

Efeito do soro de cadela em estro na maturação *in vitro* de ovócitos caninos

[Effect of estrus bitch serum on *in vitro* maturation of canine oocyte]

C.A.N. Goretti¹, E.P. Costa^{2*}, T.A.R. Paula², G.G. Macedo³, G.M. Santos³,
J.R.M. Almeida Neto³, E.C.M. Pereira³

¹Aluna de graduação - DVT-UFV - Viçosa, MG

²DVT - Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG

³Aluno de pós-graduação - DVT - UFV - Viçosa, MG

RESUMO

Avaliou-se o efeito do soro de cadela em estro na maturação *in vitro* de ovócitos caninos, utilizando-se 92 ovócitos de cadelas, submetidas à cirurgia eletiva de ovariosterectomia. Os ovócitos foram selecionados e distribuídos em dois tratamentos: T1 (n = 48), ovócitos cultivados *in vitro* durante 96 horas utilizando meio base – TCM199 + 5µg/mL de LH + 20µg/mL de FSH – mais 10% de soro inativado de vaca em estro e T2 (n = 44), ovócitos cultivados em meio base mais 10% de soro inativado de cadela em estro. O percentual de ovócitos observados em metáfase I não indicou diferenças (P>0,05) entre T1 (2,1%) e T2 (0,0%), porém a taxa de ovócitos maduros (metáfase II) foi diferente (P<0,05), sendo 27,1% em T1 e 47,7% em T2. O mesmo fato ocorreu com a taxa de cromatina condensada (P<0,01), com 14,6 e 0,0%, respectivamente. Nos ovócitos sem configuração cromossômica, não foram observadas diferenças (P>0,05), sendo 56,3% em T1 e 52,3% em T2. Estes resultados indicam que a adição de soro de cadela em estro no meio de cultivo oferece melhores condições para o desenvolvimento *in vitro*, quando comparado à de soro de vaca em estro.

Palavras-chave: cadela, cultivo de ovócito, metáfase II

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of estrus on *in vitro* canine oocyte. A total of 92 oocyte from bitches under ovary-hysterectomy surgery was used. The oocytes were selected and randomly assigned to two different treatments, being T1 (n = 48) *in vitro* cultured for 96h using basic medium (TCM199 + 5µg/mL of LH + 20µg/mL of FSH), plus 10% of cow inactive serum in estrus and T2 (n = 44) basic medium plus 10% of bitch inactive serum in estrus. The percentage of oocyte observed on metaphase I do not indicate a difference (P>0.05) between T1 (2.1%) and T2 (0.0%). However, the rate of mature oocyte (metaphase II) was different (P<0.05), being 27.1% for T1 and 47.7% for T2. There was difference (P<0.05) in the condensed chromatin rate for T1 (14.6 %) and T2 (0.0 %), respectively. There was no difference (P>0.05) between T1 (56.3%) and T2 (52.3%) in oocyte with no chromosome configuration. These results indicate that supplementation with estrus bitch serum on culture media offer better conditions to *in vitro* development, when compared to estrus cow serum.

Keywords: canine, oocyte culture, metaphase II

INTRODUÇÃO

A maturação (MIV) e a fecundação *in vitro* (FIV) têm como objetivo aproveitar melhor a aptidão genética da fêmea, permitindo à doadora

produzir mais descendentes em menor intervalo de tempo, quando associada à técnica de transferência de embriões. Na espécie canina, essas técnicas não visam, em primeiro momento, a ganho econômico, sendo principalmente utilizadas como modelo experimental para outras

Recebido em 25 de fevereiro de 2010

Aceito em 5 de abril de 2011

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: epcosta@ufv.br

espécies carnívoras ameaçadas de extinção. Ainda assim, estes estudos podem ser direcionados à exploração comercial de doadoras de elevado valor genotípico.

Os estudos na área de reprodução de carnívoros ainda apresentam resultados muito aquém do desejado e bastante discretos em relação aos observados em outras espécies. Os índices de maturação *in vitro* observados na cadela estão entre 0 e 58%, com média de 20% (Farstad, 2000). Esses baixos índices podem ser resultados de condições inadequadas de cultivo *in vitro* ou de reduzida competência meiótica dos ovócitos, que pode estar relacionada à ineficiência das células do *cumulus* em estimular o reinício da meiose. Sabe-se que as taxas de degeneração desses ovócitos *in vitro* são elevadas, já que o processo de MIV é bastante delicado e somente os ovócitos pré-ovulatórios são mais facilmente maturados (Farstad, 2000).

Os estudos para a otimização da taxa de maturação *in vitro* atualmente estão direcionados à investigação de meios de cultura que mimetizem as condições fisiológicas na maturação, como o uso de um ambiente endócrino semelhante ao de maturação *in vivo* do ovócito (Hewitt *et al.*, 1998; Hewitt e England, 1999; Bolamba *et al.*, 2002). O uso de soro de cadela no estro como componente do meio de cultivo, quando comparado com o soro de cadela em anestro e diestro, mostrou ser mais eficiente em proporcionar maturação *in vitro* até o estágio de metáfase II (Otoi *et al.*, 1999).

O soro sanguíneo contém componentes proteicos e diversos hormônios, tais como gonadotrofinas, esteroides e fatores de crescimento, tornando difícil atribuir o sucesso da maturação a um destes componentes (Luvoni *et al.*, 2005). Mesmo assim, estes resultados indicam que a adição de substâncias que fazem parte do processo *in vivo*, como os contidos no soro de cadela em estro, pode criar um ambiente mais fidedigno aos eventos pré-ovulatórios *in vivo* e, portanto, mais adequado para a maturação *in vitro*.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um período maior de cultivo e da adição de soro de cadela em estro ao meio, obtido no dia subsequente ao grau máximo de ceratinização das células epiteliais da vagina, na

maturação nuclear ovocitária *in vitro* provindos de cadelas em anestro fisiológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 92 ovócitos de 12 cadelas (24 ovários) de raças diversas ou sem raça definida, com idades entre seis meses e cinco anos, submetidas à cirurgia eletiva de ovarioisterectomia. Os ovários foram mantidos em solução salina fisiológica a 38°C (solução de transporte) e levados ao laboratório em, no máximo, 30 minutos. No laboratório, as bursas ovarianas foram lavadas três vezes em solução fisiológica a 38°C e, posteriormente, procedeu-se à retirada do tecido adjacente ao ovário. Estes foram acondicionados em placa de Petri previamente aquecida em placa aquecedora a 38°C e contendo solução de manipulação Talp-Hepes (Bavister *et al.*, 1983).

Os ovários foram seccionados com lâmina de bisturi em fatias finas para liberação dos complexos *cumulus*-oócitos (COC). Posteriormente, os fragmentos ovarianos foram observados em microscópio estereoscópio, em aumento de 20 a 40x, para rastrear os ovócitos. Os COCs encontrados foram transferidos, com auxílio de uma micropipeta, para uma nova placa de Petri aquecida, contendo meio Talp-Hepes. Assim, os COCs classificados como grau I, segundo Hewitt e England (1997a), foram lavados três vezes em solução de manipulação Talp-Hepes e transferidos para placas de Petri de 35mm de diâmetro para cultivo *in vitro*.

Foram usados dois tratamentos, utilizando-se o meio base de cultura de tecido – TCM 199 –, segundo Costa *et al.* (1997c), acrescido de 5µg/mL de LH + 20µg/mL de FSH, sendo T1 meio base + 10% de soro inativado de vaca em estro (48 ovócitos) e T2 meio base + 10% de soro inativado de cadela em estro (44 ovócitos).

O soro de animais em estro utilizado foi coletado de cadelas híidas, as quais foram acompanhadas desde o momento que apresentaram secreção vaginal serossanguinolenta indicativa de proestro. Foi coletado suabe para citologia vaginal, diariamente, até que se observasse o grau máximo de queratinização das células da mucosa vaginal, conforme método de Shiller e Stabenfeldt (1980). No dia subsequente, foi coletado sangue dos animais em tubos vacutainer

e, posteriormente, realizada a centrifugação das amostras a 800G durante 15 minutos. O soro foi transferido para um *becker* e inativado em banho-maria a 56°C por 30 minutos. As amostras foram distribuídas em alíquotas em frascos de 0,5mL e congeladas para posterior uso. De modo semelhante, foi coletado sangue de vaca com comportamento e sinais externos indicativos de estro, que foi igualmente centrifugado e inativado, para ser armazenado congelado até o momento de uso.

Os ovócitos foram incubados em placas de Petri contendo 4mL de meio de cultivo previamente equilibrado por, no mínimo, uma hora a 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade. Os ovócitos foram, então, cultivados nestas mesmas condições de temperatura e atmosfera durante 96 horas. Posteriormente, foram desnudados, hipotonizados, fixados e corados em lâmina de microscopia (Costa *et al.*, 1997a,b). A avaliação do estágio de maturação nuclear foi realizada em microscopia óptica comum, em aumento de 1000 vezes, classificando os ovócitos de acordo com a configuração dos cromossomos em: metáfase I (MI), metáfase II (MII), cromatina condensada (CC, degenerados) ou sem configuração cromossômica (SCC, degenerados). Somente foi considerado maduro, em nível nuclear, o ovócito que apresentou configuração cromossômica em

metáfase II e também o grupo cromossômico pertencente ao primeiro corpúsculo polar, quando este estava presente.

Para a análise das taxas de maturação nuclear e de degenerados, os dados foram comparados em tabelas de contingências e analisados pelo teste de qui-quadrado (SAEG, 1999), antes submetido à correção de Yates devido à dispersão com um grau de liberdade (Sampaio, 2002). O nível de significância foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS

A Tab. 1 reúne os resultados das configurações cromossômicas observadas nos diferentes tratamentos. O acréscimo de soro de cadela em estro no meio de cultura (T2) proporcionou melhor ambiente para os ovócitos atingirem estágio de metáfase II, em comparação com o soro de vaca em estro (T1, P<0,05). O cultivo com soro de cadela em estro também possibilitou menor quantidade de ovócitos com cromatina condensada em grumos – 14,6 e 0,0%, para T1 e T2, respectivamente. Neste sentido, o soro de cadela em estro apresentou melhores resultados quanto à quantidade de ovócitos degenerados – 70,8 e 52,3 %, para T1 e T2, respectivamente. Os resultados de metáfase I observados nos dois tratamentos não diferiram entre si (P>0,05).

Tabela 1. Configurações cromossômicas observadas após 96 horas de cultivo *in vitro* de ovócitos caninos

| Tratamento | Ovócito | MI (%) | MII (%) | CC (%) | SCC (%) | Degenerados |
|------------|---------|--------|---------|--------|---------|-------------|
| T1 | 48 | 2,1 | 27,1 | 14,6** | 56,3 | 70,8* |
| T2 | 44 | 0,0 | 47,7* | 0,0 | 53,2 | 52,3 |

T1: meio base acrescido de 10% de soro inativado de vaca em estro; T2: meio base acrescido de 10% de soro inativado de cadela em estro.

MI: metáfase I; MII: metáfase II; CC: cromatina condensada em grumos; SCC: sem configuração cromossômica.

** P<0,01; * P<0,05; teste do qui-quadrado.

DISCUSSÃO

Soro inativado de vaca e cadela em estro, associado ao meio de cultivo TCM 199, permitiu que os ovócitos de cadelas atingissem o estágio de metáfase II. Entretanto, o soro de cadela possibilitou melhor taxa de maturação. Os resultados de metáfase I observados nos dois tratamentos não diferiram entre si (P>0,05) e foram mais baixos que os encontrados por Rodrigues e Rodrigues (2003a), que observaram 10,4% para soro de cadela em estro e 4,2% para soro de vaca em estro, em cultivo por 72 horas.

Isto pode ter ocorrido em virtude do maior tempo de cultivo, em que 72 horas podem permitir somente desenvolvimento até metáfase I ou desenvolvimento reduzido até metáfase II, enquanto 96 horas permitiriam que maior número de ovócitos completasse a maturação.

Esta hipótese é reforçada quando se comparam estes resultados com os de Nickson *et al.* (1993), Otoi *et al.* (1999), Otoi *et al.* (2002) e Otoi *et al.* (2004), os quais, mesmo tendo encontrado resultados positivos de metáfase II, ao utilizarem soro de cadela em estro sob cultivo de 72 horas,

Efeito do soro de cadela...

verificaram taxas mais baixas – 39,0; 16,3; 16,2 e 41,0%, respectivamente – em relação às observadas no presente experimento – 47,7%. Em condições fisiológicas, ovócitos de cadela necessitam de dois a cinco dias após a ovulação para completarem a meiose (Yamada *et al.*, 1993; Hewitt *et al.*, 1998; Rodrigues e Rodrigues, 2003b). Assim, o tempo de cultivo de 96 horas utilizado neste estudo parece ser mais adequado à maturação completa de ovócitos caninos de doadoras em anestro.

Ao comparar as taxas de ovócitos que atingiram o estágio de metáfase II nos dois tratamentos, foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre eles, sendo que o soro de cadela em estro apresentou resultado mais alto – 47,7% – que o soro de vaca em estro – 27,1%. Estes resultados foram mais elevados que a média de 20% citada na literatura, considerando-se a taxa de metáfase II, independentemente do meio de cultivo utilizado.

Mesmo apresentando influência positiva do soro de cadela em estro na maturação *in vitro*, segundo Hewitt e England (1997b) e Rodrigues e Rodrigues (2003b), a fase do ciclo estral da doadora de ovócitos não constitui um fator primordial na competência meiótica, não existindo diferenças nas taxas de maturação de ovócitos oriundos de doadoras em anestro fisiológico ou diestro. Isto se confirma com os resultados aqui apresentados e difere dos resultados de Luvoni *et al.* (2005), que afirmaram que ovócitos oriundos de cadelas em anestro são incapazes de atingir a metáfase II. O presente experimento obteve elevadas taxas de metáfase II, quando comparadas às obtidas da literatura, mesmo utilizando-se ovários de cadelas nas fases de anestro.

Segundo Johnston *et al.* (2001) e Feldman e Nelson (2004), o anestro fisiológico não constitui uma fase quiescente do ciclo estral no que diz respeito aos parâmetros endócrinos, pois são observados picos esporádicos de secreção de LH, elevações da concentração de FSH, além de flutuações nos níveis de estrógeno causadas pelas ondas de desenvolvimento folicular subclínicas que ocorrem nesta fase. Já a concentração de progesterona sérica permanece baixa. Isto pode sugerir que os ovócitos oriundos de cadelas em anestro também sofrem influência de substâncias importantes para seu desenvolvimento, sendo,

portanto, viáveis para serem submetidos ao processo de maturação *in vitro*.

O presente experimento obteve taxas de metáfase II no T2 mais altas que as observadas por Rodrigues e Rodrigues (2003a), De los Reyes *et al.* (2005) e Vannucchi (2003) – 0; 6,45 e 33,1%, respectivamente. De los Reyes *et al.* (2005) utilizaram meio TCM 199 acrescido de 10UI/mL de hCG, enquanto Rodrigues e Rodrigues (2003a) e Vannucchi (2003) utilizaram 0,5µg/mL de FSH + 0,03UI/mL de hCG; 2,5µg/mL de FSH + 5µg/mL de LH, respectivamente.

Segundo Luvoni *et al.* (2005), o desenvolvimento do ovócito é dependente de estímulo hormonal. No entanto, os ovócitos utilizados na MIV geralmente são oriundos de folículos imaturos, os quais não foram expostos aos efeitos dos hormônios. Dessa forma, a presença de gonadotrofinas nos meios de cultivo seria necessária.

A influência do LH e FSH não foi avaliada neste trabalho, pois ambos os tratamentos receberam concentrações idênticas dessas substâncias; mesmo assim, é possível afirmar que a presença de LH e FSH, quando associada ao soro de cadela em estro, atuou positivamente na maturação, o que poderia justificar os bons resultados aqui observados, se comparados aos de Otoi *et al.* (2002).

Segundo Luvoni *et al.* (2005), o soro sanguíneo contém componentes importantes, como gonadotrofinas, esteroides e fatores de crescimento que podem contribuir para a maturação dos ovócitos. No estro, o soro de cadela possui maior concentração de estrógeno e progesterona, visto que na cadela a síntese da progesterona já ocorre antes mesmo da ovulação (Otoi *et al.*, 1999). Dessa forma, pode-se inferir que o soro de cadela em estro forneceu ao ovócito condições mais propícias de desenvolvimento do que o soro da vaca em estro, constituindo um ambiente mais próximo do que o que ocorre *in vivo* e, assim, permitindo ao ovócito atingir completa maturação *in vitro*.

Os níveis de estrógeno no final do proestro e início do estro na cadela são vaviáveis. No estro, diminuem enquanto ocorre aumento pré-ovulatório da progesterona (Concannon *et al.*, 1989). Otoi *et al.* (2002) observaram

concentrações de 1,6ng/mL de progesterona e 31,5pg/mL de estrógeno no soro de cadela em estro, e Kim *et al.* (2005) concluíram a suplementação do meio de cultivo com estrógeno e progesterona, em concentrações de 2,0µg/mL de estrógeno e progesterona após 72 horas de cultivo. Porém, não observaram metáfase II neste tratamento, após 96 horas de cultivo. Considerando-se que o soro de cadela utilizado no presente estudo foi coletado no dia subsequente ao dia em que se observou o grau máximo de queratinização das células da mucosa vaginal, pode-se inferir que este soro continha elevada concentração de progesterona, segundo as considerações de Concannon *et al.* (1989), como também elevada concentração de estrógeno (Otoi *et al.*, 1999).

Analisando-se as taxas de metáfase II observadas no presente experimento, é provável inferir que a suplementação do meio de cultivo com soro de cadela em estro tenha fornecido concentrações suficientes de estrógeno e progesterona para completar a maturação *in vitro*, mesmo que essas concentrações não tenham sido quantificadas. Dessa forma, não seria necessária a suplementação do meio com fontes sintéticas desses hormônios. Além disso, os níveis desses hormônios no soro podem ter influência positiva na maturação quando associados às concentrações utilizadas de FSH e LH. Segundo Vannucchi (2003), o sinergismo existente entre estes dois esteroides no meio de cultivo pode criar condições propícias para a atuação do LH nas células da granulosa.

CONCLUSÕES

A adição de 10% de soro de cadela em estro no meio de cultivo oferece melhores condições para o desenvolvimento *in vitro* após 96h de cultivo de ovócitos de cadelas em anestro fisiológico, quando comparado com o soro de vaca em estro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAVISTER, R.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the Golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.*, v.28, p.235-247, 1983.
- BOLAMBA, D.; RUSS, K.D.; OLSON, M.A. *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.
- CONCANNON, P.W.; McCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil.*, v.39, suppl., p.3-25, 1989.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C. *et al.* Técnicas para desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.49, p.425-432, 1997a.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C. *et al.* Técnica para a avaliação do estágio de maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.49, p.433-440, 1997b.
- COSTA, E.P.; NOGUEIRA, J.C.; CAMARGOS, E.R.S. *et al.* Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas. II. Aspectos ultraestruturais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.49, p.561-574, 1997c.
- DE los REYES, M.; LANGE, J.; MIRANDA, P. *et al.* Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, v.64, p.1-11, 2005.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.375-387, 2000.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: CANINE AND FELINE ENDOCRINOLOGY AND REPRODUCTION. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2004. p.752-774.
- HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The canine oocyte penetration assay, its use as an indicator of dog spermatozoal performance *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, v.50, p.123-139, 1997a.
- HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J. Reprod. Fertil.*, v.51, suppl. 51, p.83-91, 1997b.
- HEWITT, D.A.; WATSON, P.F.; ENGLAND, G.C.W. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, v.49, p.1083-1101, 1998.
- HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, v.55, p.63-75, 1999.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.; OLSON, P.N.S. The canine estrous cycle. In: CANINE AND FELINE THERIOGENOLOGY. Philadelphia: Saunders, 2001. p.16-29.
- KIM, M.K.; FIBRIANTO, Y.H.; OH, H.J. *et al.* Effects of estradiol-17β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.1342-1353, 2005.

Efeito do soro de cadela...

- LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E. *et al.* Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.41-59, 2005.
- NICKSON, D.A.; BOYD, J.S.; ECKERSALL, P.D. *et al.* Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. *J. Reprod. Fertil.* v.47, suppl., p.231-240, 1993.
- OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M. *et al.* Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.11, p.387-390, 1999.
- OTOI, T.; WILLIANGHAM, L.; SHIN, T. *et al.* Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction*, v.124, p.775-781, 2002.
- OTOI, T.; SHIN, T.; KRAEMER, D.C. *et al.* Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after *in vitro* maturation and fertilization. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.44, p.631-637, 2004.
- RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under heterologous hormone supplementation. *Reprod. Dom. Anim.*, v.38, p.58-62, 2003a.
- RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*, v.60, p.59-66, 2003b.
- SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- SHILLER, V.M.; STABENFELDT, G.H. Clinical reproductive physiology in dogs. In: MORROW, D.A. *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1980. p.571-574.
- VANNUCCHI, C.I. Estudo da maturação nuclear *in vitro* ócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina. 2003. 77f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWANO, Y. *et al.* *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.47, suppl., p.227-229, 1993.