

Maturação *in vitro* de oócitos caninos

In vitro maturation of canine oocytes

M. Apparício¹, G.Q. Mostachio, T.F. Motheo, L.Padilha, A.E. Alves, E.A. Pires-Butler, W.R.R. Vicente

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP, Brasil.

¹Correspondência: maricyap@fcav.unesp.br

Resumo

Nos últimos anos, as biotécnicas têm se desenvolvido amplamente em diversas espécies e são consideradas primordiais no manejo da reprodução assistida. Em canídeos, o emprego da MIV (maturação *in vitro*) tem sido vinculado a baixas taxas quando comparados a outras espécies, fato que limita o desenvolvimento de outras técnicas, como a fertilização *in vitro* (FIV) e a criopreservação. Por se tratar do período em que o oócito adquire a capacidade para ser fecundado, a maturação, quando realizada *in vitro*, depende da eficiência do método de colheita e, principalmente, do meio de cultivo. Este trabalho tem como objetivo revisar a MIV de oócitos caninos, os meios e as suplementações empregadas.

Palavras-chave: canídeos, meio de cultivo, ovócito, suplementações.

Abstract

In the past few years, biotechnologies have been improved in several species and are considered primordial for assisted reproduction management. In canids, in vitro maturation (IVM) have been related to low rates when compared to other species which may compromise the development of other techniques, such as IVF (in vitro fertilization) and cryopreservation. During the maturation period, oocytes acquire the capacity to be fertilized and when under in vitro conditions, it depends on the recovery method and on culture conditions. The aim of this paper is to review IVM of canine oocytes, the media and supplementations used.

Keywords: canids, culture medium, oocyte, supplementations.

Introdução

Nos últimos anos, os animais de estimação, principalmente os cães, conquistaram lugar na sociedade, passando de animal doméstico a membro da família. Esta transformação na interação homem-animal representou mudança brusca no mercado *pet*, despertando crescente interesse por produtos direcionados a cães e gatos e, consequentemente, gerando faturamento anual próximo dos US\$ 2 bilhões (Yabiku, 2009). Neste segmento, a comercialização de animais tornou-se sinônimo de lucro (Souza et al., 2001) e observou-se um aumento na procura por acompanhamento reprodutivo. Técnicas de reprodução assistida, tais como inseminação artificial e congelamento de sêmen canino, vêm sendo realizadas, permitindo intercâmbio mundial de material genético e motivando pesquisas para o aprimoramento das condições que simulam os processos biológicos.

Durante décadas, as informações referentes às biotécnicas estavam restritas aos animais destinados à produção, principalmente os bovinos. Pesquisas desenvolvidas nesta espécie tinham como escopo a seleção e o ganho genético, resultados obtidos pela inseminação artificial, produção *in vitro* e transferência de embriões. Em cães, embora a primeira notificação de reprodução assistida date do longínquo ano de 1780 (Johnston et al., 2001), uma lacuna de dois séculos se deu entre esta primeira descrição e as pesquisas posteriores acerca da reprodução nesta espécie.

É sabido que os cães domésticos vêm sendo utilizados como modelo experimental de canídeos silvestres. Sua similaridade não se dá somente no que tange à fisiologia reprodutiva, mas às respostas de experimentos *in vitro*. Assim, estudos sobre reprodução assistida em cães domésticos não contemplariam unicamente esta espécie, mas favoreceriam o conhecimento em seus símiles silvestres.

Nos últimos quinze anos, investigações sobre biologia celular têm contribuído para o entendimento da fisiologia reprodutiva dos canídeos e, consequentemente, dos mecanismos envolvidos na fecundação, sejam eles facilitadores ou inibidores. Logo, a compreensão destes aspectos possibilitará tanto o aprimoramento das técnicas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) como o desenvolvimento de novos métodos de controle populacional de cães domésticos. Neste sentido, a MIV é o procedimento primordial para o desenvolvimento e a aplicação de outras técnicas de PIVE, precisando ser mais estudada.

Nos felinos e bovinos, a MIV está bem descrita e apresenta taxas de maturação aproximando-se de 60% (Farstad, 2000b) e 90%, respectivamente (Lonergan et al., 1994), enquanto nos canídeos limita-se a escassos

estudos, com taxas variando de 0 a 58% para oócitos maturados até metáfase I, anáfase I e metáfase II em diferentes protocolos experimentais (Farstad, 2000a). Estes valores são considerados insatisfatórios e refletem a ineficiência da adaptação das técnicas empregadas em outras espécies, caracterizando a peculiar fisiologia reprodutiva dos canídeos e demonstrando a necessidade de se considerar a dinâmica do folículo pré-ovulatório e o ambiente fisiológico da tuba uterina.

Esforços no intuito de aprimorar a MIV de oócitos caninos têm sido feitos, principalmente no que concerne ao meio e tempo de cultivo apropriado e à competência meiótica, procurando ajustar da melhor maneira possível, todas as variáveis implicadas no processo. Pesquisas envolvendo a suplementação dos meios de maturação com proteínas, antioxidantes e hormônios, associados ou não, têm demonstrado taxas discrepantes e insatisfatórias (Nickson et al., 1993; Hewitt e England, 1997). Ademais, pouco se sabe sobre a maturação citoplasmática dos oócitos caninos e do papel na fertilização que estes componentes citoplasmáticos possam desempenhar, uma vez que a deficiência na maturação citoplasmática interfere no desenvolvimento embrionário (Leibfried-Rutledge et al., 1987).

A superação das dificuldades atualmente encontradas no emprego destas técnicas em canídeos permitirá aos cientistas um melhor entendimento da fisiologia reprodutiva, fornecendo informações úteis tanto para projetos de interesse comercial quanto para programas de recuperação de gametas de canídeos ameaçados de extinção, como é o caso do cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*), do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e da raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) na fauna silvestre brasileira.

Particularidades da fisiologia reprodutiva das cadelas

Os canídeos são considerados monoestricos não sazonais, ou seja, apresentam um ou dois ciclos estrais por ano, caracterizados por um extenso período de quiescência ovariana (Willingham-Rocky et al., 2003). Nas cadelas domésticas, esta fase varia de acordo com as raças e idades, sendo influenciada por fatores ambientais e genéticos (Feldman e Nelson, 2004).

O ciclo reprodutivo da cadela, também denominado de ciclo estral, apresenta quatro fases bem distintas, denominadas: proestro, estro, metaestro/diestro e anestro (Andersen, 1973). Estas se caracterizam por alterações hormonais que induzem a transformações morfológicas, clínicas e citológicas nos diferentes segmentos do aparelho reprodutor feminino (Rodrigues e Rodrigues, 2002).

Em cadelas, ocorre luteinização pré-ovulatória dos folículos, e a concentração plasmática de progesterona aumenta durante o proestro (Concannon et al., 1975, 1989), diferentemente de outras espécies de mamíferos domésticos, nas quais o estrogênio predomina no ambiente folicular pré-ovulatório (Farstad, 2000b). A ovulação começa aproximadamente dois dias após o pico de LH (hormônio luteotrófico), no início do estro, e os oócitos liberados ainda estão imaturos, em prófase I (PI), sendo que, em outras espécies, os oócitos se encontram em metáfase II (MII). Desta forma, a maturação dos oócitos caninos se dá fora do ambiente folicular, na tuba uterina, onde também ocorre a fertilização e o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Luvoni et al., 2005). Na maioria dos mamíferos, o tempo total em que os oócitos permanecem na tuba varia de três a quatro dias, enquanto nos oócitos caninos este período varia de 8,5 a nove dias (Holst e Phemister, 1971).

No período subsequente ao estro, as concentrações séricas de progesterona são similares em fêmeas prenhes ou não (Jeffcoate, 1998), principalmente nos 40 dias posteriores ao pico de LH (Rodrigues e Rodrigues, 2003a).

Desenvolvimento e maturação oocitária *in vivo*

Oócitos são células haploides derivadas das células germinativas primordiais, as quais se desenvolvem antes do nascimento (Dew, 2001). Estas células iniciam a mitose enquanto migram do saco vitelínico embrionário para o local de desenvolvimento gonadal (ovário primitivo), onde são denominadas oogônias (Wassarman e Albertini, 1994). Quando cessa a divisão mitótica, as oogônias são denominadas oócitos, e tem início a meiose (Dew, 2001), que pode ocorrer antes do nascimento (humanos, equinos e ruminantes), logo após o nascimento (suínos e felinos) e nas primeiras semanas subsequentes, como é o caso dos canídeos (Andersen, 1970).

A divisão celular, tanto mitótica quanto meiótica, compreende quatro fases distintas: prófase, metáfase, anáfase e telófase (Baker, 1982). A meiose ocorre em duas etapas, denominadas meiose I e II, e a prófase da meiose I é dividida em cinco estágios: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese (estádio de vesícula germinativa; Baker, 1982).

Na maioria dos mamíferos, o processo de desenvolvimento oocitário passa por dois momentos de estagnação, na prófase I e na metáfase II (MII), quando, então, os oócitos são ovulados e ativados após fertilização (Dulcibella, 1998). Nestes animais, a maturação ocorre dentro do folículo ovariano, e a ovulação ocorre quando estes atingem MII (oócito secundário) e já se encontram prontos para a fertilização dentro do oviduto (Wassarman e Albertini, 1994). Diferentemente, os canídeos liberam oócitos no começo da primeira divisão meiótica (estádio de vesícula germinativa, oócito primário), ou seja, tanto a maturação como a

fertilização acontecem dentro do oviduto (Holst e Phemister, 1971; Farstad et al., 1989; Tsutsui et al., 1989) e necessitam dois a cinco dias para a completa maturação (Holst e Phemister, 1971; Tsutsui, 1975). Estudo sobre maturação e fertilização *in vivo* demonstrou que oócitos caninos em MII são observados a partir de 50 horas, e embriões no estágio de pronúcleo decorridas 90 horas da ovulação (Reynaud et al., 2005).

A maturação do oócito é, portanto, caracterizada pela transição do estágio de vesícula germinativa ao de MII, passando por mudanças que preparam o oócito para ser fecundado e estar apto para se desenvolver como embrião. Estas alterações ocorrem não somente no núcleo como também no citoplasma, de maneira independente, mas de modo coordenado para garantir a competência no desenvolvimento celular (Dew, 2001; Rodrigues, 2003).

No início da maturação nuclear, ocorre condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana celular, processo denominado quebra de vesícula germinativa (Kubelka et al., 1998). Posteriormente, os cromossomos se encontram mais condensados e dispostos no plano central do eixo metafásico, caracterizando o estágio de MI, evoluindo para MII quando ocorre compactação dos cromossomos e extrusão do primeiro corpúsculo polar (Hewitt e England, 1997).

A avaliação da maturação nuclear de oócitos tem sido alvo de vários estudos em canídeos e, contrariamente, pouco se sabe sobre a maturação citoplasmática nesta família. Em outras espécies, estudos mostraram a importância dos componentes citoplasmáticos na ativação oocitária durante a fertilização, com liberação dos grânulos corticais para bloquear a poliespermia, reinício do ciclo celular, formação do pronúcleo e síntese proteica (Dulcibella, 1998).

A maturação citoplasmática pode ser descrita como as alterações estruturais e biológicas que permitem que o oócito seja fecundado e se desenvolva como embrião (Avelino, 2004). Estas mudanças incluem a redistribuição de organelas citoplasmáticas, como os grânulos corticais, as mitocôndrias, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (Dulcibella et al., 1990). Nos mamíferos, a maturação citoplasmática acontece quando o oócito se aproxima do estágio de MII e os grânulos corticais, já agrupados, se dispersam e migram para a periferia do oócito (Damiani et al., 1996; Dew, 2001). Esta característica celular tem sido utilizada para avaliar a maturação citoplasmática do oócito em várias espécies de mamíferos (Damiani et al., 1996) e, nos últimos anos, foi descrita em canídeos (Apparício-Ferreira, 2006).

Maturação de oócitos *in vitro*

Os oócitos caninos podem retomar a meiose espontaneamente *in vitro* usando adaptações das técnicas de maturação utilizadas em outras espécies domésticas, embora com índices e eficiência mais baixos. Em canídeos, a taxa de maturação *in vitro* tem demonstrado um sucesso limitado, variando de 0 a 58% para oócitos maturados até anáfase I e metáfase II (Mahi e Yanamachi, 1976; Robertson et al., 1992; Yamada et al., 1992, 1993; Nickson et al., 1993; Hewitt e England, 1997, 1998, 1999b; Hewitt et al., 1998; Metcalfe, 1999; Bolamba et al., 2002). Não obstante, os experimentos realizados até o presente momento nesta espécie têm evidenciado similaridade com os eventos *in vivo* (Rodrigues, 2003), demonstrando a necessidade de um período de cultivo ao redor de 48 a 72 horas (Fulton et al., 1998).

Obtenção dos oócitos

Os principais métodos utilizados para a obtenção de oócitos em mamíferos são: aspiração dos folículos e fatiamento dos ovários. Embora a aspiração seja uma técnica simples, não é muito utilizada em canídeos pela dificuldade de se visualizar os folículos no tecido ovariano, uma vez que os ovários destes animais são pequenos (Luvoni et al., 2005) e os folículos se localizam no córtex ovariano, tornando-se aparentes pouco antes da ovulação (Hewitt et al., 1998; Otoi et al., 2000).

Por estas razões, a técnica mais utilizada para a obtenção de oócitos nas cadelas tem sido o fatiamento, que consiste em seccionar o ovário utilizando uma lâmina de bisturi ao longo de seu comprimento e largura (Nickson et al., 1993; Hewitt e England, 1997). No entanto, ao mesmo tempo em que esta técnica permite uma recuperação maior de oócitos quando comparada com a aspiração (Nickson et al., 1993), pode também ser a responsável pela baixa obtenção de oócitos de boa qualidade (Hewitt et al., 1998; Fujii et al., 2000).

Outro método utilizado para obtenção de oócitos caninos é a digestão ovariana, técnica em que os ovários são colocados em solução enzimática (colagenase e Dnase) a 37°C, por uma hora, quando, então, o produto da digestão é filtrado e colocado em solução para lavagem (Durrant et al., 1998; Bolamba et al., 2002). Este método, segundo Durrant et al. (1998), quando seguido de refrigeração *overnight*, reduz a porcentagem de oócitos degenerados, embora ocasione danos às camadas das células da granulosa.

Fatores intrínsecos que influenciam a maturação *in vitro* (MIV)

Estudos têm demonstrado que alguns fatores exercem influência sobre os índices de MIV em cadelas; entre eles, a idade do animal (Nickson et al., 1993; Hewitt e England, 1998), o tamanho do oócito (Hewitt e

England, 1998; Srsen et al., 1998) e a morfologia nuclear e do *cumulus oophorus* (Nickson et al., 1993). Outros, tais como a fase do ciclo estral das doadoras, ainda são controversos (Nickson et al., 1993; Yamada et al., 1993; Hewitt e England, 1997; Rodrigues e Rodrigues, 2003a; Apparício-Ferreira, 2006).

A morfologia nuclear e a 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).

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). Este fato comprova a importância da manutenção da oocitária, uma vez que são responsáveis não somente por transferirem os nutrientes da granulosa para o oócito como também por permanecerem, na espécie canina, após a fecundação, até o estágio de mórula (Renton et al., 1991; Nickson et al., 1993). 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 (Hewitt e England, 1997), caracterizando a grande quantidade de lipídio em seu interior.

Pesquisas mostraram que o tamanho do oócito também influencia a competência meiótica, ou seja, a habilidade do oócito em recomençar a meiose *in vitro*. A primeira evidência dos possíveis efeitos do diâmetro oocitário na competência meiótica foi relatada por Theiss (1997), que demonstrou que oócitos com diâmetro superior a 110 µm apresentaram maior taxa de maturação em relação aos que possuíam diâmetros inferiores a 110 µm. Posteriormente, Hewitt e England (1998) ratificaram que a aquisição da competência meiótica do oócito, indicada pelo aumento do tamanho, é importante para sua habilidade de maturar *in vitro* e só é adquirida quando os oócitos atingem 120 µm de diâmetro (Otoi et al., 2000). Em hamster, camundongos, humanos e macacos, o mesmo fenômeno foi observado (Iwamatsu, 1975; Sorensen, 1976; Motlik, 1989; Durinzi, 1995; Gilchrist, 1995).

A idade da cadela doadora também influencia o número total de oócitos recuperados (Rodrigues e Rodrigues, 2003b) e as taxas de maturação, sendo que a taxa média de recuperação diminui cerca de 4,7 complexo oócito-*cumulus* (COCs) por ano (StromHolst et al., 2001), e a habilidade de maturar *in vitro* fica comprometida em fêmeas com idade superior a sete anos, quando comparada com animais mais jovens (Hewitt e England, 1998).

A raça do animal, por sua vez, parece não exercer influência sobre o número total de oócitos recuperados utilizando a técnica de fatiamento (Rodrigues e Rodrigues, 2003a). No entanto, na técnica de digestão do ovário, Durrant et al. (1998) encontraram um número significativamente maior de oócitos em animais mestiços quando cotejados aos de raça pura.

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

Alguns estudiosos afirmaram que o número de oócitos viáveis colhidos e a taxa de maturação em oócitos cultivados *in vitro* parecem ser afetados pelo ciclo estral (Nickson et al. 1993; Yamada et al., 1993), enquanto outros não encontraram influência da fase do ciclo estral sobre os índices de maturação (Rodrigues e Rodrigues, 2003a) ou diferenças na frequência de maturação oocitária entre os oócitos colhidos de cadelas no período de anestro e diestro (Hewitt e England, 1997).

Yamada et al. (1993) demonstraram que uma alta proporção de oócitos dos folículos pré-ovulatórios de cadelas estimulados com gonadotrofinas atingiu MII comparados com os de folículos obtidos de cadelas sem estímulo, sugerindo que a maturação pré-ovulatória do oócito é importante para a aquisição da competência meiótica, e consequentemente, de sua maturação *in vitro*. De modo similar, Hewitt e England (1997) sugeriram que a colheita de oócitos no fim do proestro e início de estro é mais adequada, pois as concentrações de progesterona e estrogênio durante esses estágios do ciclo têm um efeito positivo sobre a maturação. Martins (2005), em estudo comparando as taxas de maturação de oócitos até o estágio de MI, de cadelas em anestro ou estro, observou uma porcentagem maior de MI em oócitos de cadelas em estro (58 vs. 25%).

Em outro estudo sobre o efeito da fase do ciclo estral na MIV de oócitos cultivados em meios utilizando diferentes concentrações de progesterona, os autores encontraram taxas similares de MII nas cadelas em estro e diestro, porém superiores às das cadelas que estavam em anestro e proestro (Willingham-Rocky et al., 2003). Apparício-Ferreira (2006), por sua vez, não encontrou diferença significativa nas taxas de maturação entre as fases folicular, lútea e anestro, quando foi avaliada a maturação nuclear, mas a diferença foi significativa quando se avaliou a maturação citoplasmática.

Esta contradição entre os diversos estudos reitera a importância e necessidade de novas pesquisas que enfoquem a maturação *in vivo*, as modificações ocorridas no oócito no ambiente pré e pós-ovulatório e sua influência quando sob cultivo *in vitro*.

Fatores extrínsecos envolvidos na MIV

A maturação de oócitos em gotas de meio de cultivo recobertas por óleo mineral é, assim como em outras espécies, o método mais utilizado em canídeos (Luvoni et al., 2005). Embora cada estudo apresente uma

proporção oócito: volume do meio, somente um experimento avaliou o efeito da densidade oocitária na competência meiótica, concluindo que a influência de sua densidade difere de acordo com a fase do ciclo estral. Neste caso, 10 COCs de cadelas em anestro cultivados em 100 µl de meio de maturação apresentaram maior porcentagem de MII (Otoi et al., 2002).

O tempo de cultivo também é um fator importante na maturação *in vitro* de oócitos caninos. Experimentos sobre MIV em cadelas reportam períodos de incubação que variam de 24 a 120 horas (Luvoni et al., 2005), sendo que este período varia não somente com os diferentes protocolos mas também com as taxas de progressão e maturação oocitária. Desta forma, quanto maior o tempo de incubação (dentro dos períodos utilizados para a espécie), maior a progressão para o estágio de quebra da vesícula germinativa – MII, como também maiores as taxas de oócitos degenerados (Nickson et al., 1993). Portanto, o ideal é que se consiga um equilíbrio entre o meio utilizado e o período de incubação, de forma a se obter melhores taxas de maturação com níveis de degeneração reduzidos.

A temperatura de cultivo entre 37 e 39°C não influencia as taxas de maturação ou a competência meiótica. Pesquisas utilizando diferentes temperaturas, tais como 37°C (Mahi e Yanagimachi, 1976), 37,5°C (Otoi et al., 2000), 38°C (Fulton et al., 1998; Srsen et al., 1998) e 39°C (Hewitt e England, 1997) na incubação de oócitos caninos, apresentaram resultados similares. Rodrigues e Rodrigues (2004), comparando duas temperaturas na maturação de oócitos, confirmaram que não há diferença na taxa de maturação de oócitos incubados a 37 e 39°C, mas sim no tempo de cultivo, sendo que os períodos de 72 e 96 horas apresentaram maior proporção de oócitos maturados.

A tensão gasosa de 5 e 20% de CO₂ nos meios TCM 199 e CRML 1066 promoveu taxas de maturação similares para oócitos caninos (Songsasen et al., 2001), diferindo de estudos com bovinos e camundongos, em que a tensão gasosa de 5% de CO₂ garantiu um aumento na competência meiótica dos oócitos cultivados (Luvoni et al., 2005).

Na tentativa de simular as condições encontradas *in vivo*, alguns pesquisadores têm estudado meios e suplementos para o cultivo de oócitos de cadelas, com o intuito de melhorar as taxas de maturação nesta espécie. Na maioria dos casos, são utilizadas adaptações dos meios empregados em bovinos, tanto os simples (soluções salinas acrescidas de lactato, piruvato e glicose) quanto os complexos (acrescidos de aminoácidos, vitaminas e outros componentes; Gardner e Lane, 2000).

Os meios mais comumente utilizados em estudos de MIV de oócitos caninos são o SOF (synthetic oviduct fluid; Hewitt e England, 1997, 1998, 1999a; Bolamba et al., 2002) e o TCM 199 (tissue culture medium 199; Nickson et al., 1993; Hewitt et al., 1998; Fuji et al., 2000; Otoi et al., 2000, 2001; Songsasen et al., 2001; Rodrigues e Rodrigues, 2003a, 2004; Willingham-Rocky et al., 2003).

Esses meios vêm sendo empregados na MIV canina acrescidos de algumas substâncias, tais como fontes proteicas, hormônios, antioxidantes e fatores de crescimento, com o intuito de aumentar a sobrevivência dos oócitos em cultura.

Hewitt et al. (1998), em estudo utilizando o meio TCM 199, mostraram que a suplementação com 0,3% de BSA (albumina sérica bovina, em inglês) aumentou as taxas de maturação até metáfase I, anáfase I e metáfase II às 48 horas de cultivo, enquanto a adição de 20% de soro fetal bovino (SFB) ao meio de cultivo incrementou as taxas de maturação somente às 96 horas de cultivo. Similarmente, Rodrigues e Rodrigues (2003b) mostraram que a adição de 0,4% de BSA no meio TCM 199 promoveu altas taxas de maturação até o estágio de MI, embora não tenha havido progressão na mesma proporção até MII. Enquanto esses estudos, utilizando fontes proteicas no meio TCM 199, demonstraram um efeito positivo na taxa de maturação, essa suplementação no meio SOF parece não alterar de forma significativa, como evidenciam os trabalhos de Hewitt e England (1999) e Bolamba et al. (2002). Os primeiros se referem a um aumento na progressão da maturação somente quando o meio SOF foi suplementado com 4% de BSA e maturado por 96 horas, ao passo que os outros autores não observaram diferença entre o meio acrescido de fontes proteicas e o sem suplementação.

Segundo Otoi et al. (1999), a adição de soro de cadelas em estro na concentração de 10% promove um aumento na porcentagem de oócitos maturados até os estágios de MI e MII, uma vez que o soro de animais nesta fase do ciclo possui, além de componentes proteicos, uma concentração maior de estrógeno e progesterona. Ribeiro (2007), por sua vez, não encontrou diferença nas taxas de maturação dos oócitos cultivados em meio com suplementação de soro de cadelas em estro, mas sim nos índices de retomada da meiose. Destarte, a suplementação com hormônios nos meios de maturação também tem sido alvo de alguns estudos ainda não conclusivos e com resultados distintos. O consenso é que o desenvolvimento da competência do oócito em iniciar o processo de maturação implica uma ação coordenada de estímulos hormonais, caso contrário o desenvolvimento não ocorre (Luvoni et al., 2005).

Yamada et al. (1993) foram os primeiros a estudar o efeito dos hormônios sobre as taxas de maturação de oócitos de cadelas em estro e anestro induzidas por gonadotrofinas (superovulação), demonstrando que os oócitos expostos a estes hormônios *in vivo* maturaram em número significativamente maior que os do controle. Hewitt e England (1997), estudando a suplementação com progesterona (P4) e estradiol (E2), isolados ou associados, e, posteriormente (1999a), a adição de 1 µg/ml de FSH (hormônio foliculo estimulante), 1 µg/ml de

LH (hormônio luteinizante) ou 1 µg/ml de FSH e de LH, não encontraram benefícios destas suplementações nas taxas de maturação oocitária e sugeriram que a adição de quantidades superiores às fisiológicas possa incrementar esses índices.

Vannucchi et al. (2009) não observou uma influência da suplementação de altas doses de estradiol (20 µg/ml) no meio, salvo quando associado à progesterona (P4), e mesmo assim, sobre as taxas de quebra de vesícula germinativa. Achado semelhante foi descrito por Willingham-Rocky et al. (2003), que acrescentaram diferentes concentrações de progesterona (0, 20, 200, 2000 ng/ml) aos meios de maturação sem que se observasse aumento da taxa de oócitos em MII. Em contrapartida, Kim et al. (2005) relataram que uma porcentagem maior de oócitos maturados em meios acrescidos de 2 µg/ml de estradiol (E2) e de 2,0 µg/mL P4 atingiu MII (16,6%) quando comparados com aqueles em meio contendo somente E2 (10,4%), mas, curiosamente, essa associação na concentração de 2 µg/ml de E2 e 0,5 µg/ml de P4 diminuiu a competência meiótica (3,4% de MII).

De los Reyes et al. (2005) estudaram o efeito do hormônio hCG (gonadotrofina coriônica humana) sobre a maturação oocitária em diferentes grupos (com hCG, sem hCG e com hCG somente por 48 horas) e períodos de cultivo e mostraram que o meio que continha 10 UI/mL de hCG apresentou maior porcentagem de COCs em MII às 72 e 96 horas de cultivo quando comparado com o meio sem suplementação, no mesmo período de tempo. No entanto, ao maturarem os oócitos em meio contendo 10 UI/ml de hCG por 48 horas e transferi-los para outro meio sem suplementação por adicionais 24 ou 48 horas, observaram a maior taxa de maturação (43,4%) após 96 horas de cultivo.

Assim como os hormônios, o emprego do cocultivo em células da tuba uterina nos meios de maturação tem sido justificado pela similaridade com os eventos *in vivo*. Em estudo de Bogliolo et al. (2002), observou-se efeito positivo na maturação de oócitos quando utilizado o cocultivo de células da tuba uterina obtidos de fêmeas em estro, enquanto no conduzido por Vannucchi (2003) não se observou influência significativa do cocultivo de células da tuba uterina de fêmeas em anestro.

Experimentos recentes têm estudado a adição de antioxidantes e fatores de crescimento nos meios de maturação, demonstrando influência positiva desta suplementação. Kim et al. (2004) observaram uma porcentagem maior de oócitos atingindo MII quando suplementados com 50 µm de β-mercaptoetanol (20%) e com 20 ng/ml de fator de crescimento epidermal (EGF; 13%). Bolamba et al. (2006) também observaram efeito positivo utilizando EGF e hormônios (E2, FSH, LH) na expansão das células do *cumulus* e na progressão da meiose, enquanto Rota e Cabianca (2004) não encontraram diferença estatística nas taxas de maturação quando o meio de cultivo foi suplementado com ITS (insulina-transferina-selênio).

Avaliação da maturação oocitária

Os oócitos caninos possuem alta densidade e o ooplasma rico em lipídios, características que tornam difícil a visualização do núcleo e do citoplasma, bem como a avaliação da maturação *in vitro*. Por esta razão, os métodos descritos para avaliar o ooplasma preconizam a retirada mecânica do material lipídico (centrifugação) ou a utilização de marcadores nucleares fluorescentes que permitem identificá-lo sem a necessidade de se retirar o material lipídico (Hewitt et al., 1998).

Uma das técnicas usadas para coloração dos oócitos é a aceto-orceína com prévia fixação em ácido e álcool (Mahi e Yangimachi, 1976; Yamada et al., 1992; Hewitt e England, 1997, 1998, 1999a; Durrant et al., 1998) e fixação adicional em citrato de sódio por 10 minutos, o que torna o ooplasma mais claro e mais fácil de ser visualizado (Hewitt et al., 1998). A visualização da morfologia nuclear deve ser realizada em microscopia de interferência ou contraste de fase.

Métodos fluorescentes, como o HOESCHT 33342, também vêm sendo utilizados para avaliar a maturação nuclear em microscópio invertido e lâmpada ultravioleta (Hewitt e England, 1997). Esta técnica permite a visualização do material nuclear, mas não distingue, individualmente, os cromossomos, como ocorre com a coloração de aceto-orceína. Como vantagem, a coloração de HOESCHT 33342 é um método mais rápido e não causa morte celular, como pode ocorrer quando se utiliza a aceto-orceína (Dew, 2001). Os oócitos analisados são classificados de acordo com a fase de divisão meiótica, como proposto por Hewitt et al. (1998).

A maturação citoplasmática do oócito também pode ser avaliada utilizando-se métodos como: a observação da presença (número e localização) de grânulos corticais, a cinética dos índices de maturação meiótica (extrusão do primeiro corpúsculo polar) e a mensuração de glutatona no oócito (Izadyar et al., 1996).

Em estudo sobre a distribuição dos grânulos corticais e sua relação com a maturação nuclear, mostrou-se que as maiores taxas de MII e grânulos corticais distribuídos na periferia (caracterizando maturação citoplasmática completa) foram observadas às 72 horas de cultivo, sendo que oócitos oriundos de cadelas na fase folicular apresentaram estatisticamente maior taxa de maturação citoplasmática do que as demais (Apparício-Ferreira, 2006). De forma similar, a presença do antioxidante β-mercaptoetanol aumentou a síntese de glutatona no meio, especialmente quando foram utilizados oócitos provenientes de cadelas na fase folicular e lútea, quando comparados às do anestro (Kim et al., 2007). Recentemente, avaliando a ultraestrutura de oócitos maturados *in*

vitro, alguns pesquisadores observaram que mesmo aqueles oócitos em estágio de MII apresentavam uma maturação citoplasmática deficiente, ou, algumas vezes, inexistente (Viaris de Lesegno et al., 2008a). Os dados dos três trabalhos supracitados juntos evidenciam a ineficiência dos meios de cultivo utilizados para a espécie em questão e também a dificuldade de se atingir a maturação citoplasmática (por envolver um maior número de variáveis) quando comparada à nuclear, o que possivelmente é uma das responsáveis pelos baixos índices de embriões pós-FIV. Sendo assim, fica evidente a importância de se considerar tanto a avaliação nuclear quanto a citoplasmática nos estudos de maturação *in vitro* nesta espécie.

Considerações finais

A maturação *in vitro* dos oócitos caninos tem demonstrado ser uma técnica que ainda precisa de ajustes, principalmente no que tange ao meio de cultivo e às suplementações e suas concentrações adequadas. O aperfeiçoamento da técnica permitirá aos cientistas esclarecer pontos ainda obscuros da fisiologia reprodutiva nesta espécie, dentre os quais, os fatores que engatilham a retomada da meiose, o microambiente da tuba uterina e a interdependência ou não das maturações citoplasmática e nuclear. *A posteriori*, a elucidação dessas questões possibilitará o emprego de biotécnicas no desenvolvimento de programas de preservação de gametas de espécies ameaçadas e de matrizes geneticamente superiores provenientes de canis comerciais.

Referências bibliográficas

- Andersen AC** Reproductive system. B/Female In: Andersen AC, Good LS (Ed). *The Beagle as an experimental dog*. Ames, IA: Iowa State University Press, 1970. p.321-326.
- Andersen AC, Simpson ME**. *The ovary and reproductive cycle of the dog (beagle)*. Los Altos, CA: Geron-X, 1973.
- Apparício-Ferreira M**. Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos de cadelas (*canis familiares*) obtidos por ovariectomia-histerectomia. 65f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2006.
- Avelino KB**. Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutatona durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária. 93f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2004.
- Baker TG**. Germes cells and fertilization. In: Austin CR, Short RV (Ed.). *Reproduction in mammals*. 2 ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1982. p 17-45.
- Bogliolo L, Zedda MT, Ledda S, Leoni G, Naitana S, Pau S**. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod Nutr Dev*, v.42, p.265-273, 2002.
- Bolamba D, Russ KD, Harper SA, Sandler JL, Durrant, BS**. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, v.65, p.1037-1047, 2006.
- Bolamba D, Russ KD, Olson MA, Sandler JL, Durrant BS**. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology*, v.58, p.1689-1703, 2002.
- Concannon PW, Hansel W, Visek WJ**. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod*, v.13, p.112-121, 1975.
- Concannon PW, McCann JP, Temple M**. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fertil Suppl*, n.39, p.3-25, 1989.
- Damiani P, Fissore RA, Cilelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM, Duby RT**. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.45, p.521-34, 1996.
- De los Reyes M, Lange J, 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, p.1-11, 2005.
- Dew EV**. *In vitro maturation of the canine oocyte*. 56f. Thesis (Master of sciences) – University of Georgia, Athens, GA, 2001.
- Dulcibella T**. Biochemical and cellular insights into the temporal window of normal fertilization. *Theriogenology*, v.49, p.53-65, 1998.
- Dulcibella T, Duffy P, Reindollar R, Su B**. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin stimulated meiotic maturation and aging *in vivo*. *Biol Reprod*, v.43, p.870-876, 1990.
- Durinzi KL, Saniga EM, Lanzendorf SE**. The relationship between size and maturation *in vitro* in the unstimulated human oocyte. *Fertil Steril*, v.63, p.404-406, 1995.
- Durrant BS, Pratt NC, Russ KD, Bolamba D**. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, v.49, p.917-932, 1998.

- Farstad W.** Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, v.53, p.175-186, 2000a.
- Farstad W.** Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.375-387, 2000b.
- Farstad W, Mondain-Monval M, Hyttel P, Smith AJ, Markeng D.** Periovarian endocrinology and oocyte maturation unmated, mature blue fox vixens (*Alopex lagopus*). *Acta Vet Scand*, v.30, p.313-319, 1989.
- Feldman E, Nelson R.** Ovarian cycle and vaginal cytology. In: Canine and feline endocrinology and reproduction. 3.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004. p.752-776.
- Fujii M, Otoi T, Murakami M, Tanaka M, Une S, Suzuki T.** The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *J Vet Med Sci*, v.62, p.305-307, 2000.
- Fulton R, Durrant B, Keskinetepe L, Brandon C, Fayer-Hosken R.** Assisted reproductive techniques for the treatment of canine infertility. *Soc Theriogenol Newsl*, v.21, p.2-7, 1998.
- Gardner DK, Lane M.** Embryo culture systems. In: Trouson AO, Gardner DK (Ed.). *Handbook of in vitro fertilization*. 2 ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. p.205-264.
- Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK.** Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte somatic cell associations. *Biol Reprod*, v.52, p.1234-1243, 1995.
- Hewitt DA, England GC.** Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. *Vet Rec*, v.144, p.237-239, 1999a.
- Hewitt DA, England GC.** Synthetic oviductal fluid and oviductal cell co-culture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.55, p.63-75, 1999b.
- Hewitt DA, England GC.** The effect of oocyte size and bitch age upon o nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology*, v.49, p.957-966, 1998.
- Hewitt DA, England GC.** The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. *J Reprod Fertil Suppl*, v.51, p.83-91, 1997.
- Hewitt DA, Watson PF, England GC.** Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, v.49, p.1083-1128, 1998.
- Holst PA, Phemister RD.** The prenatal development of the dog. preimplantation events. *Biol Reprod*, v.5, p.771-779, 1971.
- Iwamatsu T, Yanagimachi R.** Maturation *in vitro* of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamsters. *J Reprod Fertil*, v.45, p. 83-90, 1975.
- Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM.** *In vitro* maturation of bovine oocyte in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev*, v.45, p.372-377, 1996.
- Jeffcoate I.** Physiology and endocrinology of the bitch. In: Simpson GM, England GCW, Harvey M (Ed.). *BSVA Manual of small animal reproduction and neonatology*. Cheltenham, UK: British Small Animal Veterinary Association. 1998. p.1-9.
- Johnston DS, Kustritz MVR, Olson PNS.** *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia, PA: Saunders. 2001. p.337-355.
- Kim MK, Fibrianto YH, Goo Jang HJO, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS.** Effects of estradiol-17 β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.1342-1353, 2005.
- Kim MK, Fibrianto YH, Ju Oh H, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS.** Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different of the estrus cycle. *J Vet Sci*, v.5, p.253-258, 2004.
- Kim MK, Hosseim MS, Ju Oh H, Fibrianto HY, Jang G, Kim HJ, Hong SG, Park JE, Kang SK, Lee BC.** Glutathione content of *in vivo* and *in vitro* matured canine oocytes collected from different reproductive stages. *J Vet Med Sci*, v.69, p.627-632, 2007.
- Kubelka M, Motík J, Fulka J Jr, Procházka R, Rimkeviová Z, Fulka J.** Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gamete Res*, v.19, p.423-431, 1998.
- Liebried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL.** Development potential of bovine oocytes mature *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod*, v.36, p.376-383, 1987.
- Loneragan P, Monaghan P, Rizoz D, Boland MP, Gordon D.** Effects of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilisation and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, v.37, p.48-53, 1994.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D.** Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, v. 63, p. 41-59, 2005.
- Mahi CA, Yanagimachi R.** Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J Exp Zool*, v.196, p.189-196, 1976.
- Martins LR.** *Maturação nuclear de ovócitos de cadelas em estro e anestro submetidas à maturação in vitro*. 74f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2005.

- Metcalfe SS.** *Assisted reproduction in the bitch.* 160f. Thesis (Master of Science) - Monash University, Melbourne, Vic, Australia, 1999.
- Motlik J.** Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. *J Reprod Fertil Suppl*, n.25, p.3817-3825, 1989.
- Nickson DA, Boyd JS, Eckershall PD, Ferguson JM, Harvey MJA, Renton JP.** Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. *J Reprod Fertil Suppl*, n.47, p.231-240, 1993.
- Otoi T, Fujji M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T.** Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*, v.54, p.535-542, 2000.
- Otoi T, Fujji M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T.** Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod Fertil Dev*, v.11, p.387-390, 1999.
- Otoi T, Ooka A, Murakami M, Kurniani Karja MW, Suzuki T.** Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev*, v.13, p.151-155, 2001.
- Otoi T, Willingham L, Shin T, Kraemer DC, Westhusin M.** Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction*, v.124, p.775-781, 2002.
- Renton JP, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ, Mullaney J, Perry B.** Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*canis familiaris*). *J Reprod Fertil*, v.93, p.221-231, 1991.
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, Viaris de Lesegno C, Chastant-Maillard S.** In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, v.130, p.193-201, 2005.
- Ribeiro APC.** *Influência do estágio reprodutivo e suplementação do meio de cultivo com progesterona e/ou soro de cadela em estro, nas taxas de maturação in vitro de oócitos de fêmeas caninas.* 129f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2007.
- Robertson JB, Srsen V, King WA.** Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured in vitro. In: International Congress of Animal Reproduction, 12, 1992, London. *Proceedings...* London: ICAR, 1992. v.4, p.1808-1910.
- Rodrigues BA.** *Maturação e fecundação in vitro de ovócitos de caninos domésticos (Canis familiares).* 119f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2003.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL.** Effect of two temperatures on in vitro nuclear maturation of bitch oocytes: relation to time culture intervals. *Rev Bras Ciênc Vet*, v.11, p.37-39, 2004.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL.** Endocrinologia reprodutiva na cadela. *Clín Vet*, v.7, n.40, p.50-58, 2002.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL.** Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*, v. 60, p. 59-66, 2003a.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL.** Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.58-62, 2003b.
- Rota A, Cabianca G.** In vitro maturation rate of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reprod Nutr Dev*, v.44, p.105-109, 2004.
- Songsasen N, Yu I, Leibo SP.** Effects of maturation media and oxygen concentration on nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, v.55, p.494, 2001. Abstract.
- Sorensen RA, Wassarman PM.** Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol*, v.50, p.531-536, 1976.
- Souza LC, Junior OAP, Mendonça AO, Ballaris AL.** Associação homem-animal: reflexos na economia. *Rev Educ Contin*, v.4, p. 62-65, 2001.
- Srsen V, Kalous J, Nagyova E, Sutovsky P, King WA, Motlik J.** Effects of follicle stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*alopex lagopus*) oocytes in vitro. *Zygote*, v.6, p.299-309, 1998.
- StromHolst B, Larsson B, Rodrigues-Martinez H, Lagerstedt AS, Lindeforsberg C.** Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. *J Vet Med*, v.48, p.587-92, 2001.
- Theiss T.** *Investigations on the collection, in vitro maturation and fertilization of dog oocytes.* 97f. Thesis. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximillan Universität Munich, 1997.
- Tsutsui T.** Studies on the reproduction in the dog on cleavage and transport of fertilised ova in the oviduct. *Jap J Anim Reprod*, v.21, p.70-75, 1975.
- Tsutsui T, Ahims K, Niah M, Kuvo N, Murao I, Shimizu T, Ogasa A.** An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jap J Vet Sci*, v.51, p.797-800, 1989.
- Vannuchi CI.** *Estudo da maturação nuclear in vitro de oócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina.* 77f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.
- Vannuchi CI, Faustino M, Marques MG, Nichi M, Assumpção MEOD, Visintin JA.** Effects of

- gonadotrophin exposed medium with high concentrations of progesterone and estradiol 17 β on in vitro maturation of canine oocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.45, p.328-333, 2009.
- Viariis Leseqno C, Reynaud K, Pechoux C, Chebrout M, Chastant-Maillard S.** Ultrastructural evaluation of *in vitro*-matured canine oocytes. *Reprod Fertil Dev*, v.20, p.626-639, 2008a.
- Viariis Leseqno C, Reynaud K, Pechoux C, Thoumire S, Chastant-Maillard S** Ultrastructure of canine oocytes during in vivo maturation. *Mol Reprod Dev*, v.75, p.115-125, 2008b.
- Wassarman PM, Albertini DF.** The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). *The physiology of reproduction*. 2.ed. New York, NY: Raven Press 1994. p.79-122.
- Willingham-Rocky LA, Hinrichs K, Westhusin ME, Kraemer DC.** Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro. *Reproduction*, v.126, p.501-508, 2003.
- Yabiku RM.** Animais de estimação: lucros estimados. Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br>> Acessado em: set 2009.
- Yamada S, Kawao Y, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y.** In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J Reprod Fertil Suppl*, v.47, p.227-229, 1993.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y.** Maturation, fertilization and development of dog oocytes in vitro. *Biol Reprod*, v.46, p.853-858, 1992.