

Influência das fases de anestro e diestro na competência meiótica oocitária de cadelas

Influence of anestrus and diestrus stages of oocyte on meiotic competence in bitches

Leda Maria Costa PEREIRA¹; Paulo Ricardo de Oliveira BERSANO^{2,3}; Alfredo Feio da Maia LIMA⁴; José Carlos de Figueiredo PANTOJA⁵; Maria Denise LOPES¹

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Botucatu – SP, Brasil

² Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza – CE, Brasil

³ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina, Centro de Estudos em Venenos de Animais Peçonhentos, Botucatu – SP, Brasil

⁴ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Botucatu – SP, Brasil

⁵ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Botucatu – SP, Brasil

Resumo

A cadela apresenta particularidades reprodutivas que a diferencia de outras espécies. Diversos experimentos têm sido realizados visando estabelecer protocolos eficientes para a maturação, entretanto os resultados mostram-se insatisfatórios. Nesse aspecto, a fase reprodutiva da fêmea doadora deve ser considerada, já que pode ser um fator de variabilidade dos achados até então presenciados nessa espécie. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência das fases do ciclo estral (anestro e diestro) na maturação *in vitro* (MIV) de cadelas. Os ovários foram transportados em solução de cloreto de sódio 0,9% e seccionados em solução salina fosfato tamponado (PBS) e os complexos *cumulus*-oócito (COCs) selecionados em meio de cultura de tecidos (TCM) 199 suplementado com HEPES. Foram obtidos 469 oócitos grau 1 de cadelas em anestro e diestro. Esses oócitos selecionados foram transferidos para o meio de maturação por um período de 72 horas, sendo posteriormente submetidos à solução de hialuronidase e corados com HOESCHT 33342 para avaliação da configuração nuclear. A comparação das fases de anestro e diestro não revelou diferença ($p > 0,05$) entre os estágios de maturação nuclear. Dessa maneira, a fase do ciclo estral não influenciou na maturação *in vitro* de oócitos caninos, incrementando os índices de M-II nesta espécie.

Palavras-chave: Ciclo estral. Maturação. Fase reprodutiva. Oócito. Cadela.

Abstract

The bitch has reproductive peculiarities that differentiate it from other species. Several experiments have been conducted to establish efficient protocols for maturation; however, the results appear to be unsatisfactory. In this respect, the reproductive female donor should be considered, since it can be a factor of variability of findings in this species. The objective of this study was to evaluate the relationship between the estrous cycle phases – phase diestrus and anestrus on canine oocyte *in vitro* maturation (IVM). The ovaries were transported in sodium chloride 0.9% solution, and were cut into phosphate-buffered saline (PBS) and the *cumulus*-oocyte complexes (COCs) selected in tissue culture medium (TCM), supplemented with 199 HEPES. A total of 469 grade 1 oocytes were collected from bitches in anestrus and diestrus. These selected oocytes were transferred to the maturation medium for a period of 72 hours, then subjected to hyaluronidase solution and stained with Hoechst 33342 to assess nuclear configuration. The comparison of anestrus and diestrus phase showed no differences ($p > 0.05$) between the nuclear maturation stages. Thus, the phase of the estrous cycle did not influence the *in vitro* maturation of canine oocytes, increasing the rates of M-II in this species.

Keywords: Estrous cycle. Maturation. Reproductive stage. Bitch.

Correspondência para:

Leda Maria Costa Pereira
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de
Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Área Reprodução Animal –
Laboratório de Pequenos Animais e Silvestres
Distrito de Rubião Jr, s/n – Caixa Postal 560

CEP 18618-970, Botucatu, SP, Brasil
e-mail: ledamcp@hotmail.com

Recebido: 23/02/2015
Aprovado: 01/06/2015

Introdução

A maturação oocitária *in vitro* (MIV) na espécie canina visa simular as condições observadas no ambiente endócrino da cadela. Entretanto, a eficiência dessa biotecnologia reprodutiva é ainda muito limitada com índices de metáfase II (MII) de 20%. Essas baixas taxas podem ser atribuídas às condições subótimas de cultivo ou até mesmo à baixa competência meiótica dos oócitos caninos.

A espécie canina apresenta algumas particularidades que merecem destaque. Na cadela, a ovulação ocorre de 1 a 2 dias após o pico pré-ovulatório de LH, ainda no início da fase de estro e os folículos ovarianos iniciam sua luteinização antes mesmo da ovulação. Além disso, esses oócitos são ovulados ainda imaturos, no início da primeira divisão meiótica (M-I) e logo após há a quebra da vesícula germinativa. Assim, após a ovulação, os oócitos requerem de 2 a 5 dias para completar a maturação (YAMADA et al., 1992). Desse modo, a maturação completa e a fecundação ocorrem dentro do oviduto e a aquisição da competência meiótica ocorre em ambiente intra e extrafolicular (LUVONI et al., 2005).

Embora seja uma técnica utilizada rotineiramente e com bons resultados em espécies como bovinos e felinos, em canídeos, o sistema de MIV é considerado ineficiente. Vários fatores vêm sendo apontados como possíveis influenciadores nesses baixos índices, tais como as características morfológicas dos complexos *cumulus*-oócito, o diâmetro oocitário, a fase do ciclo estral da cadela doadora, a suplementação do meio de cultivo, assim como as características ultraestruturais do oócito.

A influência do ciclo estral da doadora na habilidade do oócito em completar a meiose vem sendo investigada (BOLAMBA et al., 2006; SONGSASEN; WILDT, 2007; BUTTLER, 2010). Esses autores avaliaram a maturação nuclear de oócitos obtidos de cadelas em diferentes estágios do ciclo estral e constataram a ausência de associação entre a fase reprodutiva e a competência oocitária. Dessa maneira, sugeriram

que o ambiente hormonal na cultura *in vitro* não seria um bom marcador de competência. Rodrigues e Rodrigues (2003) referiram que, a maturação nuclear *in vitro* não é influenciada pelo estágio do ciclo estral, sendo a qualidade do oócito o indicador mais confiável do potencial de competência meiótica.

A associação das fases de anestro e diestro com a competência oocitária ainda está sob investigação e os resultados mostram-se controversos. Hewitt e England (1997) verificaram a ausência de diferença na taxa de maturação oocitária entre oócitos coletados de cadelas no período de anestro e diestro. No entanto, relataram que a obtenção de oócitos no final do proestro e início de estro é mais adequada, pois as concentrações de progesterona e estrógeno durante este período podem exercer efeito positivo sobre a maturação. Willingham-Rocky et al. (2003) afirmaram que o estágio do ciclo estral do doador é o fator chave no critério de seleção para oócitos caninos meioticamente competentes. Nickson et al. (1993) afirmaram que o número de oócitos coletados e a taxa de maturação *in vitro* são influenciados pela fase do ciclo estral.

Desse modo, a despeito de diversos estudos terem sido realizados para o estabelecimento de protocolos eficientes para a maturação e posterior FIV na espécie canina, os resultados obtidos foram insatisfatórios. Nesse aspecto, a fase reprodutiva da fêmea doadora deve ser considerada, já que pode ser um fator de variabilidade dos achados até então presenciados nesta espécie. Assim, o objetivo desse estudo foi comparar as fases de diestro e anestro do ciclo estral na competência meiótica de oócitos caninos.

Material e Métodos

Foram utilizadas 36 cadelas, de diversas raças, com idade variável entre seis meses a sete anos, submetidas à ovariectomia (OHE) eletiva. O trabalho foi aprovado pela Câmara de Ética da FMVZ – UNESP campus de Botucatu e recebeu o protocolo número 176/2011.

Os ovários foram isolados assepticamente, imersos em solução salina 0,9% e transportados à temperatura de 4°C para o Laboratório de Reprodução Animal de Pequenos Animais e Silvestres, onde foram processados no prazo máximo de quatro horas após o procedimento cirúrgico. A identificação da fase do ciclo estral foi baseada na classificação proposta por Hewitt e England (1998) da fase de anestro (ovários com ausência de folículos ou corpo lúteo) e diestro (ovários com a presença de um ou mais corpos lúteos). Posteriormente, os ovários foram seccionados em fatias finas (“*slicing*”), em solução aquecida 37°C de *phosphate buffer solution* (PBS) adicionada de 10% de soro fetal bovino (SFB). Após o processo de seleção, os complexos *cumulus-oócito* (COCs) grau 1 foram lavados em meio de cultura de tecidos 199 (TCM-199) tamponado com 25 mM de HEPES, acrescido de solução de 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 0,2 mM de piruvato e 5 mM de bicarbonato de sódio.

Os COCs grau 1 e com diâmetro > 110 µm foram submetidos à MIV em placas de cultivo de quatro poços, contendo 500 µL de meio de maturação TCM-199 suplementado com 25 mM de HEPES, solução de 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 26 mM de bicarbonato de sódio, 1,5 mM de piruvato de sódio, 2,9 mM lactato de sódio pentahidratado, 0,6 mM de cisteína, 0,03 UI/mL de hCG, 0,5 µg/mL de FSH, 20 µg/mL de E2 e 10 ng/mL do fator de crescimento epidérmico (EGF). As placas foram acondicionadas em estufa úmida a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar por um período de 72 horas. Após esse período de cultivo, os COCs foram colocados em solução de hialuronidase 0,2%, por cinco minutos, para a liberação completa das células do *cumulus*. A seguir, os oócitos foram transferidos para uma solução de PBS suplementada com paraformaldeído a 3,7%, lavados novamente em PBS e corados com 10 µg/mL de Hoechst 33342. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula, e avaliados pelo microscópio de luz e fluorescência Leica® DFC 310 FX para avaliação da maturação nuclear.

Modelos de regressão logística (SAS Institute, 2011) foram construídos para estimar as chances de ser observado oócitos nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI), metáfase II e degenerado (DEG), nas fases de anestro e diestro.

Resultados

Os oócitos foram classificados de acordo com a morfologia do DNA em cinco estágios: vesícula germinativa (VG) (Figura 1A), quebra de vesícula germinativa (QVG) (Figura 1B), metáfase I (M-I) (Figura 1C), metáfase II (M-II) (Figura 1D), e degenerados (DEG) ou não passíveis de identificação (Figura 1E). Foram isolados 469 oócitos (254 oócitos obtidos de ovários na fase de anestro e 215 oócitos em anestro) (Figuras 2A e 2B, respectivamente) que foram classificados como grau I e utilizados para avaliação da maturação nuclear.

As chances de se observar um oócito nos diferentes estágios de maturação nuclear nas fases de anestro e diestro são apresentadas na tabela 1 (Tabela 1).

Discussão

Diversos protocolos envolvendo a maturação oocitária vêm sendo desenvolvidos buscando simular as condições *in vivo* da cadela e incrementar as taxas de maturação nuclear. No entanto, os resultados não são promissores, fato este observado nas baixas taxas de M-I – M-II nesta espécie.

A influência do ciclo estral vem sendo associada à competência meiótica, entretanto não há consenso sobre os benefícios acerca da fase reprodutiva da cadela na capacidade de desenvolvimento oocitário, de modo que esta questão continua a ser alvo de pesquisas. Já foi constatado que os oócitos obtidos de folículos pré-ovulatórios e durante a fase folicular (estro e proestro) completam a maturação nuclear com mais sucesso do que aqueles obtidos em outras fases do ciclo (SONGSASEN; WILDT, 2007). No presente trabalho, foram avaliadas as fases de anestro e diestro já

Tabela 1 – Razão de chances de se encontrar um oócito nos diferentes estágios da maturação nuclear (VG, QVG, M-I, M-II e DEG) nas fases de anestro e diestro – Botucatu – 2013

Variável resposta	Fase do ciclo estral	Razão das chances	Intervalo de confiança 95%	Valor-P
VG	Anestro	1,33	0,67-2,61	0,41
	Luteal	Referência		
QVG	Anestro	0,91	0,57-1,43	0,67
	Luteal	Referência		
M-I	Anestro	0,86	0,54-1,39	0,55
	Luteal	Referência		
M-II	Anestro	0,53	0,29-0,96	0,04
	Luteal	Referência		
DEG	Anestro	1,37	0,95-1,98	0,09
	Luteal	Referência		

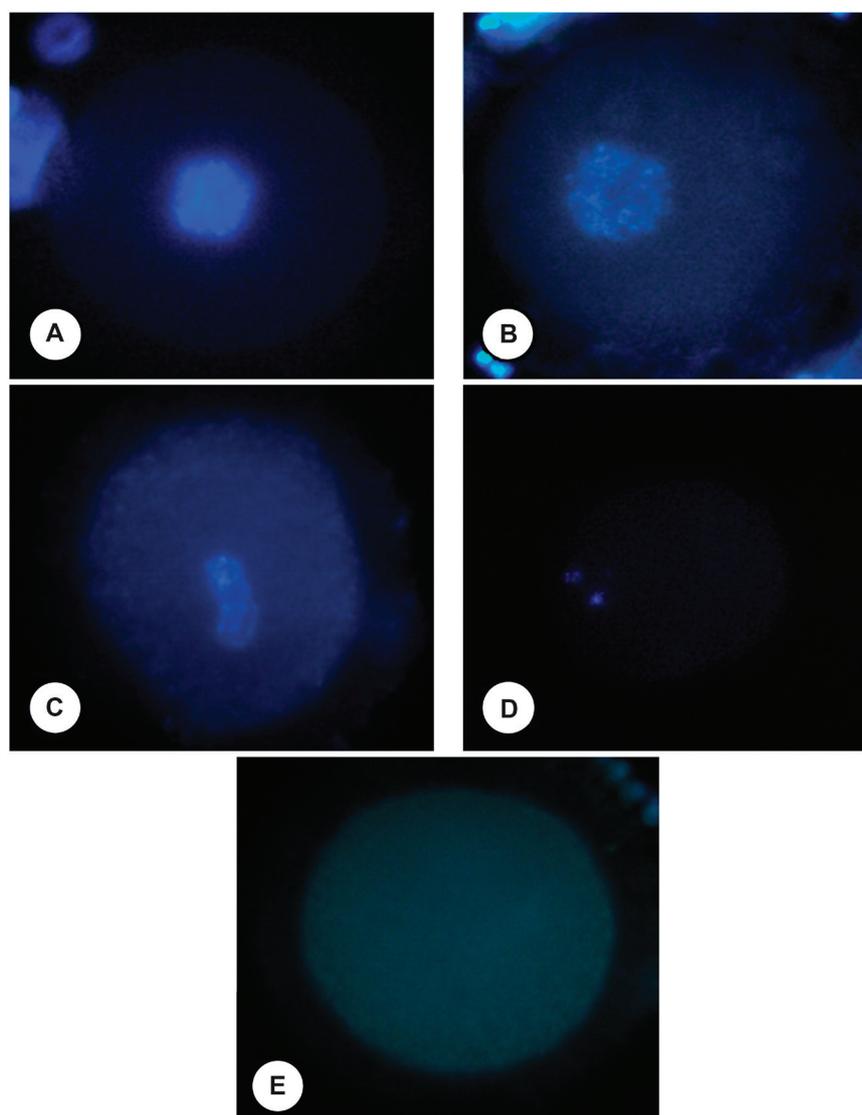


Figura 1 – Fotomicrografia digital de oócitos de cadelas em diferentes estágios de maturação nuclear após cultivo in vitro. Avaliação e classificação da cromatina. (A): Vesícula Germinativa (VG). (B): Quebra de Vesícula Germinativa (QVG), (C): Metáfase I (M-I). (D): Metáfase II (M-II), (E): Degenerado ou não passível de identificação. Coloração Hoescht 33342, comprimento de onda de 330-385 nm. Aumento 200X. Botucatu, 2013.

Fonte: (PEREIRA, 2013)

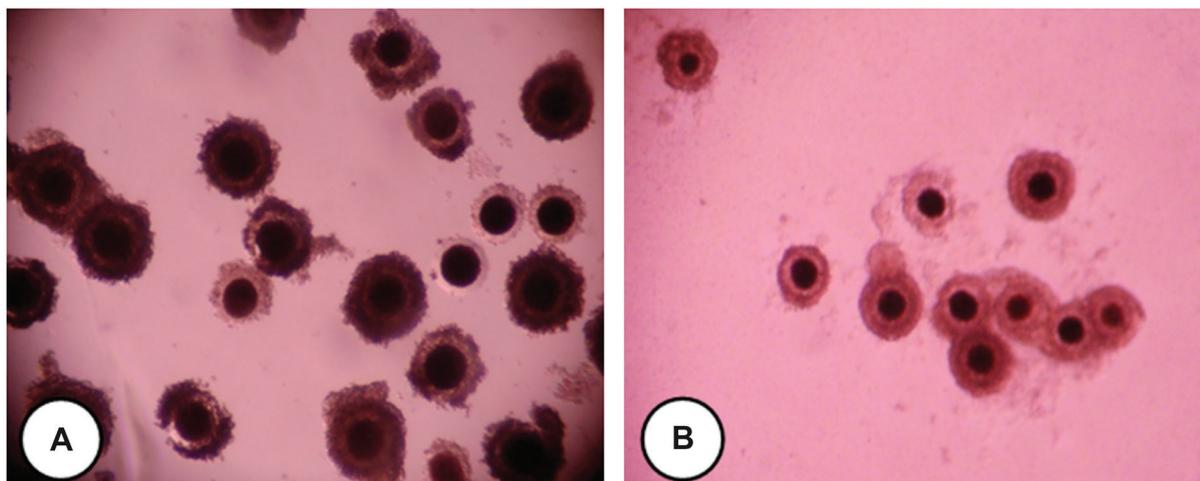


Figura 2 – (A) Fotomicrografia de COCs obtidos da fase de anestro antes da MIV. Aumento 40X. (B) Fotomicrografia de COCs obtidos da fase de diestro antes da MIV. Aumento 40X. Botucatu, 2013

Fonte: (PEREIRA, 2013)

que por razões práticas a MIV nas cadelas é frequentemente realizada com oócitos obtidos destes estágios do ciclo estral, após a OHE.

Luvoni et al. (2005) observaram que apesar de oócitos advindos de animais em anestro não apresentarem capacidade para atingir a M-II, nenhuma conclusão adicional pode ser obtida com relação à influência do ciclo estral sobre a competência meiótica. Com base nos resultados deste estudo, pode-se inferir que os oócitos obtidos da fase de anestro são aptos a alcançarem os estágios finais de maturação nuclear. Entretanto, as chances de se encontrar um oócito no estágio de M-II foram 1,9 (1,04-3,46) vezes maiores em oócitos obtidos de ovários na fase de diestro ($p < 0,05$).

Martins et al. (2006) constataram que a alta porcentagem na progressão da meiose observada nos oócitos obtidos de fêmeas durante o estro deve-se provavelmente à exposição desses oócitos ao ambiente folicular rico em estradiol, progesterona e outros fatores ainda desconhecidos. Hewitt e England (1997) verificaram que a suplementação hormonal nos meios de cultivo é baseada no fato de que os oócitos caninos em fase de VG estão sujeitos, *in vivo*, às concentrações decrescentes de estrógeno e crescentes de progesterona no folículo pré-ovulatório. O conhecimento das necessidades endócrinas da cadela pode possibilitar o

desenvolvimento de meios de cultivo mais apropriados que permitam que os oócitos adquiram a competência meiótica, independentemente da fase do ciclo estral da doadora.

Pereira, Bersano e Lopes (2013) observaram que o estágio da configuração da cromatina na obtenção dos oócitos pode influenciar a maturação nuclear. Constataram a presença de maior frequência de oócitos nos estágios iniciais de desenvolvimento (VG-1 e VG-2) em ovários obtidos da fase de anestro. Enquanto na fase de diestro foi observada uma proporção mais elevada de oócitos em estágios mais avançados de desenvolvimento (VG-3 e VG-4). Esses dados corroboram os resultados encontrados no presente trabalho já que os oócitos obtidos de ovários na fase de diestro apresentaram maiores chances de atingirem a M-II do que os oócitos obtidos da fase de anestro ($p < 0,05$).

Hewitt e England (1997), Bolamba et al. (2006) e Martins et al. (2006) têm tentado aumentar as taxas de maturação por meio de diferentes meios de suplementações. No entanto, pode-se observar diante das baixas taxas de maturação de M-I – M-II encontradas na cadela, que impossibilitam o desenvolvimento de biotecnologias como a fecundação *in vitro* (FIV) e produção *in vitro* de embriões (PIV), a inexistência de

um meio de cultivo apropriado que permita que o oócito reinicie a meiose e atinja a M-II. Dessa maneira, torna-se primordial a realização de novos estudos que possam esclarecer as concentrações de gonadotrofinas e outros fatores ainda desconhecidos no folículo ovariano da cadela, que permitam a simulação *in vitro* do que realmente ocorre *in vivo* com o oócito. Oócitos obtidos de diferentes fases do ciclo estral estão expostos a diferentes concentrações de gonadotrofinas e outros fatores ainda desconhecidos. Desse modo, a suplementação diferencial dos meios de cultivo pode permitir que todos os oócitos, independentemente da fase reprodutiva de sua doadora, sejam capazes de atingir o estágio de M-II.

Rodrigues e Rodrigues (2003) destacaram que a maturação nuclear *in vitro* não é influenciada pelo estágio reprodutivo, sendo a qualidade do oócito o indicador mais confiável do potencial de competência meiótica. Apesar de não ter sido um parâmetro avaliado no presente trabalho, observou-se, durante o processo de seleção, nos oócitos obtidos da fase de diestro, maior número de camadas de células do *cumulus*, além da presença de citoplasma mais escuro e homogêneo (Figura 2B). Ovários obtidos da fase de anestro apresentaram população mais heterogênea de oócitos, com maior proporção de oócitos graus 2 e 3 (Figura 2A). A quantidade de camadas de células do *cumulus* assim como o aspecto do citoplasma são fatores indicativos da qualidade oocitária. Essa diferença na qualidade morfológica observada nos oócitos obtidos das diferentes fases reprodutivas pode ter sido um dos fatores que resultou nos melhores índices de M-II ($p < 0,05$) apresentados pelos oócitos advindos da fase de diestro.

Nickson et al. (1993) observaram que o período de diestro é prejudicial ao desenvolvimento oocitário. Os resultados do presente trabalho contrapõem os achados desses autores, já que as chances de ser encontrado um oócito no estágio de M-II foram 1,9 (1,04-3,46) vezes maiores em oócitos obtidos de ovários na fase de diestro do que no anestro.

Luvoni et al. (2001) destacaram a importância das comunicações das junções gap na competência meiótica e mostraram que, enquanto os COCs obtidos de cadelas em anestro apresentam as junções gap fechadas, os COCs obtidos de cadelas no final do proestro possuem 89% destas junções abertas, fato que poderia explicar as baixas taxas de maturação de oócitos obtidos de cadelas em anestro, mesmo após um período de 72 ou 96 horas de cultivo. Ressaltaram, ainda, que os oócitos obtidos da fase de anestro teriam baixo potencial para atingir a M-II devido à falta de comunicação entre as células somáticas e o oócito, impossibilitando, desse modo, o transporte de moléculas entre estes padrões celulares. A falta de comunicação existente nos COCs obtidos da fase de anestro poderia explicar os índices baixos encontrados nesta fase reprodutiva. Pereira, Bersano e Lopes (2014), utilizando a suplementação do fator de crescimento epidermal (EGF) observaram que os oócitos obtidos da fase de diestro foram mais capazes de atingir a M-II ($p < 0,05$). Os dados obtidos no presente trabalho comprovam esses achados, já que apenas os oócitos obtidos da fase de diestro adquiriram habilidade para desenvolver-se até os estágios finais da maturação nuclear ($p < 0,05$).

Chastant-Maillard et al. (2012) também demonstraram que oócitos obtidos da fase de anestro não foram competentes para retomada da meiose. De acordo com esses autores, essa baixa competência pode estar associada ao pequeno tamanho dos folículos dessa fase. Os dados do presente trabalho corroboram esses achados, já que os oócitos obtidos da fase de diestro se mostraram mais competentes em completar a maturação meiótica que os da fase de anestro ($p < 0,05$). Essa diferença pode ser devida a diversos fatores como: ao tamanho folicular, à exposição hormonal, ao estágio de configuração de cromatina no momento de obtenção dos oócitos, a abertura das junções gap, a falta de uma suplementação adequada do meio de cultivo, ou outros fatores ainda desconhecidos.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que a fase do ciclo estral influencia a maturação *in vitro* de oócitos caninos, sendo que os oócitos obtidos da fase de diestro apresentam maior capacidade de adquirir a competência meiótica. Novos estudos são necessários para que se obtenha a compreensão ade-

quada da fisiologia reprodutiva e dos eventos hormonais característicos de cada fase nessa espécie.

Agradecimentos

Agradecimento à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (FAPESP 2013/21667-3).

Referências

- BOLAMBA, D.; RUSS, K. D.; HARPER, S. A.; SANDLER, J. L.; DURRANT, B. S. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1037-1047, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05003183>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.06.017>.
- BUTTLER, E. A. P. **Efeito do estágio do ciclo estral e adição de hormônios ao meio de cultivo *in vitro* sobre a morfologia do complexo cumulus-oócito canino**. 2010. 201 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.
- CHASTANT-MAILLARD, S.; SAINT-DIZIER, M.; GRIMARD, B.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; REYNAUD, K. Are oocytes from the anestrus bitch competent for meiosis? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 74-79, 2012. Supplement 6. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12007/abstract;jsessionid=370A72275205F3763228E6DE F550D6C5.f03t04>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12007>.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 83-91, 1997. Supplement.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 957-966, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X98000442>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00044-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00044-2).
- LUVONI, G. C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 41-59, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04001049>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.004>.
- LUVONI, G. C.; LUCIANO, A. M.; MODINA, S.; GANDOLFI, F. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 141-146, 2001.
- MARTINS, L. R.; PONCHIROLI, C. B.; BEIER, S. L.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; LOPES, M. D. Analysis of nuclear maturation *in vitro* matured oocytes from estrous and anestrus bitches. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 49-54, 2006.
- NICKSON, D. A.; BOYD, J. S.; ECKERSALL, P. D.; FERGUSON, J. M.; HARVEY, M. J.; RENTON, J. P. Molecular biology methods of monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 231-240, 1993. Supplement.
- PEREIRA, L. M. C.; BERSANO, P. R. O.; LOPES, M. D. Efeito do fator de crescimento epidermal (EGF) na maturação *in vitro* de oócitos caninos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 2, p. 158-165, 2014. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/71349>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v51i2p158-165>.
- PEREIRA, L. M. C.; BERSANO, P. R. O.; LOPES, M. D. Influência das fases de anestro e diestro sobre a configuração da cromatina em vesícula germinativa de oócitos caninos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 6, p. 474-481, 2013. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/55590>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v50i6p474-481>.
- RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 59-66, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013018>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01301-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01301-8).
- STATISTIAL ANALISYS SYSTEM (SAS). **SAS/STAT user's guide**. Version 9.3. Cary: SAS Institute Inc., 2011.
- SONGSASEN, N.; WILDT, D. E. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 1-2, p. 2-22, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432006004751>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.004>.
- WILLINGHAM-ROCKY, L. A.; HINRICHS, K.; WESTHUSIN, M. E.; KRAEMER, D. C. Effects of stage of oestrus cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, v. 126, n. 4, p. 501-508, 2003. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/126/4/501>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1260501>.
- YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 46, n. 5, p. 853-858, 1992. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/46/5/853>>. Acesso em: 19 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod46.5.853>.