

Influência das fases de anestro e diestro sobre a configuração da cromatina em vesícula germinativa de oócitos caninos

Influence of stages anestrus and diestrus in chromatin configuration in germinal vesicle of canine oocytes

Leda Maria Costa PEREIRA¹; Paulo Ricardo de Oliveira BERSANO^{2,3}; Maria Denise LOPES¹

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu – SP, Brasil

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

³ Centro de Estudos de Venenos de Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu – SP, Brasil

Resumo

Na espécie canina as taxas de maturação oocitária são baixas e a porcentagem de oócitos que permanecem em estágio de vesícula germinativa (VG), independente das condições de cultivo, é alta. Durante a maturação oocitária, a VG sofre modificação e remodelamento da cromatina, que se manifesta por alterações na sua configuração e posicionamento. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a configuração e o posicionamento da cromatina de oócitos em estágio de VG durante o anestro e diestro de cadelas. Os ovários de 33 fêmeas (20 cadelas em anestro e 13 em diestro) foram isolados, fatiados e os complexos *cumulus-oócitos* (COCs) foram submetidos à solução de hialuronidase 0,2% para a liberação das células do cumulus. Após esse processo, os oócitos selecionados foram corados, avaliados e apenas COCs grau 1 foram utilizados. De um total de 920 oócitos, 566 foram classificados como grau 1 e os estágios de configuração da cromatina identificados como VG-1, VG-2, VG-3 e VG-4. As alterações observadas na configuração da cromatina foram caracterizadas como transição de uma cromatina dispersa (VG-1, VG-2) para parcialmente condensada (VG-3) até atingir um estágio totalmente condensado (VG-4). Os dados analisados da configuração da cromatina mostraram uma diferença significativa entre as fases de anestro e diestro, com maior proporção de VG-1 e VG-2 durante o anestro e de VG-3 e VG-4 durante o diestro. Há necessidade de novos estudos para uma compreensão adequada da influência da configuração da cromatina de oócitos no estágio de VG na retomada da meiose e na competência meiótica do oócito.

Palavras-chave: Oócito. Cromatina. Vesícula germinativa. Cadelas.

Abstract

In canine specie, oocyte maturation rates are low and the percentage of oocytes that remain in the stage of germinal vesicle (GV) regardless of culture conditions is high. During maturation oocyte undergoes modification and the GV chromatin remodeling manifested by changes in the configuration and positioning. The objective of this work is to evaluate the configuration and positioning of chromatin of oocytes in GV stage during anestrus and diestrus bitches. The ovaries of 33 females (20 bitches in anestrus and 13 in diestrus) were isolated, sliced and only cumulus-oocyte complexes (COCs) grade 1 were subjected to solution of 0.2% hyaluronidase for release in cumulus cells. After this process, the selected oocytes were stained and evaluated. From a total of 920 oocytes, 566 were classified as grade 1 and the stages of chromatin configuration identified as GV-1, GV-2, GV-3 and GV-4. The observed changes in chromatin configuration been characterized as a transition dispersed chromatin (GV-1, GV-2) for partially condensed (GV-3) until it reaches a fully condensed stage (GV-4). The data analyzed from the chromatin configuration showed a significant difference between the stages with a higher proportion of GV-1 and GV-2 for the anoestrus and GV-3 and GV-4 during diestrus. There is need for further studies to be able to have a proper understanding of the influence of chromatin configuration of oocytes in GV stage in resumption of meiosis and consequently in oocyte meiotic competence.

Keywords: Oocyte. Chromatin. Germinal vesicle. Bitches.

Introdução

O desenvolvimento das biotécnicas reprodutivas nos canídeos é de fundamental importância para o avanço de programas de conservação genética para espécies ameaçadas de extinção. A fisiologia reprodutiva da cadela apresenta particularidades que a diferencia de outras espécies domésticas. Na cadela, a ovulação ocorre 1 a 2 dias após o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), ainda no início da fase de estro e os folículos ovarianos iniciam sua luteinização antes mesmo da ovulação. Os oócitos são ovulados imaturos, no início da primeira divisão meiótica. Assim, os oócitos requerem de 2 a 5 dias após a ovulação, para completar a maturação (TSUTSUI, 1989; NICKSON et al., 1993). O ambiente das tubas uterinas exerce uma importância fundamental para a maturação oocitária dos canídeos. Nessa espécie as tubas uterinas são responsáveis por sustentar a sobrevivência dos oócitos até completarem o seu desenvolvimento, serem fecundados e atingirem o estágio de blastocisto (LUVONI et al., 2005).

A maioria dos conhecimentos envolvendo a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos caninos é baseada em experimentos realizados em outros mamíferos. Entretanto, os índices e a eficiência da maturação oocitária não são promissores. Em cadelas, a taxa de MIV tem demonstrado sucesso limitado, variando de 0 a 58% para oócitos maturados até a anáfase I e metáfase II (NICKSON et al., 1993; HEWITT; ENGLAND, 1997; BOLAMBA; BORDEN-RUSS; DURRANT, 2002). A baixa competência meiótica desses oócitos, quando submetidos a condições artificiais de cultivo, é considerada como um grande obstáculo para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas nessa espécie, como a fecundação *in vitro* (FIV), produção de embriões *in vitro* (PIV) e a criopreservação.

Lodde et al. (2007) observaram que, o oócito de mamíferos adquire uma série de competências durante o desenvolvimento folicular, que desempenha papel fundamental na fertilização e nos estágios subsequentes de pré-implantação e desenvolvimento embrio-

Correspondência para:

Leda Maria Costa Pereira
Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP-Botucatu)
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
Área Reprodução Animal- Laboratório de Pequenos Animais e Silvestres
Distrito de Rubião Junior, s/n – Caixa Postal 560
CEP 18618-970, Botucatu – SP, Brasil
e-mail: ledamcp@hotmail.com

Recebido: 14/05/2013

Aprovado: 18/12/2013

nário. Durante a fase de crescimento, o genoma do oócito sofre influência de diversos níveis de regulação, no qual mudanças dinâmicas na função e arquitetura da cromatina possibilitam um importante mecanismo epigenético para o controle da expressão gênica global (DE LA FUENTE, 2006).

A configuração da cromatina vem sendo descrita em ratos (ZUCCOTTI et al., 1998), equinos (HINRICHS et al., 1993) e na espécie canina (DE LESEGNO et al., 2008; LEE et al., 2008). Entretanto, os estudos que avaliam a ultraestrutura dos oócitos, a remodelação da cromatina do oócito em estágio de vesícula germinativa (VG) e sua associação com a competência oocitária em cadelas são escassos e inconclusivos.

Nas cadelas, embora o oócito possa retomar espontaneamente a meiose *in vitro*, as taxas de maturação são baixas e a porcentagem de oócitos que permanecem em VG, independente das condições de cultivo, é alta, o que estimula a caracterização da configuração e do posicionamento da cromatina em VG. Em vista do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a configuração e posicionamento da cromatina de oócitos em estágio de VG durante as fases de anestro e diestro em cadelas.

Materiais e Método

Foram utilizadas 33 cadelas, sendo 20 fêmeas em anestro e 13 fêmeas em diestro, de diversas raças, com idade variável entre 6 meses e 7 anos, submetidas à ovariário-histerectomia (OHE) eletiva no Serviço de Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu. O estudo teve o aceite da Câmara de Ética da FMVZ – UNESP campus de Botucatu com protocolo número 176/2011.

Os ovários foram isolados asépticamente, 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 4 horas após o procedimento cirúrgico. A identificação da fase do ciclo estral foi baseada na classificação proposta por Otoi et al. (2002) 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 fatiados em solução aquecida a 37°C de *phosphate buffer solution* (PBS) adicionando-se 10% de soro fetal bovino (SFB). Após o processo de seleção, os complexos *cumulus-oócito* (COCs) foram lavados em meio *tissue culture medium* 199 (TCM-199) tamponado com 25 mM de HEPES, acrescido de solução de amicacina, 0,2 mM de piruvato e 5 mM de bicarbonato de sódio.

Os COCs selecionados foram submetidos, durante 5 minutos, à solução de hialuronidase 0,2% para a retirada das células do *cumulus*. Para o desnudamento completo, os oócitos foram transferidos para microtubos e colocados no agitador durante 3 minutos. Em seguida, foram submetidos a várias pipetagens para a retirada completa das células do *cumulus*.

Os oócitos foram então transferidos para uma solução de PBS suplementado com paraformaldeído a 3,7%, sendo lavados novamente no 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 a classificação da configuração da cromatina. A avaliação da configuração nuclear foi baseada na descrição de Lodde et al. (2007). O teste de Fisher (PROC FREQ, SAS Institute, 2009) foi usado para estimar a associação entre as fases do ciclo estral: anestro e diestro e a configuração da cromatina.

Resultados

Um total de 920 oócitos foi isolado, e destes, apenas 566 foram classificados como grau I e utilizados para avaliação da configuração nuclear. A configuração da cromatina dos oócitos em VG foi classificada em diferentes estágios denominados VG-1, VG-2, VG-3 e VG-4.

O estágio de VG-1 (Figura 1A) foi caracterizado como oócitos com filamentos difusos e poucos sinais de condensação da cromatina. Nesse estágio, os filamentos se apresentam organizados de forma circular e homogênea e evidenciou-se a presença do nucléolo. No estágio de VG-2 (Figura 1B), observou-se que os filamentos de cromatina mantiveram o contorno homogêneo e circular, localizando-se centralmente no nucleoplasma, semelhante ao estágio de VG-1. Entretanto, houve uma maior dispersão dos filamentos de cromatina que adquiriram um aspecto fibrino-granular e ausência de sinais de condensação da cromatina, observando-se também a presença do nucléolo.

O estágio de VG-3 (Figura 1C) foi representado por uma condensação parcial da cromatina, com filamentos organizados de forma homogênea, sem contorno e desfragmentados, visando uma maior compactação da cromatina. No estágio de VG-4 (Figura 1D), observou-se uma alta compactação da cromatina, representada por um pequeno círculo situado numa área específica do núcleo. No estágio de VG-3, assim como no VG-4, não foi observada a presença do nucléolo e nem do envelope nuclear.

Os resultados da distribuição dos estágios de oócitos em VG, durante as fases de anestro e diestro, estão expressos na Tabela 1. Comparando-se as fases reprodutivas, observou-se alta proporção de oócitos no estágio de VG-1 (29,3%) e VG-2 (22,5%) na fase de anestro. Uma maior frequência de oócitos no estágio de VG-3 (27,6%) e VG-4 (22,8%) foi observada na fase de diestro. As diferenças nos estágios de vesícula germinativa, entre as fases de diestro e anestro, foram significativas ($P < 0,05$).

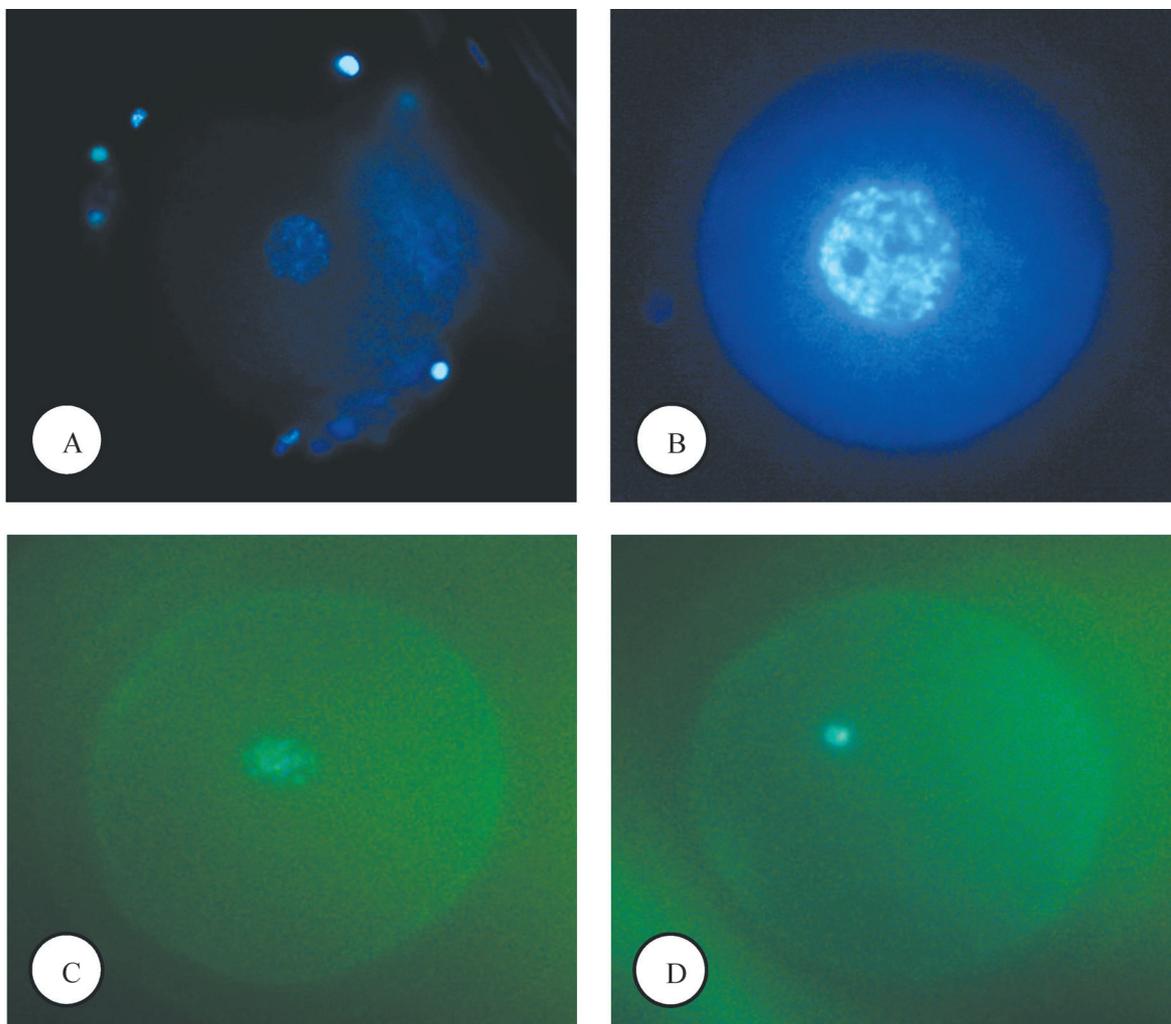


Figura 1 – Fotomicrografia de oócitos de cadelas antes da maturação *in vitro*, para avaliação e classificação da cromatina em vesícula germinativa (VG). (A): VG-1, filamentos difusos de cromatina com poucos sinais de condensação. (B): VG-2, maior dispersão dos filamentos de cromatina, observando-se a presença de nucléolos centralmente dispersos. (C): VG-3, condensação parcial da cromatina, ausência de nucléolos e do envelope nuclear. (D): VG-4, alta compactação da cromatina, localização periférica no nucleoplasma. Coloração Hoescht 33342. Aumento 200X

Tabela 1 - Configuração nuclear de oócitos caninos em estágio de VG (vesícula germinativa) na fase de anestro e diestro do ciclo estral – São Paulo – 2013

Fase Reprodutiva	Oócitos avaliados (n / %)				
	VG-1	VG-2	VG-3	VG-4	DEG
Anestro	86 (29,3) ^a	66 (22,5) ^a	46 (15,7) ^a	15 (5,1) ^a	81 (27,6) ^a
Diestro	7 (2,6) ^b	22 (8,1) ^b	75 (27,6) ^b	62 (22,8) ^b	106 (39,0) ^a

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas (a,b) na mesma coluna, diferem entre si

Discussão

Na espécie canina, os resultados de maturação oocitária *in vitro* (MIV) como na fertilização *in vitro* (FIV) são limitados. A morfologia e o diâmetro do oócito, apesar de serem apontados como possíveis indicadores de competência oocitária, não são suficientes para explicar a habilidade desta célula em atingir as etapas finais do processo de maturação. Lodde et al. (2007); De Lesegno et al. (2008) e Lee et al. (2008) sugeriram que a competência oocitária também estaria relacionada a modificações e remodelamentos da cromatina na VG (LODDE et al., 2007; DE LESEGNO et al., 2008; LEE et al., 2008).

Os estudos relatando as alterações da cromatina na VG na espécie canina são recentes. O presente trabalho, utilizando a microscopia de luz e fluorescência, pode ser considerado pioneiro no Brasil a utilizar a coloração Hoescht para a melhor visualização da cromatina e do nucléolo nessa espécie animal. Diversas técnicas podem ser usadas para descrever essa remodelação como a microscopia de luz, a microscopia eletrônica de transmissão e a microscopia confocal (DE LESEGNO et al., 2008; REYNAUD et al., 2009).

Chohan e Hunter (2003) descreveram cinco configurações de cromatina. A VG-1, caracterizada por filamentos de cromatina condensados ao redor do nucléolo e membrana nuclear. A VG-2, por filamentos de cromatina localizados ao redor do nucléolo. A VG-3, como filamentos de cromatina organizados em aglomerados distribuídos completamente no núcleo, com desaparecimento do nucléolo. A VG-4, como filamentos de cromatina organizados em aglomerados mais condensados distribuídos no núcleo. A VG-5, como filamentos de cromatina condensados em um único aglomerado isolado. A última classificação foi subdividida em VG-5 inicial e VG-5, sendo que na primeira a cromatina se encontra parcialmente condensada e na segunda totalmente condensada. Com base na classificação de Chohan e Hunter (2003), pode-se observar que a configuração de VG-1 e VG-2 são similares às encontradas no presente trabalho. Os estágios

de VG-5 no estágio inicial e de VG-5 observados por Chohan e Hunter (2003) são análogos, respectivamente, aos estágios de VG-3 e VG-4 aqui relatados. Chohan e Hunter (2003) admitem que a aquisição da competência meiótica é influenciada pelo estágio de desenvolvimento da VG no momento do isolamento do oócito. Dessa maneira, os oócitos que retomam a meiose *in vitro* são provavelmente aqueles em estágios de VG-4 ou VG-5 antes da maturação. No presente trabalho os oócitos obtidos das cadelas na fase de diestro apresentaram maior frequência de oócitos nos estágios de VG-3 e VG-4, correspondentes aos estágios de VG-5 inicial e VG-5 de Chohan e Hunter (2003), portanto, mais hábeis em se desenvolverem até os estágios finais da maturação nuclear.

As mudanças morfológicas no nucléolo ou a organização da cromatina refletem a síntese ativa de RNA que possibilita o acúmulo de transcriptos maternos necessários para a retomada da meiose e consequente desenvolvimento embrionário (FAIR et al., 1996). Gilchrist e Thompson (2007) afirmaram que o uso de oócitos transcricionalmente ativos na maturação *in vitro* pode fazer com que a retomada da meiose ocorra de forma precoce, antes que o estoque de RNAm seja suficiente para sustentar o desenvolvimento embrionário. Essa afirmação pode explicar as baixas taxas de maturação dos oócitos no estágio de alta atividade de transcrição. Os oócitos no estágio de alta compactação da cromatina (inativos transcricionalmente), representados pelos estágios de VG-3 e VG-4 encontrados, seriam os oócitos mais competentes em completar a maturação.

Lee et al. (2008) referiram que as alterações na configuração da cromatina, caracterizadas por transição de uma cromatina dispersa (VG-1, VG-2) para parcialmente agrupada (VG-4), progridem até ser atingindo um estágio totalmente agrupado (VG-5). Os estágios de VG-1 e VG-2 são semelhantes à descrição realizada neste trabalho e os estágios de VG-4 e VG-5 foram similares aos de VG-3 e VG-4. Da mesma maneira, que no experimento realizado por Lee et al.

(2008), verifica-se uma remodelação da cromatina, representada por filamentos dispersos, até ser atingido um estágio de compactação visualizado por alto grau de condensação da cromatina.

De Lesegno et al. (2008) descreveram cinco configurações de VG em cadelas, das quais duas identificadas em oócitos *in vivo* (VGc- vesícula germinativa central e VGp- vesícula germinativa periférica) e as outras três após o cultivo *in vitro* (VG-1, VG-2 e VG-3). Os oócitos que exibiram padrão VG-1 e VG-2 foram menos desenvolvidos em termos de maturação nuclear e citoplasmática quando comparados a VGp (antes do cultivo *in vitro*). Sugeriram que tanto VG-1 como VG-2 são provenientes de oócitos em VGc, enquanto os oócitos com padrão VG-3, metáfase I, metáfase II e degenerados se originam de oócitos em VGp. Os resultados do presente trabalho demonstram uma associação entre o estágio de VG no momento de isolamento do oócito e o potencial de progressão dessa célula em atingir a maturação nuclear. Assim, deve-se considerar a importância da seleção e avaliação de oócitos com características que demonstrem maior potencial de competência, já que a obtenção e seleção de oócitos ao acaso de uma população altamente heterogênea pode comprometer significativamente a taxa de maturação.

A influência da fase do ciclo estral sobre a competência oocitária, observando-se maior porcentagem na progressão da meiose em oócitos obtidos da fase de diestro ou folicular, quando comparados com oócitos obtidos da fase de anestro, tem sido destacada. Lopes, Rocha e Sousa (2010) relataram que 94% dos oócitos recuperados na fase de anestro e 63,2% resgatados na fase de diestro se apresentavam no estágio de VGc de acordo com a classificação de De Lesegno et al. (2008), enquanto 5,6% dos oócitos obtidos da fase de anestro e 36,8% dos oócitos provenientes da fase de diestro se encontravam no estágio de configuração VGp. Desse modo, os achados desses autores indicam a existência de associação entre as fases do ciclo estral e a configuração da cromatina em VG.

De modo similar, no presente trabalho, os resultados obtidos revelaram que as configurações da cromatina em VG foram distintas nas fases de anestro e diestro. No anestro, houve uma frequência maior de oócitos nos estágios mais iniciais de desenvolvimento, ou seja, VG-1 (29,3%) e VG-2 (22,5%) quando comparada ao diestro VG-1 (2,6%) e VG-2 (8,1%). No diestro, foi constatada uma proporção mais elevada de oócitos em estágios mais avançados de desenvolvimento, ou seja, VG-3 (27,6%) e VG-4 (22,8%) quando comparada aos oócitos em estágio de anestro VG-3 (15,7%) e VG-4 (5,1%). Assim, fica claro o envolvimento dos hormônios esteroides sobre os estágios da configuração da cromatina em VG conforme a progressão do ciclo estral, sendo os oócitos em VG-3 e o VG-4 mais capazes de atingir os estágios finais da maturação nuclear, possibilitando a obtenção de taxas de maturações mais elevadas, fertilização e consequente desenvolvimento embrionário.

Reynaud et al. (2009) descreveram três tipos de configurações de VG relacionadas com o pico de LH e a ovulação nas cadelas. A configuração difusa seria caracterizada por uma cromatina homogênea distribuída por todo o nucleoplasma, com aspecto difuso e presença de um ou ocasionalmente dois nucléolos. Na classificação parcialmente agrupada, a cromatina é reunida de forma parcial ao redor do nucléolo, enquanto na agrupada a cromatina é restrita a uma área específica do núcleo. Pode-se observar que o estágio de VG-1 e VG-2 classificadas no presente trabalho são semelhantes à configuração difusa, o estágio VG-3 é similar à configuração parcialmente agrupada e o estágio VG-4 à configuração agrupada.

Reynaud et al. (2009) utilizando folículos pré-ovulatórios observaram 69% e 21% de oócitos, respectivamente, com cromatina parcialmente agrupada e totalmente agrupada. Destacaram, ainda, que há um grande indicativo de que ambas as configurações de cromatina, parcial e totalmente agrupada, são competentes para a retomada da meiose e que esta transição está associada não apenas com maturação nuclear,

mas também com a maturação citoplasmática do oócito. Antes do pico de LH, a configuração de cromatina agrupada torna-se predominante (60% para 80%). O aparecimento do LH induz a mudanças na configuração da cromatina, com o aumento da proporção de configurações totalmente agrupadas. Durante dois dias após a ovulação, não há mudanças na configuração da cromatina e alguns oócitos ainda possuem cromatina parcialmente agrupada. Essa observação é consistente com o fato de que a cadela necessita de 56 a 72 horas após a ovulação para que os oócitos atinjam o estágio de M-II.

Esses dados sugerem uma influência hormonal na competência e desenvolvimento dos oócitos no ambiente intra-ovariano e/ou na tuba uterina, demonstrada pela associação existente entre a competência e a fase do ciclo estral. Além disso, apontam para a necessidade de uma seleção mais rigorosa de oócitos, levando-se em consideração as características de posicionamento e remodelação da cromatina. Essas características possibilitariam a seleção de uma amostra mais homogênea em termos de competência oocitária, já que os oócitos normalmente utilizados na maturação *in vitro* são aqueles obtidos de folículos em várias etapas do desenvolvimento e em fases distintas do ciclo estral, expostos, portanto, a diferentes concentrações de gonadotrofinas e hormônios esteroides.

De Lesegno et al. (2008) afirmaram que a ondulação do envelope nuclear é um evento que antecede a onda de LH, e que associado ao deslocamento do núcleo em direção à periferia representa o primeiro sinal que induz à maturação. Dessa maneira, para que a maturação oocitária final ocorra, são necessários dois sinais distintos: um antes do pico de LH para induzir à maturação, e outro, cerca de três dias após a ovulação, para induzir à retomada meiótica. Admitiram que a presença de oócitos com sinais de maturidade citoplasmática em ovários de fêmeas em anestro pode ser consequência da sua exposição à gonadotrofinas durante a segunda parte desta fase, o que pode ser um indicativo da presença de ondas foliculares durante o anestro. En-

tretanto, como a população de VGp é inferior a VGc durante esse período, levanta-se a hipótese que a provável evolução desses oócitos seja a atresia e que oócitos pré-ovulatórios seriam provenientes da população de VGc. Esses achados podem ser comparados com os dados do presente trabalho, no qual se observa na fase de diestro maior parcela de oócitos na configuração de VG-3 e VG-4, quando comparados com a fase de anestro. Os oócitos obtidos da fase de anestro apresentam uma parcela significativa de oócitos mantidos ainda em estágios imaturos, o que prejudica a sua habilidade em atingir a M-II, já que ainda não se encontram prontos morfológica e transcripcionalmente para se desenvolverem até os estágios finais da maturação.

A diferença entre as fases do ciclo estral, conforme discutido na literatura, pode ser consequência de mudanças hormonais e outros fatores desconhecidos, que possibilitariam melhor habilidade para o oócito se desenvolver e se tornar apto a completar sua maturação final. Esses dados demonstram a necessidade de uma suplementação diferencial, que possibilite que oócitos imaturos tenham as mesmas condições de se desenvolverem em um ambiente artificial, como ocorre aos oócitos mais competentes.

Conclusão

Os resultados obtidos revelaram que as configurações da cromatina em VG foram distintas nas fases de anestro e diestro. A configuração nuclear da vesícula germinativa, representada pela sua transição de dispersa no anestro para parcial ou totalmente agrupada no diestro, está intimamente associada à habilidade para a retomada da meiose e consequente competência oocitária, indicando que cadelas na fase de diestro representam uma melhor escolha para obtenção de oócitos mais competentes.

Agradecimentos

Agradecimento à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (FAPESP 2011/13197-1).

Referências

- BOLAMBA, D.; RUSS, K. D.; OLSON, M. A.; SANDLER, J. L.; DURRANT, B. S. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**, v. 58, n. 9, p. 1689-1703, 2002.
- CHOHAN, K. R.; HUNTER, A. G. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following in vitro maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 76, n. 1-2, p. 43-51, 2003.
- DE LA FUENTE, R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Development Biology*, v. 292, n. 1, p. 1-12, 2006.
- DELESEGNO, C. V.; REYNAUD, K.; PECHOUX, C.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 1, p. 115-125, 2008.
- FAIR, T.; HYTTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, n. 4, p. 503-512, 1996.
- GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 6-15, 2007.
- 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. Supplement.
- HINRICH, K.; SCHMIDT, A. L.; FRIEDMAN, P. P.; SELGRATH, J. P.; MARTIN, M. G. In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 2, p. 363-370, 1993.
- LEE, H. S.; YIN, X. J.; JIN, Y. X.; KIM, N. H.; CHO, S. G.; BAE, I. H.; KONG, I. K. Germinal vesicle chromatin configuration and meiotic competence is related to the oocyte source in canine. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3-4, p. 336-347, 2008.
- LODDE, V.; MODINA, S.; GALBUSERA, C.; FRANCIOSI, F.; LUCIANO, A. M. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 6, p. 740-749, 2007.
- LOPES, G.; ROCHA, A.; SOUSA, M. Comparative ultrastructural analysis of diestrous and anestrus canine grade 1 cumulus-oocyte complexes. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 244-252, 2010.
- 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.
- NICKSON, D. A.; BOYD, J. S.; ECKERSALL, P. D.; FERGUSON, J. M.; HARVEY, M. J.; RENTON, J. P. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 231-240, 1993. Supplement.
- OTOI, T.; WILLINGHAM, L.; SHIN, T.; KRAEMER, D. C.; WESTHUSIN, M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. **Reproduction**, v. 124, n. 6, p. 775-781, 2002.
- REYNAUD, K.; DE LESEGNO, C. V.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. **Theriogenology**, v. 72, n. 8, p. 1120-1131, 2009.
- TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, p. 269-275, 1989. Supplement.
- ZUCCOTTI, M.; GIORGI ROSSI, P.; MARTINEZ, A.; GARAGNA, S.; FORABOSCO, A.; REDI, C. A. Meiotic and development competence of mouse antral oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 700-704, 1998.