias em diestro e anestro. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**. v. 6 n. 3 Jul./Set. 2008 p. 342.

FONTBONE e MALANDAIN, 2006 *apud* BICUDO, A.L.C., 2008 **Avaliação ultrassonográfica convencional e dopplerfluxométrica de ovário de cadelas, durante a fase folicular do ciclo estral.** Botucatu, 2008. 78p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). Faculdade de Medicina. Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

HEWITT e ENGLAND, 1997 *apud* A.F.MARICY, 2010 **Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidos em diferentes fases do ciclo estral e cultivados *in vitro* em meios sequenciais com hormônios e espermatozóides** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010 Jaboticabal, 2010.

HEWITT et al.,1998; OTOI et al.,2000 *apud* PIRES. A. E. **Efeito da Suplementação de Cisteína e Cisteamina sobre a Maturação Nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*Canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingohisterectomia durante a fase Pré-Ovulatória do Estro.** Dissertação (Mestrado em Cirurgia) Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu. 2006. 52 f. 2006.

ALVARENGA L. e BICUDO, 1997 *apud* .DERUSSI A.A.P., LOPES M.D., 2009 Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.231-237, Out./Dez. 2009.

LOEWENSTEIN, 1987 *apud* GOTTARDI F.P. et al., 2012. Efeito das células do *cumulus* e cisteamina durante o cultivo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência para desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.2, p.245-252, 2012, Disponível em: < <http://files.bvs.br/upload/S/0100-254/2011/v39n4/a2484.pdf>> Acesso em: 16/10/2014.

LOPES G,et al., **Recovery rate, morphological quality and nuclear maturity of canine cumulus-oocyte complexes collected from anestrus or diestrus bitches of different ages.** Theriogenology, v.68, p.821-825, 2007.

LOPES M. D, UIECHI E. , TRINCA L. A., 2004. Avaliação da maturação nuclear *in vitro* de oócitos de gatas domésticas (*Felis catus*) pré-púberes e púberes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2004.

LUVONI et al., 2005 *apud* DERUSSI A.A.P., LOPES M.D., 2009 Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.231-237, Out./Dez. 2009.

LUVONI et al., 2005 *apud* MARICY A.F.,2010. **Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidos em diferentes fases do ciclo estral e cultivados *in vitro* em meios sequenciais com hormônios e espermatozoides.** Dissertação (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010 Jaboticabal, 2010.

LUVONI et al., 2006 *apud* BICUDO, A. L. C. **Avaliação ultra-sonografica convencional e dopplerfluxometrica de ovário de cadelas, durante a fase folicular do ciclo estral.** Botucatu, 2008. 78p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). Faculdade de Medicina. Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

MACHADO. A.M., 2007. **Efeito do Fator de Crescimento IGF-I sobre a Maturação *in vitro* de oócitos caninos (*Canis familiaris*): Avaliação da Maturação Nuclear e Citoplasmática.** Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus de Jaboticabal 2007.
Disponível em: <<http://javali.fcav.unesp.br/sgcd/Home/download/pgtrabs/ra/d/2383.pdf>>.
Acesso em 07/09/2013.

MARTINS, 2007 *apud* RODRIGUES, S. L. A. C. et al., Fertilização *in vitro*. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VII. 2009.

NICKSON et al., 1993 *apud* PIRES , A. E.,2006. **Efeito da Suplementação de Cisteína e Cisteamina sobre a Maturação Nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*Canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingohisterectomia durante a fase Pré-Ovulatória do Estro.** Dissertação (Mestrado em Cirurgia) Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu. 2006. 52 f. 2006.

NICKSON et al., 1993 *apud* MARICY A.F. **Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidos em diferentes fases do ciclo estral e cultivados *in vitro* em meios sequenciais com hormônios e espermatozoides.** Dissertação (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010 Jaboticabal, 2010.

RENTON et al., 1991; NICKSON et al.,1993 *apud* MARICY A.F **Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidos em diferentes fases do ciclo estral e cultivados *in vitro* em meios sequenciais com hormônios e espermatozoides.**

Dissertação (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010 Jaboticabal, 2010.

SONGSASEN e WILDT, 2007 *apud* DERUSSI A.A.P., LOPES M.D., Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.231-237, Out./Dez. 2009.

SONGSASEN, N.; WILDT, D. E., Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 2-22, 2007.

TESORIERO, 1982 *apud* RIBEIRO, A.P.C. **Influência do estado 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**.p.18. 2007

TUCHOLSKI, Â. P. et al., 2008 Quantidade de oócitos obtidos em fêmeas caninas de diferentes faixas etárias em diestro e anestro. **Rev. Acadêmica de Ciência Agrária Ambiental.**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 341-347, jul./set. 2008.

ANEXO

Anexo I:

DADOS GERAIS DO PACIENTE:

NOME:	PESO:	IDADE:
Nº DA FICHA:	SEXO:	RAÇA:
ANIMAL HÍGIDO:()SIM ()NÃO		
HISTÓRICO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO:		
PARRIÇÕES:	QUANTOS:	USO DE ANTICONCEPCIONAL:
CITOLOGIA VAGINAL:		

CARACTÉRÍSTICAS DOS OVÁRIOS:

	O E:	OD:
VOLUME		
COMPRIMENTO:		
LARGURA:		
PESO:		

CLASSIFICAÇÃO DOS OÓCITOS

Nº DE OÓCITOS:

GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	TOTAL:

OBSERVAÇÕES: