

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES POR FECUNDAÇÃO *IN VITRO* E
ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA VISANDO O ISOLAMENTO DE
CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS FELINAS**

TATIANA DA SILVA RASCADO

BOTUCATU - SP

Julho de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES POR FECUNDAÇÃO *IN VITRO* E
ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA VISANDO O ISOLAMENTO DE
CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS FELINAS**

TATIANA DA SILVA RASCADO

**Dissertação apresentada junto
ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do
título de Mestre.**

**Orientadora: Prof. Adj.
Fernanda C. Landim Alvarenga**

BOTUCATU - SP

Julho de 2009

Nome da Autora: Tatiana da Silva Rascado

Título: Produção de embriões por fecundação *in vitro* e ativação partenogenética visando o isolamento de células tronco embrionárias felinas.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Maria Denise Lopes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ-USP-São Paulo

Data da Defesa: 03 de julho de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, José Cepa Rascado e Ahlai Rosa da Silva Rascado pelo amor, carinho e incentivo constante que permitiram que eu realizasse mais esse ideal.

“POSSO TODAS AS COISAS NAQUELE QUE ME FORTALECE”

Filipenses 4:13

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo.

À minha orientadora professora Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga pelo apoio durante a execução do projeto e elaboração da dissertação.

À professora Maria Denise Lopes por estar disposta a me ajudar sempre que precisei.

À Lílian Rigatto Martins pelos ensinamentos sobre PIV de gato e ajuda durante os experimentos.

Ao Bruno Watanabe Minto e Eduardo Shigueru Mori pela colaboração com as castrações.

À Silvia Elaine Rodolfo de Sá Lorena pela realização das anestésias.

À Ana Izabel Silva Balbin Villaverde pelas colheitas de sêmen.

Ao João Ferreira de Lima Neto e à Camila Bianco das Dores pelas sugestões e troca de informações sobre cultivo de células tronco embrionárias.

À Cláudia Barbosa Fernandes pela ajuda na análise inicial das lâminas de ativação partenogenética.

Aos residentes do departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária dos anos de 2007 e 2008: Carmo, Gabriel, Maria Clara, Rosiara, Janaína, Ana Cristina, Ana Carolina e Thiago pela compreensão e companheirismo ao dividir o mesmo local de trabalho, ambulatório de pequeno animais.

Aos amigos do laboratório: Daniela, Mateus, Luciana, Liani, Ana Augusta, Ieda, Thaila, Paulo, Luís e Letícia pelo companheirismo e ambiente agradável de trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albumina sérica bovina

cAMP: Adenosina monofosfato cíclico

Ca²⁺: Íon cálcio

CCOs: Complexo *cumulus* oócito

CICLO.: Cicloheximide

CO₂: Gás carbônico

CONT.: Controle

CSF: Fator citostático

CTE: Células tronco embrionárias

CTE-like: Células semelhantes às células tronco embrionárias

DAG: Diacilglicerol

DNA: ácido desoxirribonucléico

DMEM: “Dubelco’s modified eagle’s medium”

DMEM-F12: “Dubelco’s modified eagle’s medium” suplementado com Ham F-12

6-DMAP: 6-dimetilaminopurine

DMPBS: “Dulbecco’s modified phosphate buffered saline”

EGF: Fator de crescimento epidermal

ERK: Regulador extracelular de quinase

ERO: Espécies reativas de oxigênio

EST.: Estrôncio

FEG: Fibroblasto embrionário de gato

FGF-2: Fator de crescimento de fibroblastos 2

FIV: Fecundação *in vitro*

FOC: “Feline Optimized Culture medium”

FSH: Hormônio folículo estimulante

GSH: Glutathiona

IGF-I: Fator de crescimento semelhante à insulina I

LH: Hormônio Luteinizante

IP3: Inositol 1, 4, 5 trifosfato

LIF: Fator inibidor da leucemia

MII: Metáfase II

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MCI: Massa celular interna

MEF: Fibroblasto embrionário de camundongo

MEM: “Minimum essential medium”

Mg²⁺: Íon magnésio

MHC: Complexo de histocompatibilidade maior

MIV: Maturação *in vitro*

MPF: Fator promotor de maturação

MOS quinase: c-mos proto-oncogene

N₂: Nitrogênio

NaCl: Cloreto de sódio

Na⁺/H⁺: Sódio e hidrogênio

O₂: Oxigênio

PVA: Álcool polivinílico

PIP2: Inositol bifosfato

Rosco: Roscovitine

RNA: Ácido Ribonucléico

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro

OSH: ovariosalpingohisterectomia

PRPP: Fosforribosilpirofosfato

SFB: Soro fetal bovino

SOFaa: “Sintetic ovidutal fluid” acrescido de aminoácidos

SSEA-1: antígeno embrionário estágio específico 1

SSEA-3: antígeno embrionário estágio específico 3

SSEA-4: antígeno embrionário estágio específico 4

STO: Linhagem imortal de fibroblastos embrionários murinos

TALP: “Tyrode albumin lactate pyruvate medium”

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados comparativos das repetições de cada meio com relação à porcentagem de clivagem, índice de blastocisto sobre os oócitos fecundados e índice de blastocisto sobre oócitos clivados.	58
Tabela 2. Índice de clivagem partenogenética espontânea e de blastocistos nos meios FOC e SOF.....	60
Tabela 3. Proporções (porcentagem) de ativação oocitária nos diferentes tratamentos.	60
Tabela 4. Proporções (porcentagens) de oócitos ativados que clivaram ou apresentaram apenas descondensação da cromatina em relação ao total de oócitos tratados em cada tratamento e controle.	61
Tabela 5. Proporções (Porcentagens) de oócitos clivados e de desenvolvimento embrionário segundo tratamentos e controle.	62
Tabela 6. Resultados das ativações oocitárias com ionomicina associada ao ciloheximide em relação à porcentagem de clivagem e índice de blastocisto sobre os oócitos ativados.....	63
Tabela 7. Proporções (Porcentagens) de aderência das MCIs isoladas por dissociação mecânica em diferentes meios de cultivo.....	66
Tabela 8. Meios TALP-FIV e TALP-SÊMEN.....	106
Tabela 9. Meio SOFaa.....	106
Tabela 10. Meio FOC.	107

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** No processo de maturação, o fator citostático (CSF) estabiliza a atividade do MPF que, em altos níveis e junto com a MAPK, mantém o oócito em MII até a fecundação ou a ativação partenogenética. Com o aumento nos níveis de Ca^{2+} livre, o CSF é inativado pela MAPK, o MPF perde a estabilidade e sua atividade decai juntamente com a da MAPK. Com níveis baixos dessas quinases, o oócito é capaz de progredir para a anáfase e a telófase, formar os pronúcleos, iniciar a fase de mitose com a primeira clivagem e progredir no desenvolvimento embrionário.34
- Figura 2.** Aspecto morfológico dos CCOs-I felinos selecionados para a maturação *in vitro* (MIV). (A) Oócitos antes da MIV. (B) Oócitos com expansão das células do *cumulus* após o período de maturação *in vitro*. Microscópio estereoscópio, aumento de 40X.....44
- Figura 3.** Isolamento da MCI por imunocirurgia. (A) Blastocisto antes da incubação em solução ácida de Tyrode. (B) Blastocisto após a incubação em solução ácida de Tyrode. (C) Embrião após a incubação em complemento de cobaia. Microscópio invertido, aumento de 400X A, C e aumento de 800X B. .53
- Figura 4.** Delineamento experimental seguido no cultivo *in vitro* de MCI isolada por dissociação mecânica a fim de avaliar a melhor fonte proteica.54
- Figura 5** Embriões sete dias após a FIV. (A) cultivados em meio FOC; (B) cultivados em meio SOF. Microscópio estereoscópio, aumento de 40X.....59
- Figura 6** Embriões corados com Hoechst 33342 e iodeto de propídio. (A) Embrião cultivado em meio SOF; (B) Embrião cultivado em meio FOC. Células coradas em azul são viáveis (Hoechst 33342) e células coradas em vermelho são células degeneradas (iodeto de propídio). Note que a proporção de células viáveis é maior no embrião cultivado em meio SOF. Microscópio invertido, aumento de 400x B e aumento de 800X A.59
- Figura 7.** Porcentagem de oócitos ativados e não ativados no grupo controle e em cada tratamento. (CICLO: cicloheximide, ROSCO: roscovitine e EST: estrôncio).61
- Figura 8.** Proporção de oócitos ativados que apresentaram apenas núcleo descondensado (uma célula) e que clivaram em cada tratamento e controle.

(CONT: controle; CICLO: cicloheximide; ROSCO: roscovitine e EST: estrôncio).	62
Figura 9. Proporção de oócitos clivados que se desenvolveram aos estádios de 2 a 10 células, 10 a 16 células, 16 a 30 células em cada tratamento e no controle.	63
Figura 10. Monocamada de fibroblastos felinos inativados.	64
Figura 11. Representação gráfica da porcentagem de MCIs aderidas e não aderidas segundo a forma de isolamento. 91% (100/110) das MCIs isoladas por dissociação mecânica aderiram, enquanto apenas 50% (5/10) das isoladas por imunocirurgia aderiram.	65
Figura 12. (A): MCI isolada por imunocirurgia. (B): MCI isolada por dissociação mecânica. Repare como a MCI isolada por imunocirurgia está mais enegrecida do que a isolada por dissociação mecânica. (A) Microscópio invertido aumento de 400X; (B) Microscópio estereoscópio, aumento de 80X.	65
Figura 13. (A) MCI aderida três dias após o cocultivo. (B) MCI aderida com uma semana após o cocultivo no meio DMEM baixa glicose:F12 (Meio V). Essa mesma morfologia foi apresentada pelas MCIs aderidas nos outros meios após 20 dias de cocultivo. Note que as células apresentam-se retraídas, com coloração enegrecida. (Microscópio invertido aumento de 400X).	67
Figura 14. (A) Blastocisto felino apresentando a proteína Oct4 na MCI e trofoblasto (B) Blastocisto corado com Hoechst 33342. (Microscópio invertido, aumento de 400X).	68
Figura 15. MCI de embrião felino com 10 dias de cocultivo submetida à imunocitoquímica para avaliar a presença de Oct4. (Microscópio invertido, aumento de 400X).	68

SUMÁRIO

Pág.

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	Células tronco	22
2.1.1	Células tronco embrionárias.....	23
2.1.2	Marcadores de pluripotência.....	24
2.1.3	Células tronco embrionárias derivadas de embriões de gato doméstico.....	26
2.2	Produção de embriões <i>in vitro</i>	27
2.2.1	Maturação oocitária.....	27
2.2.2	Ativação do oócito.....	33
2.2.3	Cultivo <i>in vitro</i> do embrião do gato doméstico.....	38
3	OBJETIVOS.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Obtenção dos ovários, recuperação e seleção dos oócitos	43
4.2	Maturação <i>in vitro</i>	43
4.3	EXPERIMENTO I.....	44
4.3.1	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	44
4.3.2	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	45
4.3.3	Avaliação da viabilidade celular.....	46
4.3.4	Delineamento experimental.....	46
4.3.5	Análise estatística	47
4.4	EXPERIMENTO II.....	47
4.4.1	Ativação oocitária.....	47
4.4.2	Cultivo <i>in vitro</i>	48
4.4.3	Análise dos tratamentos de ativação.....	48
4.4.4	Delineamento experimental.....	49
4.4.5	Análise estatística	49
4.4.6	Cultivo <i>in vitro</i> de blastocistos partenogénéticos	49
4.5	EXPERIMENTO III.....	50
4.5.1	Preparo da monocamada de fibroblastos (células de sustentação).....	50

4.5.2	Isolamento da MCI	52
4.5.3	Cultivo da MCI	53
4.5.4	Isolamento e cultivo da MCI de embriões partenotos	55
4.5.5	Imunocitoquímica	55
4.5.6	Análise estatística	56
5	RESULTADOS	58
5.1	EXPERIMENTO I	58
5.2	EXPERIMENTO II	60
5.3	EXPERIMENTO III	64
5.3.1	Preparo da monocamada de fibroblastos	64
5.3.2	Isolamento da MCI	64
5.3.3	Cultivo da MCI	66
5.3.4	Isolamento e cultivo da MCI de embriões partenotos	67
5.3.5	Imunocitoquímica	67
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÕES	87
8	REFERÊNCIAS	90
9	ANEXOS	106
9.1	ANEXO 1	106
9.2	ANEXO 2	106
9.3	ANEXO 3	107

RASCADO, T.S. **Produção de embriões por fecundação *in vitro* e ativação partenogenética visando o isolamento de células tronco embrionárias felinas**. Botucatu, 2009. 107p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

RESUMO

O objetivo deste estudo foi aprimorar os protocolos de produção *in vitro* de embriões e de ativação partenogenética visando o isolamento e o cultivo de células tronco embrionárias felinas. Os CCOs-I foram obtidos a partir de ovários de gatas adultas e maturados *in vitro*. No experimento I, os CCOS foram fecundados e os embriões cultivados nos meios SOFaa e FOC. Foram comparadas as taxas de clivagem e a produção de blastocistos. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância e a viabilidade embrionária foi avaliada por sondas fluorescentes (Hoechst e iodeto de propídio). Não houve diferenças significativas entre os meios de cultivo, os quais apresentaram taxas de clivagem de $50,5 \pm 9,47$ e $63,75 \pm 5,9$ ($P > 0,05$) e de produção de blastocistos em relação ao total de oócitos fecundados de $18 \pm 5,07$ e $33,2 \pm 3,71$ ($P > 0,05$) para FOC e SOF respectivamente. No experimento II, os CCOs maduros foram submetidos a três diferentes protocolos de ativação partenogenética: 1-ionomicina associada ao cicloheximide; 2-ionomicina associada ao roscovitine e 3-ionomicina associada ao estrôncio, os quais foram comparados entre si e ao controle quanto às taxas de ativação, clivagem e desenvolvimento embrionário, sendo cultivados em SOFaa por 72 horas após a ativação. Para tais avaliações, oócitos e embriões foram corados com Hoechst 33342 e examinados em microscópio invertido. Como análise estatística foi utilizado o teste qui-quadrado. Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à taxa de oócitos ativados (69,9%, 76,6% e 64,6%, para tratamento 1, 2 e 3 respectivamente) ($P > 0,05$) nem quanto às taxas de clivagem (46,6%, 46,73% e 32,32%, para tratamento 1, 2 e 3 respectivamente) ($P > 0,05$), mas sim entre estes e o controle (36% e 12%, respectivamente, para taxa de oócitos ativados e taxas de clivagem) ($P < 0,05$). Quanto ao

desenvolvimento embrionário até os estádios de 2 a 10 células, 10 a 16 células e 16 a 30 células também não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos ($P>0,05$), mas sim entre eles e o controle ($P<0,05$). 182 oócitos foram ativados com o protocolo ionomicina + cicloheximide e cultivados por sete dias em SOFaa, as taxas de clivagem foram de $46,25\pm10$ e a produção de blastocistos $1,5\pm1,91$. No experimento III, as MCIs isoladas de 120 blastocistos produzidos *in vitro* e dos 3 produzidos por partenogênese foram cultivadas sobre monocamadas de fibroblastos embrionários inativados felinos. Foram testados seis meios de cultivo celular, os quais não diferiram quanto à aderência da MCI ($P>0,05$), entretanto não houve formação de colônias. Testou-se duas formas de isolamento da MCI, isolamento mecânico e imunocirurgia; a taxa de aderência da MCI foi maior no isolamento mecânico do que na imunocirurgia ($P<0,05$). As MCIs isoladas de embriões partenotos não aderiram. A análise estatística foi feita por meio do teste qui quadrado. Concluiu-se que não houve diferença significativa entre SOFaa e FOC. Também não houve diferença entre os tratamentos de ativação partenogenética. Oócitos ativados partenogeneticamente clivaram, entretanto poucos embriões chegaram ao estágio de blastocisto. MCIs isoladas de embriões fecundados *in vitro* apresentaram altos índices de adesão quando isoladas mecanicamente, mas não formaram colônias.

Palavras Chave: embrião, gato, partenogênese, células tronco embrionárias, MCI.

RASCADO, T.S. **Embryos production by in vitro fertilization and parthenogenetic activation aiming the isolation of feline embryonic stem cells**. Botucatu, 2009. 107p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

ABSTRACT

The objective of this study was to improve the existent protocols for *in vitro* embryos production and parthenogenetic activation in cats, aiming the isolation and culture of feline embryonic stem cells. COCs-I were collected from adult queens's ovaries and matured in vitro. In the experiment I, COCs were fertilized and embryos cultured in two culture media, SOFaa and FOC. In both media the cleavage rate and blastocysts production were compared. Fluorescents probes (Hoechst and propidium iodide) were utilized to estimate embryo viability. The statistical analysis was realized through the ANOVA. No statistical difference was observed between culture media. The cleavage rates considering the total number of fertilized oocytes were 50.5 ± 9.47 and 63.75 ± 5.9 ($P > 0.05$) for FOC and SOF medium respectively. Similarly, the blastocysts production rates were 18 ± 5.07 and 33.2 ± 3.71 ($P > 0.05$) for FOC and SOF, respectively. In experiment II matured COCs were submitted to three parthenogenetic activation protocols: 1- ionomycin associated to cycloheximide; 2 – ionomycin associated to roscovitine; 3 – ionomycin associated to strontium. The treatments were compared among themselves and among them and the control concerning chromatin decondensation, cleavage and embryo development rates. The parthenogenetic embryos were then cultured in SOFaa during 72 hours. To estimate chromatin status and number of nuclei, oocytes and embryos were stained with Hoechst 33342 and examined under an inverted fluorescent microscope. As statistical analyses chi-square test was utilized. No statistical difference was observed among treatments concerning activated oocytes rates (69.9%, 76.6% e 64.6%, respectively, for treatment 1, 2 and 3) ($P > 0.05$) neither cleavage rates (46.6%, 46.73% e 32.32%, respectively, for treatment 1, 2, 3) ($P > 0.05$). However, statistical difference was observed among

treatments and control (36%, 12%, respectively, for activated oocytes rates and cleavage rates) ($P < 0.05$). Concerning embryonic development until 2–10 cells, 10-16 cells and 16-30 cells no statistical difference was observed among treatments ($P > 0.05$), but statistical difference was observed among treatments and control ($P < 0.05$). 182 oocytes were activated with ionomycin associated to cycloheximide and cultured during seven days in SOFaa. Cleavage rates were 46.25 ± 10 and blastocyst production rates were 1.5 ± 1.91 . In the experiment III, ICMs isolated from 120 *in vitro* produced blastocysts and from 3 blastocysts produced by parthenogenesis were cultured in feline embryonic fibroblast feeder layer. Six cellular culture media were tested, but no statistical difference was observed among themselves concerning ICM attachment (Chi Square - $P > 0.05$). However colonies were not formed. Two kinds of isolation of the ICM were tested, mechanical isolation and immunosurgery. ICM attachment rates were bigger in the mechanical isolation than in the immunosurgery group ($P < 0.05$). ICMs isolated from parthenogenetic embryos didn't attach. The combined results of this experiments indicated that although no statistical difference were observed between SOFaa and FOC media to produce feline IVF embryos; the SOFaa tended to lead to a less variable result than FOC. All parthenogenetic activation treatments used were efficient. Oocytes activated by parthenogenesis cleaved, however just a small number of embryos developed to blastocysts. ICMs isolated from *in vitro* fertilized embryos showed high index of attachment when they were mechanically isolated. However no colonies were formed.

Key Words: embryo, cat, parthenogenesis, embryonic stem cells, ICM.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Exceto pelo gato doméstico e outros poucos felídeos selvagens, mais de 36 espécies estão ameaçadas de extinção, segundo a Convenção de Tráfico Internacional de Espécies Ameaçadas (CITES, 2000). O estudo da reprodução nessa espécie é enfatizado devido ao gato ser um importante modelo de pesquisa, visando à preservação de felídeos selvagens ameaçados de extinção (Wildt *et al.*, 1986). É, também, um modelo experimental para, no mínimo, trinta e seis patologias humanas, incluindo doenças hereditárias (GROODROWE *et al.*, 1989). Além disso, o gato doméstico é um dos mais populares animais de estimação.

Células tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna de embriões pré-implantação e multiplicam-se infinitamente *in vitro*, mantendo seu cariótipo estável; podem originar tipos celulares derivados dos três folhetos germinativos e o ciclo celular é composto, em sua maior parte, pela fase de síntese (YU *et al.*, 2006). Estas células podem ser derivadas de embriões produzidos *in vivo*, *in vitro* e por ativação partenogenética (KIM *et al.*, 2007a; WANG *et al.*, 2005b).

Na maioria dos mamíferos, os oócitos são ovulados em metáfase II e permanecem nesse estágio até serem ativados pelo espermatozóide ou por estímulo artificial. Quando o espermatozóide ativa o oócito, ele promove múltiplas e periódicas oscilações nos níveis de cálcio intracelular (LIU *et al.*, 2002). Essa elevação na concentração intracelular de cálcio inativa o MPF e a MAPK, tornando o oócito apto a reiniciar a meiose.

Vários tratamentos artificiais de ativação já foram descritos e atuam por mecanismos diversos. Alguns promovem o aumento de cálcio intracelular, como estrôncio (BOS-MIKICH *et al.*, 1995) e ionomicina, enquanto outros inibem a fosforilação proteica, como 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; LIU *et al.*, 1998). Entretanto, apesar de buscarem mimetizar os efeitos promovidos pelo espermatozóide, nenhum deles é completamente capaz de promover todos os eventos da fecundação (NAKADA e MIZUNO, 1998).

Protocolos baseados nesses métodos de ativação oocitária têm promovido boas taxas de ativação e de desenvolvimento embrionário em felinos (DU et al., 2002; LORTHONGPANICH et al., 2004; KARJA et al., 2005). No entanto, o roscovitine, inibidor específico do MPF e o estrôncio que induz a múltiplas e periódicas oscilações intracelulares de cálcio em oócitos murinos (BOS-MIKICH et al., 1995) não foram estudados em felinos até então.

As técnicas de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e desenvolvimento embrionário evoluíram nos últimos anos (FARSTAD, 2000; POPE et al., 2000). Uma série de fatores incluindo a qualidade dos complexos *cumulus-oophorus* recuperados (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2003) e os protocolos usados para MIV, FIV e CIV afetam a eficiência da produção *in vitro* de embriões felinos.

A composição do meio de cultivo e a fonte de proteínas e macromoléculas também são críticas para o sucesso da produção embrionária. Muitos esforços têm sido empregados com o objetivo de minimizar os efeitos do bloqueio do desenvolvimento de mórula a blastocisto, já que quantidade elevada de embriões clivados se desenvolvem até o estágio de mórula, porém muitas mórulas não se desenvolvem a blastocistos (SWANSON et al., 1996; HERRICK et al., 2007; FREISTEDT et al., 2001; KANDA et al., 1998).

A terapia celular visa à recuperação de tecidos e órgãos lesados através da introdução de novas células, já diferenciadas, capazes de colonizar as áreas afetadas e restabelecer a função previamente perdida. É uma possibilidade no tratamento de doenças degenerativas, congênitas, traumas e injúrias das mais variadas etiologias (MONTROYA et al., 2005).

São poucos os relatos sobre isolamento e cultivo de CTE em felinos, entretanto, o estudo em gatos é importante para o melhor conhecimento da biologia do desenvolvimento nestas espécies. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi aprimorar os protocolos de produção *in vitro* de embriões e de ativação partenogenética visando o isolamento e o cultivo de células tronco embrionárias felinas.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células tronco

Na maioria dos tecidos adultos existem reservas de células com capacidade de multiplicação, se diferenciando naquele tecido a que pertencem e ao mesmo tempo mantendo essa própria reserva de células indiferenciadas. Essas células tronco tecido específicas são as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo de tecidos lesados e pela remodelação dos tecidos e órgãos. Ainda não se sabe se no adulto persistem células com capacidade de diferenciação ilimitada ou de formar múltiplos tecidos, ou seja, células tronco pluripotentes; se existem, devem ser muito raras e de difícil isolamento. Essas células progenitoras capazes de se diferenciar em tecidos adultos especializados são denominadas células tronco (ZAGO, 2007).

Células tronco diferem de outras células do organismo por apresentarem três características, ou seja, são indiferenciadas e não especializadas; são capazes de se multiplicar por longos períodos, mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes e são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular (ZAGO e COVAS, 2007; FRIEL *et al.*, 2005).

As células tronco permanecem a maior parte do tempo na fase S do ciclo celular, sintetizando DNA; diferentemente das células somáticas diferenciadas elas não necessitam de estímulo externo para iniciar a replicação do DNA (FRIEL *et al.*, 2005).

As células tronco adultas são células multipotentes encontradas no sistema hematopoiético, nervoso, locomotor, pele, trato gastrointestinal, sendo mais abundantes na medula óssea e sangue. Essas células existem em pouca quantidade no organismo sendo de difícil extração, purificação e identificação, possuem capacidade limitada de se diferenciar, geralmente ficando restritas à geração de células do tecido que derivaram. Não estão presentes em quantidades suficientes para transplantes e não podem ser cultivadas infinitamente sem sofrer alterações (HEIDERSBACH *et al.*, 2006).

2.1.1 Células tronco embrionárias

As células tronco embrionárias (CTE) são originadas da MCI de blastocistos e possuem a capacidade de se multiplicar infinitamente *in vitro*, mantendo o cariótipo estável e normal e são aptas a se diferenciar em qualquer tipo de célula do organismo originária dos três folhetos embrionários, o ectoderma, o mesoderma e a endoderma. (FRIEL et al, 2005; YU et al., 2006). Essas características também foram relatadas por Cibelli et al. (2002), Cibelli et al. (2006) e Lin et al. (2007) em experimentos com CTE partenogênicas.

Pesquisas com células tronco embrionárias iniciaram-se na década de 1970, quando células do carcinoma embrionário, as células tronco de teratocarcinomas, tumores da linha germinativa, foram estabelecidas como linhas celulares (WOBUS et al., 2005 apud JAKOB et al., 1973).

Em 1981, linhas celulares pluripotentes derivadas de blastocistos de camundongos foram cultivadas e se multiplicaram sem que ocorresse a perda do potencial de diferenciação, sendo chamadas de células tronco embrionárias (EVANS e KAUFMAN, 1981).

O sucesso na obtenção de culturas de CTE depende do estágio embrionário em que as células são isoladas, da retirada de quantidade suficiente de células e de condições de cultivo adequadas que conduzam mais à multiplicação do que à diferenciação (EVANS e KAUFMAN, 1981).

As CTE já foram isoladas a partir de blastocistos inteiros (PIEDRAHITA et al., 1990) ou do isolamento da MCI por meio de forma mecânica (HATOYA et al., 2006), por microdissecção a laser (PEURA et al., 2007) e por imunocirurgia (SOLTER e KNOWLES, 1975).

Entre estas, a imunocirurgia e a dissociação mecânica são as mais utilizadas. A imunocirurgia consiste na remoção das células do trofoblasto por duas reações de citotoxicidade. Blastocistos sem a zona pelúcida são incubados com antissoro e depois expostos à ação do complemento de coelho (MADDOX HYTTTEL et al., 2007).

As CTE requerem adesão a uma matriz celular ou extracelular para sobrevivência e crescimento (NIETO et al., 2007). Geralmente são cocultivadas

com fibroblastos mitoticamente inativos, mas metabolicamente ativos, permitindo a síntese estável de receptores e citocinas necessários ao crescimento das CTE (ROY *et al.*, 2001). Para esse fim são utilizadas a inativação química por meio de Mitomicina C e a inativação por irradiação gama, ambos inibem a replicação do DNA (ROY *et al.*, 2001).

Mitomicina C é um agente quimioterápico que evita a separação da dupla fita de DNA durante a replicação celular por formar ligações covalentes entre as fitas opostas, enquanto a síntese de RNA e de proteínas continua. É capaz de bloquear o ciclo celular em G1, S e G2 enquanto as células permanecem viáveis (TOMASZ *et al.*, 1987). A irradiação gama quebra as fitas de DNA (MALINOWSKI *et al.*, 1992).

Essa camada de fibroblastos inativos contribui com vários fatores essenciais para a manutenção da auto renovação das CTE, entretanto a identidade bioquímicas desses é desconhecida. Acredita-se que seja um conjunto de fatores de crescimento, moléculas de superfície celular, matriz extracelular e neutralizantes de produtos tóxicos e metabólitos produzidos pelas CTE (PEDERSEN., 2002). Por outro lado, Pedersen (2002) relata que alguns pesquisadores identificaram o LIF como sendo um fator liberado por fibroblastos embrionários murinos. Da mesma forma, Wang *et al.* (2005a) sugerem que o fator de crescimento de fibroblastos 2 também seja produzido e liberado por esses fibroblastos inativos.

O LIF atua em um receptor específico que ativa o transdutor de sinal gp130, o qual atua em duas vias de sinalização intracelular: JAK-STAT e Shp-Erk2 (FRIEL *et al.*, 2005). Minami *et al.* (1996) demonstraram que a ativação de STAT3 é suficiente para a manutenção da pluripotência em relação à via Shp-Erk2. A ativação de Stat3 é essencial para a manutenção da pluripotência, mesmo sem a presença de LIF (MATSUDA *et al.*, 1999).

2.1.2 Marcadores de pluripotência

Em CTE murinas, a expressão, em nível adequado, do gene Pou5f1 que codifica o fator de transcrição Oct4 é fundamental para manutenção da

pluripotência. Foi demonstrado que um aumento duas vezes maior em sua expressão causou diferenciação em células da endoderme primitiva e mesoderme, sendo que a ausência de expressão induziu a formação de trofotoderma culminando com a perda da pluripotência (NIWA *et al.*, 2000).

O gene Nanog também tem se mostrado muito importante, pois a ausência de sua transcrição induz a diferenciação celular para linhagens de endoderme extra-embriônica, enquanto uma expressão 50 a 60% menor induz a geração de vários tipos de tecidos, ativando genes da endoderme, mesoderme e ectoderme (HATANO *et al.*, 2004).

Dessa forma, os marcadores de superfície celular e moleculares são muito importantes para definir o estado de diferenciação de uma linha celular. As CTE de camundongos e suínos expressam antígeno embrionário estágio específico 1 (SSEA1), atividade de fosfatase alcalina, fator de transcrição Oct 4 e Nanog (WOBUS *et al.*, 2005; BREVINI *et al.*, 2007).

A pluripotência das CTE pode ser avaliada pela administração intraperitoneal ou subcutânea dessas células indiferenciadas em camundongos imunossuprimidos (SCID mice) gerando teratomas (CIBELLI *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2003). Teratomas foram pouco observados em suínos (BREVININI *et al.*, 2007). A formação de corpos embrióides, agregados de células tronco compostos pelos três tipos de camadas germinativas também é um indicador da pluripotência (SCHULDINER *et al.*, 2000).

Quanto às CTE partenogênicas, existem muitos resultados negativos, relacionados, principalmente, à plasticidade dessas células. Em experimento realizado por Newman-Smith *et al.* (1995), utilizando camundongos como modelo experimental, verificou-se que as CTE derivadas da massa celular interna de embriões partenotos se diferenciavam, predominantemente, em células da endoderme parietal.

Entretanto, para primatas, foi comprovado que as CTE partenogênicas podem se diferenciar nas três linhas de células germinativas embrionárias, incluindo cartilagem, músculo e osso (mesoderme), neurônios, melanócitos,

pele e folículos pilosos (ectoderme) e intestino e epitélio respiratório (endoderme) (CIBELLI *et al.*, 2002).

2.1.3 Células tronco embrionárias derivadas de embriões de gato doméstico

Os relatos sobre células semelhantes às células tronco embrionárias (CTE-*like*) felinas estão restritos a três resumos de congresso. Kehler *et al.* (2006) cultivaram CTE-*like* felinas derivadas de embriões produzidos *in vitro* e gerados *in vivo*. Esses autores relataram que as colônias cresceram lentamente e após três semanas as células morreram ou diferenciaram, entretanto essas colônias não foram caracterizadas. Serrano *et al.* (2006) cultivaram 32 linhas de CTE-*like* felinas, das quais 50% foram positivas para fosfatase alcalina, três linhas foram submetidas à imunocitoquímica, mas resultados positivos para OCT4, SSEA-1 e SSEA-4 foram obtidos em poucas colônias. Os autores relataram que as colônias levaram, em média, 20 dias para se estabelecerem, permanecendo em cultivo por, no máximo 80 dias, exceto uma linha celular que foi cultivada por 102 dias. Yu *et al.* (2007) cultivaram CTE-*like* felinas derivadas de embriões felinos gerados *in vivo* e obtiveram 10 linhas celulares, as quais foram positivas para Oct4 e SSEA-3.

É importante ressaltar que as linhas de CTE-*like* felinas isoladas até agora não estão muito bem caracterizadas, visto que foram positivas quanto à presença de Oct4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 e fosfatase alcalina. Tais marcadores de pluripotência são específicos para células pluripotentes humanas e murinas, fato que não pode ser extrapolado para animais domésticos (KIRCHHOF *et al.*, 2000; HE *et al.*, 2006; KEEFER *et al.*, 2007). Portanto mais estudos são necessários para que CTE legítimas sejam derivadas de embriões felinos.

Não existem relatos sobre CTE partenogênicas em felinos, diferentemente de bovinos (WANG *et al.*, 2005b) e suínos (KIM *et al.*, 2007a). Entretanto, o estudo desse tipo celular é importante, pois a diversidade de antígenos do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) e o risco de rejeição imunomediada complicam o uso alogênico de células tronco. Lin *et al.*

(2003) e Kim *et al.* (2007b) comprovaram que as células tronco embrionárias homozigotas derivadas de embriões partenotos podem evitar essa rejeição em resposta a alotransplantes.

2.2 Produção de embriões *in vitro*

2.2.1 Maturação oocitária

O processo de maturação do oócito que resulta na aquisição da capacidade deste ser fecundado ocorre em duas fases. A primeira é a fase de crescimento e confere ao oócito a capacidade de reiniciar a meiose e regular a síntese de proteínas e a formação de organelas, diferenciando a célula em um gameta funcional (CRAN e MOOR, 1990). A segunda fase, caracterizada pelo reinício da meiose é normalmente denominada de maturação final e ocorre após a puberdade no folículo pré-ovulatório (PAYNTON e BACHVAROVA, 1990; EPPIG, 1991). O oócito primário presente no folículo em desenvolvimento é ativado pela transmissão de sinais estimulatórios diretamente através das células do *cumulus* com as quais está intimamente associado. As células da corona radiata têm extensões citoplasmáticas longas que penetram a zona pelúcida e terminam em bulbos associados com a membrana plasmática do oócito através de junções comunicantes, cuja função é permitir a passagem de substâncias de baixo peso molecular das células do *cumulus* para o oócito (MARCOS *et al.*, 1996).

O sinal pré-ovulatório ou a retirada do oócito de seu ambiente folicular podem induzir o reinício da meiose com a subsequente quebra da vesícula germinativa (VGBD), término da prófase I, metáfase I, anáfase I, telófase I (fase em que ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar), prófase II e metáfase II (GORDON *et al.*, 2003).

Os oócitos maturados permanecem no estágio de MII até o momento da ativação pelo espermatozóide (fecundação) ou por algum estímulo artificial (ativação partenogenética) (KÜPKER *et al.*, 1998).

A regulação do ciclo celular das células somáticas é de responsabilidade de proteínas envolvidas nos processos de fosforilação e de desfosforilação mediados por proteínas quinases e fosfatases (FAN e SUN, 2004).

2.2.1.1 Proteínas quinases reguladoras do ciclo celular

Os oócitos maturados são mantidos no estágio de MII devido à presença, em altos níveis, das seguintes quinases: fator promotor de maturação (MPF) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), que se associam aos fusos meióticos e fosforilam diversas proteínas, dentre elas, as lâminas nucleares e as histonas H1 (YANG *et al.*, 1994; HOMA *et al.*, 1995).

O MPF é uma proteína quinase composta por uma subunidade reguladora, a ciclina B e por uma subunidade catalítica, p34^{cdc2}. Em sua forma inativa, a p34^{cdc2} é fosforilada em treonina 161, treonina 14 e tirosina 15. Para ser ativada, essa subunidade catalítica deve ser desfosforilada em treonina 14 e tirosina 15 pela fosfatase cdc 25. A p34^{cdc2} é sintetizada constantemente enquanto a ciclina B é degradada ciclicamente (KIKUCHI *et al.*, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2002).

A MAPK também conhecida como regulador extracelular de quinase (ERK, do inglês “extracellular regulated kinase”) é composta por duas isoformas: ERK1 (p^{44MPK1}) e ERK2 (p^{42mapk2}). Para se tornarem ativas, requerem dupla fosforilação nas extremidades ou nos resíduos de tirosina e treonina. ERK1 e ERK2 são fosforiladas e ativadas pela MAPK quinase (MEK) a qual é ativada pela fosforilação do proto-oncogene c-mos (MARSHALL, 1994).

Durante a divisão celular, a MAPK está envolvida na regulação da dinâmica dos microtúbulos, especialmente na manutenção e organização da placa metafásica II (LU *et al.*, 2002).

A cinética da ativação e da degradação do MPF e da MAPK durante a progressão meiótica de oócitos de gatas maturados *in vitro* foi documentada por Bogliolo *et al.* (2004). A atividade desses fatores foi avaliada por meio da análise indireta da fosforilação da histona H1 e da proteína básica de mielina.

O nível de atividade do MPF está relativamente baixo no estágio de vesícula germinativa e aumenta com a progressão da meiose até o estágio de metáfase I. Seu nível diminuiu significativamente na anáfase I e telófase I, aumentando, novamente, no estágio de metáfase II, em nível similar ao encontrado na metáfase I (BOGLIOLO *et al.*, 2004). O MPF dá início a uma série de reações que culmina com a quebra da vesícula germinativa, fase caracterizada pela condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana nuclear (GORDON *et al.*, 2003).

O nível de atividade da MAPK está relativamente baixo no estágio de vesícula germinativa, aumenta durante a quebra da vesícula germinativa e condensação dos cromossomos e atinge nível máximo na fase de metáfase I, permanecendo elevado até metáfase II (BOGLIOLO *et al.*, 2004).

Bogliolo *et al.* (2004) também relataram que o tempo de maturação pode influenciar o nível de atividade das duas quinases ao avaliar oócitos felinos maturados por 24 e 40 horas. Após 24 horas de maturação *in vitro* oócitos em Metáfase II apresentaram níveis significativamente mais altos de MAPK e MPF do que oócitos maturados por 40 horas.

Após a maturação, os oócitos são mantidos em metáfase II por ação de fatores citostáticos (CSF), os quais são capazes de manter a atividade elevada do MPF (GONÇALVES *et al.*, 2002). O CSF é composto por MAPK e por c-mos proto-oncogene (Mos quinase). Mos é uma serina, treonina quinase encontrada somente no estágio de metáfase II em oócitos bovinos e é um ativador da MAPK. O CSF é inativado devido ao aumento de cálcio intracelular induzido pelo espermatozóide durante a fecundação. Essa inativação facilita a degradação da ciclina B, diminuindo o nível de atividade do MPF no oócito (MOTLIK *et al.*, 1998).

Oócitos de ratos deficientes em MOS ($Mos^{-/-}$) sofrem a quebra da vesícula germinativa e progridem normalmente através da meiose I, mas falham no bloqueio dos oócitos na metáfase II, sofrendo ativação partenogenética espontânea (GONÇALVES *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Maturação *in vitro* do oócito do gato doméstico

Em gatos, as taxas de maturação *in vitro* variam de 50 a 65% dependendo da qualidade dos complexos *cumulus*-oophorus (CCOs), do meio utilizado e de sua suplementação (KATSKA-KSIAZKWICZ *et al.*, 2003; KARJA *et al.*, 2002).

Wood e Wildt (1997) classificaram os CCO em quatro graus, baseados na aparência do citoplasma do oócito e nas células do *cumulus*. Quanto à aparência do citoplasma, a classificação foi baseada em observações histológicas, segundo as quais a atresia citoplasmática está associada com agregados de pequenas gotas lipídicas formando grandes vacúolos acumulados centralmente. E, na fragmentação citoplasmática, a qual se manifesta como um mosaico, apresentando áreas translúcidas (WOOD *et al.*, 1997).

Oócitos Grau I apresentam citoplasma uniforme e fortemente pigmentado, são envoltos por cinco ou mais camadas de células do *cumulus* firmemente aderidas. Oócitos Grau II também apresentam citoplasma uniforme e fortemente pigmentado, mas são envoltos por menos de cinco camadas de células do *cumulus* firmemente aderidas. Oócitos Grau III apresentam citoplasma disforme e granuloso, sendo envoltos por algumas células do *cumulus*, não muito compactas. Oócitos Grau IV apresentam severa transparência e fragmentação citoplasmática, com células do *cumulus* esparsas ou ausentes (WOOD e WILDT, 1997).

Alguns autores incluem os CCOs classificados como Grau I e Grau II por Wood e Wildt (1997) em um só grau, no qual os oócitos devem ser envoltos por, pelo menos, duas camadas de células do *cumulus* firmemente aderidas (JOHNSTON *et al.*, 1989; WOLF e WILDT, 1996; FREISTED *et al.*, 2001; KARJA *et al.*, 2002; LUVONI *et al.*, 2006).

Recentemente, Godard *et al.* (2008), ao estudarem oócitos felinos, revelaram que as células do *cumulus* e suas comunicações com o oócito estão envolvidas na retomada espontânea da meiose, na maturação nuclear induzida por hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), na maturação citoplasmática, no sucesso da fecundação e no desenvolvimento

embrionário inicial. Os mesmos autores também relataram a competência de ócitos desnudos cocultivados com CCOs grau I em alcançar o estágio de metáfase II, suportando a idéia de que fatores parácrinos liberados pelos CCOs induzem a maturação desses oócitos.

Em oócitos felinos, a adição de gonadotrofinas ao meio de maturação exerce efeito positivo na maturação nuclear, pois leva a um aumento significativo na proporção de oócitos em metáfase II comparados a oócitos maturados sem suplementação desses hormônios (SCHRAMM e BAVISTER; 1995; WOOD *et al.*, 1995; LUVONI *et al.*, 2006).

Luvoni *et al.* (2006) sugeriram que os oócitos respondem às gonadotrofinas com aumento na concentração intracelular de AMPc e com mudanças significativas nas comunicações entre o oócito e as células do *cumulus*. Também, relataram que a presença de gonadotrofinas mantém a ligação entre oócito e *cumulus* durante as primeiras três horas de maturação, enquanto sem a estimulação hormonal ocorre ruptura prematura dessa comunicação.

Comizzoli *et al.* (2003) concluíram que a suplementação do meio de maturação com altas concentrações de FSH melhorou a capacidade do oócito maturar *in vitro* e o subsequente desenvolvimento embrionário durante o período de anestro.

Wood *et al.* (1995) obtiveram melhora, embora não significativa, nas taxas de maturação quando o estradiol foi adicionado ao meio de maturação, juntamente com as gonadotrofinas. As taxas se elevaram de 48,4% para 60,1%.

Em 2002, Pope *et al.* sugeriram que os índices de maturação e subsequente desenvolvimento embrionário após a fecundação melhoraram quando oócitos foram maturados em meio suplementado com cisteína sob atmosfera de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Entretanto, Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2003) não observaram diferenças nas taxas de maturação ao compararem atmosferas gasosas de 5 % CO₂ em ar e 5 % CO₂, 5% O₂ e 90% N₂.

Embora, CCOs maturados em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) tenham apresentado maior expansão das células do *cumulus* e maior mucificação quando comparados com CCOs maturados em álcool polivinílico (PVA) e albumina sérica bovina (BSA), ficou comprovado que o SFB tem efeito inibitório sobre a maturação de oócitos felinos, já que muitos oócitos permaneceram no estágio de vesícula germinativa após 24 e 52 horas de maturação. Os autores especularam a possibilidade de existir, no SFB, inibidores meióticos não identificados que exerçam influência independentemente das células do *cumulus* (WOOD *et al.*, 1995).

Baseados nos resultados que indicaram o impacto inibitório do SFB, Wood *et al.* (1995) conduziram um experimento adicional em que analisaram três fontes de SFB e seus constituintes. Um dos soros foi submetido à diálise a fim de remover componentes menores que 1 kDa e a fração dialisada foi liofilizada. Então, oócitos foram maturados em meio padrão suplementado com SFB total, SFB dialisado e SFB reconstituído (porção dialisada + liofilizada), sendo que a inibição foi significativamente eliminada no grupo tratado com SFB dialisado.

O estudo desenvolvido por Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2003) indicou claramente a existência de duas ondas de maturação nuclear nos oócitos de gatos. A primeira onda ocorre em 26 horas de maturação, sendo provável que muitos oócitos madurem entre 17 e 18 horas. A segunda onda tem início após 28 a 30 horas. Acredita-se que essa dupla onda reflita a presença de duas populações que requerem diferentes períodos de maturação. Nesse estudo, a porcentagem de oócitos maduros aumentou significativamente quando o período de maturação foi prolongado até 45 horas. Entretanto, a avaliação morfológica de oócitos maturados por 42 a 45 horas mostrou, em alguns deles, sintomas de envelhecimento como fragmentação do corpúsculo polar e presença de muitos debris no espaço perivitelino. Esses oócitos devem ter maturado durante a primeira onda, num período mais curto.

Resultados de outro experimento mostraram que, ao prolongar o período de maturação de oócitos de gatos usados como citoplastos receptores para clonagem somática por 43 horas, o desenvolvimento dos embriões

reconstruídos diminuiu significativamente. A fusão, taxas de clivagem e o desenvolvimento a blastocisto foram significativamente menores em relação aos citoplastos maturados por um período mais curto (SKRZYSZOWSKA *et al.*, 2002).

2.2.2 Ativação do oócito

Diversos experimentos têm demonstrado que o aumento do cálcio intracelular é essencial para a ativação do desenvolvimento embrionário (TOSTI *et al.*, 2002; CAMPBELL *et al.*, 2000; FISSORE *et al.*, 1998). No entanto, além do aumento dos níveis de íons cálcio, também o aumento do pH intracelular é importante para a síntese de proteínas e a replicação do DNA.

Segundo Grupen *et al.* (2002) dois modelos foram propostos para explicar a ativação do oócito. O primeiro é baseado na interação entre as membranas plasmáticas do oócito e do espermatozóide e o segundo, na introdução de um fator espermático no interior do citoplasma do oócito. Mudanças nos níveis de cálcio e pH do oócito resultam em uma cascata de eventos que envolvem a ativação de diversas proteínas e a hidrólise de um lipídeo de membrana, o fosfatidil inositol. A ligação do espermatozóide ativa a proteína ligada ao GTP (proteína G), localizada internamente na membrana plasmática do oócito, a qual estimula a atividade da fosfolipase C, localizada na face interna da membrana. A fosfolipase C causa hidrólise do fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) para diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). O DAG permanece na membrana plasmática ativando a bomba de Na⁺/H⁺ responsável pelo aumento de pH. Em contraste o IP₃ é liberado da membrana e se difunde no citoplasma onde se liga ao retículo endoplasmático e induz ao resgate do cálcio de seus reservatórios intracelulares, aumentando os níveis de cálcio no citoplasma (MALCUIT *et al.*, 2006).

Esse aumento nos níveis de cálcio intracelular leva a uma queda abrupta nas concentrações de MPF e MAPK, permitindo a retomada da meiose; promove a exocitose dos grânulos corticais, o endurecimento da zona pelúcida, o bloqueio à polispermia, a extrusão do segundo corpúsculo polar, a formação

dos pronúcleos e o início das mitoses (clivagens) (WHITE e YUE, 1996; KÜPKER *et al.*, 1998; DUCIBELLA *et al.*, 2002) (Figura 1).

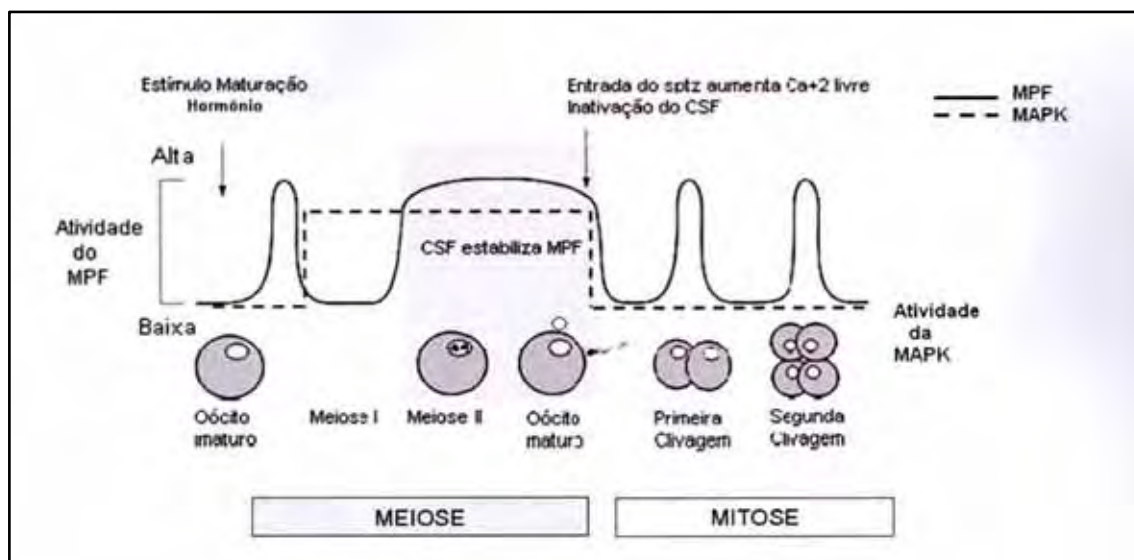


Figura 1. No processo de maturação, o fator citostático (CSF) estabiliza a atividade do MPF que, em altos níveis e junto com a MAPK, mantém o oócito em MII até a fecundação ou a ativação partenogenética. Com o aumento nos níveis de Ca^{2+} livre, o CSF é inativado pela MAPK, o MPF perde a estabilidade e sua atividade decai juntamente com a da MAPK. Com níveis baixos dessas quinases, o oócito é capaz de progredir para a anáfase e a telófase, formar os pronúcleos, iniciar a fase de mitose com a primeira clivagem e progredir no desenvolvimento embrionário (Fonte: ABRIEU *et al.*, 2001).

2.2.2.1 Fecundação *in vitro* do oócito do gato doméstico

Em felinos, o sêmen para realização da fecundação *in vitro* pode ser colhido por vagina artificial (WOOD *et al.*, 1995), por eletroejaculação (WOLFE e WILDT, 1996) e pela lavagem da cauda do epidídimo de gatos castrados. Além disso, podem ser utilizadas amostras de sêmen a fresco (MURAKAMI *et al.*, 2002) ou congelado (KARJA *et al.*, 2002a).

O swin-up é a forma de seleção mais utilizada (KARJA *et al.*, 2002a; GODARD *et al.*, 2008), entretanto alguns autores optam por, apenas, lavar o

sêmen, centrifugando-o, em meio de lavagem, por uma ou duas vezes (HERRICH *et al.*, 2007).

Os meios mais utilizados têm sido o Ham's F10, o Brackett-Oliphant e o TALP (NAGANO *et al.*, 2008; FREISTED *et al.*, 2001; COMIZZOLI *et al.*, 2003). A heparina é o agente capacitante adicionado à maioria dos meios (FREISTED *et al.*, 2001; MURAKAMI *et al.*, 2002; KARJA *et al.*, 2002a).

A relação entre a duração da MIV e o subsequente desenvolvimento embrionário após a FIV foi investigado por Wolf e Wildt (1996) e por Nagano *et al.* (2008). Os primeiros, ao maturar os CCOs – I durante 16, 24, 32, 40 e 48 horas, concluíram que a fertilização ocorreu em todos os períodos, entretanto a taxa de clivagem (69,4%) e o desenvolvimento ao estágio de mórula (59,2%) foram maiores no grupo inseminado após 32 horas de maturação *in vitro*.

A conclusão de Nagano *et al.* (2008) foi que a maior taxa de penetração espermática ocorreu em oócitos maturados durante 30 horas, em relação à aqueles maturados por período de 24, 36 e 48 horas. É importante ressaltar que os autores não encontraram diferenças significativas quando avaliaram as taxas de maturação com 30 e 36 horas de cultivo.

Apesar dos efeitos inibitórios na maturação nuclear, a presença do SFB durante a MIV promove a fecundação de oócitos maduros, possivelmente por evitar o endurecimento da zona pelúcida, caracterizado pela diminuição da fecundação e aumento de sua resistência à digestão enzimática (WOOD *et al.*, 1995).

Murakami *et al.* (2002) avaliaram a proporção de fecundação após 23 horas de inseminação (12 horas de coincubação + 11 horas de cultivo) em possíveis embriões cultivados em cinco meios diferentes após a FIV. Concluíram que os meios avaliados não interferiram nas taxas de fecundação, as quais variaram de 50 a 66,7% entre os meios MK-1, Ham'sF10, Waymouth, TCM 199 e CR1aa.

2.2.2.2 Ativação partenogenética

Partenogênese é definida como a produção de um embrião com ou sem o eventual desenvolvimento de um indivíduo, a partir de um gameta feminino na ausência da contribuição do gameta masculino (BEATTY *et al.*, 1957).

Na ausência do espermatozóide, a concentração de cálcio intracelular pode ser elevada por diferentes tratamentos em oócitos mamíferos. A injeção citoplasmática de soluções contendo cálcio, de agonistas de receptores de inositol trifosfato, de ativadores da proteína G ou a incubação com etanol, cálcio ionóforo, estrôncio e timerosal têm induzido oscilações intracelulares de cálcio. A infusão de cálcio extracelular ou inositol trifosfato no citoplasma com subsequente exposição a pulsos de eletricidade também eleva as concentrações de cálcio (GRUPEN *et al.*, 2002).

Embora a amplitude e a duração dos picos de cálcio produzidos artificialmente sejam diferentes dos observados na fecundação, eles são capazes de desencadear os eventos relacionados com a ativação oocitária. Muitos protocolos de ativação artificial provocam um único pico de cálcio, fato que se opõe às variadas oscilações induzidas pelo espermatozóide (GRUPEN *et al.*, 2002).

Os métodos de ativação mais eficientes são os que combinam a inativação temporária do MPF obtida com um pico de cálcio (cálcio ionóforo, etanol, estrôncio), com a sua inibição persistente que é induzida por inibidores da síntese protéica ou inibidores da proteína quinase (KARJA *et al.*, 2005; GRUPEN *et al.*, 2002).

Os ionóforos de cálcio são compostos capazes de formar um complexo com o íon cálcio e transportá-lo através de membranas biológicas. O mecanismo preciso de liberação de cálcio induzido pelo ionóforo não é bem entendido, pois alguns trabalhos relataram a necessidade de meios de ativação contendo cálcio para que ocorra elevação no nível desse íon (WANG *et al.*, 1999), entretanto há relatos de oscilações quando oócitos foram tratados em meio sem cálcio (GRUPEN *et al.*, 2002). Ionomicina e A23187 são exemplos de cálcio ionóforo. A concentração e o tempo de exposição ao cálcio ionóforo podem afetar a eficiência da ativação oocitária. Nakada e Mizuno (1998)

relataram que a amplitude do único pico de cálcio induzido pelo cálcio ionóforo foi similar à primeira oscilação induzida pelo espermatozóide, entretanto a duração foi maior.

O estrôncio promove a liberação de cálcio dos estoques intracelulares. Similarmente ao espermatozóide, o estrôncio induz a múltiplas e periódicas oscilações de cálcio intracelular, entretanto os pulsos de cálcio são menores em frequência e amplitude e mais longos em duração do que os observados na fecundação (LIU *et al.*, 2002).

O etanol promove um único pico intracelular de cálcio de amplitude maior e mais duradouro do que o pico inicial observado na fecundação (ROGERS *et al.*, 2006). Esse pico é originado pelo influxo de cálcio extracelular e pela liberação dos estoques internos (LOI *et al.*, 1998).

Inibidores da síntese proteica são compostos que inibem a síntese do fator citostático, reduzindo o nível de atividade do MPF e desencadeando o reinício da meiose. Como exemplo, cicloheximide (GRUPEN *et al.*, 2002).

Os inibidores da proteína quinase mais utilizados são roscovitine e 6-dimetilaminopurine (6-DMAP). A roscovitine inibe o MPF evitando a ligação da subunidade $p34^{cdc2}$ ao ATP sem afetar a atividade de outras quinases (DENG e SHEN, 2000). O 6-DMAP atua por meio da inibição de proteínas quinases, inibindo conseqüentemente a fosforilação de proteínas como a $p34^{cdc2}$ e a MEK quinase, reduzindo deste modo, as atividades do MPF e MAPK (LIU *et al.*, 1998).

A estimulação elétrica consiste em colocar os oócitos entre dois eletrodos, imersos em uma solução não eletrolítica que contenha manitol, sucrose ou glicose e submetê-los a um ou mais pulsos de eletricidade. As moléculas de açúcar desestabilizam a membrana plasmática enquanto o estímulo elétrico induz à formação de poros na bicamada lipídica, facilitando o influxo de cálcio extracelular. A membrana permanece permeável ao cálcio por muitos minutos (GRUPEN *et al.*, 2002). A amplitude e o tempo de duração do pico de cálcio são afetados pela voltagem aplicada e pela duração do estímulo elétrico.

Recentemente, foram desenvolvidos experimentos utilizando o estímulo elétrico como indutor de ativação oocitária em felinos. Os resultados indicaram que esse, como estímulo único, é ineficaz, entretanto quando associado ao etanol e ao cicloheximide, as taxas de clivagem e o desenvolvimento embrionário foram satisfatórios (SHIN *et al.*, 2004; KARJA *et al.*, 2005; GABRIEC *et al.*, 2007).

Karja *et al.* (2005) demonstraram que a exposição de oócitos ativados eletricamente ao cicloheximide melhorou significativamente o desenvolvimento embrionário quando comparado a oócitos ativados apenas pelo estímulo elétrico.

A citocalasina B e o 6-DMAP estão relacionados com produção de embriões partenogenéticos diplóides (IMAHIE *et al.*, 2002; NAVARA *et al.*, 1994; MITALIPOV *et al.*, 2001).

A citocalasina B inibe a extrusão do segundo corpúsculo polar e afeta a citocinese, mas não interrompe a segregação dos cromossomos; desta forma origina zigotos diplóides (IMAHIE *et al.*, 2002).

O 6-DMAP promove a desintegração da segunda placa meiótica, afetando a citocinese e inibindo a extrusão do segundo corpúsculo polar. Após a remoção de 6-DMAP, o oócito reinicia a citocinese, mas, nesse estágio, já ocorre a primeira divisão mitótica (clivagem), mantendo, portanto, a diploidia cromossômica (NAVARA *et al.*, 1994; MITALIPOV *et al.*, 2001).

Em felinos, poucos são os estudos que enfocam a ativação partenogenética com o intuito de descobrir adequados protocolos de ativação, sendo que a maioria dos trabalhos são resumos de congresso (GABRIEC *et al.*, 2007).

2.2.3 Cultivo *in vitro* do embrião do gato doméstico

Em gatos, 20 a 30% dos oócitos recuperados conseguem se desenvolver até o estágio de blastocisto após a fecundação *in vitro* (KARJA *et al.*, 2002a; KARJA *et al.*, 2002b; GODARD *et al.*, 2008).

Embora 60 a 95% dos embriões clivados tendem a se desenvolver até o estágio de mórula sob condições variadas de cultivo *in vitro*, muitas mórulas não conseguem alcançar o estágio de blastocisto (SWANSON *et al.*, 1996). Este bloqueio no desenvolvimento tem sido atribuído a condições deficientes de maturação e desenvolvimento embrionário inicial (WOLF e WILDT, 1996). Temperatura, atmosfera gasosa e cocultivo com células da tuba uterina foram avaliados e descartados como causas ou possíveis soluções para esse problema (JOHNSTON *et al.*, 1991a; SWANSON *et al.*, 1996). Swanson *et al.* (1996) sugeriram que a fonte proteica está relacionada com o bloqueio na transição de mórula a blastocisto, assim como a presença de glicose.

Roth *et al.* (1994) concluíram que as condições durante a fecundação ou embriogênese inicial tendem a comprometer o desenvolvimento de mórulas a blastocistos tanto de embriões produzidos *in vitro* quanto de embriões maturados e fecundados *in vivo* que foram submetidos ao cultivo *in vitro* nos estádios de duas a oito células.

Os efeitos da adição de antioxidantes ao meio de maturação também são observados durante o cultivo embrionário, pois, segundo Comizzoli *et al.* (2003), a qualidade dos blastocistos em relação ao número e uniformidade dos blastômeros foi melhor no grupo de oócitos maturados com antioxidantes.

É possível que a transição materno-zigótica e o início da transcrição embrionária, que ocorre no estágio de 5 a 8 células no gato (HOFFERT *et al.*, 1997) seja melhorada na presença de antioxidantes porque foi observado mais embriões se desenvolvendo além do estágio de 8 a 16 células quando o meio de MIV continha ácido ascórbico ou cisteína (COMIZZOLI *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Isolar e cultivar células tronco embrionárias de gatos domésticos a partir de embriões produzidos *in vitro* e por partenogênese.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

EXPERIMENTO I

- Avaliar os meios de cultivo, SOFaa e FOC, quanto ao desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

EXPERIMENTO II

- Determinar o melhor protocolo de ativação partenogenética em gatos domésticos.

EXPERIMENTO III

- Estabelecer a melhor metodologia de cultivo para o isolamento e o cultivo de células tronco embrionárias felinas.
- Avaliar a eficácia dos fibroblastos embrionários felinos inativados com mitomicina C como células de sustentação.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos ovários, recuperação e seleção dos oócitos

Gatas adultas foram submetidas à OSH (ovariosalpingohisterectomia) de rotina. Os ovários foram mantidos em DMPBS (Nutricell, Brasil) acrescido de 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina (GIBCO, 15140-122) a 4°C (JOHNSTON *et al.*, 1989) por uma a três horas até o processamento. A recuperação dos CCOs foi realizada através da técnica de *slicing* (fatiamento) em placas de petri de plástico contendo DMPBS suplementado com antibióticos. Nessa mesma placa, procedeu-se a classificação dos CCOs. Foram utilizados apenas CCOs que apresentavam citoplasma uniforme e fortemente pigmentado, envoltos por duas ou mais camadas de células da granulosa firmemente aderidas (JOHNSTON *et al.*, 1989; WOLF e WILDT, 1996, FRIESTED *et al.*, 2001; MURAKAMI *et al.*, 2002; KARJA *et al.*, 2002).

Cinco gatas, em média, foram castradas para realização de cada manipulação. Foram obtidos aproximadamente 15 CCOs – I por gata.

4.2 Maturação *in vitro*

Após a seleção, os CCOs foram lavados por cinco vezes em gotas de MEM-hepes (Gibco, 12360-038) acrescido de 4mg/mL de BSA (Sigma A4503), 1mM de piruvato de sódio (Sigma, P2256), 0,13mM de cisteína (Sigma, C1276), 100mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina.

Em seguida, foram lavados em cinco gotas de meio MIV: DMEM (Gibco, 11995-065) suplementado com 4mg/mL de BSA, 1mM de piruvato de sódio, 0,13mM de cisteína, 20ng/mL de IGF-I (Sigma, I1271), 10ng/mL de FGF-2 (Sigma, F0291), 10ug/mL de FSH (Folltropin[®], Vetrepharm), 1ug/mL de LH (Lutropin-V[®], Vetrepharm), 1ug/mL de estradiol (Sigma, E0130), 100mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina. A maturação foi realizada em placas com quatro poços (Nunc[®], Dinamarca), sendo colocados, em cada poço, 400uL de meio MIV e 20 a 30 CCOs. O período de maturação foi de 32 horas para

CCOs que foram fecundados (Experimento I) e de 36 horas para aqueles submetidos à ativação partenogenética (Experimento II). Foram maturados a temperatura de 38,5°C em atmosfera úmida de 5%O₂, 5%CO₂ e 90%N₂ (Figura 2).



Figura 2. Aspecto morfológico dos CCOs-I felinos selecionados para a maturação *in vitro* (MIV). (A) Oócitos antes da MIV. (B) Oócitos com expansão das células do *cumulus* após o período de maturação *in vitro*. Microscópio estereoscópio, aumento de 40X.

4.3 EXPERIMENTO I

4.3.1 Fecundação *in vitro* (FIV)

A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada após 32h de MIV, em gotas, cobertas por óleo mineral, de 90µL de meio TALP-FIV (Anexo 1) suplementado com 20µg/mL de heparina (Sigma H-3149), 6 mg/mL de BSA, 1mM de piruvato, 100mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina.

O sêmen, colhido por vagina artificial momentos antes da preparação, foi diluído 1:4 em meio TALP-Sêmen (Anexo1) suplementado com 6 mg/mL de

BSA, 1mM de piruvato, 100mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina e centrifugado a 300xg durante 10 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o pellet diluído em 30 uL de meio TALP-FIV. A motilidade espermática foi avaliada em microscópio com contraste de fase, a avaliação subjetiva foi expressa em porcentagem e o vigor avaliado em escala de zero a cinco. A concentração foi determinada em câmara de *Neubauer* após a diluição do sêmen em água destilada (1:100).

O volume de meio de TALP-FIV que foi adicionado ao sedimento (pellet + 30uL de meio) para se obter uma concentração de 1×10^7 espermatozóides móveis/mL foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Volume total} = \text{motilidade} \times \text{volume do sedimento} \times 0,5 \times n,$$

sendo n o número de espermatozóides contados na câmara de Neubauer e 0,5 um fator de correção. Essa fórmula foi elaborada para sempre obter-se 100.000 espermatozóides móveis em 10 uL do volume total.

Posteriormente, 10µL do sêmen diluído foram adicionados às gotas contendo de 10 a 15 oócitos, obtendo-se a concentração final de 1×10^5 espermatozóides móveis/gota. O período de coincubação foi de 18 h, em incubadora à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

4.3.2 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após 18 horas, os prováveis zigotos foram denudados por meio da passagem pelo lúmen estreito de pipeta de vidro e aleatoriamente submetidos a dois meios de cultivo, sendo dispostos em grupos de 10 a 15 em gotas de 90uL sob óleo mineral (Sigma, M8410).

- Meio SOFaa (Anexo 2) acrescido de 6 mg/mL de BSA, 1mM de piruvato, 1mM de glutamina, 2,7mM de mioinositol (Sigma, I5125), 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina.

- Meio FOC (Anexo 3) acrescido de 4 mg/mL de BSA, 0,1mM de piruvato, 1mM de glutamina, 0,1mM de taurina (Sigma, T0625), 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina.

A taxa de clivagem foi avaliada aproximadamente 72 horas após a fecundação. Os embriões clivados foram transferidos para gotas de 50 uL (10 oócitos/gota) do mesmo meio em que estavam sendo cultivados substituindo-se BSA por 5% SFB, o meio SOFaa foi suplementado com 1,5 mM de glicose. Durante os 7 dias de cultivo, os embriões foram incubados a 38°C em atmosfera úmida de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂.

No sétimo dia após a fecundação *in vitro* foi avaliada a taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

4.3.3 Avaliação da viabilidade celular

Os blastocistos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (com filtro de excitação de 340-380 nm e emissão de 430 nm) quanto à proporção de células viáveis (núcleos com fluorescência azul, corados pelo Hoechst 33342) e inviáveis (núcleos com fluorescência vermelha, corados pelo iodeto de propídio). Para tanto, os blastocistos foram incubados em gotas de iodeto de propídio (125ug/mL) por trinta segundos, lavados em PBS e fixados entre lâminas e lamínulas com 5uL de Hoechst 33342 (1mg/mL) diluído em glicerol, sendo levemente achatados por pressão manual.

4.3.4 Delineamento experimental

Foram realizadas quatro repetições a fim de avaliar qual o meio de cultivo mais adequado ao desenvolvimento embrionário.

Do total de embriões produzidos, 10% foram corados com Hoechst 33342 (Molecular Probes, H1399) e iodeto de propídio (Sigma, P4170) para avaliação da viabilidade celular.

Em todas as manipulações 10% dos oócitos foram separados a fim de avaliar a proporção de oócitos ativados partenogeneticamente, sendo submetidos a tratamento idêntico ao dos oócitos fecundados, exceto pela coincubação com espermatozóides.

4.3.5 Análise estatística

As taxas de clivagem, índice de blastocistos sobre os oócitos fecundados e índices de blastocistos sobre os oócitos clivados foram analisados pela análise de variância, a qual foi realizada pelo programa Sisvar 4.3 Daniel Furtado Ferreira 2003. O nível de significância utilizado foi 5%.

4.4 EXPERIMENTO II

4.4.1 Ativação oocitária

Após 36 horas de MIV, os oócitos foram desnudados com auxílio de uma micropipeta de vidro de ponta fina. Os oócitos totalmente desnudos foram distribuídos aleatoriamente aos tratamentos de ativação. Os tratamentos utilizados para a produção de embriões partenogénéticos diplóides foram os seguintes:

Tratamento 1: incubação em 5mM de ionomicina (Sigma, I0634) em MEM-hepes suplementado com 10% de SFB (Nutricell, Brasil) por 8 min em temperatura ambiente, seguida por incubação em MEM (Gibco, 11380-037) acrescido de 10% SFB, 10ug/mL de cicloheximide (Sigma, C1988) e 7,5ug/mL de citocalasina B (Calbiochem, 250233).

Tratamento 2: incubação em 5mM de ionomicina em MEM-hepes suplementado com 10% de SFB por 8 min em temperatura ambiente, seguida por incubação em MEM acrescido de 10% SFB, 66uM de roscovitine (Sigma, R7772) e 7,5ug/mL de citocalasina B.

Tratamento 3: incubação em 5mM de ionomicina em MEM-hepes suplementado com 10% de SFB por 8 min em temperatura ambiente, seguida por incubação em MEM acrescido de 10% SFB, 20mM de cloreto de estrôncio ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, J.T.BAKER, 4036-01) e 7,5ug/mL de citocalasina B.

Grupo Controle: os oócitos foram maturados e não ativados, ou seja, cultivados nos mesmos meios, mas na ausência de qualquer agente de ativação.

Os oócitos foram incubados em gotas de 90uL de meio SOFaa, segundo cada tratamento (15 oócitos/gota) à temperatura de $38,5^{\circ}\text{C}$ em atmosfera úmida de 5% O_2 , 5% CO_2 e 90% N_2 durante 6 horas.

4.4.2 Cultivo *in vitro*

Após o período de ativação, os oócitos foram lavados em SOFaa (Anexo 2) suplementado com 6mg/mL de BSA, 1mM de piruvato de sódio, 2mM de glutamina, 2,7 mM de mioinositol, 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina. Foram cultivados em gotas de 90uL (15 oócitos/gota) do mesmo meio em estufa com a temperatura de $38,5^{\circ}\text{C}$ em atmosfera úmida de 5% O_2 , 5% CO_2 e 90% N_2 , durante 72 horas.

4.4.3 Análise dos tratamentos de ativação

A avaliação das taxas de ativação foi realizada por meio da transferência dos oócitos, após o período de cultivo, para gotas de 5uL de Hoescht 33342 (1mg/mL) diluído em glicerol, sendo fixados entre lâmina e lamínula e avaliados em microscópio invertido Leica- DMIRB luz UV filtro nº 2 (350 a 461 nm). Foram considerados ativados os oócitos que apresentaram descondensação da cromatina ou que estavam clivados no momento da análise.

4.4.4 Delineamento experimental

Foram realizados seis procedimentos de ativação partenogenética para cada tratamento e controle, com média de 17 oócitos cada um.

Os tratamentos foram comparados quanto à porcentagem de oócitos ativados e não ativados, quanto à proporção de oócitos apresentando cromatina descondensada ou clivagem e quanto ao desenvolvimento embrionário aos estádios de 2 a 10 células, 10 a 16 células e 16 a 30 células.

Oócitos controle foram cultivados em paralelo com os oócitos tratados para garantir que as ativações foram promovidas pelos agentes de ativação e não pelas condições de cultivo.

4.4.5 Análise estatística

As taxas de oócitos ativados, não ativados, apresentando cromatina descondensada, clivados e de desenvolvimento embrionário foram avaliados pelo teste de qui-quadrado no programa Bioestat 5.0 com nível de significância de 5%.

4.4.6 Cultivo *in vitro* de blastocistos partenogenéticos

Como não foram obtidas diferenças significativas entre os tratamentos 72 horas após a ativação partenogenética e o protocolo ionomicina associado ao cicloheximide é o mais utilizados em felinos, este tratamento foi o escolhido para ativação oocitária permitindo o desenvolvimento embrionário até 7 dias após a ativação.

Para tanto, 182 oócitos foram ativados com objetivo de avaliar o desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Até 72 horas de cultivo o tratamento foi idêntico ao descrito acima. 72 horas após a ativação, as taxas de clivagem foram avaliadas e os embriões clivados foram transferidos para gotas

de 50 uL do mesmo meio acrescido de 1,5 mM de glicose e 5% SFB, sem BSA. Durante os 7 dias de cultivo, os embriões foram incubados a 38,5°C em atmosfera úmida de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂.

4.5 EXPERIMENTO III

4.5.1 Preparo da monocamada de fibroblastos (células de sustentação)

4.5.1.1 Obtenção e manutenção de fibroblastos embrionários felinos

Fetos de gatos com 30 a 45 dias de gestação foram submetidos à digestão enzimática para produção de fibroblastos. A cabeça e as vísceras dos fetos foram removidas e a carcaça foi cortada em pequenos pedaços em placa de petri contendo DMPBS e penicilina/estreptomicina. DMPBS e pedaços da carcaça foram centrifugados por 10 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de Tripsina Versene (Instituto Adolfo Lutz, 0,2% Tripsina e 0,02% Versene) a 36°C e centrifugados por mais 10 minutos. Ao *pellet* foram adicionados 4 mL de tripsina, sendo incubado a 38,5°C durante 30 minutos. Após esse período, a solução foi filtrada e centrifugada por 10 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em meio de cultivo: DMEM acrescido de 10% SFB (GIBCO, 12657-029), 100 mg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina e 3ug/mL de anfotericina B (Sigma, A2411). O material obtido foi dividido em três garrafas de cultivo celular de 25 cm² (Sarstedt, 831810300), as quais foram completadas com 5 mL de meio de cultivo e incubadas a 38,5°C em 5% CO₂ em ar. Após três dias de cultivo foi realizada a primeira troca de meio e com 90% de confluência foi realizada a tripsinização.

Para a tripsinização foi retirado todo o meio de cultivo das garrafas, que foram lavadas com DMPBS e preenchidas com 2 mL de Tripsina. As garrafas foram mantidas em estufa a 38,5°C por, no máximo, dez minutos até que todas as células se soltassem do fundo. Realizou-se então a neutralização com meio de cultivo na proporção de 3:1 (meio / tripsina). Uma amostra de 50 uL desta mistura de células e meio foi retirada e adicionada a 50 uL do corante *Tripan*

Blue (GIBCO, 15250-061). A câmara de *Neubauer* foi preenchida com esta solução e as células translúcidas dos quatro quadrantes mais externos foram contadas. As células coradas em azul permitiram a passagem do corante, portanto estavam mortas e não foram consideradas. O valor encontrado foi colocado na fórmula:

$$\frac{\text{Nº células contadas} \times 2 \text{ (fator de diluição)} \times 10^4}{4 \text{ (quadrantes lidos)}}$$

O resultado obtido é a concentração inicial (C_i), que foi colocado na fórmula: **$C_i \times V_i = C_f$ (concentração final, 1×10^6) $\times V_f$ (volume final de meio na garrafa)** para identificar a quantidade de meio + células que deveria ser adicionada às novas garrafas para se obter a concentração de 1×10^6 células.

A tripsinização foi realizada mais uma vez para que as células fossem congeladas em segunda passagem.

4.5.1.2 Congelação e descongelação dos fibroblastos embrionários felinos

Para a congelação, as células de cada garrafa foram tripsinizadas como descrito acima e foi realizada a contagem de células viáveis em câmara de *Neubauer*. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas na concentração de 1×10^6 em meio de congelação refrigerado (DMEM, 10% SFB, 10% dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, D2650)). Em seguida, foram distribuídas em criotubos. Os criotubos foram acondicionados em um tubo especialmente desenvolvido para a troca lenta de calor e permaneceram 24 horas em freezer -80°C . Após este período foram transferidos diretamente ao N_2 líquido.

Para a descongelação, os criotubos foram retirados do N_2 líquido e colocados em água à 37°C (até 2 minutos). Para a remoção do crioprotetor, o conteúdo do criotubo foi transferido a um tubo de centrífuga de 15mL ao qual foram adicionados 10mL de meio de cultivo e foram centrifugados a 1750 rpm durante 5 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 5mL de meio de cultivo.

Meio e fibroblastos foram transferidos para garrafas de cultivo celular e incubados a 38,5°C a uma atmosfera de 5% CO₂ em ar por três dias.

4.5.1.3 Inativação química dos fibroblastos

No dia anterior ao dia do isolamento da MCI, os fibroblastos que haviam sido descongelados foram incubados em meio de cultivo contendo 10ug/mL de mitomicina C (Sigma, M4287) durante 2,5 horas. Passado esse período, o meio foi descartado e a garrafa de cultivo foi lavada com 50 mL de DMPBS aquecido, sendo realizada cinco lavagens, 10mL por vez para que toda a mitomicina C fosse descartada. Depois de lavadas, as células foram tripsinizadas como descrito acima e plaqueadas a uma concentração de 140.000 células/poço em placas com 24 poços, cada poço apresentava 2cm² de área (Sarstedt, 831836300).

A densidade de células inicialmente plaqueadas em cada poço foi de 250.000 células, sendo testada a inativação com mitomicina C a 10 ug/mL, 5 ug/mL e 7,5 ug/mL durante 2,5 horas. Para cada concentração foram realizadas cinco repetições.

4.5.2 Isolamento da MCI

4.5.2.1 Dissociação mecânica

As MCIs de 110 embriões foram separadas dos trofoblastos por meio de uma lâmina de bisturi sob estereomicroscópio.

4.5.2.2 Imunocirurgia

A zona pelúcida foi removida com solução ácida de Tyrode (Sigma, T1788). Após, os embriões foram lavados e incubados por 60 minutos a 38°C em anticorpo anti-IgG de gato (Sigma, C6284) diluído 1:10 em meio DMEM-

F12 (Gibco, 11320-033). Após serem lavados, a lise do complemento foi induzida, incubando-os em complemento de cobaia (Sigma, S1639) diluído 1:10 em DMEM-F12 a 38⁰C por 60 minutos. Em seguida, os embriões foram lavados e a MCI liberada das células lisadas do trofoblasto pela passagem pelo lúmen estreito de pipeta de vidro (Figura 3). Dez embriões tiveram as MCIs isoladas por imunocirurgia.

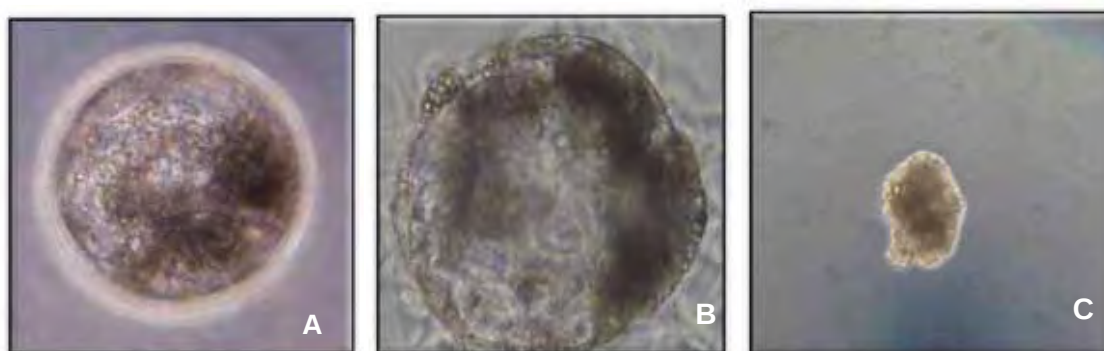


Figura 3. Isolamento da MCI por imunocirurgia. (A) Blastocisto antes da incubação em solução ácida de Tyrode. (B) Blastocisto após a incubação em solução ácida de Tyrode. (C) Embrião após a incubação em complemento de cobaia. Microscópio invertido, aumento de 400X A, C e aumento de 800X B.

4.5.3 Cultivo da MCI

No dia do isolamento da MCI, o meio dos fibroblastos inativados foi substituído por meio de cultivo de CTE.

Inicialmente foram testadas duas fontes protéicas: SFB e substituto do soro Knockout (GIBCO, 10828-028) (Figura 4).

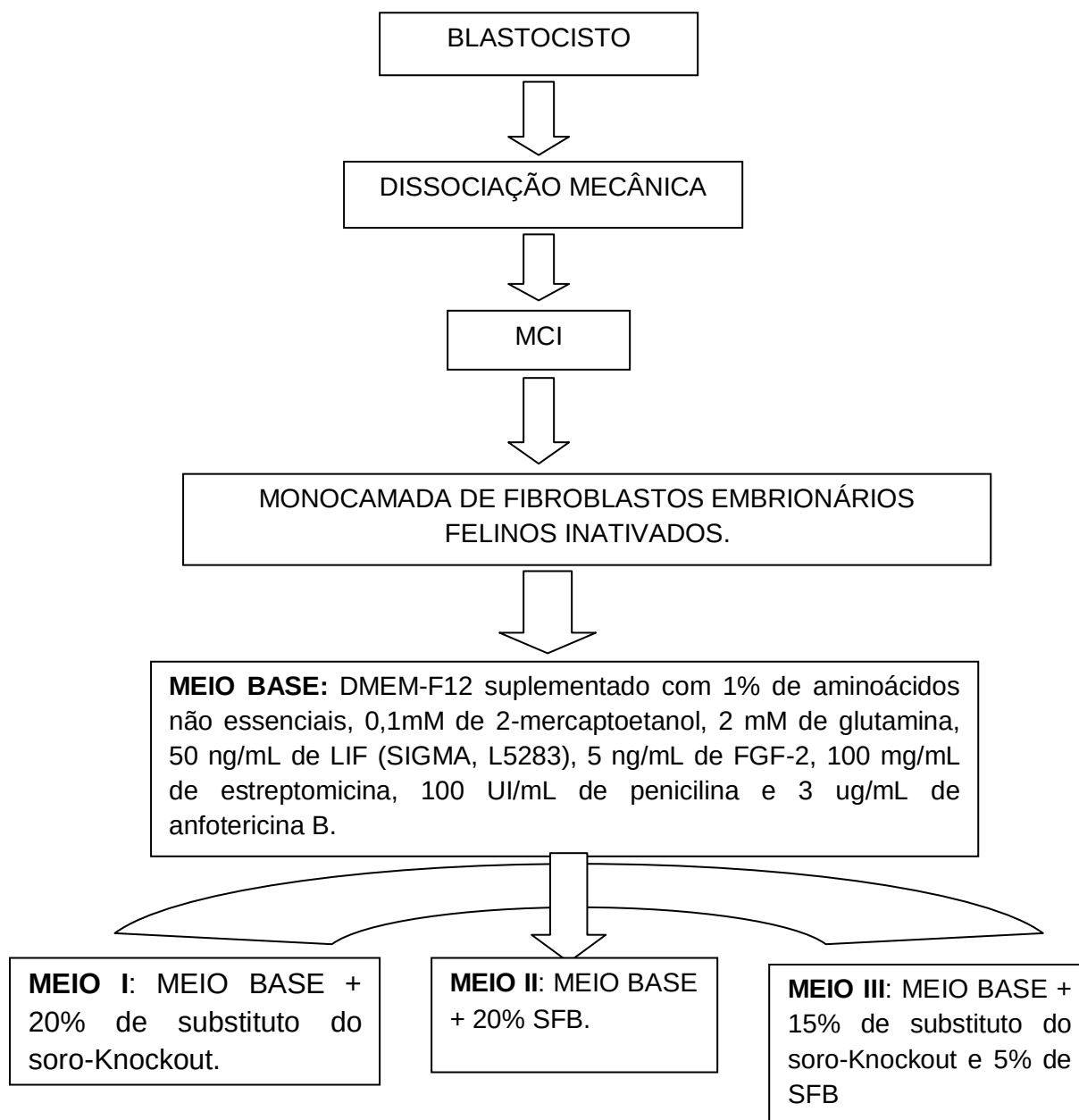


Figura 4. Delineamento experimental seguido no cultivo *in vitro* de MCI isolada por dissociação mecânica a fim de avaliar a melhor fonte proteica.

Além desses (figura 4), foram testados outros três meios de cultivo celular utilizando-se 20% de SFB como fonte proteica, os quais diferiram quanto a algumas modificações em relação à adição de aminoácidos, concentração de glicose do meio, piruvato de sódio e FGF-2.

MEIO IV: DMEM-F12 suplementado com 20% SFB, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de aminoácidos essenciais (Sigma, B6766), 2mM de glutamina,

0,1mM de 2-mercaptoetanol, 50ng/mL de LIF, 100 mg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina e 3ug/mL de anfotericina.

MEIO V: DMEM baixa glicose : F12 (1:1) suplementado com 20% SFB, 1% de aminoácidos não essenciais, 2mM de glutamina, 0,1mM de 2-mercaptoetanol, 50ng/mL de LIF, 100 mg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina e 3ug/mL de anfotericina. (DMEM: Gibco, 10567-014; F12 - Gibco, 11765-047).

MEIO VI: DMEM–F12 suplementado com 20% SFB, 1% de aminoácidos não essenciais, 2mM de glutamina, 0,1mM de 2-mercaptoetanol, 1mM de piruvato, 5 ng/mL de FGF-2, 50ng/mL de LIF, 100 mg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina e 3ug/mL de anfotericina. O complemento de cobaia e o anti-IgG de gato utilizados na imunocirurgia foram diluídos neste meio.

As MCIs isoladas por imunocirurgia foram cultivadas apenas no MEIO VI por ser o meio mais completo.

O cultivo da MCI, independente do meio utilizado foi realizado a 38,5⁰C a uma atmosfera de 5%CO₂ em ar. O meio foi trocado a cada dois dias.

4.5.4 Isolamento e cultivo da MCI de embriões partenotos

MCIs foram isoladas de três blastocistos iniciais por meio da dissociação mecânica e colocadas para serem cultivadas sob fibroblastos felinos inativados em meio de cultivo VI.

4.5.5 Imunocitoquímica

15 blastocistos foram examinados por imunocitoquímica quanto à presença da proteína Oct4. Para isso, os embriões foram fixados em 3% de paraformaldeído por 20 minutos e, em seguida, impermeabilizados em DMPBS acrescido de 0,2% de Triton X-100 e de 0,2% de gelatina de pele de suíno (Sigma, G1890) por 5 minutos. O anticorpo primário Oct 3/4 (Goat Polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, SC-8628) foi diluído 1:100 em DMPBS e

aplicado aos embriões por 60 minutos. Após, esses embriões foram incubados com o anticorpo secundário rabbit anti goat IgG associado ao Alexa Flúor 555 (Invitrogen, A21431) diluído 1:500 durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os embriões foram lavados, montados em lâminas, recobertos por lamínula e analisados em microscópio de fluorescência com o filtro vermelho (excitação 555nm e emissão 565nm). Os mesmos embriões também foram corados com Hoechst 33342. Para tanto, no momento da confecção das lâminas foram acrescentados 5 uL de Hoechst 33342 diluído em glicerol a uma concentração de 1mg/mL e analisados em filtro UV (350 a 461 nm).

As MCIs aderidas também foram avaliadas quanto à presença da proteína Oct4. Fibroblastos inativados e MCIs aderidas foram incubados em DMPBS contendo anticorpo primário Oct 3/4 a uma diluição de 1:100 durante 60 minutos. Após, foram lavados e incubados com o anticorpo secundário rabbit anti goat IgG associado ao Alexa Flúor 555 diluído 1:500 durante 30 minutos. Em seguida, foram lavados com DMPBS e analisados em microscópio de fluorescência com o filtro vermelho (excitação 555nm e emissão 565nm).

4.5.6 Análise estatística

As porcentagens de MCIs aderidas nas duas formas de isolamento e nos diferentes meios de cultivo foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado no programa Bioestat 5.0, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO I

Embora numericamente o uso do meio SOF tenha apresentado melhores resultados, estatisticamente não houve diferença entre os dois meios de cultivo testados (Tabela 1). Entretanto, a variabilidade dos resultados obtidos foi maior no meio FOC quando comparado ao meio SOFaa (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados comparativos das repetições de cada meio com relação à porcentagem de clivagem, índice de blastocisto sobre os oócitos fecundados e índice de blastocisto sobre oócitos clivados.

REPETIÇÕES	MEIOS	Oócitos fecundados	Índice de Clivagem (%)	Índice de blastocisto sobre oócitos (%)	Índice de blastocisto sobre clivados (%)
1	SOFaa	48	81	43,7	53,8
1	FOC	48	58	12,5	21,4
2	SOFaa	48	60	27,08	44,8
2	FOC	53	45	11,3	25
3	SOFaa	33	54	33	61
3	FOC	27	59	33	56
4	SOFaa	48	60	29	48
4	FOC	45	40	15	38
MÉDIA ± EPM	SOFaa		63,75±5,92a	33,2±3,71a	51,9±3,56a
MÉDIA ± EPM	FOC		50,5±4,73a	17,95±5,07a	35,1±7,8a

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P>0,05$).

EPM: erro padrão da média.

No total, foram obtidos 59 blastocistos cultivados em meio SOF (Figura 5) e 29 blastocistos cultivados em meio FOC (Figura 5). Desses, 6 (SOF) e 3 (FOC) foram avaliados quanto à proporção de células viáveis. Os embriões cultivados em meio SOF, aparentemente, apresentaram maior viabilidade do que os embriões cultivados em meio FOC (Figura 6).

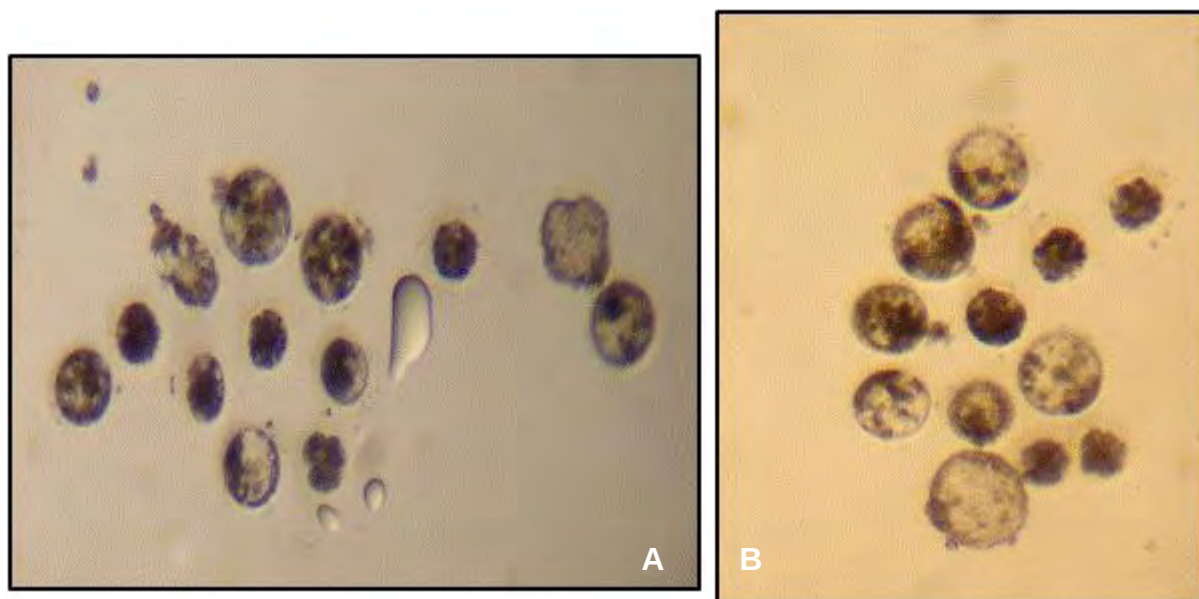


Figura 5 Embriões sete dias após a FIV. (A) cultivados em meio FOC; (B) cultivados em meio SOF. Microscópio estereoscópio, aumento de 40X.

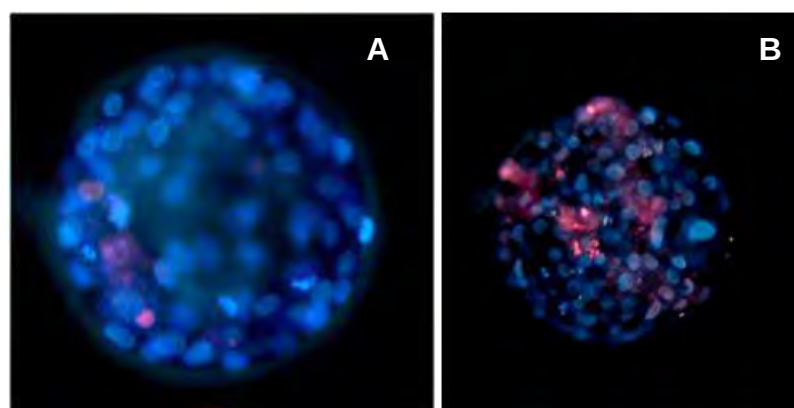


Figura 6 Embriões corados com Hoechst 33342 e iodeto de propídio. (A) Embrião cultivado em meio SOF; (B) Embrião cultivado em meio FOC. Células coradas em azul são viáveis (Hoechst 33342) e células coradas em vermelho são células degeneradas (iodeto de propídio). Note que a proporção de células viáveis é maior no embrião cultivado em meio SOF. Microscópio invertido, aumento de 400x B e aumento de 800X A.

Como mostrado na tabela 2, as taxas de oócitos ativados partenogeneticamente foi elevada e não diferiu significativamente entre os meios. Entretanto os embriões partenotos não se desenvolveram a blastocistos.

Tabela 2. Índice de clivagem partenogenética espontânea e de blastocistos nos meios FOC e SOF.

REPETIÇÕES	MEIOS	OÓCITOS	ÍNDICE DE CLIVAGEM	ÍNDICE DE BLASTOCISTOS
1	SOFaa	5	40%	0
1	FOC	5	60%	0
2	SOFaa	5	20%	0
2	FOC	5	0%	0
3	SOFaa	4	25%	0
3	FOC	4	25%	0
4	SOFaa	4	25%	0
4	FOC	4	25%	0
MÉDIA±EPM	SOFaa		27,5±4,33a	
MÉDIA±EPM	FOC		27,5±10,65a	

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P>0,05$).

EPM: erro padrão da média.

5.2 EXPERIMENTO II

Como mostrado na tabela 3 e na figura 7, não foram observadas diferenças significativas quanto às taxas de ativação entre os tratamentos ($P>0,05$), mas sim entre os tratamentos e o controle ($P<0,05$).

Tabela 3. Proporções (porcentagem) de ativação oocitária nos diferentes tratamentos.

TRATAMENTO	Não ativados (%)	Ativados (%)
CONTROLE	64/100 (64,0) a	36/100 (36,0) b
CICLOHEXIMIDE	31/103 (30,1) b	72/103 (69,9) a
ROSCOVITINE	25/107 (23,4) b	82/107 (76,6) a
ESTRÔNCIO	35/99 (35,4) b	64/99 (64,6) a

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P<0,05$).

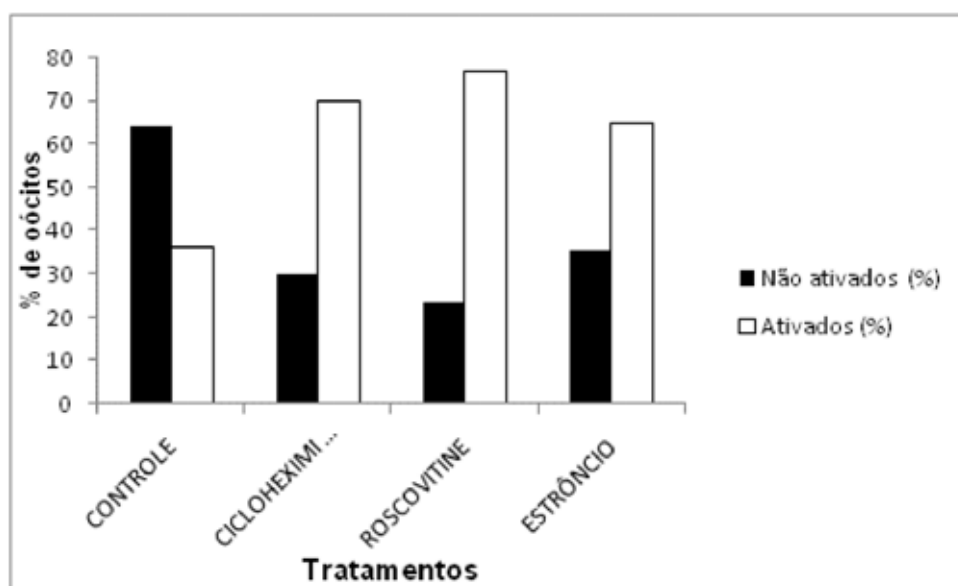


Figura 7. Porcentagem de oócitos ativados e não ativados no grupo controle e em cada tratamento. (CICLO: cicloheximide, ROSCO: roscovitine e EST: estrônio).

Quanto às taxas de clivagem, após a ativação partenogenética, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$), mas sim entre eles e o controle ($P < 0,05$). A porcentagem de oócitos que apresentaram cromatina descondensada, mas não sofreram clivagem não diferiu entre os tratamentos nem entre os tratados e o controle ($P > 0,05$) (Tabela 4, Figura 8).

Tabela 4. Proporções (porcentagens) de oócitos ativados que clivaram ou apresentaram apenas descondensação da cromatina em relação ao total de oócitos tratados em cada tratamento e controle.

TRATAMENTO	UMA CÉLULA (%)	CLIVADOS (%)
CONTROLE	24/100 (24,00)a	12/100 (12,00)b
CICLOHEXIMIDE	24/103 (23,30)a	48/103 (46,60)a
ROSCOVITINE	32/107 (29,91)a	50/107 (46,73)a
ESTRÔNCIO	32/99 (32,32)a	32/99 (32,32)a

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$).

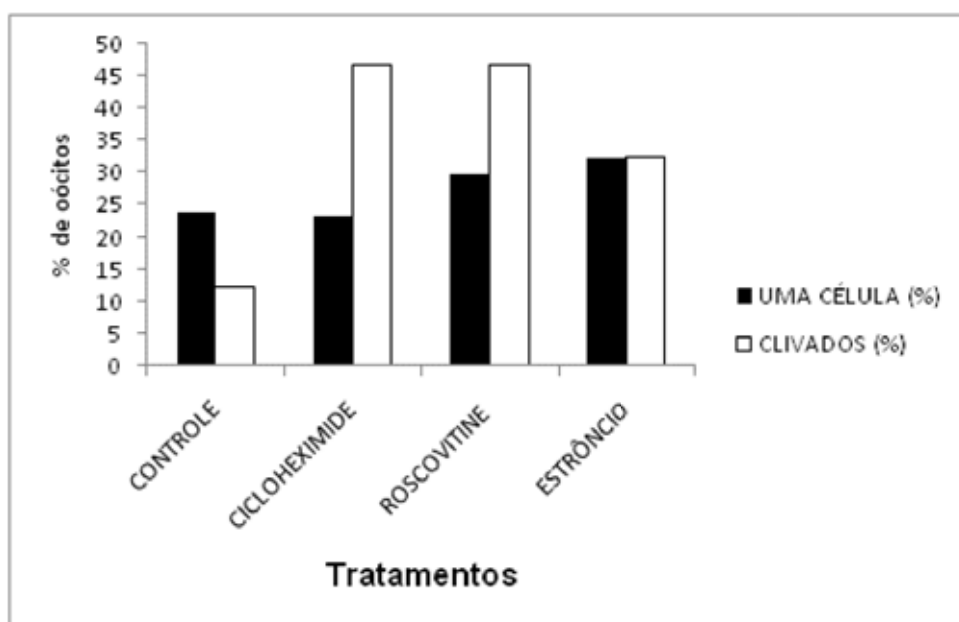


Figura 8. Proporção de oócitos ativados que apresentaram apenas núcleo descondensado (uma célula) e que clivaram em cada tratamento e controle. (CONT: controle; CICLO: cicloheximide; ROSCO: roscovitine e EST: estrônio).

Com relação ao desenvolvimento embrionário dos oócitos clivados aos estádios de 2 a 10 células, 10 a 16 células e 16 a 30 células não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), mas sim entre os tratados e o controle ($P < 0,05$) (Tabela 5, Figura 9).

Tabela 5. Proporções (Porcentagens) de oócitos clivados e de desenvolvimento embrionário segundo tratamentos e controle.

Tratamento	Oócitos Tratados	Oócitos Clivados (%)	Desenvolvimento embrionário a:		
			2 a 10 céls	10 a 16 céls.	16 a 30 céls.
CONTROLE	100	12 (12)a	11 (91,67)a	0 (0,00)a	1 (8,33)b
CICLOHEXIMIDE	103	48 (46,60)b	28 (58,33)b	8 (16,67)b	12 (25,00)a
ROSCOVITINE	107	50 (46,72)b	28 (56,00)b	11 (22,00)b	11 (22,00)a
ESTRÔNCIO	99	32 (32,32)b	19 (59,37)b	6 (18,75)b	7 (21,88)a

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$).

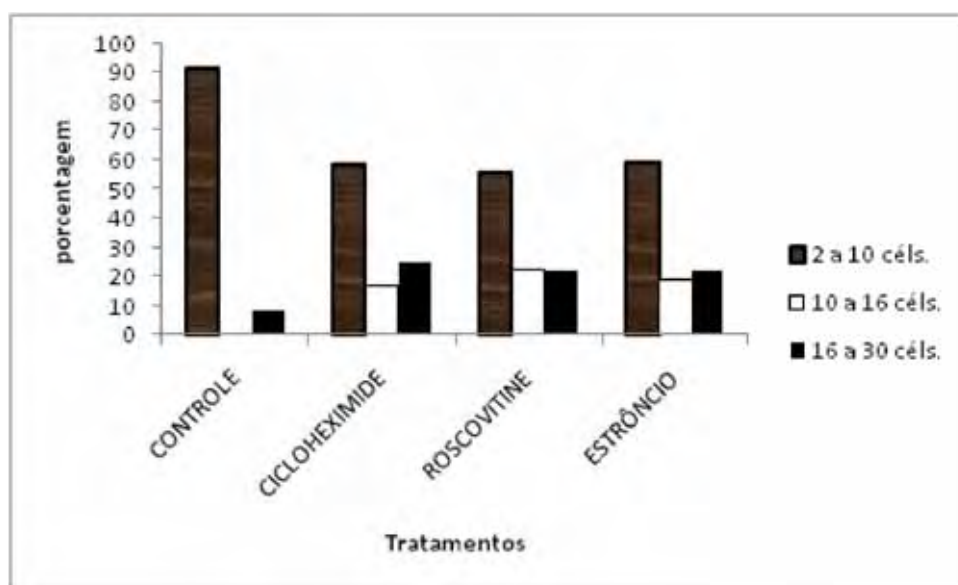


Figura 9. Proporção de oócitos clivados que se desenvolveram aos estádios de 2 a 10 células, 10 a 16 células, 16 a 30 células em cada tratamento e no controle.

Na tabela 6 estão dispostos o número de oócitos ativados com ionomicina associada ao cicloheximide em cada repetição, assim como as taxas de clivagem obtidas e a proporção de embriões que se desenvolveram ao estágio de blastocisto. Também está representado a média e o desvio padrão da média para porcentagem de clivagem e taxas de formação de blastocistos.

Tabela 6. Resultados das ativações oocitárias com ionomicina associada ao cicloheximide em relação à porcentagem de clivagem e índice de blastocisto sobre os oócitos ativados.

Repetições	Nº de oócitos	Índice de Clivagem n (%)	Índice de Blastocisto (D7) n (%)
1	50	20 (40%)	1 (2%)
2	44	22 (50%)	0 (0%)
3	39	23 (58,97%)	0 (0%)
4	49	18 (36,73%)	2 (4%)
Média ± DPM		46,25±10	1,5±1,91

DPM: desvio padrão da média.

5.3 EXPERIMENTO III

5.3.1 Preparo da monocamada de fibroblastos

A densidade inicial de 250.000 células/poço suportou a aderência dos fibroblastos somente até a primeira troca de meio realizada três dias após o plaqueamento. A princípio acreditou-se que o problema estivesse na concentração de mitomicina C utilizada. A concentração foi reduzida para 5 ug/mL e 7,5 ug/mL, entretanto o problema não foi resolvido. Então, a densidade de fibroblastos inativados foi diminuída para 140.000 células/poço, os quais, morfológicamente avaliando, formaram uma boa camada de sustentação para a aderência da MCI (Figura 10).

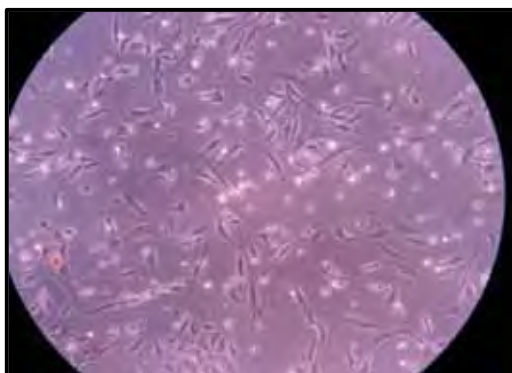


Figura 10. Monocamada de fibroblastos felinos inativados.

5.3.2 Isolamento da MCI

Como mostrado na figura 11, a porcentagem de MCIs aderidas foi significativamente maior quando o isolamento foi realizado por meio da dissociação mecânica ($P < 0,05$).

As MCIs aderiram de um a três dias após serem colocadas em cocultivo em ambas as formas de isolamento.

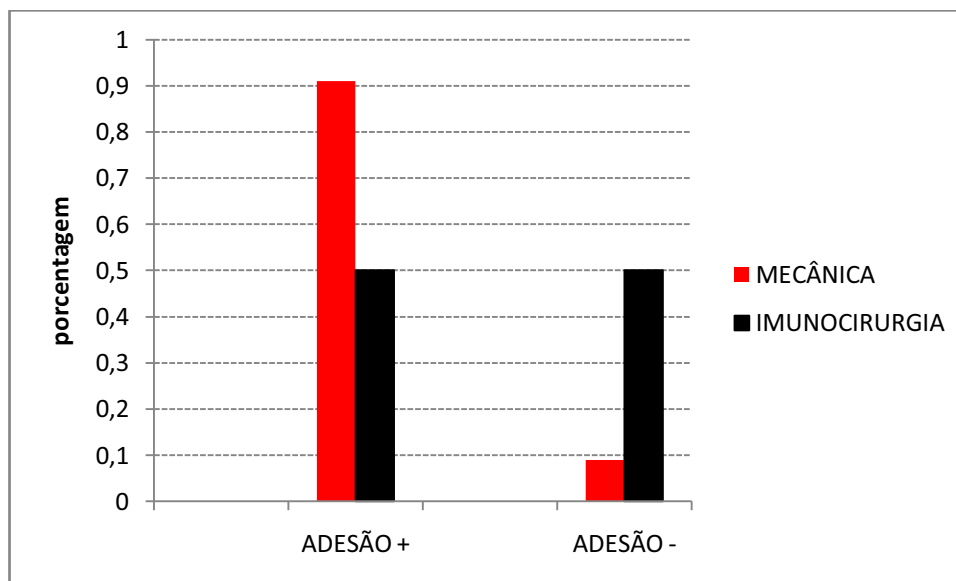


Figura 11. Representação gráfica da porcentagem de MCIs aderidas e não aderidas segundo a forma de isolamento. 91% (100/110) das MCIs isoladas por dissociação mecânica aderiram, enquanto apenas 50% (5/10) das isoladas por imunocirurgia aderiram.

Foi observado que 3 MCIs isoladas por imunocirurgia apresentaram coloração enegrecia, indicando sua lise (Figura 12).

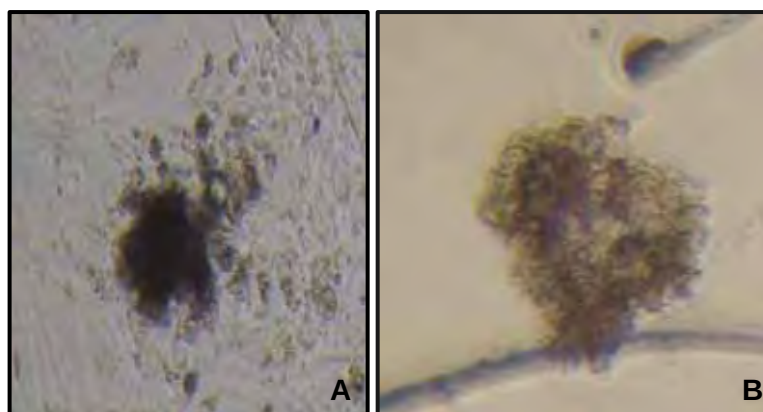


Figura 12. (A): MCI isolada por imunocirurgia. (B): MCI isolada por dissociação mecânica. Repare como a MCI isolada por imunocirurgia está mais enegrecida do que a isolada por dissociação mecânica. (A) Microscópio invertido aumento de 400X; (B) Microscópio estereoscópio, aumento de 80X.

Não foram observadas formações de colônias em nenhuma das formas de isolamento da MCI.

5.3.3 Cultivo da MCI

Não houve diferenças significativas quanto à aderência da MCI e formação de colônias quando diferentes fontes proteicas foram utilizadas (MEIO I, II, III), nem com a adição de aminoácidos essenciais (MEIO IV), diminuição da concentração de glicose do meio (MEIO V) ou adição de FGF-2 e piruvato de sódio (MEIO VI) (Tabela 7).

Tabela 7. Proporções (Porcentagens) de aderência das MCIs isoladas por dissociação mecânica em diferentes meios de cultivo.

	MEIO I	MEIO II	MEIO III	MEIO IV	MEIO V	MEIO VI
ADERÊNCIA DA MCI	18/20 (90%)a	18/20 (90%)a	18/20 (90%)a	9/10 (90%)a	9/10 (90%)a	28/30 (93%)a

Letras iguais não diferem ($P > 0,05$).

Não foram observadas formações de colônias em nenhum dos meios de cultivo analisados.

As MCIs isoladas por dissociação mecânica e cocultivadas no meio V com DMEM baixa glicose:F12 apresentaram similar taxa de aderência, entretanto a morfologia das células aderidas apresentou-se muito ruim após uma semana (Figura 13). Esta morfologia foi apresentada após 20 dias de cultivo nos outros meios.

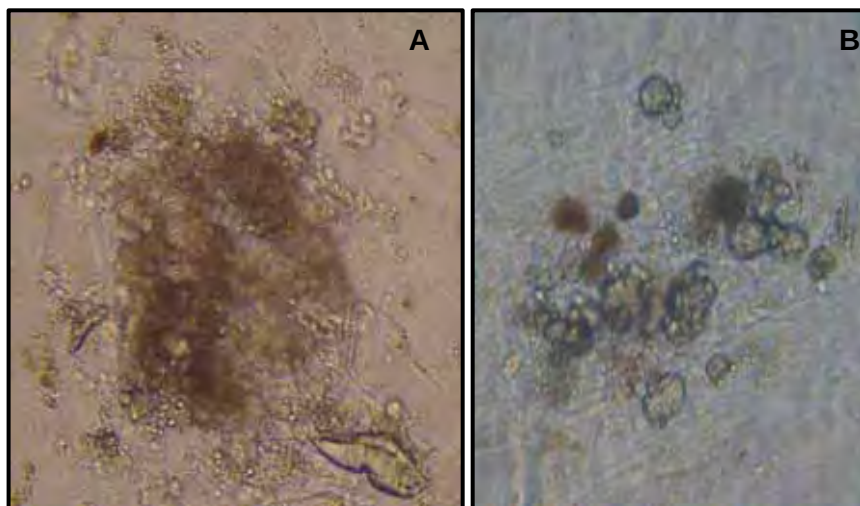


Figura 13. (A) MCI aderida três dias após o cocultivo. (B) MCI aderida com uma semana após o cocultivo no meio DMEM baixa glicose:F12 (Meio V). Essa mesma morfologia foi apresentada pelas MCIs aderidas nos outros meios após 20 dias de cocultivo. Note que as células apresentam-se retraídas, com coloração enegrecida. (Microscópio invertido aumento de 400X).

5.3.4 Isolamento e cultivo da MCI de embriões partenotos

As três MCIs não aderiram à placa de cultivo celular.

5.3.5 Imunocitoquímica

Por imunofluorescência observou-se que a proteína OCT4 estava presente tanto na MCI quanto no trofoblasto dos blastocistos produzidos *in vitro* (Figura 14).

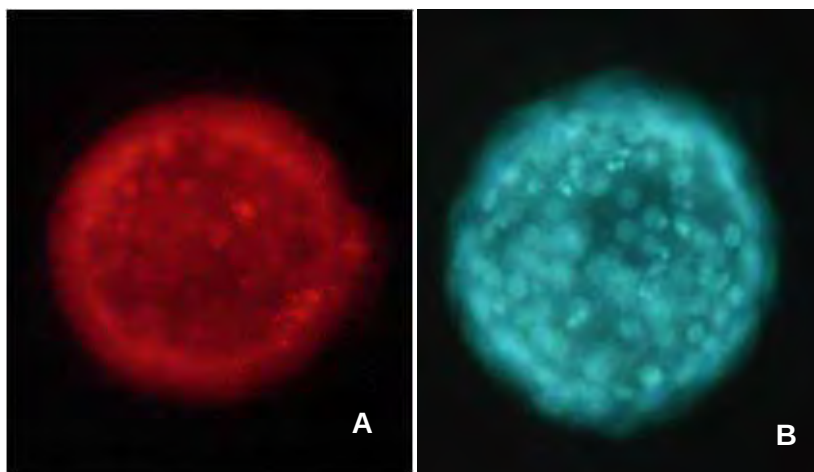


Figura 14. (A) Blastocisto felino apresentando a proteína Oct4 na MCI e trofoblasto. (B) Blastocisto corado com Hoechst 33342. (Microscópio invertido, aumento de 400X).

A proteína Oct4 foi detectada, também, na MCI aderida (Figura 15).

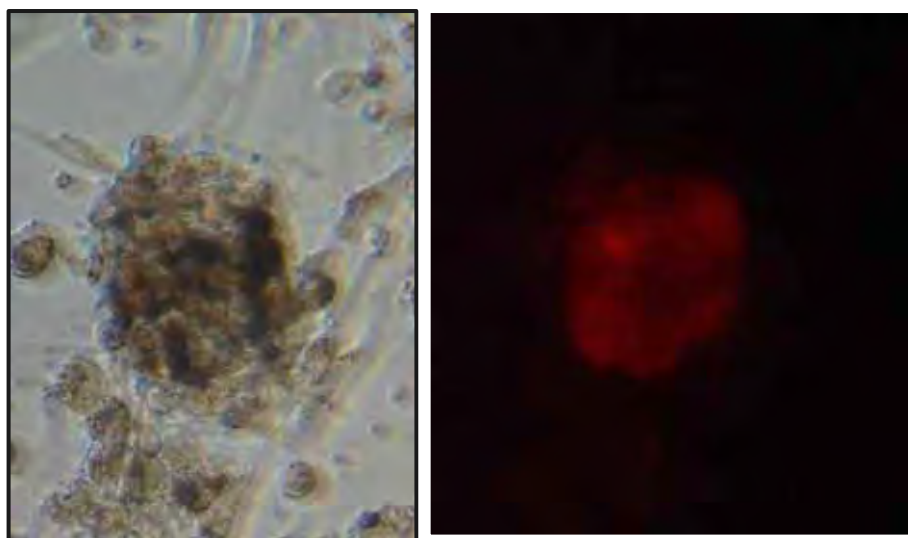


Figura 15. MCI de embrião felino com 10 dias de cocultivo submetida à imunocitoquímica para avaliar a presença de Oct4. (Microscópio invertido, aumento de 400X).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Herrick *et al.* (2007) desenvolveram uma série de experimentos com o objetivo de investigar a fisiologia do embrião do gato doméstico e assim desenvolver um meio de cultivo mais adequado ao desenvolvimento embrionário.

Segundo os resultados encontrados, o desenvolvimento embrionário foi maior em concentrações de 100mM de NaCl do que de 120mM, sendo, portanto, beneficiado por concentrações reduzidas de NaCl. O SOFaa utilizado nesse experimento continha 107,6mM de NaCl e o meio desenvolvido por Kanda *et al.* (1998) chamado MK-1 116,36mM de NaCl, sendo ambos adequados ao desenvolvimento embrionário, portanto dados discordantes aos de Herrick *et al.* (2007), pois ao que parece, a faixa de concentração de 100 a 120 mM de NaCl não interfere significativamente com os resultados. Pequenas alterações na osmolaridade do meio podem ser minimizadas pela adição de glutamina, taurina, inositol e aminoácidos não essenciais ao meio, pois esses podem atuar como osmólitos, estabilizando o volume e a função celular quando a osmolaridade está alterada (LIU e FOOTE, 1996; DUMOLIN *et al.*, 1997).

Foi sugerido que embriões bovinos produzidos *in vitro* deveriam ser expostos aos aminoácidos desde a fase de maturação do oócito, dessa forma a quantidade de mRNA materno seria aumentada favorecendo o desenvolvimento embrionário pré-implantação (WATSON *et al.*, 2000). Entretanto, a quebra espontânea desses aminoácidos resultante da deaminação metabólica pode comprometer o desenvolvimento por aumentar as concentrações de amônio no meio de cultivo (ORSI e LEESE, 2004), o qual é tóxico ao embrião.

A adição de aminoácidos essenciais ao meio de cultivo de embriões felinos diminuiu a proporção de clivagem, não afetando o número de blastocistos totais, mas sim a qualidade desses blastocistos, observando-se menor número de células (HERRICK *et al.*, 2007).

Contrariamente aos resultados apresentados por Herrick *et al.* (2007), quando 3% de aminoácidos essenciais foram adicionados ao meio de cultivo SOFaa não se observou taxas de clivagem inferiores, mas sim com tendência a serem superiores às do meio FOC, ao qual não foram adicionados aminoácidos essenciais. Zander *et al.* (2006) relataram que a concentração de amônio nem sempre altera o desenvolvimento do blastocisto, entretanto a viabilidade dos blastômeros é significativamente prejudicada.

Similarmente aos resultados deste trabalho, Karja *et al.* (2002b) conseguiram porcentagem de 39% de oócitos fecundados que se desenvolveram ao estágio de blastocistos, os quais também foram cultivados na presença de aminoácidos essenciais (2%). A diferença entre as concentrações de piruvato utilizadas pode ter sido a responsável pelos resultados discrepantes com relação aos resultados de Herrick *et al.* (2007), pois sabe-se que embriões bovinos em cultivo competem pelo íon amônio presente no meio ao utilizá-lo para converter piruvato a alanina, a qual é secretada e não prejudica o desenvolvimento embrionário (ORSI, 2004). Karja *et al.* (2002b) adicionaram três vezes mais piruvato do que Herrick *et al.* (2007) ao meio de cultivo, enquanto no presente experimento foi adicionado 10 vezes mais no meio SOFaa do que no meio FOC.

A adição de SFB ao meio de cultivo do terceiro ao sexto dia pós-inseminação melhorou o desenvolvimento embrionário, com 70% dos embriões clivados se desenvolvendo a blastocisto, enquanto na ausência de SFB foi relatado apenas 15% de desenvolvimento (HERRICK *et al.*, 2007).

Os efeitos da suplementação do meio de cultivo com SFB ou BSA foram estudados por Karja *et al.* (2002b), os quais não encontraram diferença quanto à proporção de clivagem e desenvolvimento aos estádios de mórula e blastocisto. A quantidade de zigotos que se desenvolveram aos estádios de blastocisto em eclosão e eclodido e o número médio de células dos blastocistos foram significativamente maiores em meio suplementado com SFB. Esses resultados foram de encontro aos de Kanda *et al.* (1998) que afirmaram que a suplementação com SFB inibiu as primeiras clivagens e causou o bloqueio de mórula a blastocisto.

No presente estudo adicionou-se 5% de SFB ao SOFaa e ao FOC do terceiro ao sétimo dia pós-fecundação a partir dos resultados obtidos por Kanda *et al.* (1998) e Herrick *et al.* (2007). Entretanto, os resultados obtidos foram inferiores aos de Herrick *et al.* (2007) tanto para SOFaa quanto para FOC. Isto, provavelmente, está relacionado com o fato desses autores terem fecundado oócitos maturados *in vivo*, uma vez que a competência desses é bastante superior a dos maturados *in vitro*, a taxa de 70% de embriões clivados se desenvolvendo a blastocistos foi anteriormente relatada por Kanda *et al.* (1998) também com oócitos maturados *in vivo*, não sendo de nosso conhecimento outros resultados alcançando taxa tão elevada para felinos.

Swanson *et al.* (1996) sugeriram que, durante o cultivo embrionário inicial, a presença de glicose em meio de cultivo leva ao bloqueio de mórula a blastocisto.

Corroborando com tais conclusões, quando o cultivo embrionário foi realizado em meio Waymouth contendo 27,75mM de glicose, as taxas de clivagem e o desenvolvimento ao estágio de mórula foram baixos e mórulas cultivadas em Ham's F10 (6,1mM de glicose) e Waymouth não se desenvolveram a blastocistos (MURAKAMI *et al.*, 2002). Em relação ao meio Ham's F10, os autores sugeriram que além da alta concentração de glicose a presença de hipoxantina pode estar relacionada com o bloqueio do desenvolvimento embrionário como foi relatado em ratos (DIENHART *et al.*, 1997). A hipoxantina bloqueia o desenvolvimento embrionário devido a depleção dos níveis de fosforribosilpirofosfato (PRPP), o que compromete a atividade de outras vias dependentes de PRPP, as quais participam do processo necessário para divisão celular, levando a uma interrupção das clivagens e conseqüente bloqueio do desenvolvimento (DIENHART *et al.*, 2007). Murakami *et al.* (2002) enfatizaram a importância de suplementar o meio com SFB quando embriões forem cultivados em Ham's F10, pois os efeitos da hipoxantina tornam-se mais evidentes em meios de cultivo sem a adição de soro visto que possíveis agentes anti-oxidantes presentes no SFB devem proteger os embriões dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio geradas com a oxidação da xantina e hipoxantina.

No entanto, Johnston *et al.* (1991b) relataram que o meio de cultivo contendo baixas concentrações de glicose (<6,1mM) melhoram o desenvolvimento embrionário quando comparado ao meio sem adição de glicose.

Da mesma forma, Kanda *et al.* (1998) e Herrick *et al.* (2007) relataram que a suplementação do meio de cultivo com 1,5mM de glicose é favorável ao desenvolvimento embrionário.

Neste experimento, os dados obtidos com a adição de 1,5mM de glicose ao meio SOFaa no período pós-compactação tendeu a ser melhor do que os obtidos com a adição de igual concentração no meio FOC nos períodos pré e pós compactação em relação ao total de oócitos fecundados e embriões clivados se desenvolvendo a blastocistos.

Ao realizar a fecundação em período igual ao deste experimento, ou seja, 32 horas após a maturação *in vitro*, Wolf e Wildt (1996) obtiveram 69,4% de clivagem e 13,3% de formação de blastocistos em relação aos oócitos fecundados cultivando os embriões em meio Ham's F10 suplementado com SFB. Com relação ao cultivo em meio SOFaa, esses resultados se equiparam aos aqui relatados com relação à taxa de clivagem, que foi, em média, 63,75%, entretanto nosso índice de blastocistos foi superior (em média, 33,2%). Por outro lado a produção de blastocistos reportada por Wolf e Wildt (1996) foi similar à obtida com o cultivo em meio FOC (aproximadamente 17,95%).

Os resultados obtidos com o meio SOFaa foram similares aos de Nagano *et al.* (2008), que relataram 66,3% de clivagem e 24,8% de blastocistos derivados de oócitos maturados por 30 horas e cultivados em meio SOF por sete dias.

Freisted *et al.* (2001) também cultivaram embriões em meio SOFaa e os resultados por eles obtidos foram semelhantes aos aqui apresentados, ou seja, 30,9% de blastocistos em relação aos oócitos fecundados e clivagem aparentemente menor (50%). Portanto pode-se afirmar que o SOFaa é um meio adequado ao desenvolvimento de embriões felinos. Os resultados da produção de embriões cultivados nesse meio têm sido equiparados aos obtidos com o meio MK-1 (KARJA *et al.*, 2002b, KARJA *et al.*, 2002a). O meio FOC

embora não diferindo estatisticamente do meio SOFaa, numericamente se mostrou inferior e a variabilidade entre as repetições foi mais marcante.

Murakami *et al.* (2002) obtiveram taxas de clivagem partenogenética de oócitos felinos variando de 0 a 31,6% e Nagano *et al.* (2008) de 23,3%. No presente estudo as taxas de partenogênese também foram elevadas (aproximadamente 27,5%, para SOF e para o FOC).

Já foi comprovado que o envelhecimento do oócito favorece a ativação oocitária (MEO *et al.*, 2004; SOLOY *et al.*, 1997). Bogliolo *et al.* (2002) relataram que após 24 horas de maturação *in vitro* oócitos felinos em Metáfase II apresentaram níveis significativamente mais altos de MAPK e MPF do que oócitos maturados por 40 horas. Entretanto, é arriscado atribuir as taxas de ativação partenogenética obtidas ao período de maturação, visto que Wolfe e Wildt (1996) maturaram oócitos por 32 horas e obtiveram 3,7% de ativação partenogenética. Ao maturar oócitos por 28 horas, Godard *et al.* (2008) relataram 0% de ativação partenogenética. Tais períodos de maturação são muito próximos aos utilizados por Murakami *et al.* (2002), Nagano *et al.* (2008) e ao do presente experimento que foram de 24, 30 e 32 horas, respectivamente.

Acredita-se, portanto, que o meio TALP-FIV e Brackett & Oliphant (Murakami *et al.*, 2002; Nagano *et al.*, 2008) contenham alguma substância, desconhecida até então, que desencadeie os eventos relacionados à ativação oocitária em parte dos oócitos que não foram fecundados.

Embora a ativação oocitária seja favorecida pelo envelhecimento do oócito, o desenvolvimento embrionário fica comprometido (SKRZYSZOWSKA *et al.*, 2002; KARJA *et al.*, 2006). Oócitos maturados por 42 a 45 horas mostraram sinais de envelhecimento e baixo desenvolvimento a blastocisto (SKRZYSZOWSKA *et al.*, 2002 KATSKA-KSIAZKIEWICZ *et al.*, 2003). Dessa forma, no experimento II, os oócitos submetidos aos tratamentos de ativação oocitária foram maturados durante 36 horas.

No experimento II foram obtidos 36% de ativação espontânea, o que está em total desacordo com os resultados encontrados por Gabrieć *et al.*

(2007), os quais relataram apenas 2% dessa ativação. Embasados no trabalho de Bogliolo *et al.* (2004) pode-se sugerir que após 36 horas de maturação, os níveis de MPF e MAPK já tenham declinado, favorecendo, assim, a ativação oocitária. De fato, esses autores relataram que grande quantidade de oócitos felinos ativaram espontaneamente após 40 horas de maturação.

A associação entre cálcio ionóforo e cicloheximide foi utilizada para ativar oócitos felinos por Du *et al.* (2002) e Keller *et al.* (2001). Comparando os resultados obtidos neste experimento com os acima citados, percebe-se que as taxas de ativação obtidas (69,9%) foram inferiores às conseguidas por Keller *et al.* (2001) (90%). A taxa de clivagem aqui apresentada (46,6%) também foi inferior à taxa obtida por Du *et al.* (2002) (82%). Os resultados inferiores aos da literatura podem ter sido causados pela ativação de oócitos sem prévia avaliação da extrusão do primeiro corpúsculo polar, assim como por diferentes condições experimentais incluindo meio de cultivo usado durante os tratamentos e tempo de exposição à ionomicina e cicloheximide.

Este foi o primeiro experimento a incubar oócitos de gatos em 5uM de ionomicina por oito minutos e em cicloheximide por 6 horas, uma vez que o tratamento com ionomicina convencionalmente é feito por 5 minutos seguido por incubação em cicloheximide por 4 a 5 horas. Este protocolo foi escolhido baseado nos bons resultados obtidos com sua utilização na ativação partenogenética de oócitos bovinos em nosso laboratório (Fernandes *et al.*, 2007).

A utilização de ionomicina como único agente de indução partenogenética já foi estudada por Gomez e Pope (2006), os quais obtiveram 47% de ativação oocitária. Entretanto, já foi comprovado que a combinação de ionomicina com agentes responsáveis pela inibição persistente do MPF e MAPK apresentou melhores resultados em suínos (YI e PARK, 2005) e bovinos (WANG *et al.*, 2008). Embora as taxas de ativação induzidas unicamente com a utilização de ionomicina não tenham sido avaliadas neste trabalho, pode-se inferir que os resultados de Gomez e Pope (2006) foram inferiores com relação à ativação induzida por ionomicina associada ao cicloheximide e ao roscovitine, mas semelhante ao conseguido com a associação de ionomicina e estrôncio.

Ao associar etanol com cicloheximide, Gabrieç *et al.* (2007) obtiveram 48,43% de ativação oocitária e 18,24% de clivagem. A associação de etanol, cicloheximide e estimulação elétrica resultou em 29,68% de ativação e apenas 5,16% de clivagem. Esses dados são inferiores aos apresentados nos três tratamentos do presente experimento, sendo semelhantes ao controle (36% de ativação e 12% de clivagem). Entretanto, é complicado comparar tratamentos quando a combinação entre os agentes de ativação é diferente. Isso pode ser concluído após a análise dos resultados demonstrados por Wang *et al.* (2008) ao ativar oócitos bovinos com ionomicina e etanol e depois por meio da associação desses com outros agentes de indução. Oócitos ativados com ionomicina e etanol apresentaram taxas similares de ativação oocitária. Nas mesmas condições de cultivo, os tratamentos combinados de ionomicina e 6-DMAP foram significativamente superiores ao tratamento ionomicina, cicloheximide e citocalasina B, enquanto etanol associado ao cicloheximide e citocalasina B foram superiores a etanol e 6-DMAP.

O Roscovitine, um inibidor específico do MPF tem sido usado com a finalidade de atrasar a progressão meiótica de oócitos bovinos (MERMILLOD *et al.*, 2000), suínos (SCHOEVERS *et al.*, 2005), equinos (FRANZ *et al.*, 2003) e caprinos (JIMENEZ-MACEDO *et al.*, 2006) sem afetar o subsequente desenvolvimento embrionário, sugerindo seu eventual uso para ativação partenogenética.

Roscovitine e 6-DMAP são inibidores da proteína quinase, mas apresentam diferentes maneiras de inibi-la. Enquanto roscovitine age especificamente no MPF (p34^{cdc2}), 6-DMAP atua na fosforilação das proteínas de forma mais ampla. Os efeitos de 6-DMAP associado ao cálcio ionóforo já foram estudados em felinos, entretanto os efeitos de roscovitine não haviam sido avaliados nessa espécie até então. Kitiyanant *et al.* (2003) conseguiram 70% de embriões clivados no estágio de 2 células e 40% de mórulas utilizando 6-DMAP associado ao cálcio ionóforo enquanto com roscovitine obtivemos 46,73% de oócitos clivados e 25% de embriões nos estágios de 16 a 30 células. Novamente, a comparação dos resultados é arriscada uma vez que a eficiência de ambos os protocolos não foram avaliadas nas mesmas condições de cultivo.

A concentração de roscovitine capaz de inativar o MPF em oócitos de camundongos foi $\geq 50\mu\text{M}$, visto que quando os oócitos foram incubados em meio contendo $20\mu\text{M}$ a atividade da histona H1 não foi diminuída. No mesmo experimento, também, ficou comprovado que a concentração de $100\mu\text{M}$ não foi tóxica aos oócitos (DENG e SHEN, 2000). Como não há referências do uso de roscovitine em oócitos felinos, utilizou-se a concentração de $66\mu\text{M}$ a qual foi utilizada por Franz *et al.* (2003) para bloquear o ciclo meiótico em oócitos equinos.

O Roscovitine foi utilizado para ativar partenogeneticamente oócitos de macacos (MITALPOV *et al.*, 2001) e de ratos (PHILLIPS *et al.*, 2002). O primeiro resultou em taxas de clivagem de 61 ± 9 e o segundo em taxas de ativação oocitária de aproximadamente 90%. Mitalipov *et al.* (2001) não encontraram diferenças significativas entre as taxas de clivagem obtidas a partir dos protocolos ionomicina/6-DMAP, ionomicina/roscovitine e eletroporação/cicloheximide/citocalasina B. Entretanto, os oócitos ativados com ionomicina e 6-DMAP se desenvolveram até o estágio de mórula em proporções significativamente superiores aos ativados com ionomicina e roscovitine.

A comparação entre a ativação induzida por inibidores da síntese proteica e inibidores da proteína quinase já foram realizadas em suínos, ao avaliar as taxas de ativação promovidas por cicloheximide e 6-DMAP. Os autores também não encontraram diferenças significativas entre os tratamentos (YI e PARK, 2005).

O estrôncio foi utilizado para ativar oócitos de várias espécies induzindo oscilações de cálcio a partir de estoques intracelulares (KLINE e KLINE, 1992). O trabalho aqui apresentado é o primeiro que relata um tratamento com ionomicina seguido de estrôncio e citocalasina B induzindo a ativação partenogenética e clivagem em oócitos felinos.

Tal protocolo já foi testado na ativação de oócitos suínos por Che *et al.* (2007) e em oócitos bovinos por Meo *et al.* (2005). Em suínos, o tratamento combinado de ionomicina e estrôncio melhorou as taxas de ativação e de desenvolvimento embrionário em relação à ativação somente com ionomicina.

Em bovinos não houve diferença significativa entre os tratamentos com estrôncio e ionomicina associada ao estrôncio. A dose recomendada para suínos foi de 10mM e para bovinos de 20mM, dessa forma optou-se por utilizar, neste experimento, a melhor dose encontrada para bovinos.

No presente estudo, os oócitos foram tratados com estrôncio em meio contendo Ca^{2+} , entretanto, segundo Kline e Kline (2002) a presença de Ca^{2+} em meio contendo estrôncio pode interferir com a ativação induzida por esse cátion bivalente. Meo *et al.* (2005) não encontraram diferenças significativas nas taxas de desenvolvimento pronuclear quando oócitos foram ativados com 25mM de estrôncio em meio com ou sem a presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Apesar disso, seria interessante avaliar o desenvolvimento de oócitos felinos ativados com estrôncio na ausência de cálcio, pois, numericamente, a proporção de oócitos clivados foi menor no tratamento ionomicina e estrôncio e as porcentagens de oócitos clivados e dos ativados que apresentaram apenas descondensação da cromatina foram iguais, sendo que nos outros tratamentos a porcentagem de oócitos clivados sempre foi superior.

Embora os resultados do presente estudo tenham comprovado que o roscovitine e o estrôncio são tão eficientes quanto a cicloheximide em promover a ativação e clivagem dos oócitos, as taxas de clivagem não foram muito boas, dessa forma, estudos futuros são necessários para estabelecer qual a melhor concentração a ser utilizada e o mais adequado período de incubação.

A partir da observação de que os tratamentos foram similares com relação à ativação e às taxas de clivagem, a combinação ionomicina, cicloheximide e citocalasina B foi eleita para avaliar a produção de blastocistos sete dias após a ativação. Entretanto, poucos embriões partenotos se desenvolveram até o estágio de blastocisto.

Esse resultado é característico de protocolos que produzem partenotos haplóides (LIU *et al.*, 2002), entretanto utilizou-se citocalasina B, um inibidor da citocinese que inibe a extrusão do segundo corpúsculo polar, gerando oócitos diplóides (com dois pronúcleos) (IMAHIE *et al.*, 2002). Por outro lado, a não avaliação da extrusão do primeiro corpúsculo polar pode ter

levado oócitos em metáfase I a retomar a meiose após a ativação química originando embriões tetraplóides. Estes embriões aneuplóides são capazes de sofrer as primeiras clivagens, mas o desenvolvimento é interrompido não chegando ao estágio de blastocistos.

Utilizando semelhante protocolo Du *et al.* (2002) obtiveram 28% de blastocistos, resultado muito superior ao deste experimento. Lorthongpanich *et al.* (2004) ativaram oócitos com etanol associado ao cicloheximide e citocalasina D obtendo 13% de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

A partir de dados da literatura sugere-se que o tempo de maturação de 36 horas possa ter afetado o desenvolvimento embrionário, pois nesse período, talvez, os oócitos já tenham perdido a competência para produzir embriões viáveis. Essa possibilidade já foi inferida por Nagano *et al.* (2008) ao avaliar que após 36 horas de maturação *in vitro* muitos oócitos já estavam envelhecidos para serem fecundados. Ou a incubação por oito minutos em ionomicina e por seis horas em cicloheximide tenha sido extremamente deletéria ao desenvolvimento embrionário pós-compactação.

Assim como o desenvolvimento partenogenético, o estudo de células tronco embrionárias tem sido pouco explorado em gatos domésticos e felinos em geral.

Células tronco embrionárias podem ser derivadas de embriões produzidos *in vitro* e de embriões partenogenéticos, entretanto o cultivo adequado de CTE felinas não está estabelecido.

Para que essas células se desenvolvam é necessário que sejam cultivadas sob uma matriz celular ou extracelular. A matriz celular freqüentemente é formada por fibroblastos inativados com mitomicina C a qual já foi utilizada para bloquear o ciclo celular de fibroblastos em humanos (PEURA *et al.*, 2007), murinos (CHOI *et al.*, 2005), suínos (KIM *et al.*, 2007) e bovinos (MUÑOZ *et al.*, 2008), entretanto nada foi publicado a respeito dos efeitos da mitomicina C em fibroblastos embrionários felinos. Dessa forma, utilizou-se a concentração de 10ug/mL por 2,5 horas como Nieto *et al.* (2007),

os quais relataram ser a melhor dose e o melhor período de exposição para fibroblastos humanos, o que foi recentemente confirmado por Zhou *et al.* (2009). A preparação da camada de sustentação é importante para o estabelecimento de culturas de CTE. O melhor protocolo, pelo menos morfológicamente avaliando, no presente experimento foi 140.000 células/poço (70.000 células/cm²) previamente inativadas com 10ug/mL de mitomicina C por 2,5 horas como Pleura *et al.* (2007) utilizaram em humanos e Li *et al.* (2004) em suínos.

A eficiência do tratamento com mitomicina C varia de acordo com o tipo de célula utilizada (PARK *et al.*, 2003) e, segundo ROY *et al.* (2001) as células tratadas com mitomicina C são menos viáveis do que as tratadas com irradiação gama. Dessa forma, os fibroblastos embrionários de gato talvez não tenham sido uma boa matriz celular para o crescimento da MCI aderida.

A densidade ideal de células de sustentação tem variado bastante entre os autores, sendo de 25.000 células/cm² (Zhou *et al.*, 2009), 50.000 células/cm² (SULLIVAN *et al.*, 2007), 20.000 células/cm² (HENG *et al.*, 2004), 75.000 células/cm² (REUBINOFF *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2003). Park *et al.* (2004), entretanto, conseguiram bons resultados ao usar uma densidade de 140.000 células/cm², uma vez que no presente experimento a densidade de 125.000 células/cm² não suportou a primeira troca de meio. Zhou *et al.* (2009) relataram que quanto maior a concentração de células utilizadas, maior será a quantidade de mitomicina C armazenada entre as células, mesmo após muitas lavagens e isso poderá ser tóxico tanto para as células de sustentação quanto para as CTE cultivadas. Altas densidades também poderão afetar o crescimento das CTE por competir com nutrientes e oxigênio, além de exercer pressão sobre elas (CHANG-QING *et al.*, 2005; HENG *et al.*, 2004).

Em suínos e bovinos, CTE-*like* têm sido cocultivadas com a linhagem imortal de fibroblastos embrionários murinos STO (SAITO *et al.*, 2003; GJORRET e MADDOX-HYTTEL, 2005; KIM *et al.*, 2007) ou com fibroblastos embrionários murinos inativados (LI *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007; MITALIPOVA *et al.*, 2001). No entanto, o cocultivo com células homólogas não impediu que MUÑOZ *et al.* (2008) alcançassem sucesso na derivação de

linhagens de CTE-like em bovinos. Da mesma forma, atualmente, CTE humanas tem sido cultivadas com fibroblastos humanos (PEURA *et al.*, 2007). Serrano *et al.* (2006) compararam o cocultivo de CTE-like felinas com MEF ou fibroblastos embrionários inativados de gato (FEG), a aderência da MCI não foi afetada pelo tipo de célula, mas a formação de colônias foi significativamente maior no cocultivo com células homólogas (MEF $12,7 \pm 7,2\%$ e FEG $55,4 \pm 7,2\%$).

O passo inicial para o estabelecimento de CTE é o isolamento da MCI. O cultivo de CTE a partir de MCI isolada por dissociação mecânica com o auxílio de lâminas ou agulhas foi reportado por Wang *et al.* (2005b), Gjørret e Maddox-Hyttel, (2005) e Hatoya *et al.* (2006). Utilizando-se a imunocirurgia, foram obtidas CTE de equinos (LI *et al.*, 2006), bovinos (MUÑOZ *et al.*, 2008) e suínos (KIM *et al.*, 2007), sendo, essa, a técnica mais utilizada em humanos (SULLIVAN *et al.*, 2007).

Embora no presente estudo não tenha sido possível estabelecer o cultivo de CTE em gatos, foi possível avaliar que a aderência da MCI foi significativamente maior quando ela foi isolada por dissociação mecânica (91%) do que por imunocirurgia (50%). Vale ressaltar, entretanto, que não existe na literatura protocolos de isolamento da MCI ou protocolos de coloração diferencial de MCI e trofoblastos que utilizem a imunocirurgia, dessa forma a concentração e o tempo de exposição ao anticorpo anti-IgG de gato e ao complemento de cobaia foram estimados a partir de dados obtidos em humanos (SULLIVAN *et al.*, 2007) e bovinos (MUÑOZ *et al.*, 2008). Portanto a possibilidade dessa MCI ter sido lisada por inadequada concentração ou exposição ao complemento não pode ser descartada.

Por outro lado, Li *et al.* (2004) relataram que em embriões suínos produzidos *in vitro* a imunocirurgia não é adequada devido ao pequeno número de células que formam a MCI. Tal justificativa talvez possa ser utilizada em embriões felinos produzidos *in vitro* embora a contagem de células da MCI não tenha sido realizada. Serrano *et al.* (2006) compararam o isolamento da MCI por imunocirurgia e por dissociação mecânica em blastocistos de gatos, relatando não haver diferenças entre as técnicas quanto à aderência e derivação de CTE, esses dados não corroboram com os apresentados nesse

estudo, mas a comparação entre os resultados é complicada por se tratar de um resumo em que não há o detalhamento da técnica. Kehler *et al.* (2006) isolaram CTE-*like* felinas a partir do cultivo de blastocistos sem a zona pelúcida e Yu *et al.* (2007) a partir da MCI isolada por dissociação mecânica.

Os protocolos utilizados na derivação de CTE-*like* em animais doméstico são similares aos utilizados em murinos e humanos. Neste experimento, primeiramente, objetivou-se avaliar a importância da fonte proteica no isolamento e cultivo de CTE. Para tanto, comparou-se o efeito do SFB e do substituto do soro Knockout. Não houve diferenças significativas quanto à aderência da MCI e à formação de colônias, visto que ambos apresentaram 90% de aderência e incapacidade de formar colônias. Estes dados não concordam com os encontrados por Yu *et al.* (2007), uma vez que esses autores relataram que o meio contendo Knockout foi superior ao meio contendo SFB com relação à aderência da MCI, entretanto inferior com relação à formação de colônias. O substituto do soro Knockout tem sido muito utilizado no isolamento e cultivo de CTE humanas, entretanto os resultados encontrados até então com isolamento e cultivo de CTE-*like* felinas sugerem que a utilização desse substituto do SFB não traz benefícios em relação ao uso do SFB.

Embora relatos sobre a utilização de aminoácidos essenciais no cultivo de CTE não exista na literatura, optou-se por analisar qual seria a influência deste no cultivo, entretanto a adição deste suplemento não alterou os resultados encontrados anteriormente.

Partindo do princípio de que a glicose em altas concentrações é deletéria ao desenvolvimento de embriões felinos (SWANSON *et al.*, 1996; KANDA *et al.*, 1998) tentou-se cultivar a MCI em meio com baixa glicose, no entanto, contrariamente ao esperado, os resultados obtidos foram os piores não com relação à aderência da MCI, mas sim com relação à morfologia uma semana após ser colocada em cocultivo. A partir deste dado podemos sugerir que o meio de cultivo deve ser rico em glicose para a derivação das CTE-*like* felinas uma vez que os resultados pioraram quando o cocultivo foi realizado em meio contendo 4,5 vezes menos glicose.

Sabe-se que o fator inibidor da leucemia não sustenta o cultivo das CTE em humanos, mas sim em camundongos (HUMPHREY *et al.*, 2004; THOMSON *et al.*, 1998). A necessidade de adição dessa citocina ao meio de cultivo de CTE-like felinas é desconhecida, uma vez que a presença de receptores de LIF nessas células ainda não foi analisado. Contudo, Kehler *et al.* (2006) relataram que o LIF humano ou murino não tiveram efeitos na manutenção e proliferação de colônias de CTE-like felinas. No presente estudo 50 ng/mL de LIF murino foram utilizados em todos os meios de cultivo analisados, entretanto, aparentemente, seus efeitos não foram suficientes para a formação de colônias.

É amplamente aceito que a adição de fator de crescimento de fibroblastos 2 ao meio de cultivo de CTE humanas promove a autorrenovação e a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células somáticas (XU *et al.*, 2001). Recentemente foi reportado que altas doses de FGF-2 foram adequadas para manter CTE humanas após 30 passagens em condições de cultivo sem soro e sem células de suporte (WANG *et al.*, 2005a). Portanto na busca de um meio completo para o cultivo de CTE-like felinas, neste estudo, foram adicionamos 5ng/mL de FGF-2, o qual também não mostrou exercer efeito benéfico no cultivo dessas células. Esse fator de crescimento também foi utilizado por Serrano *et al.* (2006).

No presente estudo, as MCIs derivadas dos três blastocistos partenogenéticos não aderiram, entretanto esse fato deve estar relacionado com a qualidade do embrião e não com as condições de cultivo celular. Wang *et al.* (2005b) relataram que a MCI de partenotos bovinos tem desenvolvimento alterado o que predispõe à diferenciação espontânea. A formação de colônias de CTE partenogenéticas foi inferior às de CTE derivadas de embriões fecundados *in vitro* e por transferência nuclear tanto em bovinos (WANG *et al.*, 2005b) quanto em suínos (KIM *et al.*, 2007).

De acordo com os dados da literatura pode-se concluir que o meio de cultivo utilizado para derivação de CTE humanas e murinas parece não ser adequado para o cultivo de CTE-like felinas, já que neste experimento foi utilizado desde um meio simples até um meio mais complexo utilizado em

humanos e não resultou na formação de colônias. Como dito anteriormente, a camada de sustentação formada a partir de fibroblastos embrionários felinos pode não ter secretado fatores adequados ao desenvolvimento dessas células. Entretanto, essa justificativa talvez não proceda pelo fato de ter sido adicionado LIF e FGF-2 ao meio de cultivo e nem assim obter bons resultados.

Deve ser levado em consideração a dificuldade encontrada para o isolamento e cultivo desse tipo celular, assim como a informação de que as CTE-*like* obtidas até então não foram adequadamente caracterizadas. Não pode ser descartada a possibilidade de que as células isoladas sejam de linhagem trofoblástica uma vez que já foi comprovado que os marcadores de pluripotência utilizados em humanos e murinos não são confiáveis em animais domésticos (KIRCHHOF *et al.*, 2000; HE *et al.*, 2006; KEEFER *et al.*, 2007).

As CTE-*like* felinas isoladas por Serrano *et al.* (2006) e Yu *et al.* (2007) expressaram SSEA-1, SSEA-3 e SSEA-4. Entretanto, em bovinos e caprinos há grande divergência quanto aos dados obtidos com esses marcadores de pluripotência. Em 2001, Mitalipova *et al.* relataram forte expressão de SSEA 1, SSEA3 e SSEA4 em CTE derivadas de embriões bovinos. Esses dados concordaram parcialmente com os encontrados por Saito *et al.* (2003), os quais observaram expressão de SSEA1, mas não de SSEA 3 e SSEA4 e com os de Muñoz *et al.* (2008), segundo os quais houve expressão de SSEA4, mas não de SSEA1. Muñoz *et al.* (2008) compararam os resultados encontrados com os obtidos a partir da imunistoquímica de embriões produzidos *in vitro*, a expressão foi negativa para SSEA1 e homogênea para SSEA4, o qual foi identificado tanto na MCI quanto no trofotoderma.

He *et al.* (2006) observaram a expressão de SSEA1 e SSEA4 exclusivamente na MCI de blastocistos caprinos produzidos *in vitro*, entretanto esses foram expressos no trofotoderma de blastocistos gerados *in vivo*.

A atividade da fosfatase alcalina detectada nas CTE-*like* felinas isoladas por Serrano *et al.* (2006), a qual é bastante utilizada para avaliar a indiferenciação de células tronco embrionárias tem sido controversa em bovinos. No estudo realizado por Vejlsted *et al.* (2005) as células do epiblasto não apresentaram atividade de fosfatase alcalina, a qual foi detectada

unicamente em células do trofoblasto por Edwards *et al.* (2003). Maddox-Hyttel *et al.* (2003) analisando a atividade de fosfatase alcalina, também, por imunistoquímica, em embriões 14 dias pós-inseminação observaram que não houve detecção no epiblasto, mas sim no trofoblasto e no hipoblasto.

Oct 4 é um importante marcador de pluripotência em humanos e murinos, entretanto nos animais domésticos sua expressão não tem sido exclusiva de células pluripotentes. Por meio da imunistoquímica, a expressão do Oct4 foi estudada em blastocistos produzidos *in vitro* e *in vivo* nas espécies murina, suína e bovina. Em camundongos, a expressão do Oct 4 foi restrita à MCI, enquanto em suíno e bovinos sua expressão foi observada tanto na MCI quanto no trofotoderma, não havendo diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (KIRCHHOF *et al.*, 2000). Esses dados corroboram com os encontrados por He *et al.* (2006), segundo os quais houve expressão de Oct4 na MCI e trofotoderma de blastocistos caprinos produzidos *in vivo*. Concluiu-se, portanto, que existe marcada diferença na regulação do Oct 4 entre camundongos e animais domésticos (KIRCHHOF *et al.*, 2000; HE *et al.*, 2006).

Fato semelhante foi observado no presente experimento, pois a proteína Oct4 foi detectada tanto na MCI quanto no trofoblasto dos blastocistos, indicando que Oct 4 não pode ser considerado um marcador de pluripotência confiável para células derivadas de embriões de gato doméstico produzidos *in vitro*.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

EXPERIMENTO I

- A produção de embriões felinos *in vitro* foi semelhante quando utilizou-se o meio SOFaa ou FOC. No entanto, numericamente o meio SOF resultou em menor variabilidade entre as rotinas, acarretando, portanto, em melhor repetibilidade.

EXPERIMENTO II

- As taxas de ativação partenogenética espontânea após 36 horas de maturação *in vitro* são elevadas.
- Não há diferença entre o uso da ionomicina associada ao cicloheximide, ao roscovitine ou ao estrôncio quanto às taxas de ativação partenogenética e clivagem.
- O uso de Ionomicina e cicloheximide no período de exposição e concentrações utilizados neste experimento são prejudiciais ao desenvolvimento embrionário pós-compactação.

EXPERIMENTO III

- A dissociação mecânica se mostrou superior à imunocirurgia com relação à aderência da MCI.
- A fonte protéica adicionada ao meio de cultivo não interfere na aderência da MCI.
- Os meios de cultivo utilizados neste experimento não são eficazes para formação de colônias de CTE-like felinas.
- Fibroblastos embrionários felinos inativados com mitomicina C são benéficos para a aderência da MCI, mas não são capazes de sustentar a formação de colônias.

- O Oct4 não pode ser considerado um bom marcador de pluripotência para embriões felinos produzidos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- BEATTY, R.A. Parthenogenesis and polyploidy in mammalian development. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, p.134.
- BOGLIOLO, L.; LEONI, G.; LEDDA, S.; ZEDDA, M.T.; BONELLI, P.; MADAU, L.; SANTUCCIU, C.; NAITANA, S.; PAU, S. M-phase promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinases (MAPK) activities of domestic cat oocytes matured in vitro and in vivo. **Cloning and Stem Cells**, v.6, p.15-23, 2004.
- BOS-MIKICHI, A.; WOOD, M.J.; CANDY, C.J.; WHITTINGHAM, D.G. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. **Biology Reproduction**, v.53, p.780-785, 1995.
- BREVINI, T. A. L.; TOSETTI, V.; CRESTAN, M.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Derivation and characterization of pluripotent cell lines from pig embryos of different origins. **Theriogenology**, v.67, p.54-63, 2007.
- CAMPBELL, K. D.; REED, W. A.; WHITE, K. L. Ability of integrins to mediate fertilization, intracellular calcium release and parthenogenetic development in bovine oocytes. **Biology Reproduction**, v. 62, p. 1702-1709, 2000.
- CHANG-QING, X.; GE, L.; DING, Y.; JIAN, W.; TIAN-CHENG, L.; GUANG-XIU, L. proliferative feeder cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells. **Cell Biology International**, v.29, p.623-628, 2005.
- CHE, L.; LALONDE, A.; BORDIGNON, V. Chemical activation of parthenogenetic and nuclear transfer porcine oocytes using ionomycin and strontium chloride. **Theriogenology**, v.67, p.1297-1304, 2007.
- CITES, 2000. Convention on international trade of endangered species of wild flora and fauna. *CITES-listed species database. Fauna*. Châtelaine-Genève, Switzerland: CITES.
- CIBELLI, J.B.; GRANT, K.A.; CHAPMAN, K.B.; CUNNIF, K.; WORST, T.; GREEN, H.L.; WALKER, S.J.; GUTIN, P.H.; VILNER, L.; TABAR, V.; DOMINKO, J.K.; WETTSTEIN, P.J.; LANZA, R.P.; STUDER, L.; VRANA, K.E.; WEST, M.D. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. **Development**, v.295, p.819, 2002

- COMIZZOLI, P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. Overcoming poor in vitro nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season. **Reproduction**, v.126, p.809-816, 2003.
- CRAN, D.G.; MOOR, R.M. Programming the oocyte for fertilization. In BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E.R.S. **Fertilization in mammals**. Norwell: Serono Symposia, p.35-50, 1990.
- DENG, M.; SHEN, S.S. A specific inhibitor of p34^{cdc2}/cyclin B suppresses fertilization-induced calcium oscillations in mouse eggs. **Biology Reproduction**, v.62, p.873-878, 2000.
- DIENHART, M.K.; O'BRIEN, M.J.; DOWNS, S.M. Uptake and salvage of hypoxanthine mediates developmental arrest in preimplantation mouse embryos. **Biology Reproduction**, v.56, p.1-13, 1997.
- DU, F.L.; JIANG, S.; TIAN, X.C.; AVNER, D.; YANG, X.; Parthenogenetic activation and somatic nuclear transfer in domestic cat using in vitro matured oocytes. **Theriogenology**, v.57, p.409, 2002 (Abstract).
- DUCIBELLA, T.; HUNEAU, D.; ANGELICHIO, E.; XU, Z.; SCHULTZ, R. M.; KOPF, G. S.; FISSORE, R.; MADOUX, S.; OZIL, J. P. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca²⁺ oscillation number. **Developmental Biology**, v.250, p.280-291, 2002.
- EDWARDS, J.L.; POWELL, A.M.; REXROAD, C.E. Alkaline phosphatase activity in bovine oocytes and preimplantation embryos as affected by removal of the zona pellucida and culture medium constituents. **Reproduction, Fertility and Development**, v.15, p.285-292, 2003.
- EPPIG, J.J. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed *in vitro* from antral follicles. **Biology Reproduction**, v.45, p.824-830, 1991.
- EVANS, J.M.; KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, p. 154-156, 1981.
- FAN, H.F.; SUN, Q.Y. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology Reproduction**, v. 70, p. 35-47, 2004.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 375-387, 2000.

- FERNANDES, C.B.; DEVITO, L.G.; MARTINS, L.R.; RASCADO, T.S.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Ativação partenogenética de ovócitos bovinos maturados in vitro com ionomicina, cicloheximide, roscovitine e estrôncio. *Anais da XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES. Acta Scientiae Veterinariae*, v.35. p.1263 – 1263, 2007
- FISSORE, R.A.; GORDO, A.C.; WU, H. Activation of development in mammals: Is there a role for a sperm cytosolic factor? ***Theriogenology***. v.49, p. 43-52, 1998.
- FRANZ, L.C.; CHOI, Y.H.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.; HINRICHS, K.E. Effects of roscovitine on maintenance of germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. ***Reproduction***, v. 125, p. 693-700, 2003.
- FREISTED, P.; STOJKOVIC, M.; WOLF, E. Efficiency in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. ***Biology Reproduction***, v. 65, p. 9-13, 2001.
- GABRIEL, A.; MAX, A.; TISCHNER, M. Parthenogenetic activation of domestic cat oocytes using ethanol, calcium ionophore, cycloheximide and a magnetic field. ***Theriogenology***. v. 67. p. 795-800, 2007.
- FRIEL, E.; SAR, S.; MEE, J.P. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. ***Advanced Drug Delivery Reviews***, v 57, p. 1894-1903, 2005.
- GJORRET, J.O.; MADDUX-HYTTEL, P. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. ***Reproduction, Fertility and Development***, v. 17, p. 113-124, 2005.
- GODARD, N.M.; PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; COMIZZOLI, P. Paracrine factors from cumulus-enclosed oocytes ensure the successful maturation and fertilization in vitro of denuded oocytes in the cat model. ***Fertility and Sterility***, p. 1-11, 2008.
- GÓMEZ, M.C.; POPE, C.E. Current concepts in cat cloning. In: INUI, A. ***Epigenetic risks of cloning***, Taylor and Francis, 2006. p. 111-151.
- GONÇALVES, P. B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L.F.S. Produção in vitro de Embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J. F. ***Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal***, São Paulo: Varela, 2002. p.195-226.

GOODROWE, K.L., HOWARD, J.G., SCHMIDT, P.M. & WILDT, D.E. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. **J. Reproduction & Fertility Supplement**, v.39, p.73-90,1989.

GORDON, I.R. Laboratory Production of Cattle Embryos. 2. ed. CABI Publishing, 2003.

GRUPEN, C.G.; NOTTLE, M.B.; NAGASHIMA, H. Calcium release at fertilization : artificially mimicking the oocyte's response to sperm. **J. Reproduction and Development**. v. 48, p. 313-333, 2002.

HATANO, S.; TADA, M.; KIMURA, H.; YAMAGUCHI, S.; KONO, T.; NAKANO, T.; SUEMORI, H.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. **Mechanisms of Development**, v. 122, p. 67-79, 2005.

HATOYA, S.; TORII, R.; KONDO, Y.; OKUNO, T.; KOBAYASHI, K.; WIJEWARDANA, V.; KAWATE, N.; TAMADA, H.; SAWADA, T.; KUMAGAI, D.; SUGIURA, K.; INABA, T. Isolation and characterization of embryonic stem –like cells from canine blastocyst. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 73, p. 298-305, 2006.

HE, S.; PANT, D.; SCHIFFMACHER, A.; BISCHOFF, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W.; KEEFER, C. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of nanog protein localization in the nucleolus **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1512-1522, 2006.

HENG, B.C.; LIU, H.; GAO, T. Feeder cell density-a key parameter in human embryonic stem cell culture. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, v. 40, p. 255-257, 2004.

HERRICK, J.R.; BOND, J.B.; MAGAREY, G.M.; BATEMEN, H.L.; KRISHER, R.L.; DUNFORD, S.A.; SWANSON, W.F. Toward a feline-optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of in vitro fertilization – derived feline embryos relative to embryos grown in vivo. **Biology Reproduction**, v. 76, p. 858-870, 2007.

HOFFERT, K.A.; ANDERSON, G.B.; WILDT, D.E.; ROTH, T.L. Transition from maternal to embryonic control of development in IVM/IVF domestic cat embryos. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 48, p. 208-215, 1997.

- HOMA, S.T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, p. 122-134, 1995.
- HUMPHREY, R.K.; BEATTIE, G.M.; LOPEZ, A.D.; BUCAY, N.; KING, C.C.; FIRPO, M.T.; ROSE-JHON, S.; HAYEK, A. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. **Stem Cells**, v. 22, p. 522-530, 2004.
- IMAHIE, H.; TAKAHASHI, M.; TOYODA, Y.; SATO, E. Differential effects of cytochalasin B on cytokinesis in parthenogenetically activated oocytes. **J. Reproduction and Development**. v 48, p. 31-40, 2002.
- JIMENEZ-MACEDO, A.R.; IZQUIERDO, D.; URDANETA, A.; ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T. Effect of roscovitine on nuclear maturation, MPF and MAP kinase activity and embryo development of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 65, p. 1769-1782, 2006.
- JOHNSTON, L.A.; O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E. In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. **Gamete Research**, v.24, p.343-356, 1989.
- JOHNSTON, L.A.; DONOGHUE, A.M.; BRIEN, S.J.O.; WILDT, D.E. Influence of temperature and gas atmosphere on in-vitro fertilization and embryo development in domestic cats. **J. Reproduction Fertility**, v. 92, p. 377-382, 1991a.
- JOHNSTON, L.A.; DOLNOGHUE, A.M.; O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E. Culture medium and protein supplementation influence in vitro fertilization and embryo development in the domestic cat. **J. Experimental Zoology**, v. 257, p.350-359, 1991b.
- KANDA, M.; MIYAZAKI, T.; KANDA, M.; NAKAO, H.; TSUTSUI, T. Development of in vitro fertilized feline embryos in a modified Earle's balanced salt solution: influence of protein supplements and culture dishes on fertilization success and blastocyst formation. **J. Veterinary Medical Science**, v. 60 p. 423-431, 1998
- KARJA, N.W.K.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; FAHRUDIN, M.; SUZUKI, T. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of reproductive cycle. **Theriogenology**, v. 57, p. 2289-2298, 2002a.

KARJA, N.W.K.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; YUGE, M.; FAHRUDIN, M.; SUZUKI, T. Effect of protein supplementation on development to the hatching and hatched blastocyst stages of cat IVF embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, p. 291-296, 2002b.

KARJA, N.W.K.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; WONGSRIKEAO, P.; BUDIYANTO, A.; FAHRUDIN, M.; NAGAI, T. Effect of cycloheximide on in vitro development of electrically activated feline oocytes. **J. Reproduction and Development**, v. 51, p.783-786, 2005

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; RYNSKA, B.; KANIA, G. SMORAG, Z.; GAJDA, B.; PIENKOWSKI, M. Timing of nuclear maturation of nonstored and stored domestic cat oocytes. **Theriogenology**, v.59, p.1567-1574, 2003.

KEEFER, C. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of nanog protein localization in the nucleolus **Molecular Reproduction Development**, v.73, p.1512-1522, 2006.

KEHLER, J.; ROELKE-PARKER, M.; PUKAZHENTHI, B.; SWANSON, W.; WARE, C.; DOBRINSKI, I.; O'BRIEN, S. Production of in vitro and in vivo derived cat blastocyst for the establishment of feline embryonic stem cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.207, 2006 (Abstract).

KELLER, D.L.; COX, A.M.; WESTHUSIN, M.E.; KRAEMER, D.C. Feline oocyte activation : effects on level of MPF and MAPK. **Theriogenology**, p. 454, 2001 (Abstract).

KIKUCHI, K.; NAITO, K.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A.; KANEKO, H.; YAMASHITA, M.; AOKI, F.; TOJO, H.; TOYODA, Y. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. **Biology Reproduction**, v. 63, p. 715-722, 2000.

KIM, H.S.; SON, H.Y.; LEE, G.S.; PARK, C.H.; KANG, S.K.; LEE, B.C. Isolation and initial culture of porcine inner cell masses derived from in vitro-produced blastocysts. **Zygote**, v. 15, p. 55-63, 2007a.

KIM, K.; LEROU, P.; YABUUCHI, A.; Lengerke, C.; NG, K.; WEST, J.; KIRBY, A.; DALY, M. J.; DALEY, G. Q. Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis. **Science**, v. 315, p. 482-486, 2007b.

KIRCHOFF, N.; CARNWATH, J.W.; LEMME, E.; ANASTASSIADIS, K.; SCHOLER, H.; NIEMANN, H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biology Reproduction**, v.63, p.1698-1705, 2000.

KITIYANANT, Y.; SAIKHUN, J.; PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocyte treated with IGF-I for in vitro maturation. **Theriogenology**, v.59. p.1775-1786, 2003.

KLINE, D.; KLINE, J.T. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. **Developmental Biology**, v. 149, p. 80-89, 1992.

KÜPKER, W.; DIEDRICH, K.; EDWARDS, R. G. Principles of mammalian fertilization. **Human Reproduction**, v.13, p.20-32, 1998.

LANE, M.; GARDNER, D. K.; Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. **Reproduction Fertility and Development**, v. 109, p. 153-164, 1997.

LI, M.; LI, Y.; HOU, L.; SUN, X.; SUN, Q.; WANG, W. Isolation and culture of pluripotent cells from in vitro produced porcine embryos. **Zygote**, v. 12, p. 43-48, 2004.

LI, X.; ZHOU, S.G.; IMREH, M.P.; AHRLUND-RICHTER, L.; ALLEN, W.R. Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. **Stem Cells**, v. 15, p. 523-531, 2006.

LIN, H.; LEI, J.; WININGER, D; NGUYEN M.; KHANNA, R.; HARTMANN, C.; YAN, W.; HUANG, S. C. Multilineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes. **Stem Cells**, v. 21, p. 152-161, 2003.

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Sodium chloride, osmolyte, and osmolarity effects on blastocyst formation in bovine embryos produced by in vitro fertilization (IVF) and cultured in simple serum-free media. **J. Assisted Reproduction and Genetics**, v.13, p. 562-568, 1996.

LIU, L.; JU, J.; YANG, X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. **Biology Reproduction**, v. 59, p. 537-545, 1998.

LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE, D. L. Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. **Biology Reproduction**. v 66, p. 204-210, 2002.

LOI, P.; LEDDA, S.; FULKA, J.; CAPPAL, P.; MOOR, R.M. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biology Reproduction**. v. 58, p. 1177-1187, 1998.

LORTHONGPANICH, C.; LAOWTAMMATHRON, C.; MUENTHAISOG, S.; VETCHAYAN, T.; KETUDAT-CAIRAS, M.; LIKITDECHAROTE, B. In vitro development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed within skin fibroblasts of domestic and leopard cats. **Reproduction, Fertility and Development**, v 16, p. 149-150, 2004 (Abstract).

LU, Q.; DUNN, R.L.; ANGELES, K.; SMITH, G.D. Regulation of spindle formation by active mitogen-activated protein kinase and protein phosphatase 2A during mouse oocyte meiosis. **Biology Reproduction**, v. 66, p. 29-37, 2002.

LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S. PEREGO, L.; LODDE, V.; MODINA, S.; LUCIANO, A.M. Effect of gonadotropins during in vitro maturation of feline oocytes on oocyte-cumulus cells functional coupling and intracellular concentration of glutathione. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 66-78, 2006.

MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N.I.; VATJA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v. 125, p. 607-623, 2003.

MADDOX-HYTTEL, P.; WOLF, X.A.; RASMUSSEN, M.A.; SCHAUER, K. Embryonic stem cell in pig and cattle: derivation, culture and potential applications. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 823-830, 2007.

MALCUIT, C.; KUROKAWA, M.; FISSORE, R.A. Calcium oscillations and mammalian egg activation. **J. Cellular Physiology**, v 206, p. 565-573, 2006.

MALINOWSKI, K.; PULLIS, C.; RAISBECK, A.P.; RAPAPORT, F.T. Modulation of human lymphocyte marker expression by gamma irradiation and mitomycin C. **Cellular Immunology**, v. 143, p. 368-377.

MARCOS, M.V.; SPELL, AR.; BUTINE, M.D.; ARNS, M.J. Influence of cumulus cells on in vitro maturation and fertilization of equine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 263, 1996. (Abstract).

MARSHALL, C.J. MAP Kinase kinase kinase, MAP kinase kinase kinase and MAP kinase. **Genes Development**, v. 1994, p. 82-89, 1994.

MATSUDA, T.; NAKAMURA, T.; NAKAO, K.; ARAI, T.; KATSUKI, M.; HEIKE, T.; YOKOTA, T. STAT 3 activation is sufficient to maintain na undifferentiated

state of mouse embryonic stem cells. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 18, p. 4261-4269, 1999.

MÉO, S.C.; LEAL, C.L.M., GARCIA, J.M. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. **Animal Reproduction Science**. v. 81, p. 35-46, 2004

MÉO, S.C.; YAMAZAKI, W.; LEAL, C.L.V.; OLIVEIRA, J.A.; GARCIA, J.M. Use of strontium for bovine oocyte activation. **Theriogenology**, v. 63, p. 2089-2102, 2005.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the vesicle stage for 24h in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 89-95, 2000.

MINAMI, M.; INOUE, M.; WEI, S.; TAKEDA, K.; MATSUMOTO, M.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. STAT 3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid leukemia cell line. **Proc. Nat. Acad. Sc. USA**, v. 93, p. 3963-3966, 1996.

MITALIPOV, S. M.; NUSSER, K. D.; WOLL, D. P. Parthenogenetic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. **Biology Reproduction**, v. 65, p. 253-259, 2001a.

MITALIPOVA, N.; BEYHAN, Z.; FIRST, N. L. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos. **Cloning**, v. 3, p. 59-67, 2001.

MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; KALOUS, J.; KALAB, P. Interplay between cdc2 kinases and MAP Kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 49, p. 461-469, 1998.

MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, C.; DE FRUTOS, C.; CAAMAÑO, J.N.; DíEZ, C.; FACAL, N.; GÓMEZ, E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. **Theriogenology**, v. 69, p. 1159-1164, 2008.

MURAKAMI, M.; OTOI, T.; KARJA, N.W.K.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization. **Reproduction Domestic Animals**, v. 37, p. 352-356, 2002.

NAGANO, M.; UCHIKURA, K.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M. Effect of duration of in vivo maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes. **Theriogenology**, v. 69, p. 231-236, 2008.

NAKADA, K.; MIZUNO, J. Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. **Theriogenology**, v. 50, p. 269-282, 1998.

NAVARA, C. S.; FIRST, N. L.; SCHATTEN, G. Microtubule organization in the cow during fertilization, polysperm, parthenogenesis and nuclear transfer: the role of the sperm aster. **Developmental Biology**, v. 162, p. 29-40, 1994.

NEWMAN-SMITH, E.; WERB, Z. Stem cell defects in parthenogenetic peri-implantation embryos. **Development**, v. 121, p. 2069-2077, 1995.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature**, v. 24, p. 372-376, 2000.

NIETO, A.; CABRERA, C.M.; CATALINA, P.; COBO, F.; BARNIE, A.; CORTÉS, J.L.; JESUS, A.B.; MONTES, R.; CONCHA, A. Effect of mitomycin C on human foreskin fibroblasts used as feeder in human embryonic stem cells: immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. **Cell Biology International**, v. 31, p. 269-278, 2007.

ORSI, N.M. LEESE, H.J. Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocyst in vitro. **Reproduction**, v.127, p. 131-140, 2001.

PARK, J.H.; KIM, S.J.; OH, E.J.; MOON, S. Y.; ROH, S. I.; KIM, C.G.; YOON, H.S. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. **Biology Reproduction**, v. 69, p. 2007-2014, 2003.

PARK, S.P.; LEE, Y.J.; LEE, K.S.; AH SHIN, H.; CHO, H.Y.; CHUNG, K.S.; KIM, E.Y.; LIM, J.H. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. **Human Reproduction**, v. 19, p. 676-684, 2004.

PAYNTON, B. V.; BACHVAROVA, R. Changes in maternal RNAs during oocyte maturation. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. **Fertilization in mammals**. Norwell: Serono Symposia, 1990. p. 25-34.

PEDERSEN, R.A. Feeding hungry stem cells. **Nature**, v. 20, p. 882-883, 2002.

PHILLIPS, K.P.; PETRUNEWICH, M.A.F.; COLLINS, J.L.; BOOTH, R.A.; LIU, X.J.; BALTZ, J.M. Inhibition of MEK or cdc2 kinase parthenogenetically activates mouse eggs and yields the same phenotypes as $Mos^{-/-}$ parthenogenotes. **Developmental Biology**, v. 247, p. 210-223, 2002.

POPE, C. E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**, v. 53, p. 163-174, 2000.

POPE, C.E.; SCHMID, R.; DRESSER, B.L. In vitro development of cat embryos produced by in vitro fertilization is enhanced by addition cysteine to the maturation medium and a reduced O_2 atmosphere. **Theriogenology**, p.291, 2002 (Abstract).

PEURA, T.T.; BOSMAN, A.; STOJANOV, T. Derivation of human embryonic stem cell line. **Theriogenology**, v. 67, p. 32-42, 2007.

REUBINOFF, B.E.; PERA, M.F.; FONG, C.Y.; TROUNSON, A.; BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. **Natural Biotechnology**, v. 18, p.399-404, 2000.

ROGERS, N.T.; HALET, G.; PIAO, Y.; CARROLL, J.; KO, M. S. H.; SWANN, K. The absence of a Ca^{2+} signal during mouse egg activation can affect parthenogenetic preimplantation development, gene expression patterns, and blastocyst quality. **Reproduction**, v 132, p. 45-57, 2006.

ROTH, T.L.; SWANSON, W.F.; WILDT, D.E. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro. **Biology Reproduction**, v. 51, p. 441-451, 1994.

ROY, A.; KRZYKWA, E.; LEMIEUX, R.; NÉRON, S. Increased efficiency of γ – irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term cultures. **J. Hematotherapy & Stem Cell Research**, v. 10, p. 873-880, 2001.

SAITO, S.; SAWAI, K.; UGAI, H.; MORIYASU, S.; MINAMIHASHI, A.; YANAMOTO, Y.; HIRAYAMA, H.; KAGEYAMA, S. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 104-113, 2003.

SCHOEVERS, E.J.; BEVERS, M.M.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B. Nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes are not synchronized by

specific meiotic inhibition with roscovitine during in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 63, p. 1111-1130, 2005.

SCHRAMM, R.D.; BAVISTER, B. D. Effects of gonadotrophins growth hormone and prolactin on developmental competence of domestic cat oocytes matured in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 1061-1066, 1995

SCHULDINER, M.; YANUKA, O.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; MELTON, D. A.; BENVENISTY, N. et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **PNAS**, v. 97, n. 21, p. 11307-11312, 2000.

SERRANO, M.A.; GÓMEZ, M.C.; LOPEZ, M.; DUMAS, C.L.; SMITH, K.E.;LEIBO, S.P.; DRESSER, B.L.; POPE, C.E. Derivation of cat embryonic stem-like cellsfrom in vivo produced blastocysts and their support by intraespecific vs interespecific feeder cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 210, 2006 (Abstract).

SHIN, T.; OTOI, T.; KRAEMER, D. C.; WESTHUSIN, M. E. Developing an activation protocol for somatic cell nuclear transfer (SCNT) in the domestic cat. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16. 272, 2004 (Abstract).

SKRZYSZOWSKA, M.; KATSKA, L.; RYNSKA, B.; KANIA, G.; SMORAG, Z.; PIENKOWSKI, M. In vitro developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. **Theriogenology**. v 58, p. 1615-1621, 2002.

SOLOY, E.; KANKA, J.; VIUFF, D.; SMITH, S.D.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. **Biology Reproduction**, v. 57, p. 27-35.

SOLTER, D.; KNOWLES, B. B.; Immunosurgery of mouse blastocyst. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, p. 5099-5102, 1975.

STEWART, C.L.; GADI, I.; BHATT, H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Development Biology*, v. 161, p. 626-628, 1994.

SULLIVAN, S.; EGLI, D.; AKUTSU, H.; MELTON, D.A.; EGGAN,K.; COWAN, C.A. Derivation of human embryonic stem cell lines. In: SULLIVAN, S.; COWAN, C.A.; EGGAN, K. **Human Embryonic Stem Cells: The Practical Handbook**. John Wiley and Sons, 2007. 4, p.35-51.

- SWANSON, W.F.; ROTH, T. L.; GODKE, R. A. Persistence of the developmental block of in vitro fertilized domestic cat embryos to temporal variations in culture conditions. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 298-305, 1996.
- THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145-1147, 1998.
- TOMASZ, M.; LIPMAN, R.; CHOWDARY, D.; PAWLAK, J.; VERDINE, G.L.; NAKANISHI, K. Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. **Science**, v. 235, p. 7212-7220, 1987.
- TOSTI, E.; BONI, R.; CUOMO, A. Fertilization and activation currents in bovine oocytes. **Reproduction**, v. 124, p. 835-846, 2002..
- VELJSTED, M. DU, Y.; VATJA, G.; MADDOX-HYTTEL, P. Post-hatching development of the porcine and bovine embryos-defining criteria for expected development in vivo and in vitro. **Theriogenology**, v. 65, p. 153-165, 2006.
- WANG, W. H.; MACHATY, Z.; RUDDOCK, N.; BBEYDEERA, L. R.; BOQUEST, A. C.; PRATHER, R. S.; DAY, B. N. Activation of porcine oocytes with calcium ionophore: Effects of extracellular calcium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 99-107, 1999.
- WANG, L.; LI, L.; MENENDEZ, P.; CERDAN, C.; BHATIA, M. Human embryonic stem cells maintained in the absence of mouse embryonic fibroblasts or conditioned media are capable of hematopoietic development. **Blood**, v. 105, p. 4598-4603, 2005a.
- WANG, L.; DUAN, E.; SUNG, L.H.; JEONG, B.S.; YANG, X.; TIAN, X.C.; Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. **Biology Reproduction**, v.73, p. 149-155, 2005b.
- WANG, Z.; WANG, W.; YU, Z. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. **Animal Reproduction Science**, p.292-301, 2008.
- WATSON, A.J.; DE SOUZA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M.E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology Reproduction**, v. 62, p. 355-364, 2000.

- WHITE, K. L.; YUE, C. Intracellular receptors and agents that induce activation in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 91-100, 1996.
- WILDT, D.E., SCHIEWE, M.C., SCHMIDT, P.M., GOODROWE, K.L., HOWARD, J.G., PHILLIPS, L.G., O'Brien, S.J. & Bush, M. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wild-life. **Theriogenology**, v.25, p. 33-51, 1986.
- WOBUS, A.M.; BOHELER, K.R. Embryonic stem cells: prospects for development biology and cell therapy. **Physiological Review**, v. 85, p. 635-678, 2005.
- WOLFE, B.A.; WILDT, D.E. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. **J. Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 135-141, 1996.
- WOOD, T.C.; BYERS, A.P.; JENNETTE, B.E.; WILDT, D.E. Influence of protein and hormone supplementation on in vitro maturation and fertilization of domestic cat eggs. **J. Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 315-323, 1995.
- WOOD, T.C.; WILDT, D.E. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocyst in vitro. **J. Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 355-360, 1997.
- WOOD, T.C.; MONTALI, R.J.; WILDT, D.E. Follicle-Oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 46, p. 190-200, 1997.
- XU, C.; INOKUMA, M.S.; DENHAM, M.S.; GOLDS, L.; KUNDU, P.; GOLD, J.D.; CARPENTER, M.K. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 971-974, 2001.
- YANG, X.; PRESICCE, G.A.; MORAGHAN, L.; JIANG, S.; FOOTE, R.H. Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, p. 395-403, 1994.
- YEOH, J.S.G.; HAAN, G. Fibroblast growth factor as regulators of stem cell self-renewal and aging. **Mechanisms of Ageing**, v. 128, p. 17-24, 2007.
- YI, J., PARK, C. S. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**. v. 86, p. 295-304, 2005.
- YU, X.; JIN, X.J.; CHOI, D.S.; JUNG, D.K.; CHOI, B.H.; CHO, S.G.; KONG, L.K. Serum-free derivation of cat embryonic stem-like cells derived from in vivo-

produced blastocysts on cat embryonic fibroblast feeder. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 232, 2007 (Abstract).

ZAGO, M.A. Células-Tronco: origens e propriedades. In: ZAGO, M.A; COVAS, D.T. **Células-Tronco: a nova fronteira da medicina**. 1. ed. São Paulo: Editora Ateneu, 2006. 1, p.3-20

ZANDER, D.L.; THOMPSON, J.G.; LANE, M. Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure a the cleavage stages. **Biology Reproduction**, v. 74, p. 288-294, 2006.

ZHOU, D.; LIU, T.; ZHOU, X.; LU, G. Three key variables involved in feeder preparation for the maintenance of human embryonic stem cells. **Cell Biology International**, p. 1-5, 2009.

ANEXOS

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Tabela 8. Meios TALP-FIV e TALP-SÊMEN.

REAGENTES	CONCENTRAÇÕES		Empresa	Código
	TALP-FIV	TALP-SÊMEN		
NaCl	114mM	114mM	Sigma	S5886
KCl	3mM	3mM	Sigma	P5405
NaHCO ₃	25mM	25mM	Sigma	S5761
MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,5mM	0,5mM	Sigma	M2393
CaCl ₂ ×2H ₂ O	2mM	2mM	Sigma	C4901
NaH ₂ PO ₄	0,3mM	0,3mM	Sigma	S5011
Lactato de Sódio	12mM	21,6mM	Sigma	L4263
Hepes Ácido	0mM	10mM	Sigma	H6147

9.2 ANEXO 2

Tabela 9. Meio SOFaa.

Reagentes	Concentração	Empresa	Código
NaCl	107,6mM	Sigma	S5886
KCl	7,16mM	Sigma	P5405
NaHCO ₃	25mM	Sigma	S5761
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,74mM	Sigma	M1880
CaCl ₂ ×2H ₂ O	1,78mM	Sigma	C7902
KH ₂ PO ₄	1,2mM	Sigma	P5655
Tri-Sódio Citrato	0,34mM	Sigma	S4641
Lactato de Sódio	4,2mM	Sigma	L4263
Aminoácidos Essenciais	3%	Sigma	B6766
Aminoácidos não essenciais	1%	Gibco	11140-050

9.3 ANEXO 3

Tabela 10. Meio FOC.

Reagentes	Concentração	Empresa	Código
NaCl	100mM	Sigma	S5886
KCl	8mM	Sigma	P5405
NaHCO ₃	25mM	Sigma	S5761
MgSO ₄ X7H ₂ O	1mM	Sigma	M1880
CaCl ₂	2mM	Sigma	C4901
KH ₂ PO ₄	1mM	Sigma	P5655
Lactato de Sódio	6mM	Sigma	L4263
Glicose	1,5mM	Sigma	G6152
Aminoácidos não essenciais	1%	Gibco	11140-050

TRABALHO CIENTÍFICO

“Trabalho enviado para a revista Theriogenology”

**Parthenogenetic development of domestic cat oocytes treated with
ionomycin, cycloheximide, roscovitine and strontium**

T.S.Rascado^a, L.R.Martins^a, B.W.Minto^b, S.E.R.S.Lorena^b,
F.C.Landim-Alvarenga^a

^a Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty of
Veterinary Medicine and Animal Science, FMVZ, UNESP, Distrito de Rubião
Júnior, s/n zip code 18618-000, Botucatu, Brazil

^b Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, Faculty of Veterinary
Medicine and Animal Science, FMVZ, UNESP

Abstract

The objective of the present experiment was to evaluate the parthenogenetic activation of domestic cat oocytes. Cumulus oocyte complexes obtained after ovariectomy from adult health queens were subjected to three different protocols of parthenogenetic activation: Group 1 – Ionomycin associated with cycloheximide; Group 2 – ionomycin associated with roscovitine, and Group 3 – ionomycin associated with strontium. As a control, cat embryos were produced in vitro. In all of the groups, the embryos were cultured in SOFaa for 72 hours after activation/fertilization, and evaluated for activation rate, cleavage and embryo development using Hoechst 33342. Statistical analysis was performed using chi-square with significance levels of 5%. No statistic differences were observed among groups in relation to the

number of activated oocytes (69.9%, 76.6% and 64.6%, for treatment 1, 2 and 3 respectively); nor in relation to cleavage rates (46.6%, 46.73% and 32.32%, for treatment 1, 2 and 3 respectively). However, the cleavage rates were statistically different between the treatment groups and the control. When embryo development was analyzed, the results showed no differences among the treatment groups for the embryos with 2 to 10 cells, 10 to 16 cells and 16 to 32 cells ($P>0.05$). However, the embryo production rate was significantly higher ($P<0.05$) in the control group compared with the parthenogenetic activation, independent of the drug combination used. The results obtained in the present experiment indicate that all of the treatments tested were effective in inducing parthenogenetic activation in cat oocytes. However, the parthenogenetic activation resulted in the formation of fewer embryos compared with the control.

Keywords: Artificial activation, cat, strontium, roscovitine, cycloheximide

1. Introduction

In mammals, the mature oocyte is maintained in the second meiotic arrest (MII phase) until sperm penetration or the occurrence of an artificial stimulus (parthenogenetic activation) [1].

Oocyte activation is characterized by pulsate elevations in the intracellular calcium levels, and by the reduced activity of the maturation promoter factor (MPF) and the mitogen activation promoter factor (MAP). These modifications in the cellular environment lead to a depolarization of the oocyte membrane, a release of the cortical granule contents and a hardening of the zone pellucid, which characterize polyspermy blockage. The second meiotic

arrest is also finalized with the liberation of the second polar body and the formation of male and female pronuclei [2,1].

When the sperm is not present, the intracellular calcium concentration can be raised by several mechanical and chemical stimuli. Although the amplitude and the duration of the calcium peaks produced artificially differ from the ones observed during fertilization, they are still capable of inducing the events of oocyte activation that characterize parthenogenetic activation [3].

The most efficient parthenogenetic activation methods combine the use of a calcium ionophore, ethanol, strontium or an electric stimulus. Electrical stimuli induce a transitory calcium elevation, while drugs induce a more permanent MPF inhibition, such as protein synthesis inhibitors (cycloheximide) and protein kinase inhibitors [4,3].

The calcium ionophore (ionomycin and A23184) is capable of forming a complex that transports the calcium ions into the cells through the membrane [5]. However, the precise mechanism of intracellular calcium liberation induced by calcium ionophores is not fully understood, since some results indicate that the presence of calcium in the medium is not necessary for intracellular calcium elevation induced by calcium ionophores [3].

The strontium also induces calcium elevation in the cells. The use of this compound results in multiple and periodic calcium oscillations, which are very similar to the ones observed after sperm penetration. Efficient oocyte activation was obtained with strontium in oocytes from mice [6], pigs [7] and cows [8,9].

Protein synthesis inhibitors such as cycloheximide are responsible for reducing the CSF synthesis, resulting in an indirect effect that decreases the

MPF activity and restarts meiosis. On the other hand, the roscovitine is a specific MPF inhibitor that has been used to delay meiotic progression in the oocytes from bovine [10], porcine [11], equine [12] and ovine [13] species. The meiosis blockage induced by roscovitine has no effect on the subsequent embryo development, suggesting that this drug could also be used for parthenogenetic activation.

In cats, the protocols for parthenogenetic activation are not very well documented, since the literature on the subject is scarce. Due to this lack of information, the present experiment aimed to evaluate parthenogenetic activation induced in *in vitro* matured cat oocytes using the combination of ionomycin with cycloheximide, roscovitine or strontium.

2. Materials and Methods

All chemicals utilized were purchase from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise specified.

2.1. Oocyte recovery and *in vitro* maturation

Ovaries were obtained from adult health queens submitted to ovariectomy. For the recovery of complex-cumulus-oocytes (CCOs), each ovary was individually sliced. Only the CCOs with a uniform and dark cytoplasm and

presenting at least two layers of compact cumulus cells were used in this experiment.

For *in vitro* maturation, 20 to 30 oocytes were cultured in four-well dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) containing 400 µl of DMEM (GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 4 mg/mL BSA, 1 mM sodium pyruvate, 0.13 mM cysteine, 20 ng/mL IGF-I, 10 ng/mL bFGF, 10 µg/mL FSH (Folltropin[®], Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, Canada), 1 µg/mL LH (Lutropin-V[®], Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, Canada), 1 µg/mL estradiol, 100 mg/mL streptomycin and 100 UI/mL penicillin (GIBCO). Oocytes were maintained at 38.5⁰C in a 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ atmosphere with 100% humidity for 36 h.

2.2. Oocyte activation

At the end of the maturation period the oocytes were striped using a fine bore glass pipette and subjected to one of the following treatments:

Control – oocytes were cultured in MEM (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Nutricell, Campinas, SP, Brazil) in the absence of any activation agent.

Ionomycin + Cycloheximide (1) – oocytes were incubated in MEM-hepes (GIBCO) with 5µM ionomycin for 8 min and transferred to a solution with MEM supplemented with 10 µg/mL of cycloheximide and 7.5 µg/mL of cytochalasin B for 6 h.

Ionomycin + Roscovitine (2) – after 8 min of incubation in MEM-hepes (GIBCO) with 5uM ionomycin, the oocytes were transferred to a solution with MEM supplemented with 66 uM roscovitine and 7.5 ug/mL cytochalasin B for 6 h.

Ionomycin + Strontium (3) – oocytes were incubated in MEM-hepes (GIBCO) with 5uM ionomycin for 8 min and transferred to a solution with MEM supplemented with 20 mM strontium ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, J.T.BAKER) and 7.5 ug/mL cytochalasin B for 6 h.

2.3. Culture

At the end of the activation protocol, the oocytes were cultivated in 100 μL drops of SOF (107.6 mM NaCl, 7.16 mM KCl, 25 mM NaHCO_3 , 0.74 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.78 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM KH_2PO_4 , 0.34 mM Tri-Sodium citrate and 4.2 mM sodium lactate) supplemented with 1% non essentials amino acids, 3% essential amino acids, 6 mg/mL BSA, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 2.7 mM myoinositol, 100mg/mL streptomycin and 100 UI/mL penicillin under mineral oil at 38.5°C in a 5% O_2 , 5% CO_2 and 90% N_2 atmosphere for 72 h.

2.4. Evaluation of activation treatment

The index of oocyte activation was established after 72 h in culture by transferring the oocytes to drops with 10 ug/mL bisbenzimidazole (Hoescht 33342) into glycerol. Samples were analyzed in an inverted fluorescent microscope

equipped with a UV light. The oocytes were considered activated when cleavage or a decondensed chromatin was observed.

2.5 Experimental design

Six replicates of oocyte activation were performed in each treatment using 17 oocytes in each replicate. Treatments were compared concerning the percentage of activated oocytes, the proportion of oocytes with a decondensed chromatin and cleavage, as well as embryo development from 2 to 10 cells, 10 to 16 cells and 16 to 30 cells.

In the control group, the oocytes were cultured without activation treatment to confirm that parthenogenetic activation was promoted by the proposed protocols and not by the culture conditions.

2.6 Statistical analysis

The rates of activated oocytes, non-activated oocytes, cleavage and embryonary development were evaluated using a chi-square test with a level of significance of 5% (Bioestat 5.0).

3. Results

No differences ($P>0.05$) were observed among the treatments in relation to activation rates (Table 1). However, the results obtained in the treatment groups were different ($P<0.05$) from the control.

Table 1. Percentage of oocyte activation in accordance with the treatment group.

Treatment	Non-activated (%)	activated (%)
Control	64/100 (64.0) ^a	36/100 (36.0) ^b
Ionomycin + Cycloheximide	31/103 (30.1) ^b	72/103 (69.9) ^a
Ionomycin + Roscovitine	25/107 (23.4) ^b	82/107 (76.6) ^a
Ionomycin + Strontium	35/99 (35.4) ^b	64/99 (64.6) ^a

Letters with different values on the same column differ (P<0.05).

The results showed that cleavage rates were not different (P>0.05) among the treatment groups, but the number of cleavage embryos in the control group was lower than the numbers observed in all of the treatments tested. Similarly, the percentage of oocytes with a decondensed chromatin that did not progress through to cleavage was not different among the treatment groups, or between the control and the treatment groups (P>0.05) (Table 2).

Table 2. Percentage of oocytes that cleaved or presented a decondensed chromatin in relation to the total number of oocytes in each treatment.

Treatment	Decondensed chromatin	Cleaved
Control	24/100 (24.00) ^a	12/100 (12.00) ^b
Ionomycin + Cycloheximide	24/103 (23.30) ^a	48/103 (46.60) ^a
Ionomycin + Roscovitine	32/107 (29.91) ^a	50/107 (46.73) ^a
Ionomycin + Strontium	32/99 (32.32) ^a	32/99 (32.32) ^a

Letters with different values on the same column differ (P<0.05).

The percentage of cleaved oocytes that developed until 2 to 10 cells, 10 to 16 cells and 16 to 30 cells is shown in Table 3. No difference was observed among the groups ($P>0.05$), but the results in the control group were different from all of the treatments tested ($P<0.05$).

Table 3. Percentage of cleaved oocytes that developed into embryos in each treatment.

Treatment	Treated oocytes	Cleaved oocytes (%)	Embryonary development		
			2 to 10 cells	10 to 16 cells.	16 to 30 cells.
Control	100	12 (12) ^a	11 (91.67) ^a	0 (0.00) ^a	1 (8.33) ^b
Ionomycin + Cycloheximide	103	48 (46.60) ^b	28 (58.33) ^b	8 (16.67) ^b	12 (25.00) ^a
Ionomycin + Roscovitine	107	50 (46.72) ^b	28 (56.00) ^b	11 (22.00) ^b	11 (22.00) ^a
Ionomycin + Strontium	99	32 (32.32) ^b	19 (59.37) ^b	6 (18.75) ^b	7 (21.88) ^a

Letters with different values on the same column differ ($P<0.05$).

4. Discussion

For oocyte activation to occur, it is necessary that the MPF and the MAPK levels were low. This reduction is obtained due to the multiple and periodic oscillations in the intracellular calcium content [2]. During fertilization, these changes are induced by the interaction between the oocyte and the sperm, or by the release of a sperm factor into the oocyte cytoplasm [1]. When the sperm is not present, the intracellular calcium concentration can be raised artificially by a combination of several chemical activators [3]. Although this process is well described in many mammals, in cats, the protocols for artificial activation are poorly described in the literature.

In the present experiment, domestic cat oocytes submitted to three different activation protocols were matured *in vitro* for 36 h. Several studies [8,14] demonstrate that aging oocytes undergo artificial activation more rapidly than oocytes matured for shorter periods (24 h). In fact, it was reported that oocytes matured *in vitro* for 24 h presented levels of MAPK and MPF significantly higher than the ones matured for 40 h [15]. However, the developmental competence of these aging oocytes is low [16,17]. The maturation of cat oocytes from 42 to 45 h significantly reduced embryo development after fertilization [16,18].

The index of spontaneous oocyte activation obtained in the present experiment was 36%, which is significantly higher than the one described by Gabriec et al. [8], who reported only 2% spontaneous oocyte activation in the domestic cat. This difference may be linked with the long maturation time (36 h) used in the present experiment, since at 40 h of maturation, the levels of MAPK and MPK are lower than those required for facilitating the occurrence of spontaneous oocyte activation [15].

The utilization of ionomycin as a single agent to induce parthenogenetic activation resulted in 47% oocyte activation [20]. However, many other reports indicate that better results are obtained when ionomycin is associated with other drugs to prevent the elevation of MPF levels, such as protein synthesis inhibitors [21,22].

When the association between calcium ionophore and cycloheximide was used, 69.9% of the cat oocytes studied was positively activated. This rate is superior than the one obtained using only ionomycin (47%) [20], but is lower

than the one previously described by Keller et al. [23] who obtained 90% oocyte activation using the same drug combination. Moreover, the cleavage rate obtained in the present experiment was also lower at 46.6% compared to the 82% described by Du et al. [24]. The explanation for the lower oocyte activation rates obtained in the present experiment probably relates to the fact that the oocytes were destined to artificial activation without previous evaluation for the presence of a polar body, indicating that some oocytes might have still been immature at the moment of activation and were not capable of responding to the chemical stimulus. Also, some oocytes in Metaphase I could form tetraploid embryos after activation, since the first polar body was not yet extruded. In those embryos, the first cleavage appeared normal, but further development was always impaired.

Moreover, the different experimental conditions may also be responsible for the differences observed between the results of the present experiment and the literature. The results from Keller et al. [23] and from Du et al. [24] were obtained after exposure of the oocytes to ionomycin for 5 min followed by 4 to 5 h of cycloheximide treatment, while in the present experiment oocytes were exposed to ionomycin for 8 min and treatment with cycloheximide lasted for 6 h. This protocol was chosen based on the good results for bovine oocyte activation obtained previously in our laboratory [25].

Gabriele et al. [19] obtained 48.43% oocyte activation and 18.24% cleavage using the association of ethanol and cycloheximide. On the other hand, the association of ethanol, cycloheximide and an electric stimulus resulted in 29.68% oocyte activation and only 5.16% cleavage rates. These results are lower than the ones obtained in the present experiment in all of the

treatment groups, but are similar to the control group (36% oocyte activation and 12% cleavage rate). However, it is difficult to compare the results obtained using different protocols, especially because the effect of each drug on oocytes is different.

Kitiyant et al. [26] were able to obtain a 70% rate of development of the embryos to the two cell stage and 40% morulae using 6-DMAP associated with the calcium ionophore, compared to 46.72% of cleaved oocytes and 22% of 16 to 30 cell embryos obtained in the present experiment using roscovitine. Although Roscovitine and 6-DMAP are both protein kinase inhibitors, their action is different. Roscovitine acts specifically on the phosphorylation of the MPF, while the 6-DMAP acts indirectly on the phosphorylation of other proteins, which results in the decrease of MPF activity. The effect of the calcium ionophore in association with 6-DMAP was already described in cats [26]. To our knowledge, however, this is the first report of cat oocyte activation using ionomycin and roscovitine.

The ideal concentration of roscovitine used in mouse oocytes to reduce the MPF activity was ≥ 50 μ M, since the use of 20 μ M was not enough to reduce the activity of the H1 histone, and the use of 100 μ M, although not toxic for the oocytes, resulted in similar activation rates compared with the concentration of 50 μ M [27]. No previous data were presented in the literature concerning the use of roscovitine for cat oocytes, and in the present experiment the concentration of 66 μ M was based on the results obtained to prevent meiosis in equine oocytes [12]. However, a dose response experiment may be necessary to determine the ideal concentration of roscovitine for cat oocytes.

The use of strontium to activate oocytes was previously described in pigs [7] and in cows [9]. Strontium acts through the induction of calcium oscillations using the intracellular stocks of the ion [28]. In pigs, the use of 10mM of strontium associated with ionomycin improved the activation and the embryo development in comparison to the use of ionomycin alone [7], while in cows no differences were observed on oocyte activation when 20 mM of strontium was utilized alone or in association with ionomycin [9].

Again, to our knowledge, this is the first report of the use of strontium to activate cat oocytes. In the present experiment the oocytes were treated with strontium in media with calcium, since Meo et al. [9] did not find any differences when cow oocytes were activated with strontium in media with the presence or absence of Ca^{++} and Mg^{++} . The presence of calcium in the media containing strontium, however, may interfere with the oocyte activation [28].

In conclusion, the results of oocyte activation obtained in this study were similar between the use of cycloheximide, roscovitine and strontium. However, to optimize the use of strontium and roscovitine, a dose response and the effect of the presence of Ca^{++} in the media still need to be studied in cats.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP.

References

- [1] Küpker W, Diedrich K, Edwards RG. Principles of mammalian fertilization. Hum Reprod 1998;13:20-33.
- [2] White KL, Yue C. Intracellular receptors and agents that induce activation in bovine oocytes. Theriogenology 1996;45:91-100.
- [3] Grupen CG, Nottle MB, Nagashima H. Calcium release at fertilization : artificially mimicking the oocyte's response to sperm. Reprod Dev 2002;48: 313-333.
- [4] Karja NWK, Otoi T, Murakami M, Wongsrikeao, P, Budiyo A, Fahrudin, M, Nagai T. Effect of cycloheximide on in vitro development of electrically activated feline oocytes. Reprod Dev 2005;51:783-788.
- [5] Wang WH, Machaty Z, Ruddock N.; Bbeydeera LR, Boquest AC., Prather RS, Day BN. Activation of porcine oocytes with calcium ionophore: effects of extracellular calcium. Mol Reprod Dev 1999;53:99-107.
- [6] Bos-mikichi A, Wood M.J, Candy C.J, Whittingham, DG. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. Biol Reprod 1995;53:780-785.
- [7] Che L, Lalonde A, Bordignon V. Chemical activation of parthenogenetic and nuclear transfer porcine oocytes using ionomycin and strontium chloride. Theriogenology 2007;67:1297-1304.
- [8] Méo SC, LEAL CLM, Garcia JM. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. Ann Reprod Sci 2004;81:35-46.

- [9] Méo SC, Yamazaki W, Leal CLV, Oliveira JA, Garcia JM. Use of strontium for bovine oocyte activation. *Theriogenology* 2005;63:2089-2102.
- [10] Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the vesicle stage for 24h in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol Reprod Dev* 2000;55:89-95.
- [11] Schoevers EJ, Bevers MM, Roelen BA, Colenbrander B. Nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes are not synchronized by specific meiotic inhibition with roscovitine during in vitro maturation. *Theriogenology* 2005;63:1111-1130.
- [12] Franz LC, Choi YH, Squires EL, Seidel GE, Hinrichs KE. Effects of roscovitine on maintenance of germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction* 2003;125:693-700.
- [13] Jimenez-Macedo, A.R.; Izquierdo D.; Urdaneta A.; Anguita B.; Paramio M.T. Effect of roscovitine on nuclear maturation, MPF and MAP kinase activity and embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 2006;65:1769-1782.
- [14] Soloy E, Kanka J, Viuff D, Smith SD, Callesen H, Greve T. Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biol Reprod* 1997;57:27-35.
- [15] Bogliolo L, Leoni G., Ledda S, Zedda MT, Bonelli P.; Madau L.; Santucci C; Naitana S, Pau S. M-phase promoting factor (MPF) and mitogen activated

protein kinases (MAPK) activities of domestic cat oocytes matured in vitro and in vivo. *Cloning Stem Cells* 2004;6:15-23.

[16] Skrzyszowska M, Katska L, Rynska B, Kania G, Smorag Z, Pienkowski M. In vitro developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. *Theriogenology* 2002;58:1615-1621.

[17] Karja NM, Otoi T, Wongsrikeao P, Shimizu R, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T. Effects of electric field strengths on fusion and in vitro development of domestic cat embryos derived by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 2006;66:1237-1242.

[18] Katska-ksiazkiewicz L, Rynska B, Kania G, Smorag, Z, Gajda B, Pienkowski M. Timing of nuclear maturation of nonstored and stored domestic cat oocytes. *Theriogenology* 2003;59:1567-1574.

[19] Gabrieć A, Max A, Tischner M. Parthenogenetic activation of domestic cat oocytes using ethanol, calcium ionophore, cycloheximide and a magnetic field. *Theriogenology* 2007;67:795-800.

[20] Gomez MC, Pope CE. Current concepts in cat cloning. In: Inui A, editor. *Epigenetic risks of cloning*. Publisher: Taylor and Francis; 2006.p.11-51 [Chapter 8].

[21] Yi J, Park CS. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. *Anim Reprod Sci* 2005;86:295-304.

[22] Wang Z, Wang W, Yu Z. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. *Anim Reprod Sci* 2008;292:301.

[23] Keller DL, Cox AM, Westhusin ME, Kraemer DC. Feline oocyte activation : effects on level of MPF and MAPK. *Theriogenology* 2001;55:454 [Abstract].

[24] Du FL, Jiang S, Tian XC, Avner D, Yang X. Parthenogenetic activation and somatic nuclear transfer in domestic cat using in vitro matured oocytes. *Theriogenology* 2002;57:409 [Abstract].

[25] Fernandes CB, Devito LG, Martins, LR, Rascado, TS, Landim-Alvarenga, FC. Parthenogenetic activation of in vitro matured bovine oocytes with ionomycin, cycloheximide, roscovitine and strontium. *Acta Scientiae Veterinariae* 2007;35:1263 [Abstract].

[26] Kitiyanant Y, Saikhun J, Pavasuthipaisit, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocyte treated with IGF-I for in vitro maturation. *Theriogenology* 2003;59:1775-1786.

[27] Deng M, Shen SS. A specific inhibitor of p34 cdc2/cyclin B supresses fertilization-induced calcium oscillations in mouse eggs. *Biol Reprod* 2000;62:873-878.

[28] Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992;149:80-89.

[26] White KL, Yue C. Intracellular receptors and agents that induce activation in bovinen oocytes. *Theriogenology* 1996;45:91-100.

Guide for Authors

PREPARATION

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Use of Word-processing Software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format and double spaced. It is important that all pages and lines are numbered. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts. Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your word processor.

Article Structure

Subdivision - Numbered Sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line, with one blank line above and below each heading.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. In most cases, this section should not exceed approximately 2 double-spaced pages.

Materials and Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise, and should correspond to data collection as described in Materials and Methods.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential Title Page Information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Connor EE, Ashwell MS, Dahl GE. Characterization and expression of the bovine growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. *Domest Anim Endocrinol* 2002;22:189-99.

Reference to a book:

[2] Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. *Principles of Laboratory Animal Science*, Revised Edition. Elsevier B.V., 2001.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Betteridge KJ. Embryo Transfer. In: *Reproduction in Domesticated Animals*, King GJ (Ed.), World Animal Science B9, Elsevier B.V., 1993, pp. 413-8.