



Adição da água de coco (*Cocus nuciferal*) ao meio de maturação de oócitos caninos⁽¹⁾

[Addition of coconut water (*Cocus nuciferal*) to maturation media of canine oocytes]

"Artigo Científico/Scientific Article"

VMR Pina^A, CC Cavalcanti Neto^B, GML Holanda^A, LM Freitas Neto^A,
ER Santos Junior^A, PP Machado^A, FF Paula-Lopes^C, PF Lima^A, MAL Oliveira^{A(*)}

^ALaboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife-PE/Brasil.

^BDepartamento de Zootecnia da Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL/Brasil.

^CBolsita (DCR) do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico, Brasília-DF/Brasil.

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da água de coco sobre a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos caninos. Um total de 595 oócitos foram submetidos a MIV em TCM/125mM HEPES (Grupo Controle – GI) suplementado com 25% (GII), 50% (GIII) e 75% (GIV) de uma solução à base de água de coco (SBAC) a 37°C por 48 horas em 5% de CO₂. Após este período, os oócitos foram avaliados citogeneticamente ou submetidos à fecundação *in vitro* (FIV). A proporção de oócitos nos estádios de vesícula germinativa (VG), Metáfase I/Anáfase I/Metáfase II e em degeneração foram, respectivamente, 31,3%, 11,3% e 57,4% (GI); 33,6%, 10,3% e 56,1% (GII); 32,7%, 13,3% e 54,0% (GIII) e 19,3%, 5,5% e 75,2% (GIV). A FIV, após pré-incubação dos espermatozoides por 4 horas em mDM, foi realizada a 37°C em 5% de CO₂ durante 20 horas. Os presumíveis zigotos foram cultivados em KSOM durante 7 dias a 37°C em 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. No Grupo I (n = 36), 4 (11%) clivaram, 3 (8,33%) alcançaram os estádios de 2 a 4 células e 1 (2,78%) o de 6 a 8 células. No Grupo II (n = 55), 5 (9,09%) clivaram e 5 (9,09%) alcançaram o estágio de 2 a 4 células. Não foi registrado clivagem nos Grupos III e IV. A análise estatística não revelou diferença entre os grupos, podendo-se concluir que a SBAC não exerce efeito sobre a competência de oócitos caninos.

Palavras-chave: cadela, oócito, maturação *in vitro*, água de coco.

Abstract

The objective was to evaluate the effect of the coconut water on *in vitro* maturation (MIV) of canine oocytes. A total of 595 oocytes were *in vitro* matured in TCM 199/25mM HEPES (Control Group- GI) supplemented with 25 (GII), 50 (GIII) and 75% (GIV) coconut water based solution (SBAC) at 37°C for 48 hours in 5% CO₂. Following IVM oocytes were evaluated for meiotic stage or *in vitro* fertilized (IVF). The proportion of oocytes at the germinal vesicle (GV), metaphase I/anaphase I/Metaphase II and degenerated was, respectively, 31.3%, 11.3% and 57.4% (GI); 33.6%, 10.3% and 56.1% (GII); 32.7%, 13.3% and 54.0% (GIII); 19.3%, 5.5% and 75.2% (GIV). IVF was performed following a 4 h spermatozoa preincubation in mDM for 20 hours at 37°C in 5% CO₂. Presumptive zygotes were culture in KSOM for 7 days at 37°C in 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. In Group I (n = 36), 4 (11%) cleaved, 3 (8.33%) reached the 2-4 cells and 1 (2.78%) 6-8 cells stages. In Group II (n = 55), 5 (9.09%) cleaved and 5 (9.09%) reached the 2-4 cell stage. Cleavage rate was not determined in Groups III and IV. Statistical analysis did not indicate difference between groups, being possible to conclude that the SBAC has not effect on competence of canine oocytes.

Key-words: bitch, oocytes, *in vitro* maturation, coconut water.

⁽¹⁾Trabalho extraído da Dissertação de Mestrado da primeira autora apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

^(*)Autor para correspondência/Corresponding author (maloufrpe@uol.com.br; malo@dmv.ufrpe.br).

Introdução

O primeiro estudo *in vitro* realizado com gametas da espécie canina foi descrito por Mahi e Yanagimachi (1976), contudo, só nos últimos dez anos é que biotécnicas aplicadas à reprodução de carnívoros foram conduzidas com maior êxito. Segundo Otoi et al. (2001), as técnicas de maturação *in vitro* (MIV) e de fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos caninos podem ser aplicadas na preservação de espécies em extinção, porém, a reduzida competência meiótica de oócitos maturados *in vitro* representa um obstáculo para a produção *in vitro* (PIV) de embriões desta espécie.

Em contraste com a maioria dos mamíferos, as fêmeas da espécie canina liberam oócitos imaturos que requerem ainda 2 a 5 dias, após a ovulação, para completarem o processo de maturação meiótica (HEWITT et al., 1998). Também de acordo com essa particularidade, Farstad (2000a) cita que cadelas e raposas liberam de seus folículos maduros, oócitos que se encontram no início da primeira divisão meiótica (MI) e somente na tuba uterina, 2 a 3 dias depois, é que os mesmos alcançam o estádios subseqüentes de desenvolvimento.

A MIV de oócitos canídeos apresenta resultados muito limitados, variando de 0 a 58%, seja decorrente da qualidade dos oócitos utilizados ou da inexistência de padrões para a suplementação dos meios de cultura com hormônios, proteínas ou vitaminas (FARSTAD, 2000b). Assim, a aquisição de conhecimentos sobre as técnicas de maturação e fecundação *in vitro* de gametas canídeos, poderá proporcionar parâmetros, nos quais, entre outros benefícios conduzirá a investigações sobre a função espermiática e criopreservação de oócitos e embriões, permitindo assim ganhos em programas tais como a preservação de espécies de canídeos selvagens ou em melhoramento genético dessa espécie entre outros.

Diante deste contexto, a suplementação dos diversos meios de cultura, visando incrementar os índices de maturação de oócitos, tem sido instrumento de estudo entre os diversos grupos de pesquisadores. Há

muito, já é bem conhecido que a água de coco contém substâncias que induzem a diferenciação das células vegetais (BLUME et al., 1997) e que favorecem o desenvolvimento de embriões das espécies bovina (BLUME et al., 1998) e murídea (BLUME e MARQUES JR., 1994), todavia, sua eficiência na MIV de oócitos caninos ainda não foi avaliada.

A água de coco, além de ser naturalmente estéril e desprovida de contaminantes de origem animal, contém sais, proteínas, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento e gorduras neutras. Por todas essas propriedades, além do baixo custo de obtenção, sua utilização tem sido investigada tanto como meio de cultivo quanto como promotor de crescimento de estruturas embrionárias em outras espécies (SILVA et al., 2003).

Diante do que foi abordado e considerando-se a escassez de pesquisas sobre a eficiência na FIV de caninos, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito da água de coco adicionada ao meio de MIV de oócitos da espécie canina.

Material e Métodos

Colheita dos ovários

Foram utilizadas 96 cadelas sem raça definida, sexualmente maduras e em diferentes fases do ciclo estral, provenientes do Centro de Vigilância Ambiental (CVA) da Cidade do Recife – PE e do Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

Para determinação da fase do ciclo estral foram realizados exames clínico-ginecológico e colpocitológico. O exame clínico-ginecológico constou da observação do escore corporal, hígidez geral e do trato genital externo e a colpocitologia foi procedida através do esfregaço vaginal com material colhido através de palenetes de algodão. Após rotacioná-lo sobre uma lâmina, o material foi fixado com álcool e corado com eosina/hematoxilina e sob microscópio óptico identificou-se o tipo celular predominante.

Os ovários, obtidos após ovariosalpingohisterectomia (OSH), foram transportados ao laboratório de Biotecnologia da Reprodução da UFRPE em recipiente térmico, contendo solução fisiológica acrescida de 30 µg/mL de sulfato de gentamicina a 35°C.

No laboratório, os ovários foram colocados em placas de petri contendo o meio de lavagem OWM constituído de 8,0 mg de bicarbonato de sódio, 45,0 mg de glucose, 5,6 mg de piruvato de sódio, 11,9 mg de HEPES, 2,5 mg de sulfato de gentamicina e 20,0 mg de álcool polivinílico em 50 mL de TALP. Para obtenção dos complexos cumulus-oócito (CCOs), os ovários receberam vários cortes longitudinais e o líquido folicular foi colocado em repouso, sendo posteriormente levado ao estereomicroscópio para seleção dos oócitos. Os CCOs foram obtidos num período máximo de duas horas após a colheita dos ovários.

Maturação *in vitro*

Os CCOs foram selecionados morfológicamente (ooplasma escuro e homogêneo, contendo uma ou mais camadas de células do *cumulus*) e lavados 3 vezes no meio OWM. Grupos de 15-20 CCOs foram maturados, sob óleo de parafina, em gotas de 150 µL de meio TCM 199/25 mM HEPES contendo diferentes concentrações de solução a base de água de coco (SBAC) constituída de 50% de água de coco, 25% de água destilada e 25% de citrato de sódio a 5%.

Foram utilizados 595 CCOs distribuídos aleatoriamente em meio de maturação [TCM 199/25 mM HEPES suplementado com 50 µg/mL de piruvato de sódio, 2,6 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 5,0 µg/mL de FSH e 10% de soro de cabra no estro (SCE)] contendo 0% (GI controle; n = 151), 25% (GII; n = 171), 50% (GIII; n = 164) ou 75% (GIV; n = 109) de SBAC a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 48 horas. Após a MIV, parte dos CCOs foram submetidos à avaliação citogenética pela determinação do estágio meiótico e parte submetidos a FIV.

Para análise citogenética, os CCOs

foram desnudos em solução de citrato de sódio a 10% por 10 minutos seguido do vórtex por 2,5 minutos. Em seguida, os oócitos foram fixados em ácido acético/metanol (1:2) e corados com aceto-orceína a 2%. Os oócitos desnudos foram avaliados sob microscópio óptico para observação das configurações cromossômicas. A maturação nuclear foi classificada em VG caracterizada pela presença do material nuclear intacto, nucléolo distinto e fino filamento da cromatina visível e em metáfase I (MI)/ anáfase I (AI)/ metáfase II (MII), quando foram observadas quebra da VG, extrusão do primeiro corpúsculo polar e grupos de cromossomos compactados, de acordo com (HEWITT e ENGLAND, 1997; HEWITT et al., 1998).

Preparação do sêmen e FIV

Quatro cães adultos, dois da raça Rottweiler, um Shitzu e um Dogue Alemão foram utilizados como doadores de sêmen. O sêmen, colhido através de manipulação peniana, foi transportado imediatamente ao laboratório de Biotécnicas Reprodutivas do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE numa temperatura de 30°C. No laboratório, a amostra foi avaliada quanto às características macroscópicas (volume, coloração, viscosidade) e microscópicas (motilidade, vigor, concentração). Somente foi liberado para utilização na FIV o sêmen que apresentasse coloração branco opalescente, motilidade mínima de 80%, vigor entre 3 e 5 e concentração acima de 150x10⁶ de espermatozoides/mL.

Em seguida, o sêmen foi centrifugado duas vezes a 500 G durante 5 minutos para remoção do plasma seminal, utilizando o Meio Definido Modificado (mDM) constituído de 0,125 g de glucose, 0,1552 g de bicarbonato de sódio, 0,0069 g de piruvato de sódio, 0,05 g de álcool polivinílico, 0,05 g de cafeína e 0,025 g de penicilamina em 50 mL de mDM, de acordo com Keskinetepe et al. (1995). O sêmen foi padronizado a uma concentração final de 0,6 a 4,0x10⁸ espermatozoides/mL e posteriormente incubado em gotas de 100µL de mDM sob óleo de

parafina durante 4 horas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Após o período de maturação, os CCOs foram lavados em mDM e expostos aos espermatozóides previamente capacitados *in vitro* durante 20 horas.

Desenvolvimento embrionário

Os presumíveis zigotos foram distribuídos em tubos contendo o meio de cultura KSOM [85,15 mM de cloreto de sódio, 8 mM de cloreto de potássio, 2 mM de cloreto de cálcio, 0,5 mM de cloreto de magnésio, 25 mM de bicarbonato de sódio, 5 mM de lactato de sódio, 0,5 mM de piruvato de magnésio, 2 mM de glucose, 4,9 mM de glicina, 0,1 mM de glutamina e 0,12 UI/mL de insulina, além de 10% de soro de vaca no estro (SVE)] e submetidos ao vórtex, durante dois minutos, para remoção das células do *cumulus*.

Em seguida, os presumíveis zigotos foram distribuídos em gotas de 100 µL de meio de cultivo KSOM sob óleo de parafina por 48 horas. Após a retirada das estruturas não clivadas, substituiu-se 25% do KSOM e os embriões foram novamente incubados a

37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ durante cinco dias adicionais.

Análise Estatística

Para análise estatística de proporções foi utilizado o teste do Qui-quadrado com nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

As cadelas utilizadas durante o experimento apresentaram-se em diferentes fases do ciclo estral (Tabela 1), corroborando os estudos de Cinone et al. (1992), ressaltando-se que a maioria encontrava-se na fase luteal (diestro: 30,22%; prenhez: 25,55%). Os mesmos autores demonstraram que os índices de MIV em caninos podem melhorar se os oócitos utilizados forem selecionados, respeitando-se as mudanças endócrinas das fêmeas doadoras, ou seja, a fase do ciclo estral em que as mesmas se encontram. Todavia, o experimento de Farstad (2000b), utilizando oócitos de cadelas no pró-estro e estro (fase folicular), não obteve maior sucesso na MIV quando comparou os resultados obtidos com oócitos de cadelas em anestros.

Tabela 1 - Número de cadelas em diferentes fases do ciclo estral e a quantidade respectiva de oócitos recuperados.

Cadelas/Oócitos	Status Reprodutivo das Cadelas				
	Fase folicular	Diestro	Anestro	Prenhez	Patologias
Cadelas (n)	23	39	13	12	9
Total de oócitos (%)	124 (20,88)	180 (30,22)	71 (11,93)	152 (25,55)	68 (11,41)

Os oócitos utilizados neste estudo foram oriundos de uma população heterogênea de cadelas, o que pode influenciar no padrão de maturação nuclear. Isto pode ser explicado pela extensa flutuação dos receptores do estrógeno e da progesterona durante as distintas fases do ciclo estral, de acordo com a presença do tecido folicular ou luteal (VERMEIRSCH et al., 1999). Deve ser considerado que folículos primários e secundários estão presentes em maior quantidade tanto na fase folicular quanto no anestros, nos quais se observa alto nível de

receptores estrogênicos. Todavia, Luvoni et al. (2001) concluiu que a permeabilidade das junções gap entre o *cumulus* e o oócito, encontrada na fase folicular (pró-estro) e não na de anestros, contribui para a retomada da meiose na espécie canina, sendo, portanto, a fase que apresenta melhores índices de maturação de oócitos.

Outro ponto a considerar é a variação na idade das doadoras utilizadas neste estudo (2 a 7 anos), uma vez que oócitos provenientes de cadelas jovens têm um maior potencial de maturação do que aqueles

colhidos de cadelas mais velhas. Este fato, segundo Hewitt e England (1998), é uma consequência do perfil fisiológico de uma cadela de 2 anos ser diferente do de outra de 7 anos. Desta forma, a variação encontrada nas idades das cadelas deste estudo tem que ser considerada diante dos resultados obtidos, contudo acredita-se que o efeito da idade da doadora sobre a MIV de oócitos caninos necessita de futuras investigações.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados da análise citogenética e através dela pode ser observado que o número de oócitos que alcançaram a MI/AI/MII foram baixos, achado que pode ser explicado pelo alto índice de oócitos degenerados nos três grupos. Mahi e Yanagamachi (1976) ao examinarem oócitos imediatamente após recuperação de ovários, observaram que cerca de 65% já se encontravam em estágio de degeneração. Embora que os oócitos deste experimento tenham sido previamente selecionados quanto aos aspectos morfológicos, essa classificação é subjetiva e concorda com a citação de Viana (2003) ao relatar que a avaliação morfológica, normalmente utilizada na classificação dos oócitos, é subjetiva e limitada à integridade das células do *cumulus* e ao aspecto do citoplasma. Portanto, é pouco precisa no estabelecimento do real potencial de desenvolvimento das estruturas recuperadas, ainda que seja importante como método de

triagem e seleção dos oócitos a serem enviados ao laboratório.

Os valores apresentados de MI/AI/MII no monitoramento da maturação neste experimento, condizem com os achados de Bolamba et al. (2002) utilizando o meio SOF na maturação de oócitos caninos oriundos de folículos pré-antrais. Sendo assim é importante ressaltar a capacidade de oócitos caninos responderem positivamente à maturação *in vitro*. Contudo, aqueles que alcançam o estágio de MII é pequena. Acredita-se que o aperfeiçoamento dos procedimentos de seleção dos gametas e condições de cultivo poderá resultar em melhoria dos resultados.

Houve diferença entre os grupos experimentais, sendo observado que a porcentagem de oócitos em estágio de VG no GIV foi inferior ($P < 0,05$) a dos demais grupos e com relação a porcentagem de oócitos degenerados, verificou-se que no GIV foi maior ($P < 0,05$) do que a dos GI, GII e GIII. Isto pode ser explicado pela instabilidade das características da água de coco nas condições de temperatura e umidade utilizadas, uma vez que quanto maior concentração adicionada ao meio, mais oócitos degenerados foram encontrados. Com oócitos bovinos, Blume et al. (1997) obtiveram taxa eficiente de maturação de oócitos com a utilização da água de coco *in natura*.

Tabela 2 - Resultados da análise citogenética após a MIV de oócitos nos quatro grupos estudados, de acordo com a concentração de SBAC no meio de MIV.

Grupos	Nº de oócitos	Estádios de MIV		
		Oócitos em VG n (%)	Oócitos em MI/AI/MII n (%)	Oócitos Degenerados n (%)
GI - Grupo Controle	115	36 (31,3) ^a	13 (11,3) ^a	66 (57,4) ^a
GII – 25% de SBAC	116	39 (33,6) ^a	12 (10,3) ^a	65 (56,1) ^a
GIII – 50% de SBAC	113	37 (32,7) ^a	15 (13,3) ^a	61 (54,0) ^a
GIV – 75% de SBAC	109	21 (19,3) ^b	6 (5,5) ^a	82 (75,2) ^b
TOTAL	453	133 (29,3)	46 (10,20)	274 (60,5)

Letras diferentes em mesma coluna representam diferença significativa para teste do X^2 ($P < 0,05$)

Quanto à abundância de material lipídico no ooplasma dos oócitos caninos, verificou-se que essa característica dificulta a visualização dos componentes nucleares durante a análise da citogenética. Entretanto, essa dificuldade foi contornada utilizando-se o ácido acético e o metanol, conforme proposto por Bolamba et al. (2002). Ainda com relação às preparações para a análise citogenética, Mahi e Yanagamachi (1976) citaram que a perda do corpúsculo polar, durante o procedimento de fixação, dificulta a distinção das fases entre MI e MII. Esta situação também foi comprovada neste experimento, uma vez que em várias lâminas não foi possível visualizar a presença lateral do fuso. Porém, Hewitt et al. (1998) mencionaram que a redução do número de cromossomos pode auxiliar no reconhecimento da MII, apesar de que, na prática, esse fator tornou-se pouco preciso.

É importante considerar que as condições de cultura empregadas na maturação dos oócitos podem exercer influência sobre as taxas de fecundação e posterior desenvolvimento embrionário *in*

vitro (BRACKETT et al., 1989; BAVISTER et al., 1992; RODRIGUES et al., 2004).

Na atualidade, Hori e Tsutsui (2003), bem como Rodrigues et al. (2004) verificaram o desenvolvimento de embriões caninos até o estágio de oito células com a utilização da solução de bicarbonato modificada de Krebs-Ringer (TYH) nos processos de capacitação e fecundação dos gametas. Neste trabalho foi utilizado o mDM e os resultados (Tabela 3) não diferiram daqueles obtidos com o meio TYH, por Hori e Tsutsui (2003) e Rodrigues et al. (2004), nos quais cerca de 10% das estruturas embrionárias superaram o bloqueio celular. Sendo assim, os dados aqui obtidos também mostram ser possível alcançar respostas semelhantes (9,09%) com o mDM. Nos caninos, segundo Hori e Tsutsui (2003), o bloqueio do desenvolvimento embrionário já pode ocorrer no estágio de quatro células, mesmo considerando o relato do estudo de Farstad (2000b), o qual afirma que a ativação do genoma na raposa ocorre no estágio de seis a oito células e nos caninos no estágio de oito células.

Tabela 3 - Resultados da clivagem e do desenvolvimento embrionário obtidos após a FIV.

Grupos	Nº de Oócitos	Estádios Embrionários		
		Clivagem n (%)	2-4 Células n (%)	6-8 Células n (%)
GI – Grupo Controle	36	4 (11,11)	3 (8,33)	1 (2,78)
GII – 25% de SBAC	55	5 (9,09)	5 (9,09)	-
GIII – 50% de SBAC	51	-	-	-
TOTAL	142	9	8	1

O período de quatro horas de pré-incubação dos espermatozóides foi considerado positivo, tendo em vista que a porcentagem de estruturas clivadas foi semelhante aos dados obtidos por Hori e Tsutsui (2003). Apesar destes achados, não se pode deixar de comentar que os espermatozóides da espécie canina, sob condições artificiais, podem permanecer até sete horas mantendo sua viabilidade até ocorrer à reação do acrossoma e a penetração através da zona pelúcida, conforme relatos de

Mahi e Yanagimachi (1976) e Shimazu et al. (1992).

Um outro achado importante para ser salientado foi que mesmo constatando-se alta viabilidade espermática, no período acima referido, foram observados vários pontos de aglutinação dos espermatozóides. Esta ocorrência também foi percebida por Shimazu et al. (1992) após seis horas de incubação com o meio TYH. Neste trabalho, assim como no desses autores, constatou-se ser necessário determinar os efeitos dessa aglutinação sobre

o processo de fecundação, haja visto que esse foi um achado constante nas condições experimentais deste estudo.

Como citado por Cordeiro et al. (2006), os dados deste experimento sugerem que a principal aplicação da água de coco ainda consiste numa alternativa para reduzir os custos da produção *in vitro* de embriões, diferente do averiguado por Blume et al. (1998) com embriões bovinos.

Considerando que os oócitos são os precursores dos embriões e que a maturação dessas estruturas ainda é o maior entrave da produção *in vitro* de embriões de espécies com um volume substancialmente maior de pesquisas do que da espécie canina, conclui-se que a SBAC não é recomendável para o cultivo *in vitro* de oócitos.

Referências

BAVISTER, B.D. et al. Development of *in vitro* matured/ *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v.37, p.127-143, 1992.

BLUME, H.; MARQUES JR, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murideos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.18, n.3, p.97-104, 1994.

BLUME, H. et al. Água de coco no cultivo de embriões bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.4, p.395-399, 1998.

BLUME, H. et al. Avaliação da água de coco na maturação de oócitos bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.2, p. 72-75, 1997.

BOLAMBA, D. et al. *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.

BRACKETT, B.G. et al. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. **Fertility and Sterility**, v.52, n.2, p.319-324, 1989.

CINONE, M. et al. Collection and maturation of oocytes in the bitch. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION,

12th. The Hague. **Proceedings...** The Hague, 1992. v.4, p.1767-1769.

CORDEIRO, M.S. et al. The use of coconut water solution (*Cocos nuciferal*) as a holding medium for immature bovine oocytes for *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v.3, n.3, p.376-379, 2006.

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. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.375-387, 2000b.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of the domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.51, p.83-91, 1997.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. **Theriogenology**, v.49: p. 957-966, 1998.

HEWITT, D.A. et al. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.1083-1101, 1998.

HORI, T.; TSUTSUI, T. *In vitro* fertilization of mature canine ova. **Veterinary Record**, v.31, p.688-690, 2003.

KESKINTEPE, L. et al. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. **Biology of Reproduction**, v.52, n. 6, p.1410-1417, 1995.

LUVONI, G.C. et al. Influence of different stages of the oestrus cycle of *cumulus-oocyte* communication in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.57, p.141-146, 2001.

MAHI, C.A.; YANAGAMACHI, R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. **Journal of Experimental Zoology**, v.196, p.189-196, 1976.

OTOI, T. et al. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. **Reproduction and Fertility**, v.13, p.151-153, 2001.

RODRIGUES, B.A. et al. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, n.2, p.215-23, 2004.

SHIMAZU, Y. et al. *In vitro* capacitation of canine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v.38, p.67-71, 1992.

SILVA, J.R.V. et al. Crescimento de folículos primordiais caprinos após cultivo *in vitro* de fragmentos de cortex ovariano em meios contendo

água de coco. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.578-579, 2003.

VERMEIRSCH, H. et al. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v.51, p.729-44, 1999.

VIANA, J.H.M. Expectativas e limitações da punção folicular na recuperação de oócitos para a produção *in vitro* de embriões. **O Embrião**, n.17, p.7-10, 2003.