

ASPECTOS ATUAIS DAS BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO EM CARNÍVOROS

CURRENT ASPECTS OF BIOTECHNOLOGY OF REPRODUCTION IN CARNIVORES

D. J. CARDILLI^{1*}, E. A. PIRES-BUTTLER¹, C. F. JOÃO², F. A. VOORWALD¹,
K. S. OLIVEIRA¹, M. A. M. SILVA¹, J. F. PÉREZ-GUTIÉRREZ³,
G. H. TONIOLLO¹

RESUMO

O desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida no cão e no gato desperta grande interesse, pois poderiam ser utilizadas para a conservação de espécies de carnívoros selvagens ameaçadas de extinção. Nos últimos anos houve um grande avanço das biotecnologias da reprodução aplicáveis aos felinos domésticos. No entanto, o seu desenvolvimento nos caninos domésticos tem sido dificultado pela baixa eficiência. Um dos maiores problemas reside na fisiologia única dos gametas caninos, que exigem meios complexos para a maturação e desenvolvimento, o que dificulta a implementação de protocolos e técnicas que têm sido eficazes em outras espécies. O objetivo desta revisão é descrever os avanços nas biotecnologias da reprodução que se aplicam aos cães e gatos, com enfoque sobre os aspectos que podem ser importantes para o uso em espécies protegidas de carnívoros

PALAVRAS-CHAVE: Cadela. Gata. Produção *in vitro* de embriões.

SUMMARY

The development of assisted reproductive techniques (ART) in dogs and cats is an area of increasing interest because ART can be potentially applied to non-domestic carnivores threatened with extinction. Much progress has been achieved in ART of the feline species. However, advances on assisted reproduction in dogs are hampered by its low efficiency. A major obstacle lies on the particular characteristics of canine gamete physiology, for instance, the highly complex requirements for oocyte maturation and development, which makes difficult to apply protocols/techniques that have been successful in other species. This review aims to depict the advances made on assisted reproductive techniques in dogs and cats, focusing on those features that may be relevant for applying these techniques to wild endangered carnivores.

KEY-WORDS: Bitch. Cat. *In vitro* embryo production.

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP) CEP: 14884-900. Jaboticabal, SP, Brasil. *Autor para correspondência: djcardilli@yahoo.com.br.

² Universidade Federal do Pará (UFPA), Castanhal, PA, Brasil.

³ Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Espanha.

INTRODUÇÃO

A partir da década de 90, com o início do interesse da comunidade científica pela preservação de espécies ameaçadas de extinção, ocorreu um grande desenvolvimento das biotecnologias da reprodução em carnívoros (LUVONI, 2000). Desde então, canídeos e felídeos domésticos são utilizados como modelos experimentais (DURRANT et al., 1998).

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é composta das fases de maturação *in vitro* de oócitos (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), e cultivo *in vitro* de embriões (CIV).

Em canídeos, MIV apresenta índices limitados, com valores que variam de 0 a 58% (FARSTAD, 2000). Luvoni (2000) refere taxas ainda piores, que giram em torno de 20%, enquanto que, em felinos, cerca de 75% dos oócitos completam a maturação (NAGANO et al., 2008).

O objetivo deste trabalho é mostrar os avanços na PIV de cães e gatos domésticos, pois estes são importantes modelos experimentais de espécies silvestres ameaçadas de extinção.

PIV DE EMBRIÕES EM CÃES

Considerações sobre a fisiologia reprodutiva da cadela

Os canídeos são conhecidos por sua fisiologia reprodutiva peculiar. Estes animais são considerados monoestrícos, predominantemente não estacionais e a ovulação ocorre um ou dois dias após o pico de LH, no início do estro. Em cadelas e raposas ocorre luteinização pré-ovulatória dos folículos, e a concentração plasmática de progesterona aumenta durante o proestro (REYNAUD et. al., 2005), oposto ao que ocorre em outras espécies de mamíferos domésticos, onde o estrógeno domina o ambiente folicular pré-ovulatório (FARSTAD, 2000).

Além disso, enquanto na maioria dos mamíferos, o oócito em fase de vesícula germinativa (prófase) sofre meiose nas etapas finais da maturação folicular, sendo ovulado em metáfase II, já com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, nos canídeos, os oócitos são liberados ainda imaturos, na fase de vesícula germinativa. Assim, tanto a maturação completa quanto a fertilização ocorre dentro do oviduto e a aquisição de competência meiótica se dá em ambiente intra e extra-folicular (FARSTAD et. al., 1989). Esta peculiaridade justifica a importância do ambiente oviductal para a maturação oocitária canina, pois o oviduto é responsável por sustentar durante um extenso período, a sobrevivência dos oócitos liberados ainda imaturos até completarem o seu desenvolvimento, serem fecundados e atingirem o estágio de blastocisto (FARSTAD et. al., 1989; LUVONI et al., 2005).

MIV: Obtenção dos oócitos

Os oócitos são obtidos principalmente por “slicing” ou fatiamento do ovário (NICKSON, et al., 1993) e por digestão enzimática (BOLAMBA et. al.,

2002). Essas duas técnicas apresentam um maior número de oócitos recuperados quando comparadas à técnica de aspiração, a qual, devido ao pequeno tamanho do ovário e dos folículos de carnívoros domésticos e também porque os folículos apenas tornam-se visíveis poucos dias antes da ovulação é de difícil execução. A técnica de digestão enzimática, apesar de apresentar reduzido número de oócitos degenerados, causa muitos danos às células da granulosa (BOLAMBA et. al., 2002), o que faz do “slicing” a técnica de escolha no laboratório da FCAV – UNESP - Jaboticabal.

Strom Holst et al. (2001) e Rodrigues & Rodrigues (2003) relataram que não existe diferença significativa com relação ao número de oócitos obtidos entre animais de raça pura e sem raça definida e entre cadelas de diferentes pesos corporais. Rodrigues & Rodrigues, (2003) demonstraram ainda que quanto maior é a idade menor é a taxa de oócitos recuperados. Quanto à influência da fase do ciclo estral na recuperação de oócitos, os resultados são controversos. Alguns autores referem que há uma tendência para uma maior taxa de oócitos recuperados durante a fase folicular do ciclo estral (STROM HOLST et al., 2001), porém, Ribeiro (2007) demonstrou que não há diferença significativa. Em seu estudo apenas encontrou tal correlação nos animais em que o estro foi induzido hormonalmente.

Seleção dos oócitos

Os oócitos canídeos podem retomar espontaneamente a meiose *in vitro* quando submetidos a adaptações das técnicas de maturação utilizadas para bovinos e suínos, embora com índices bastante inferiores, tanto em relação às espécies supracitadas, quanto aos felinos domésticos (FARSTAD, 2000). Dessa forma, na tentativa de melhorar estes índices, a seleção de oócitos para a MIV de cães se atenta não somente a aspectos relacionados ao oócito canino como a fatores inerentes à fêmea doadora, como a idade e a fase do ciclo estral.

Segundo Ebner et al. (2006) a morfologia do oócito é vista como pré-requisito para o desenvolvimento de embriões. A integridade do fenótipo do complexo *cumulus*-oócito (COC) é considerada não apenas um indicador da sua viabilidade como também um potencial marcador da capacidade de transcrição de genes envolvidos na maturação e desenvolvimento embrionário inicial (RODRIGUES et al., 2009). Por esta razão, na espécie canina, a seleção de oócitos para o cultivo *in vitro* se apóia em critérios morfológicos selecionando para a MIV somente complexos *cumulus*-oócitos grau I (Figura 1), ou seja, oócitos com citoplasma uniformemente escuro, zona pelúcida intacta e circundados por duas ou mais camadas de células do *cumulus* (BOLAMBA et al., 1998).

Outro parâmetro avaliado é o diâmetro oocitário. Sobre este aspecto, durante alguns anos a competência meiótica do oócito canino foi relacionada ao grau de crescimento atingido pelo oócito antes de ser liberado do folículo. Dessa forma, quanto maior o

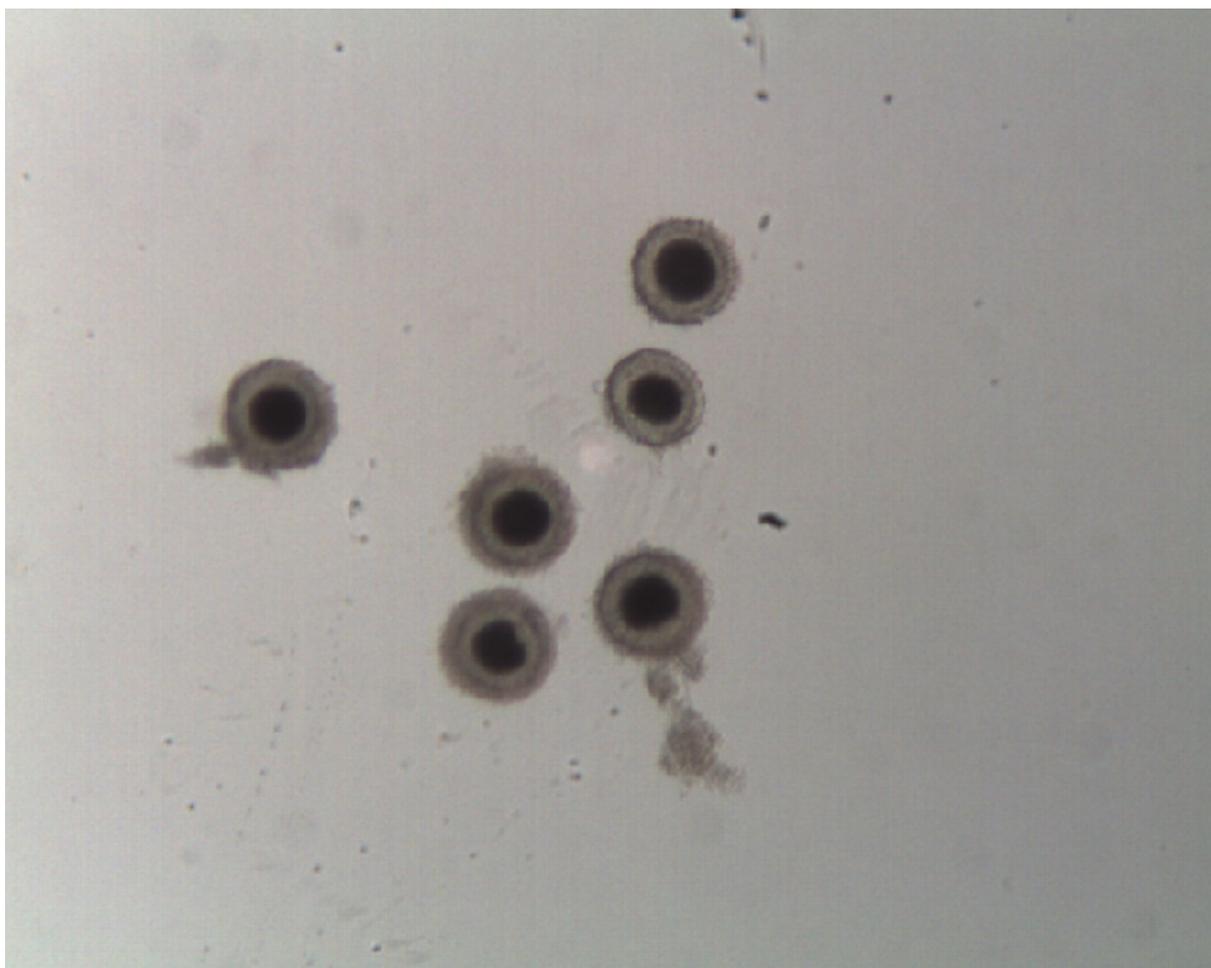


Figura 1 - Fotomicrografia de COCs de cadela Grau 1. Note ooplasma uniformemente escuro, com zona pelúcida intacta, circundado por uma ou mais camadas de células do *cumulus* e com diâmetro superior a 100 μm . Microscópio estereoscópio, aumento de 4x. Jaboticabal-SP, 2012.

oócito, maior é a habilidade de transpor à fase de quebra da vesícula germinativa e atingir a metáfase II (HEWITT & ENGLAND, 1998; OTOI et al., 2001). No entanto, recentes estudos demonstraram que o fator que influencia a aquisição de competência meiótica é o diâmetro folicular e não o diâmetro oocitário (SONGSASEN et al., 2009). Essa afirmação foi feita com base na observação de oócitos que, embora tivessem atingido o tamanho máximo ideal, não foram capazes de completar a maturação nuclear *in vitro*, por serem oriundos de folículos com diâmetro inferior a 2 mm (SONGSASEN et al., 2009). Segundo estes pesquisadores, para que o oócito canino se torne capaz de completar a maturação nuclear, ser fertilizado e tornar-se embrião é necessário que haja modificações intracelulares, as quais possivelmente ocorram nos estágios finais do desenvolvimento folicular.

Somado aos fatores morfológicos supracitados, outros fatores associados à fêmea doadora, como a idade e a fase do ciclo estral são importantes na seleção de oócitos com habilidade para reassumir a meiose *in vitro*. De acordo com Dolezel et. al. (2004), os ovários

de fêmeas caninas pré-púberes apresentam menor proporção de folículos em estágios avançados de desenvolvimento e maior taxa de folículos atresícos. Hewitt e England (1998) observaram que a habilidade de maturar *in vitro* fica comprometida em fêmeas com idade superior a sete anos, quando comparadas com animais mais jovens.

A influência da fase do ciclo estral sobre a taxa de recuperação e frequência de maturação nuclear de oócitos ainda é controversa. Enquanto alguns pesquisadores indicam que não há associação (RODRIGUES & RODRIGUES, 2003; APPARÍCIO et al., 2011), outros demonstram que o *status* reprodutivo da cadela influencia a capacidade de desenvolvimento oocitário (OTOI et al., 2001; KIM et al., 2004). De tal forma que, oócitos obtidos durante a fase folicular (proestro e estro) apresentam melhores índices de maturação do que oócitos recuperados de animais em outras fases reprodutivas (YAMADA et al., 1993; OTOI et al., 2001; KIM et al., 2004; SONGSASEN & WILDT, 2007).

As explicações para o efeito do estágio do ciclo estral sobre a competência meiótica são muitas. Segundo Luvoni et al. (2005), a influência do estágio do ciclo estral está relacionada com o *status* funcional das GAPjs entre o oócito e as células do *cumulus*. As baixas taxas de maturação durante o anestro seriam decorrentes da ausência de comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito. Já Pires-Buttler (2010), em um estudo das características morfológicas do complexo *cumulus*-oócito canino, afirma que embora oócitos provenientes de fêmeas em anestro e em fase folicular apresentem a mesma intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*, sugerindo que estes oócitos possuam a mesma capacidade de retomada de meiose, os melhores índices de maturação *in vitro* são alcançados em oócitos provenientes de animais em fase folicular. Provavelmente este fato decorra do maior grau de maturidade citoplasmática obtido pelos oócitos durante esta fase reprodutiva.

As controvérsias e as diferentes explicações sobre o efeito do estágio do ciclo estral sobre a competência meiótica reiteram a necessidade de mais estudos acerca deste assunto.

Meios de maturação

Os meios de maturação geralmente são adaptações daqueles utilizados em bovinos, sendo os mais comumente utilizados o SOF, *Synthetic Oviduct Fluid*, (BOLAMBA et al., 2002; MACHADO et al., 2007) e o TCM 199, *Tissue Culture Medium 199* (OTOI et al., 2001; SONGSASEN et al., 2001; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003; APPARICIO et al., 2011) acrescidos de diferentes substâncias, como hormônios, fatores de crescimento e antioxidantes, objetivando melhorar os índices de maturação e reduzir os processos de degeneração.

Com base na fisiologia reprodutiva peculiar da cadela, onde os oócitos são expostos a elevadas concentrações de progesterona no folículo pré-ovulatório, muitos estudos foram realizados com suplementação de hormônios esteróides (estrógeno e progesterona) aos meios de maturação. Vannucchi et al. (2009) verificaram que a adição de estrógeno e progesterona ao meio de maturação apresentou efeito benéfico sobre a MIV de cadelas, o mesmo foi encontrado por Apparício et al. (2011) ao adicionarem hCG, progesterona e estradiol. Em contrapartida, Ribeiro (2007) relatou que a adição de progesterona não apresentou efeito positivo.

A respeito dos fatores de crescimento, o IGF-I tem papel essencial sobre a foliculogênese. Este fator de crescimento, além de estimular a proliferação das células da granulosa, melhora o efeito biológico do FSH e LH sobre as células da teca e da granulosa, uma vez que é responsável por estimular a síntese de receptores, através dos quais estes hormônios atuam (CHASTANT-MAILLARD et al., 2011).

Alhaider & Watson (2009) estudaram a associação de diferentes fatores de crescimento sobre a maturação oocitária canina e observaram que a combinação de IGF-1, GH humano, TGF- α e FGF favoreceu a aquisição de competência meiótica. Da mesma forma, CUI et al. (2006) verificaram que a

suplementação de EGF ao meio de cultivo apresentou efeito benéfico sobre a MIV de cadelas. A partir destes dados, acredita-se que adição de fatores de crescimento ao meio de cultivo é um dos pré-requisitos para o oócito canino completar a maturação *in vitro*, embora uma pesquisa tenha demonstrado que a adição de IGF-1 ou EGF ao meio TCM 199 não foi benéfica para a MIV de oócitos caninos (CARDILLI et al., 2011).

Uma das principais preocupações durante o processo de maturação e fecundação *in vitro* são os danos causados pelos radicais livres (ROS) produzidos, normalmente, pelo metabolismo oxidativo (DEW, 2001). Embora a maioria das células apresente um eficiente sistema de defesa contra radicais livres, representado pela glutatona; a manipulação do oócito durante o processo de maturação *in vitro*, retirando-o do ambiente intra-folicular e o expondo inevitavelmente a altas tensões de oxigênio, promove um elevado estresse oxidativo, o qual provoca a mobilização de grande quantidade de glutatona e conseqüente declínio dos seus níveis (LUBERDA, 2005). Como conseqüência, há redução da competência meiótica, devido à elevação dos índices de degeneração e morte celular provocada pelos radicais livres presentes no meio de maturação (PIRES, 2006). Em virtude disto, tem sido proposta a suplementação de compostos que atuem como substrato ou precursor da glutatona, como a cisteína, cisteamina e β -mercaptoetanol, os quais têm sido utilizados com êxito em diferentes espécies (DE MATOS et al., 1996).

Kim et al. (2004) concluíram que a adição de β -mercaptoetanol ao meio de cultivo melhorou as taxas de MIV em cadelas, porém, Pires (2006) ao estudar os efeitos da cisteína e da cisteamina, verificou que não houve efeito positivo.

Com o objetivo de mimetizar o ambiente oviductal, alguns pesquisadores estudaram o co-cultivo de oócitos em células do oviduto de cadelas. Bogliolo et al. (2002) demonstraram que este procedimento apresentou efeito positivo sobre a MIV de cadelas.

Alguns pesquisadores acreditam que os espermatozoides apresentem papel importante na retomada da meiose de oócitos de cadelas durante o processo de MIV. Estudos com meios de cultivos acrescidos de espermatozoides foram desenvolvidos, porém, não foi verificado efeito positivo sobre a MIV (SAINT DIZIER et al., 2001).

Tempo de cultivo

O tempo de cultivo pode chegar até 120 horas. Quanto maior o tempo utilizado na MIV, menores serão os achados de vesícula germinativa intacta e maiores os de metáfase II, e também das porcentagens de oócitos degenerados. Algumas pesquisas relataram que o tempo de 72 horas seria o ideal para MIV de oócitos de cadelas (LUVONI et al., 2005).

Formas de avaliação

A eficiência da MIV deve ser avaliada baseada na maturação nuclear e citoplasmática do oócito. A avaliação da maturação nuclear deve ser feita utilizando-se a técnica de fluorescência, devido à grande quantidade de material lipídico presente em

oócitos de canídeos (BOLAMBA et al., 2002). Após o tempo de cultivo, as células do *cumulus* são retiradas, por meio de sucessivas passagens em hilonidase 0,2%, o oócito desnudo é então corado com bisbenzimidazolo (APPARÍCIO et al., 2011).

Para a classificação do grau de maturação, preconiza-se o seguinte padrão: vesícula germinativa (presença de núcleo vesicular com cromossomos pouco condensados), quebra da vesícula germinativa (cromossomos com algum grau de condensação e dispersa distribuição, porém ainda com núcleo de aspecto vesicular), metáfase I (cromossomos atingem grau mais avançado de condensação, não sendo possível a visualização individual dos cromossomos), metáfase II (grupo denso de cromossomos formando o primeiro corpúsculo polar e outro grupo mais afastado, caracterizado pela placa metafásica) e degenerados ou não passíveis de identificação (HEWITT & ENGLAND, 1998).

A avaliação da maturação citoplasmática se baseia em algumas características das organelas celulares, tais como: posição dos grânulos citoplasmáticos, que se localizam na periferia de oócitos maduros e na região central de imaturos (MACHADO et al., 2007; APPARÍCIO et al., 2011).

Fertilização *in vitro* (FIV)

Devido às dificuldades com a MIV, os índices de clivagem e blastocistos na FIV de canídeos ainda são muito baixos. Yamada et al. (1993) relataram que apenas 2% dos oócitos inseminados atingiram o estágio de oito células. Otoi et al. (2000) obtiveram um blastocisto em 217 oócitos inseminados e England et al. (2001) obtiveram a única prenhez por meio de FIV nesta espécie.

Clonagem

Apesar de todas as dificuldades mencionadas anteriormente na produção *in vitro* de embriões de canídeos, no ano de 2005 foi anunciado o primeiro clone nesta espécie (LEE et al., 2005), o qual foi obtido por meio de células da orelha de um Afghan Hound de três anos. O mesmo grupo de pesquisa obteve o primeiro clone comercial no ano de 2008.

Hong et al. (2008) obtiveram um clone por meio da técnica de transferência nuclear utilizando fibroblastos fetais, e concluíram ser este um modelo mais eficiente que o descrito anteriormente.

PIV DE EMBRIÕES EM GATOS

Considerações sobre a fisiologia reprodutiva da gata

As gatas são poliétricas estacionais e caracterizadas por apresentarem ovulação induzida pelo coito, embora alguns autores relatem que em animais que não têm acesso à rua, pode ocorrer a ovulação espontânea. Nesta espécie os oócitos são ovulados já no estágio de metáfase II, e são bastantes escuros (semelhantes aos de canídeos) devido à grande quantidade de material lipídico (LUVONI, 2000).

Pope et al. (2006) referem que a sazonalidade tem grande interferência sobre a PIV de embriões em

felinos. Oócitos obtidos de ovários funcionais, ou seja, na época do ano que os dias são mais longos, apresentam melhor qualidade e maiores taxas de clivagem e blastocisto quando comparados com oócitos obtidos de ovários quiescentes, ou seja, na época do ano em que os dias são mais curtos. Em países como o Brasil o efeito da sazonalidade não é tão marcante, principalmente nas regiões mais próximas a linha do Equador.

MIV de oócitos em felinos

A MIV nesta espécie apresenta melhores resultados que nos canídeos, sendo que os índices podem chegar a 75% de oócitos em metáfase II, porém tais resultados ainda são piores que os encontrados nos animais de produção (NAGANO et al., 2008).

A seleção dos oócitos segue os mesmos padrões utilizados nas cadelas e os meios de maturação também são adaptações de outras espécies. Luvoni et al. (2000) relataram que a adição de gonadotrofinas aos meios de maturação, assim como também de compostos antioxidantes apresentam efeito benéfico sobre a MIV. Quanto aos fatores de crescimento, Kitiyanant et al. (2003) concluíram que a adição de 100 ng/ml de IGF-1 ao meio apresenta efeito benéfico sobre a MIV, o mesmo foi observado por Merlo et al. (2005) ao adicionarem 25 ng/ml de EGF ao meio de cultivo.

Nagano et al. (2008) relataram que o tempo ideal de MIV para oócitos felinos em meio TCM 199 é de 30 horas.

Fertilização *in vitro*

Recentemente muitas pesquisas foram feitas com PIV de embriões felinos, e os resultados mostraram-se satisfatórios. Os índices de embriões produzidos *in vitro* que chegam até a fase de blastocisto variam de 40-60%. Alguns autores relatam que a taxa de embriões obtidos após FIV de oócitos maturados *in vivo*, que chegam até o estágio de blastocisto, é maior que aqueles obtidos de oócitos maturados *in vitro*. Uma explicação para isso seria a maior atividade dos fatores MPF e MAPK em oócitos maturados *in vivo* (POPE et al., 2006).

Armstrong et al. (2004), ao realizarem FIV em oócitos maturados *in vivo*, obtidos por laparoscopia em felinos selvagens (*Panthera Leo*), conseguiram um índice de 30% de blastocistos.

Criopreservação de oócitos e embriões felinos

Com o objetivo de estocar material genético de espécies ameaçadas de extinção, algumas pesquisas foram realizadas com criopreservação de oócitos e embriões felinos. Nascimentos de filhotes oriundos de embriões congelados produzidos *in vitro* foram relatados na literatura, tanto no gato doméstico quanto em algumas espécies selvagens (POPE et al., 2006).

A criopreservação de oócitos apresenta resultados menos satisfatórios. A FIV de oócitos maduros criopreservados apresenta índice de 38,7% de clivagem, utilizando-se o método lento e o etileno glicol como crioprotetor; enquanto que a FIV com oócitos imaturos criopreservados apresenta índice de clivagem de 6,8% (LUVONI et al., 2000).

Injeção intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Nascimentos de filhotes oriundos da técnica de ICSI em oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* já foram relatados no gato doméstico (POPE et al., 2006). Gómez et al. (2000) compararam os índices de clivagem e de blastocistos obtidos por meio das técnicas de ICSI e FIV em oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*. Os melhores índices foram encontrados utilizados oócitos maturados *in vivo*.

Em felinos selvagens, foram conseguidos apenas embriões com ICSI em oócitos maturados *in vivo* obtidos por laparoscopia, entretanto, nenhuma prenhez foi relatada na literatura (DAMIANI et al., 2004).

Clonagem

O primeiro clone felino foi obtido por Shin et al. (2002) por meio da técnica de transferência de núcleo, onde o material genético de células fibroblásticas da mucosa oral de um gato doméstico adulto foi transferido para um oócito de gata doméstica, o qual sofreu maturação *in vitro* e teve seu material genético retirado por micromanipulação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A MIV de oócitos de canídeos é um processo complexo e ainda pouco eficiente, o que limita a PIV de embriões. O mesmo não acontece com felinos e animais de produção, onde a PIV de embriões apresenta resultados satisfatórios.

REFERÊNCIAS

ALHAIDER, A. K.; WATSON, P. F. Effects of hCG and growth factors on *in vitro* nuclear maturation of dog oocytes obtained during anoestrous. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, n.4, p.538-548, 2009.

APPARÍCIO, M.; ALVES, A. E.; PIRES-BUTLER, E. A.; RIBEIRO, A. P.; COVIZZI, G. J.; VICENTE, W. R. Effects of hormonal supplementation on nuclear maturation and cortical granules distribution of canine oocytes during various reproductive stages. **Reproduction in Domestic Animal**. Article first published online: 24 feb 2011.

ARMSTRONG, D. L.; CRICHTON, E. G.; DANKOFF, S. M.; SCHWALBACH, L. M. J.; GARDNER, D. K.; LOSKUTOFF, N. M. Ovarian stimulation, laparoscopic retrieval, IVF and blastocyst production using sequential media in the African lion (*Panthera leo*). **Reproduction, Fertility and Development**. v.16, p.221, 2004.

BOGLIOLO, L.; ZEDDA, M. T.; LEDDA, S.; LEONI, G.; NAITANA, S.; PAU, S. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction, nutrition and development**, v.42, n.3, p.265-273, 2002.

BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K. D.; DURRANT, B. S. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**, v.581, p.1689-1703, 2002.

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

CARDILLI, D. J.; TONIOLLO, G. H.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J. F.; OLIVEIRA, K. S.; VOORWALD, F. A.; SILVA, M. A. M. The effect of the tissue culture medium (TCM) 199 supplemented with epidermal growth factor (EGF) or insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**. v.46, p.92 – 93, 2011.

CHASTANT-MAILLARD, S.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; MEYLHEUC, T.; FONTBONNE, A.; CHODKIEWICZ, M.; SAINT-DIZIER, M.; REYNAUD, K. The canine oocyte: uncommon features of *in vivo* and *in vitro* maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.391-402, 2011.

CUI, X. Y.; SHEN, X. H.; LEE, J. Y.; LEE, H. S.; YIN, X. J.; KONG, I. K.; KIM, N. H. Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. **Theriogenology**. v.66, p.267-274, 2006.

DAMIANI, P.; GOMEZ, M.; COLE, A.; POPE, E.; AGUILAR, R.; HAMMOND, B.; NET, L.; CORTEZ, C.; VACCARO, J.; SARRAT, E.; MARKEY, E.; DRESSER, B. The production of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) lion (*Panthera leo*) embryos using spermatozoa collected by percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) from vasectomised males. **Reproduction, Fertility and Development**. v.16, p.223, 2004.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F.; MARTINEZ, A. G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.451-457, 1996.

DEW, E. V. ***In vitro* maturation of the canine oocyte**. 2001. 56f. Thesis (Master of Sciences) – University of Georgia.

DOLEZEL, R.; KYLIANKOVA, R.; KUMMER, V.; MAKOVA, J.; STARA, P.; VITASEK, R. Follicular Population and Oestrogen Receptor Alpha in Ovary of the Bitch. **Acta Veterinaria BRNO**, n.73, p.37-43, 2004.

- DURRANT, B. S.; PRATT, N. C.; KUSS, K. D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.917-932, 1998.
- FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v.52, p.175-186, 2000.
- EBNER, T.; MOSER, M.; TEWS, G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? **Reproductive Biomedicine Online**, v.12, P.507-512, 2006.
- ENGLAND, G. C. W.; VERSTEGEN, J. P.; HEWITT, D. A. Pregnancy following *in vitro* fertilization of canine oocytes. **The Veterinary Record**, v.148, n.1, p.20-22, 2001.
- FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v.52, p.175-186, 2000.
- FARSTAD, W.; MONDAIN-MONVAL, M.; HYTTEL, P.; SMITH, A. J.; MARKENG, D. Periovarian endocrinology and oocyte maturation unmated, mature blue fox vixens (*Alopex lagopus*). **Acta veterinaria Scandinavica**, v.30, p.313-319, 1989.
- GOMEZ, M. C; POPE, C. E.; HARRIS, R.; DAVIS, A., MIKOTA, S., DRESSER, B. L. Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**. v.12, p.423-33, 2000.
- 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.
- HONG, S. G.; JANG, G.; KIM, M. K.; OH, H. J.; PARK, J. E.; KANG, J. T.; KOO, O. J.; KIM, D. Y.; LEE, B. C. Dogs cloned from fetal fibroblasts by nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, 2008.
- KIM, M. K.; FIBIRANTO, Y. H.; HYUN, J. O.; GOO JANG, H. J. O.; KIM, H. J.; LEE, K. S.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Effect of mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. **Journal Veterinary Science**, v.5, n.3, p.253-258, 2004.
- KITIYANANT, Y.; SAIKHUN, J.; PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for *in vitro* maturation. **Theriogenology**. v.59, p.1775-86, 2003.
- LEE, B. C.; KIM, M. K.; JANG, G.; OH, H. J.; YUDA, F.; KIM, H. J.; HOSSEIN, M. S.; KIM, J. J.; KANG, S. K.; SCHATTEEN, G.; HWANG, W. S. Dogs cloned fom adult somatic cells. **Nature**, v.436, p.641-642, 2005.
- LUBERDA, Z. The role glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v.5, n.1, p.5-17, 2005.
- LUVONI, C. G. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. **Reproduction Nutrition Development**, v.40, p.505-512, 2000.
- LUVONI, G. C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.41-59, 2005.
- MACHADO, M. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, K. S. Influência do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) adicionado ao meio fluido sintético da tuba uterina (SOF) sobre a maturação *in vitro* de oócitos caninos (*canis familiares*). **Semina**, v.28, n.3, p.455-464, 2007.
- MERLO, B.; IACONO, E.; ZAMBELLI, D.; PRATI, F.; BELLUZZI, S. Effect of EGF on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. **Theriogenology**. v.63, p.2032-9, 2005.
- NAGANO, M.; UCHIKURA, K.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M. Effect of duration of *in vitro* maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes. **Theriogenology**, v.69, p.231-236, 2008.
- 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**, supplement 47, p.231-240, 1993.
- OTOI, T.; OOKA, A.; MURAKAMI, M.; KARJA, N. W.; SUZUKI, T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrus cycle. **Reproduction and Fertility Development**, v.13, p.151-155, 2001.
- OTOI, T; MURAKAMI, M.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; UNE, S.; SUZUKI, T. Development of canine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **The Veterinary Record** v.146, p.52-53, 2000.
- PIRES, E. A. **Efeito da Suplementação de Cisteína e Cisteamina sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*Canis familiaris*) obtidos por ovariectomia durante a fase pré-ovulatória do estro**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006.
- PIRES-BUTTLER, E. A. **Efeito do estágio do ciclo estral e adição de hormônios ao meio de cultivo *in vitro* sobre a morfologia do complexo cumulus-oócito canino**. Jaboticabal: Universidade Estadual

- Paulista, 2010. 164f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.
- POPE, C. E.; GÓMEZ, M. C.; DRESSER, B. L. *In vitro* production and transfer of cat embryos in the 21st century. **Theriogenology**. v.66, p. 59–71, 2006.
- REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIS de LESEGNO, C.; CHASTANT MALLARD, S. *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, n.130, p.193-201, 2005.
- RIBEIRO, A. P. C. **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**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2007. 129f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.
- RODRIGUES, B. A.; SILVA, A. E.; RODRIGUEZ, P.; CAVALCANTE, L. F.; RODRIGUES, J. L. *Cumulus* cells features and nuclear chromatin configuration of *in vitro* matured canine COCs and the influence of the *in vitro* serum progesterone concentrations of ovary donors. **Zygote**, v.17, p.79-91, 2009.
- RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. **Theriogenology**, v.60, p.59-66, 2003.
- SAINT-DIZIER, M.; SALOMON, J. F.; PETIT, C.; RENARD, J. P.; CHASTANTMAILLARD, S. *In vitro* maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.147-150, suppl 57, 2001.
- SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J.; LIU, L.; RUGILA, J.; HOWE, L.; BUCK, S.; MURPHY, K.; LYONS, L.; WESTHUSIN, M. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**, v.415, p.819, 2002.
- SONGSASEN, N.; FICKES, A.; PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. Follicular morphology, oocyte diameter and localization of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, suppl.2, p.65-70, 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.
- SONGSASEN, N.; YU, I.; LEIBO, S. P. Effects of maturation media and oxygen concentration on nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.494, 2001.
- STROM HOLST, B. [LARSSON, B.](#); RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LAGERSTEDT, A. S.; LINDEFORSBERG, C. Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. **Journal of veterinary medicine. Series A** v.48, p.587–92, 2001.
- VANNUCCHI, C.; FAUSTINO, M.; MARQUES, M. G.; NICHI, M.; ASSUMPTÃO, M. E.; VISINTIN, J. A. Effects of gonadotropin-exposed medium with high concentrations of progesterone and estradiol-17 β on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v.45, p.328-333, 2009.
- 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, p.853-858, 1993.