

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO *IN*  
*VITRO* DE OÓCITOS DE GATAS DOMÉSTICAS APÓS  
VITRIFICAÇÃO EM MEIO SUPLEMENTADO COM  
VITAMINA E**

**Raquel Ribeiro Gutierrez**

Médica Veterinária

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO *IN*  
*VITRO* DE OÓCITOS DE GATAS DOMÉSTICAS APÓS  
VITRIFICAÇÃO EM MEIO SUPLEMENTADO COM  
VITAMINA E**

**Raquel Ribeiro Gutierrez**

**Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente**

**Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maricy Apparício Ferreira**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

Gutierrez, Raquel Ribeiro  
G984a Avaliação da viabilidade e desenvolvimento *in vitro* de óocitos de  
gatas domésticas após vitrificação em meio suplementado com  
vitamina E / Raquel Ribeiro Gutierrez. -- Jaboticabal, 2014  
VII, 41 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente  
Co-orientadora: Maricy Apparício Ferreira  
Banca examinadora: Eliandra Pires Buttler, Aracelle E. Alves  
Bibliografia

1. Felinos. 2. Óocitos imaturos. 3. Antioxidante. 4. Criopreservação.  
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE OÓCITOS DE GATAS DOMÉSTICAS APÓS VITRIFICAÇÃO EM MEIO SUPLEMENTADO COM VITAMINA E

**AUTORA:** RAQUEL RIBEIRO GUTIERREZ

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA

Pós-doutoranda / Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal /


Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. ELIANDRA ANTONIA PIRES BUTTLER

Professora credenciada / Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal /

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. ARACÉLE ELISANE ALVES

Universidade Federal de Uberlândia / Uberlândia/MG

Data da realização: 15 de maio de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**RAQUEL RIBEIRO GUTIERREZ** – nascida em 27 de Novembro de 1987, no município de São Paulo – SP, filha de Vanda Carmem Ribeiro Gutierrez e Tomas Gutierrez Montero. Ingressou em Março de 2005 no curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu (FMVZ-UNESP – Botucatu), concluindo-o em dezembro de 2009. Em Fevereiro de 2010 iniciou o Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, área de concentração Reprodução e Obstetrícia Animal, na FCAV - UNESP- Jaboticabal, concluindo-o em Janeiro de 2012. Em Março de 2012 iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração Reprodução Animal, na FCAV - UNESP- Jaboticabal.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	II
ABSTRACT.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Fisiologia reprodutiva da gata doméstica.....	4
2.2. Criopreservação de oócitos.....	6
2.3. Antioxidantes.....	11
3. MATERIAL E MÉTODO.....	14
3.1. Organograma do delineamento experimental.....	14
3.2. Animais.....	15
3.3. Obtenção e seleção de oócitos.....	15
3.4. Vitrificação de oócitos imaturos.....	18
3.5. Descongelamento, aquecimento e avaliação morfológica.....	18
3.6. Avaliação da viabilidade oocitária.....	21
3.7. Maturação <i>in vitro</i> e avaliação das taxas de maturação nuclear.....	21
3.8. Análise Estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÕES.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## **AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE GATAS DOMÉSTICAS APÓS VITRIFICAÇÃO EM MEIO SUPLEMENTADO COM VITAMINA E**

**RESUMO** - O emprego de técnicas de criopreservação de gametas em felinos domésticos são consideradas importantes no aprimoramento de procedimentos na reprodução assistida. A vitrificação se baseia no uso de altas concentrações de crioprotetores com o intuito de inibir a formação de cristais de gelo. É possível que a criopreservação induza a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou altere o potencial antioxidante enzimático do oócito, sendo assim, aventa-se que a adição de antioxidantes aos meios de vitrificação poderia reduzir o estresse oxidativo causado pelos crioprotetores. No experimento I compararam-se quatro protocolos de vitrificação utilizando-se como meio base (MB) o TCM199 (Meio de cultura de tecidos 199) com glicose mais antibiótico, acrescido de crioprotetores: G1 (3M etilenoglicol-EG + 2M de dimetilsulfóxido-DMSO), G2 (3M EG + 3M 1,2 propanediol-PrOH), G3 (1,5M EG + 1M DMSO) e G4 (1,5M EG + 1,5M PrOH). Após descongelamento, este material foi avaliado quanto à alteração morfológica e viabilidade (coloração cFDA/*trypan blue*). Neste, não houve diferença estatística ( $p=0,2857$ ) entre os oócitos descongelados dos quatro grupos estudados em relação à morfologia, mas em relação a viabilidade oocitária os grupos G1 e G2 obtiveram maior porcentagem de oócitos viáveis, porém não diferiram entre si (35,71% e 36,84%, respectivamente;  $p=0,018$ ). No experimento II três concentrações de vitamina E (0,4, 0,6 e 0,8mM) foram acrescidas ao protocolo de MB com 3M EG + 3M PrOH, formando os grupos G 0,4mM, G 0,6mM, G 0,8mM e o G 0 (sem adição de vitamina E). A escolha do protocolo base foi de acordo com os resultados obtidos no experimento I. Observamos que houve melhora da porcentagem ( $p=0,0032$ ) de oócitos que apresentavam morfologia normal, nos grupos G 0,6mM (88,6%) e G 0,8mM (62,5%). Oócitos do experimento II que mantiveram sua morfologia após a descongelamento foram submetidos à maturação *in vitro* por um período de 36 horas. Ao avaliarmos a retomada da meiose, observamos que não houve diferença estatística entre os 4 grupos e também quando os mesmos foram comparados com o controle (oócitos frescos, submetidos a MIV;  $p= 0,0052$ ). Conclui-se que a vitamina E na concentração de 0,6mM pode melhorar a taxa de sobrevivência pós-descongelamento, porém mais estudos são necessário para sabermos o real dano desta substância sobre oócito.

**Palavras chave:** felinos, oócitos imaturos, antioxidante, criopreservação.

## EVALUATION OF THE VIABILITY AND IN VITRO DEVELOPMENT OF DOMESTIC CATS OOCYTES AFTER VITRIFICATION IN MEDIUM SUPPLEMENTED WITH VITAMIN E

**ABSTRACT** - The use of techniques of cryopreservation of gametes in domestic cats are considered important in enhancing procedures in assisted reproduction. Vitrification is based on the use of high concentrations of cryoprotectants in order to inhibit the formation of ice crystals. It is possible that cryopreservation induces the production of reactive oxygen species (ROS) or change the enzymatic antioxidant potential of the oocyte, so one might speculate that the addition of antioxidants to the means of vitrification could reduce the oxidative stress caused by cryoprotectants. In the first experiment are compared four protocols vitrification using as base medium (MB) the TCM199 (tissue culture medium 199) more antibiotic glucose plus cryoprotectants: G1 (EG + 3M ethylene glycol + 2M dimethyl-DMSO), G2 (3M EG + 3M 1,2 propanediol - PrOH) , G3 (1.5 M EG + 1M DMSO) and G4 (1.5 M EG + 1.5 M PrOH) . After thawing, the material was assessed for viability and morphological changes (staining cFDA / trypan blue). In this , there was no statistical difference ( $p = 0.2857$ ) among the four groups thawed oocytes studied with respect to morphology, but in relation to oocyte viability G1 and G2 groups had a higher percentage of viable oocytes , but did not differ ( 35.71% and 36.84 %, respectively ,  $p = 0.018$ ). In the second experiment three concentrations of vitamin E (0.4 , 0.6 and 0.8 mM) were added to the protocol MB with 3M EG + 3M PrOH , L forming the groups G 0.4 mM, G 0.6 mM, G 0.8 mM and G 0 (no added vitamin E). The choice of the base protocol was in accordance with the results obtained in experiment I. We observed improvement in percentage ( $p = 0.0032$ ) of oocytes with normal morphology in groups G 0.6 mM (88.6 %) and G 0.8 mM (62.5 %). Experiment II oocytes that maintained their morphology after thawing were subjected to in vitro maturation for a period of 36 hours. When evaluating the resumption of meiosis, we observed no statistical difference between the 4 groups and also when they were compared with the control (fresh oocytes undergoing IVM ,  $p = 0.0052$ ). It is concluded that vitamin E at a concentration of 0.6 mM can improve the rate of post -thaw survival, but more studies are needed to know the real harm this substance on oocyte.

**Keywords:** cats, immature oocytes, antioxidant, cryopreservation.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1:</b> A) Animal anestesiado para início do procedimento cirúrgico de ovariectomia. B) Ovário (cabeça de seta) e corno uterino (seta) da fêmea felina. C) Ovários obtidos por ovariectomia mantidos em tubo falcon contendo solução PBS-ATB.....</p>	16
<p><b>Figura 2:</b> Etapas do procedimento de obtenção dos oócitos. A) Ovário dissecado. B) fatiamento dos ovários (<i>slicing</i>). C) liberação dos complexos oócito-<i>cumulus</i> (COC's). D) Placa de Petri contendo solução PBS-PVA com os COC's. E) Complexo COC'S grau 1 (setas) e grau 3 (cabeça da seta), colhidos após realização do <i>slicing</i> de ovários de gatas domésticas (aumento de 20x).....</p>	17
<p><b>Figura 3:</b> A) Palheta de 0,25 mL pronta para vitrificação. a = Solução de sucrose a 0,2 M. b = Meio de vitrificação contendo cinco oócitos. B) Descongelamento da palheta pela sua exposição à temperatura ambiente por 10 segundos. C) seguida de imersão em banho maria a 38°C por 30 segundos. D) Oócitos de gatas domésticas logo após a descongelamento classificados como morfologicamente normais (setas) e com morfologia anormal (cabeça da seta) (aumento de 20x).....</p>	20

**Figura 4:** Fotomicrografias de complexos oócito-*cumulus* (COC) de gatas domésticas corados pelo cFDA/*Trypan Blue* (A) COC viável. (B) COC inviável. (C) oócito viável, células do *cumulus* inviável. (D) oócito inviável, células do *cumulus* viável. Coloração HOESCHT 33342 (E) Vesícula germinativa. (F) Quebra de vesícula germinativa. (G) Metáfase I. (H) Metáfase II. (Figuras A e D aumento de 40x, as outras figuras aumento de 20x).....

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Número absoluto e relativo (%) de oócitos pós-descongelamento apresentando morfologia normal e classificados como viáveis após coloração com o cFDA/ <i>Trypan Blue</i> nos quatro grupos experimentais. Jaboticabal 2014.....	24
<b>Tabela 2.</b> Número absoluto e relativo (%) de oócitos criopreservados em três concentrações de vitamina E (0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM) e sem a adição de vitamina E apresentando morfologia normal pós-descongelamento. Jaboticabal 2014.....	25
<b>Tabela 3.</b> Efeito da vitrificação de oócitos em meios com diferentes concentrações de vitamina E sobre a retomada da meiose e percentual de degenerados. Jaboticabal, 2014.....	26
<b>Tabela 4.</b> Número absoluto e relativo (%) de oócitos felinos classificados segundo seu status meiótico após terem sido congelados em concentrações distintas de vitamina E, descongelados e cultivados <i>in vitro</i> por 36 horas. Jaboticabal 2014.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(%).....	Porcentagem
ATB.....	Antibiótico
°C.....	Graus Celsius
CO <sub>2</sub> .....	Dióxido de carbono
cFDA.....	Diacetato de 5-carboxifluoresceína
COC.....	Complexo oócito-cumulus
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
EG.....	Etilenoglicol
EROs.....	Espécies reativas de oxigênio
FDA.....	Diacetato de floreceína
FIV.....	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH.....	Hormônio folículo estimulante
GLI.....	Glicerol
IP.....	Iodeto de propídio
LH.....	Hormônio luteinizante
M.....	Mol
MB.....	Meio base
MI.....	Metáfase I
MII.....	Metáfase II
MIV.....	Maturação <i>in vitro</i>
min.....	Minuto
µL.....	Microlitro
mL.....	Mili litro
mm.....	Milimetro
mMol.....	Mili mol
ng.....	Nanograma
OH.....	Ováriohisterectomia
OPS.....	<i>Open pulled Straw</i>
PBS.....	Tampão fosfato salino
pg.....	Picograma
PM.....	Peso molecular
PrOH.....	1,2 Propanediol
PVA.....	Álcool Polivinil
QVG.....	Quebra de Vesícula germinativa
TCM199.....	Meio de cultura de tecidos 199
VG.....	Vesícula germinativa

## 1. INTRODUÇÃO

A maioria das espécies de felinos selvagens é classificada como rara, vulnerável ou ameaçada de extinção, devido à caça ilegal e, principalmente, pela perda de seu habitat natural. Por esta razão, a utilização de técnicas de criopreservação de gametas em gatos domésticos é considerada uma importante ferramenta no aprimoramento de procedimentos da reprodução assistida, e seu desenvolvimento contribuirá para a preservação do material genético de animais ameaçados para, que a *posteriori*, sejam estabelecidos programas de conservação de gametas (POPE et al., 1997).

Neste contexto, o gato doméstico é um importante modelo experimental devido à similaridade de sua fisiologia reprodutiva e às respostas de experimentos *in vitro* com essas espécies, podendo inclusive servir como receptor de embriões de pequenos felinos selvagens, como já reportado (GOMEZ et al., 2004).

A criopreservação de oócitos é uma técnica promissora, pois permite o armazenamento dos gametas por tempo indeterminado, mantendo sua atividade funcional e sem causar alteração genética (WHITTINGHAM, 1980). Na espécie felina, os resultados obtidos pela sua utilização ainda são insatisfatórios. Apenas recentemente foi relatado o desenvolvimento até o estágio de blastocisto após um ciclo de congelamento-descongelamento de oócitos imaturos (COCCHIA et. al., 2010) e o desenvolvimento e nascimento de quatro filhotes de gatos a partir de oócitos maduros vitrificados (POPE et al., 2012). Além disso, nesta espécie, os estudos apresentam resultados conflitantes em relação ao método mais viável, estágio em que o gameta deve ser congelado e componentes do meio de criopreservação.

Embora o princípio de todos os procedimentos seja o mesmo, proteger as células dos efeitos do congelamento, tais como, a formação de gelo intracelular, desidratação e efeitos tóxicos, tanto a técnica tradicional (congelamento lento) quanto a vitrificação, causam danos ao material biológico (SHAW et al., 2000).

No congelamento lento, há a vantagem de se utilizar concentrações relativamente baixas de crioprotetores os quais estão associados à toxicidade

química e choque osmótico, no entanto sua habilidade em prevenir a formação de cristais de gelo é limitada. Na vitrificação o uso de altas concentrações de crioprotetores inibe a formação de cristais de gelo e aumenta as taxas de sobrevivência (STACHECKI; COHEN, 2004), em contrapartida torna-se altamente tóxica, sendo necessário minimizar o tempo de exposição dos oócitos a estas substâncias (LUVONI; PELLIZZARI, 2000; VAJTA et al., 1998). Entretanto, a vitrificação pode ser considerada como uma alternativa viável ao método tradicional por ser um procedimento rápido, prático e menos oneroso (BARIL et al., 2001).

O estágio em que o gameta felino se encontra no momento em que é congelado tem sido objeto de alguns estudos, com resultados divergentes. Sabe-se que em oócitos maduros (estádio de metáfase II), os cromossomos estão condensados e dispostos sobre os fusos, não sendo protegidos pelo envelope nuclear, o que pode aumentar a sensibilidade aos danos da criopreservação. Diferentemente, nos oócitos imaturos (estádio de vesícula germinativa) a cromatina ainda está protegida por um envelope nuclear e não há fuso presente, característica que pode ser responsável pela maior resistência à criopreservação (CRITSER et al., 1997; LUVONI, 2006; CHEN et al., 2003; SAUNDERS; PARKS, 1999). Além disso, a utilização de oócitos imaturos ainda pode ser justificada, pela facilidade com que são obtidos em números significativos nos ovários e por dispensar o tratamento hormonal prévio para maturação (LUCIANO et al., 2009).

Em vista do exposto, é notório que ambos os métodos de criopreservação apresentam limitações, muitas das quais relacionadas às alterações celulares decorrentes do choque térmico, osmótico e estresse oxidativo. Estas modificações ocasionam a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's), as quais, por sua vez, prejudicam a qualidade das células (BILODEAU et al., 2001).

No caso da vitrificação, têm sido sugeridas diferentes abordagens para minimizar a toxicidade das soluções de congelamento. Entre elas estão o uso de substâncias menos tóxicas, associação de distintos crioprotetores, exposição prévia a concentrações menores destes agentes e redução do tempo de exposição às soluções de vitrificação (COCCHIA et al., 2010).

Estudos com embriões de camundongos relataram que o EG é menos tóxico do que o glicerol, e na espécie bovina foi responsável por maior taxa de

sobrevivência de embriões (KASAI et al., 1990; MAHMOUDZADEH et al., 1993). E o DMSO mostrou-se um crioprotetor eficaz na vitrificação de oócitos de camundongos e hamsters (BOS-MIKICH et al., 1995; WOOD et al., 1993). Outro crioprotetor comum usado para oócitos de mamíferos é 1,2-propanediol (PrOH), que tem uma baixa toxicidade e favorável capacidade de suportar maturação e fertilização após o descongelamento (LIM et al., 1999).

O estresse oxidativo, resultado da liberação de grande quantidade de ERO's, ocorre quando há desequilíbrio entre estas e os antioxidantes (ANDRADE et al., 2010). É possível que a criopreservação induza a produção de ERO's ou altere o potencial antioxidante enzimático do oócito, uma vez que a membrana plasmática destas células contém fosfolípidios ricos em ácidos graxos poliinsaturados esterificados, que são sensíveis a reações oxidativas (DINARA et al., 2001).

Sendo assim, aventa-se que a adição de antioxidantes aos meios de vitrificação poderia reduzir o estresse oxidativo causado pelos crioprotetores, resultando em maiores taxas de sobrevivência pós- descongelamento e contribuindo para a retomada da meiose quando cultivados *in vitro*. Em vista disso, os objetivos específicos desse trabalho foram: comparar dois protocolos de vitrificação (etilenoglicol + dimetilsulfóxido e etilenoglicol + 1,2 propanediol) para oócitos de gatas domésticas; investigar se a adição de vitamina E aos protocolos de vitrificação favorece a preservação dos oócitos felinos e incrementa as taxas de maturação *in vitro* e estabelecer a concentração adequada de vitamina E a fim de reduzir os danos causados pelo processo de vitrificação e favorecer a competência meiótica dos oócitos felinos pós descongelamento.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Fisiologia reprodutiva da gata doméstica

A gata doméstica é tradicionalmente classificada como poliéstrica estacional. Porém, muitas vezes se comporta como uma espécie não sazonal. Tem ovulação induzida pelo coito, mas também podem ser induzidas a ovular por estímulos visuais ou por ferormônios (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; GUBERMUTH et al., 1997; POPE, 2000; JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN; NELSON, 1996).

O início da puberdade é bastante variável podendo ocorrer entre 04 a 12 meses. Normalmente ocorre quando atingem pelo menos 80% do peso de adulto (FELDMAN; NELSON, 1996; VERSTEGEN, 1998; JOHNSTON et al., 2001). Há também variação racial para o início da puberdade. Raças de pelos longos tendem a apresentar a puberdade mais tardiamente do que raças de pelos curtos (JOHNSTON et al., 2001).

A atividade sexual da gata é favorecida nas épocas em que os dias são mais longos. Porém quando estão na região equatorial, onde as estações não são bem definidas, a gata pode ser coberta o ano todo (GRUFFYDD-JONES, 1955). Gatas entre um a sete anos estão no período ideal para reprodução ao passo que fêmeas fora dessa faixa etária tendem a apresentar ciclos irregulares (FELDMAN; NELSON, 1996). Por esta razão, em técnicas de reprodução assistida, é aconselhável o emprego de gametas oriundos de fêmeas com esta idade.

O ciclo estral nas gatas apresenta duração média de duas a três semanas, com uma ampla variação (entre cinco e 73 dias), especialmente devido ao desencadeamento ou não da ovulação. Pode ser dividido nas seguintes fases; proestro, estro, interestro, diestro (gestação ou pseudogestação) e anestro (JOHNSTON et al., 2001).

No proestro ocorre o aumento das concentrações séricas de estradiol, secretado pelas células da granulosa dos folículos ovarianos. A duração é de 12 a 72 horas, com média de 48 horas e se caracteriza por mudanças comportamentais, tais como maior docilidade, vocalização, rolamento do corpo, fricção da cabeça

contra objetos, lordose do posterior e atração do macho sem permitir a cópula (FELDMAN; NELSON, 1996, JOHNSTON et al., 2001).

O estro é caracterizado pela receptividade da fêmea à monta e ocorre durante o pico de atividade folicular e secreção de estradiol, cuja concentração plasmática pode alcançar 70 pg/mL. Nessa fase, a gata apresenta acentuação dos sinais do proestro, atraindo o macho e aceitando a monta (GOODROWE et al., 1989; FELDMAN; NELSON, 1996; JOHNSTON et al., 2001). Observa-se grande variação na duração do estro ocorrendo entre dois a 19 dias, independentemente de ocorrer ou não a ovulação (ROOT et al., 1995).

A fase de interestro compreende o período entre um estro e o pro-estro seguinte, sendo exclusiva das espécies de ovulação induzida quando não há o desencadeamento da ovulação durante o estro (FELDMAN; NELSON, 1996). Caracteriza-se pela regressão dos folículos pré-ovulatórios e o surgimento de uma nova onda folicular, com duração média de oito a 15 dias (GOODROWE et al., 1989).

No diestro, ocorre a fase lútea do ciclo. A concentração sérica de progesterona varia de 1,5 ng/mL até mais de 20 ng/mL. O diestro dura aproximadamente 40 dias na fêmea com pseudogestação (quando houve a ovulação sem fertilização) e aproximadamente 60 dias na fêmea prenhe, e termina com a luteólise, quando as concentrações plasmáticas de progesterona ficam abaixo de 1,5 ng/mL. Após sete a 10 dias da luteólise pode iniciar-se uma fase de estro, embora a lactação possa causar anestro com duração de até duas a três semanas após o desmame (SCHMIDT et al., 1983).

No anestro ocorre a ausência de atividade ovariana, com folículos antrais superficiais, de diâmetro médio de 0,5 mm ou menores e concentrações séricas de progesterona e estradiol em níveis basais (FELDMAN; NELSON, 1996). A duração do anestro está diretamente relacionada ao número de horas de luz por dia. Assim em luminosidade decrescente ou inferior a 12 horas por dia, ocorrem longos períodos de anestro (FELDMAN; NELSON, 1996; VERSTEGEN, 1998).

## 2.2. Criopreservação de oócitos

As biotécnicas de reprodução assistida (como maturação *in vitro* - MIV e fertilização *in vitro* - FIV) tem se desenvolvido muito nos últimos anos, tanto para espécies de importância econômica, como para aquelas ameaçadas de extinção. Seu rápido desenvolvimento levou a um aumento da necessidade e interesse na criopreservação de oócitos, considerados material biológico de fácil obtenção e cultivo *in vitro* (SANTOS, 2008).

A criopreservação de oócitos permite o armazenamento de gametas femininos por longos períodos e possibilita a conservação de espécies, o tratamento de infertilidade e a preservação de material para estabelecimento de bancos genéticos (SANTOS, 2008).

Existem dois métodos de criopreservação, o congelamento lento e a vitrificação. O congelamento lento é caracterizado pela exposição das células ou tecidos a baixas concentrações de crioprotetores (PAYNTER, 2000), e por apresentar curva de resfriamento lento (SANTOS, 2008). Vitrificação é a solidificação de uma solução (formação de vidro) a baixas temperaturas, sem que haja formação de cristais de gelo. Para tanto, necessita de uma rápida curva de resfriamento e a utilização de altas concentrações de soluções crioprotetoras (VAJTA, 2000; VAJTA et al., 1998). Contudo, tais concentrações elevadas de crioprotetores podem ser tóxicas, resultando em estresse osmótico e danos celulares subsequentes, razão pela qual a exposição a estes agentes deve se dar por curtos períodos (PARKS, 1997; LUCIANO et al., 2009).

A vitrificação pode ser realizada de várias formas. O procedimento tradicional ocorre através do envasamento em palhetas de 0,25 mL, mas também por meio de *open pulled straws* - OPS (VAJTA et al., 1998), microgotas (PAPIS et al., 2000), grades de microscopia eletrônica (MARTINO et al., 1996), *hemistraw* (VANDERZWALMEN et al., 2003), *Nylon mesh* (MATSUMOTO et al., 2001), *cryoloop* (LANE et al., 1999), *cryotop* (HOCHI et al., 1998) e vitrificação em superfície sólida – SSV (DINNYES et al., 2000). As técnicas de OPS e SSV utilizam pouco volume de meio e por isso, podem conduzir a melhores taxas de desenvolvimento embrionário pós vitrificação (SANTOS, 2008). No estudo de

Turathum et al. (2010), oócitos caninos imaturos que foram vitrificados com OPS retomaram com sucesso a meiose quando cultivados *in vitro*.

No descongelamento, a retirada do crioprotetor é necessária para que ocorra a reidratação dos embriões ou oócitos e para diminuir os danos causados por sua toxicidade (GREEN, 2005). A diluição do crioprotetor tem a função de evitar a entrada muito rápida de água na célula, uma vez que a redução acelerada da osmolaridade pode levar a lise celular (SCHNEIDER; MAZUR, 1984). A sacarose, por exemplo, quando presente nos meios de descongelamento, evita o choque osmótico, pois atua como um tampão, mantendo constante a concentração do meio extracelular e regulando a velocidade de entrada e saída do crioprotetor (SANTOS, 2008).

No entanto, para minimizar a toxicidade das soluções de vitrificação, além dos meios de descongelamento, podem-se utilizar, durante o procedimento de vitrificação, soluções menos tóxicas, associar diferentes crioprotetores, expor previamente a concentrações menores de crioprotetores e reduzir o tempo de exposição a tais soluções (VAJTA, 2000). Os principais crioprotetores utilizados na criopreservação de oócitos são o etilenoglicol (EG), glicerol (GLI), dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2 propanediol (PrOH) e acetamida (PEDRO et al., 2005).

Há poucos estudos sobre a criopreservação de oócitos de gata. Porém os resultados foram animadores, principalmente quando da utilização de oócitos maduros (LUVONI, 2006).

No estudo de Luvoni e Pellizzari (2000), oócitos imaturos e maduros foram criopreservados por congelamento lento com uma concentração de 1,5 M de DMSO e 1,5 M de EG, após a FIV os oócitos maduros congelados com EG obtiveram melhor taxa de clivagem do que oócitos imaturos, enquanto que em oócitos maduros e imaturos congelados com DMSO não houve diferenças significativas. O desenvolvimento embrionário além de oito células foi obtido apenas quando oócitos maduros foram congelados com EG. Este estudo sugere que oócitos de gatas criopreservados podem ser fertilizados com sucesso e que o seu desenvolvimento *in vitro* é melhorado quando oócitos maduros são congelados com EG.

Merlo et al. (2008) utilizaram o sistema *cryoloop* para vitrificação de oócitos maduros com uma associação de crioprotetores, utilizando 3,6 M de EG + Ficoll

(10mg/mL) + 0,3 M de sucrose. Após descongelamento, os oócitos foram submetidos à FIV e cultivados por dez dias utilizando-se oócitos frescos como controle. Observou-se maior porcentagem de oócitos degenerados, e menor taxa de clivagem e taxa de mórula/blastocisto no dia seis, no grupo vitrificado quando comparado ao controle, porém observou-se uma maior taxa de blastocistos eclodidos no dia dez no grupo vitrificado, concluindo que oócitos maduros de gatas, vitrificados com o método *cryoloop*, nos permite obter oócitos competentes e capazes de se desenvolver *in vitro* até o estágio de blastocisto eclodido.

Em outro estudo, realizaram a vitrificação de oócitos imaturos com o método OPS, utilizando meio com 1M de sucrose e uma solução mista com 2,32 M de DMSO e 2,94 M de EG. Foi utilizado para avaliação da viabilidade oocitária a coloração cFDA/*Trypan Blue*. Os resultados revelaram um alta incidência de lesão em células do *cumulus* nos oócitos imaturos vitrificados, além do percentual de COC's não viáveis ter sido significativamente maior e a taxa de clivagem e de blastocistos foi menor nos oócitos vitrificados quando comparados ao grupo controle. Contudo, este foi o primeiro relato de blastocisto a partir da vitrificação de oócitos imaturos de gatas (COCCHIA et al., 2010).

Alves et al. (2012) vitrificou *ex situ* (isolados) e *in situ* (dentro do córtex ovariano) COC's de gatas com 2M de DMSO + 1M de acetamida + 3M de 1,2 propanediol (DAP213) em criotubos ou 15% de EG + 15% de DMSO + 0,5M sucrose pelo método *cryotop*. As porcentagens de oócitos *ex situ* e *in situ* viáveis (cercado por completa camadas de células do *cumulus* – coloração FDA-PI) foram menores em ambos os procedimentos de vitrificação em comparação com oócitos frescos. A retomada da meiose ocorreu em todos os tratamentos. Após 24 h de cultura, os resultados foram semelhantes nos oócitos *ex situ* e *in situ* vitrificados independentemente do protocolo utilizado, apesar de inferior aos oócitos frescos. Após 48 h de cultura, oócitos *ex situ* vitrificados com *cryotop* obtiveram uma taxa de retomada da meiose semelhante aos oócitos frescos e oócitos *ex situ* e *in situ* vitrificados com DAP 213 apresentaram taxas semelhantes de retomada da meiose. Estes resultados demonstraram que DAP213 e o *cryotop* preservam a viabilidade de oócitos *ex situ* e *in situ*, mas as células do *cumulus* são altamente susceptível ao procedimento de vitrificação. No entanto, a capacidade de retomar a meiose prova

que oócitos felinos imaturos vitrificados isolados ou dentro do córtex ovariano tem semelhante criotolerância.

Em relato recente, oócitos de gatas maturados *in vivo* e *in vitro* foram vitrificados com o método *cryotop* utilizando uma associação de crioprotetores composta de 15% DMSO + 15% EG + 0,5 M sucrose. A porcentagem de oócitos morfológicamente normais após descongelamento foi em torno de 90%, no entanto alterações morfológicas grosseiras foram observadas no citoplasma em embriões após a FIV e ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozóides), particularmente naqueles que foram maturados *in vivo*. Independentemente disso, as taxas de clivagem de oócitos maturados *in vivo* ou *in vitro* fertilizados por FIV ou ICSI foram semelhantes aos observados em oócitos frescos. Apenas oócitos maturados *in vitro* se desenvolveram até blastocistos, porém com baixa porcentagem comparado-se a oócitos frescos. No entanto a viabilidade *in vivo* de zigotos e/ou embriões produzidos por ICSI de oócitos vitrificados foi estabelecida pelo nascimento de quatro filhotes vivos após a transferência para as receptoras.

Embora os estudos acerca da vitrificação de oócitos maduros reportem, na maioria das vezes, melhores taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário, a utilização de oócitos imaturos se justifica pela sua maior resistência à criopreservação (já que sua cromatina ainda está protegida por um envelope nuclear e não há fuso presente), pela facilidade com que são obtidos em números significativos nos ovários e por dispensar o tratamento hormonal prévio para maturação (LUCIANO et al., 2009). Ainda assim, a criopreservação de oócitos imaturos pode induzir lesões nas membranas de células do *cumulus* que desempenham papel importante na maturação do oócito pelas junções *gap* (GILCHRIST et al., 2004; GOUD et al., 2000), além de danificar os microfilamentos, responsáveis pela migração dos grânulos corticais para a periferia do oócito durante o processo de maturação (LUCIANO et al., 2009).

Portanto, após o processo de vitrificação é necessário verificar se houve lesão celular significativa a ponto de comprometer a retomada da meiose e a distribuição dos grânulos corticais após cultivo. Pós descongelamento oócitos frequentemente apresentam ruptura de zona pelúcida, fraturas de oolema e degeneração citoplasmática.

A avaliação da integridade morfológica imediatamente após descongelamento tem sido utilizada por diversos autores como um parâmetro não-invasivo indicativo de criolesão. Porém sabe-se que a morfologia não é preditivo da capacidade de retomar a meiose , uma vez que podem ocorrer danos estruturais não identificados quando apenas morfologia é avaliada por meio de microscópio de luz (LUVONI et al., 1997).

Já a avaliação da viabilidade oocitária pelo cFDA/*Trypan Blue* avalia a integridade da membrana plasmática, que não pode ser avaliado somente pela morfologia. O composto cFDA (diacetato de 5-caroxifluoresceína) é um substrato de esterase que ultrapassa passivamente as membranas celulares, indicando integridade da membrana plasmática (coloração amarela), podendo ser usado portanto como indicador geral de viabilidade celular. Em contrapartida a molécula de *Trypan Blue* cora exclusivamente células com membrana plasmática rompida, facilitando a visualização das células , pois células viáveis coram em amarelo e células não-viáveis coram em azul (COCCHIA et al., 2010).

A avaliação da maturação nuclear de oócitos têm sido alvo de vários estudos que mostram a importância dos componentes citoplasmáticos na ativação oocitária durante a fertilização, como a liberação dos grânulos corticais para bloquear a poliespermia, reinício do ciclo celular, formação do pronúcleo e síntese proteica (DULCIBELLA, 1998). A maturação do oócito é caracterizada pela transição do estágio de vesícula germinativa (VG) ao de MII (metáfase II), passando por mudanças que preparam o oócito para ser fecundado e estar apto para se desenvolver como embrião. Estas alterações ocorrem não somente no núcleo, como também no citoplasma, de maneira independente, mas de modo coordenado para garantir a competência no desenvolvimento celular (DEW, 2001; RODRIGUES, 2003). No início da maturação nuclear ocorre condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana celular, processo denominado de quebra de vesícula germinativa (QVG) (KUBELKA et al.,1998). Posteriormente, os cromossomos se encontram mais condensados e dispostos no plano central do eixo metafásico, caracterizando o estágio de MI, evoluindo para MII quando ocorre compactação dos cromossomos e extrusão do primeiro corpúsculo polar (HEWITT & ENGLAND, 1997).

Para tanto, a avaliação morfológica e da viabilidade oocitária pós-descongelamento associada às taxas de maturação nuclear e citoplasmática permite identificar o protocolo que ocasiona menos injúria ao oócito e ao seu desenvolvimento *in vitro*.

### 2.3. Antioxidantes

Independentemente do crioprotetor utilizado, o procedimento de congelamento causa injúrias, dentre as quais se destacam a formação de cristais de gelo, o choque osmótico e o estresse oxidativo (SHAW et al., 2000). O estresse oxidativo é uma consequência do desequilíbrio de espécies reativas ao oxigênio (ERO). Fazem parte das ERO's todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, os quais são eletricamente instáveis e capazes de exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, agindo como doadores de elétrons (AGARWAL et al., 2005). Os três principais tipos de ERO's são: superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ) (ANDRADE et al., 2010). Quando há um aumento excessivo na produção das ERO's ou diminuição de agentes oxidantes, ocorre um efeito prejudicial no organismo.

As ERO's estão envolvidas nos processos fisiológicos, como maturação oocitária, esteroidogênese, e nas funções do corpo lúteo (AGARWAL et al., 2005). O estresse oxidativo parece levar à peroxidação dos fosfolipídios de membrana e à alteração de grande parte dos tipos de moléculas celulares, tais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando assim ao comprometimento embrionário (WANG et al., 2002).

A presença de antioxidantes no fluido folicular e no oviduto parecem proteger os oócitos e embriões do estresse oxidativo. Porém, quando os oócitos são tirados de seu ambiente natural (para a produção *in vitro* de embriões, por exemplo), perdem a sua defesa natural. Portanto, cuidados especiais, como a adição de antioxidantes ao meio de cultivo, são recomendados a fim de se evitar que o estresse oxidativo ocorra e reduza a eficiência da produção *in vitro* (WANG et al., 2002). De forma similar, a adição de antioxidantes nos meios de criopreservação poderia reduzir os danos causados pelos crioprotetores.

Antioxidantes são definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação às do substrato oxidável, retarda ou previne, significativamente, a oxidação de tal substrato. Em condições normais, os antioxidantes convertem ERO's em água para prevenir a superprodução destes compostos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Existem dois sistemas de defesa antioxidantes: os enzimáticos (antioxidantes naturais) que neutralizam as ERO's excessivas (superóxido dismutase - SOD; catalase - CAT; peroxirredoxinas - Prx; glutathione - GSH; glutathione redutase - GR e glutathione peroxidase - Gpx) e os não enzimáticos que são antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta (MAIA, 2006). Os antioxidantes não enzimáticos podem atuar em duas linhas: como removedores do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão instalada. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

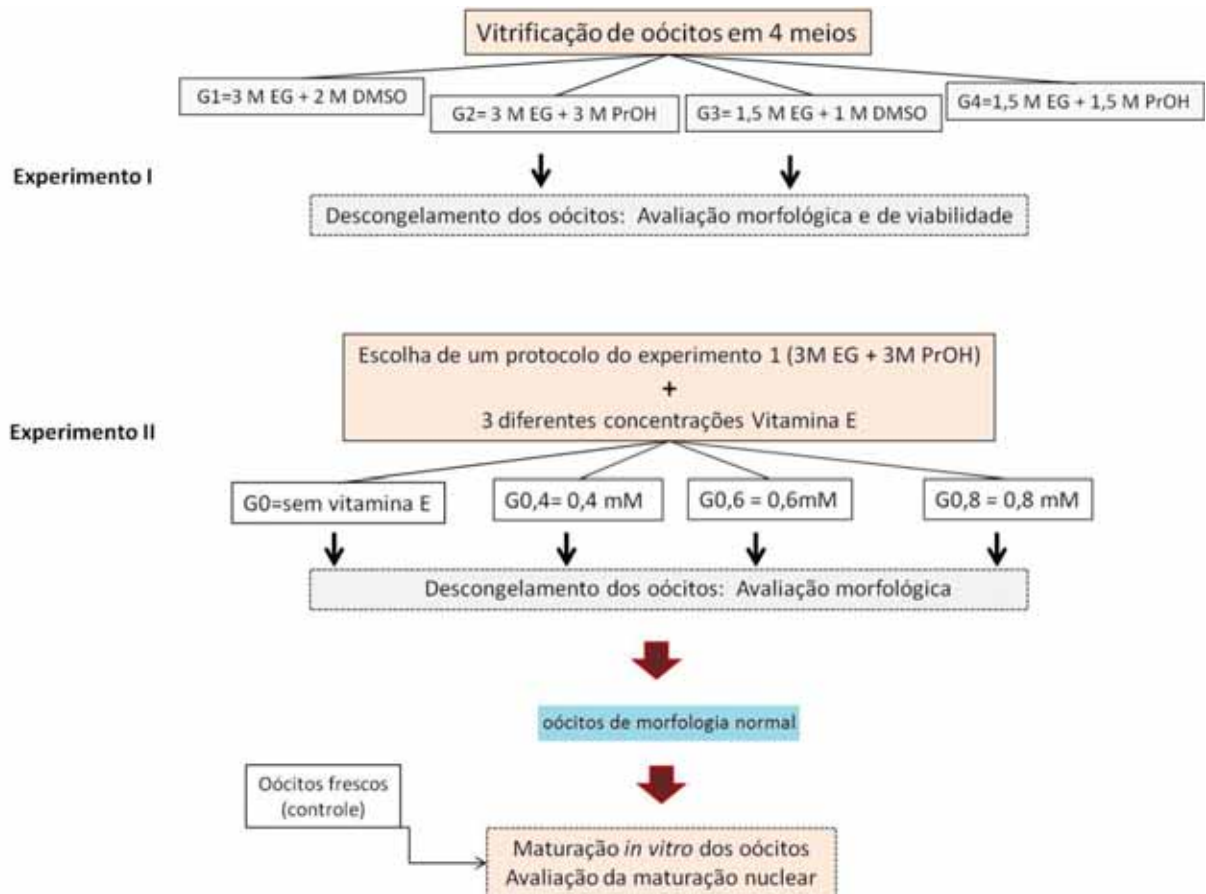
A vitamina E é conhecida como o principal antioxidante lipossolúvel que protege os ácidos graxos poliinsaturados dos tecidos contra a peroxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). É importante destacar que os efeitos podem variar de acordo com a dose utilizada, podendo ter efeito de antioxidante ou de estimulante da oxidação (CAO; CUTLER, 1997). A adição de vitamina E ao meio de cultivo de embriões bovinos melhorou a competência de desenvolvimento ao estágio de blastocisto (OLSON; SEIDEL, 2000). Em embriões suínos suprimiu os danos oxidativos e potencializou o seu desenvolvimento (KITAGAWA et al., 2004).

O uso deste antioxidante nos ejaculados tem sido objeto de alguns estudos, sendo que a habilidade do tocoferol na inibição da lipoperoxidação da membrana espermática de sêmen criopreservado já foi demonstrada em varrões, bovinos e em ovinos com sêmen fresco (BREININGER et al., 2005). Em cães, a adição de 0,1 e 0,3 mMol de vitamina E ao meio de congelamento de sêmen aumentou a viabilidade espermática pós- descongelamento, mas não interferiu positivamente na preservação da integridade acrossomal (MICHAEL et al., 2007; MICHAEL et. al., 2009). Por outro lado, quando utilizado na concentração de 0,6 mMol promoveu um aumento da motilidade e no número de espermatozóides com membrana acrossomal íntegra (LOPES, 2010). Até o momento, não há estudos que tenham

acrescentado vitamina E aos protocolos de congelamento de oócitos, sendo assim, é possível que a adição deste antioxidante aos meios de vitrificação de oócitos reduza o estresse oxidativo promovido pelo procedimento de criopreservação e permita a retomada e finalização da meiose após descongelamento e cultivo *in vitro*.

### 3. MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1. Organograma do delineamento experimental



### 3.2. Animais

Foram utilizadas 30 gatas de diferentes raças, com idades entre seis meses e cinco anos, atendidas na rotina do Setor de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Ludo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, câmpus de Jaboticabal. As fêmeas consideradas clinicamente híginas após aferição de temperatura, auscultação cardíaca e respiratória e palpação abdominal, foram submetidas a ováriohisterectomia (OH) (Figura 1A e 1B).

### 3.3. Obtenção e seleção de oócitos

Os ovários foram obtidos assepticamente durante o procedimento de OH e transferidos para tubos falcon de 50 mL contendo solução de PBS-ATB com temperatura ambiente (Figura 1C) e encaminhados ao laboratório de Reprodução Animal em até quatro horas. Em seguida foram colocados em placa de Petri contendo 2mL de solução de PBS-PVA (temperatura ambiente), onde foram fatiados com lâmina de bisturi ao longo de seu comprimento e largura (*slicing*), para que houvesse a liberação dos complexos oócito-*cumulus* (COC's; Figura 2A a 2D).

Foram selecionados para o experimento apenas COC's classificados como grau I, aqueles circundados com três ou mais camadas de células do *cumulus*, com citoplasma escuro ou vesicular (Figura 2E).

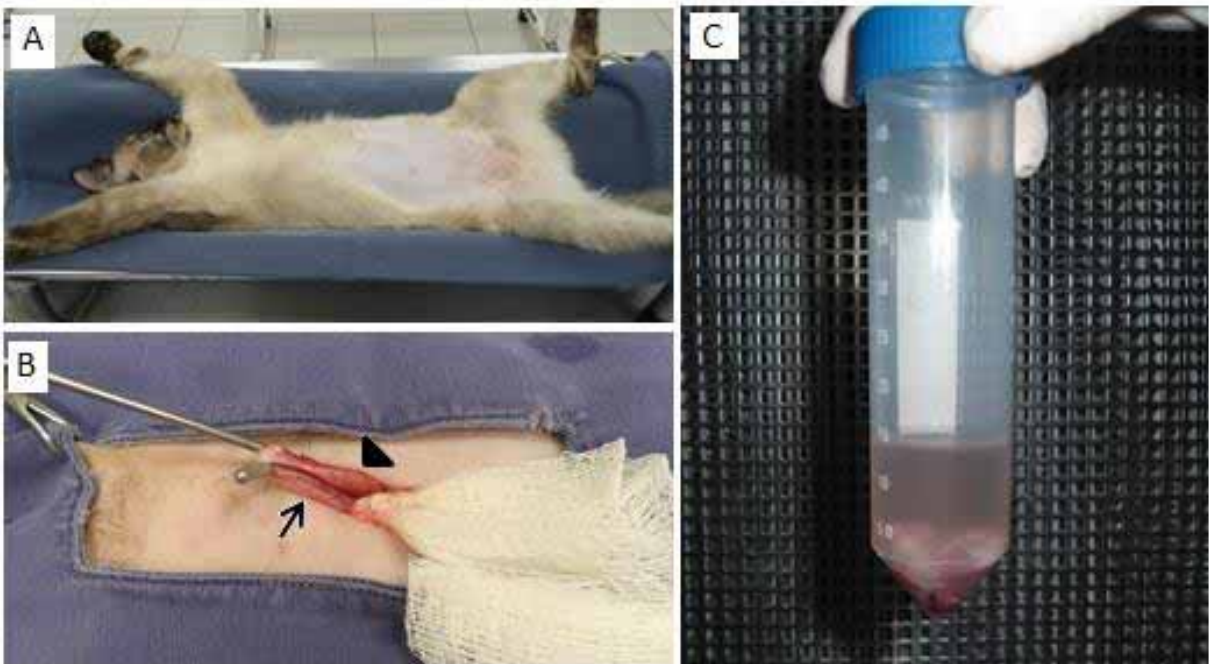


Figura 1. A) Animal anestesiado para início do procedimento cirúrgico de ovariectomia. B) Ovário (cabeça de seta) e corno uterino (seta) da fêmea felina. C) Ovários obtidos por ovariectomia mantidos em tubo falcon contendo solução PBS-ATB. Jaboticabal 2014.

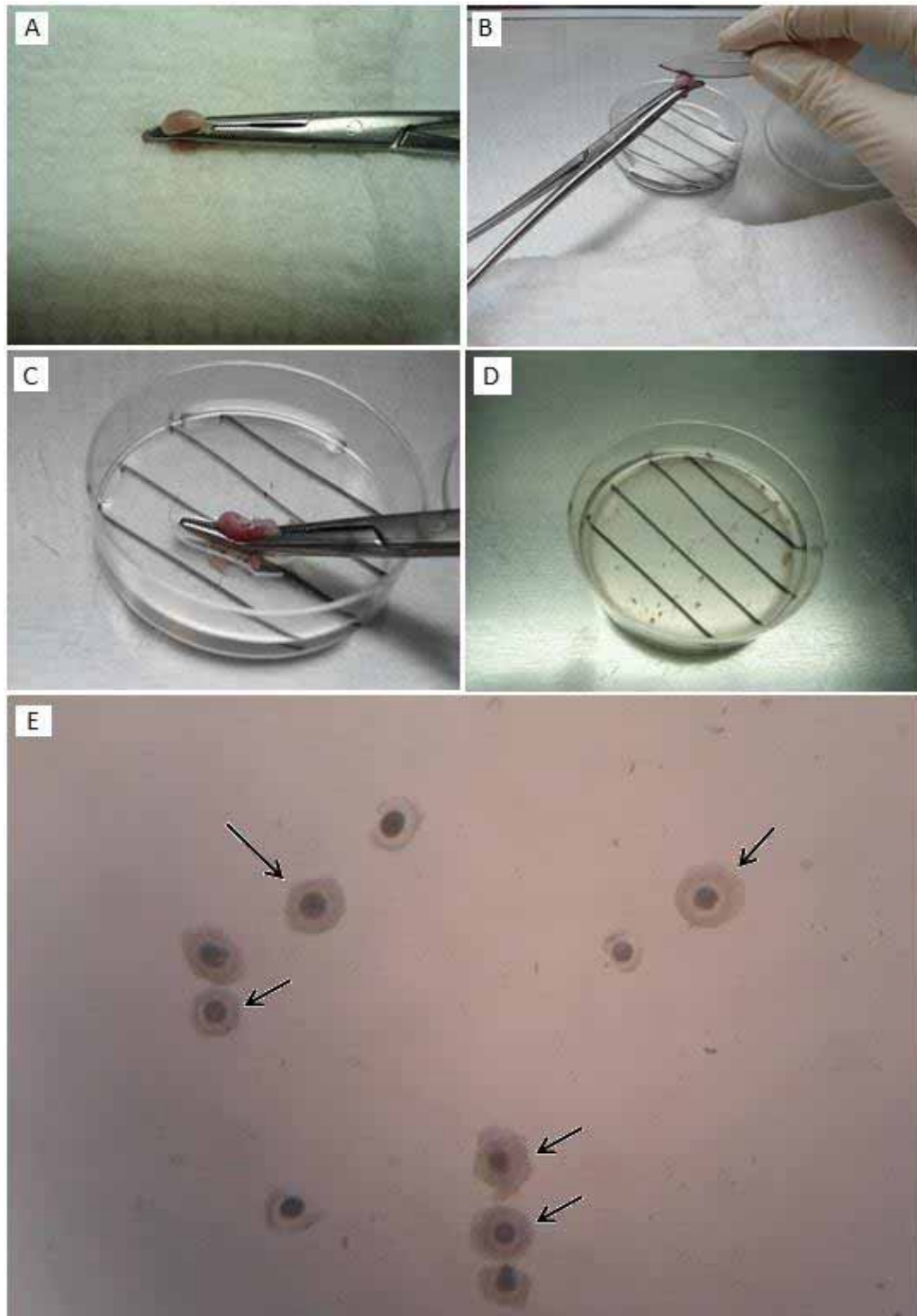


Figura 2. Etapas do procedimento de obtenção dos oócitos. A) Ovário dissecado. B) fatiamento dos ovários (*slicing*). C) liberação dos complexos oócito-cumulus (COC's). D) Placa de Petri contendo solução PBS-PVA com os COC's. E) COC's grau 1 (setas), colhidos após realização do *slicing* de ovários de gatas domésticas (aumento de 20x). Jaboticabal 2014.

### **3.4. Vitrificação de oócitos imaturos**

Foi utilizado como meio base (MB) o TCM199 acrescido de glicose (1 mg/mL), sódio piruvato (3,2721  $\mu$ L/mL) e antibiótico estreptomicina/penicilina (3  $\mu$ L/mL).

No experimento I foi realizada a vitrificação utilizando uma associação de crioprotetores em duas concentrações, constituindo quatro grupos experimentais: G1: 3M etilenoglicol (EG) + 2M dimetilsulfóxido (DMSO); G2: 3M EG + 3M 1,2 propanediol (PrOH); G3: 1,5M EG + 1M DMSO; G4: 1,5M EG + 1,5 M PrOH.

No experimento II comparamos a adição de três diferentes concentrações de vitamina E (0,4 mMol ; 0,6 mMol ; 0,8 mMol) a um dos meios de vitrificação utilizados no experimento I. A escolha foi pela associação de 3M EG + 3M PrOH baseado nos resultados obtidos no experimento I, em que o grupo G2 (3M EG + 3M PrOH) conseguiu manter a viabilidade oocitária e obteve uma porcentagem um pouco maior de oócitos viáveis do que o grupo G1 (3M EG + 2M DMSO), porém estatisticamente não houve diferença.

Primeiramente os oócitos foram equilibrados durante 1 minuto em solução contendo MB + 10% de soro fetal bovino, em seguida foram expostos durante 30 segundos em solução contendo metade da concentração dos crioprotetores e depois em solução com a concentração final dos crioprotetores durante 25 segundos e imediatamente envasados em palhetas.

A técnica de envasamento utilizada foi em palhetas de 0,25mL, nas quais foram colocados cinco oócitos (Figura 3A). Após serem seladas, foram expostas durante um minuto no vapor do nitrogênio líquido e logo depois imersas imediatamente no mesmo. A taxa de resfriamento foi de aproximadamente 2500°C/min.

### **3.5. Descongelamento, aquecimento e avaliação morfológica**

Os oócitos foram descongelados pela exposição das palhetas à temperatura ambiente por 10 segundos, seguida de imersão em banho maria a 38°C por 30 segundos (Figura 3B e 3C). Em seguida, as palhetas foram agitadas manualmente cinco vezes para permitir a mistura da solução de sucrose com o meio de

vitricificação. Para remoção dos crioprotetores os oócitos foram colocados em uma gota de solução Pb1 final e então foram avaliados quanto a sua morfologia. Oócitos com forma simétrica, sem sinais de ruptura, lesão na membrana, ou degeneração e envoltos por células do *cumulus* não danificadas foram classificados como de morfologia normal. Aqueles envolvidos por células do *cumulus* danificadas (desnudos ou parcialmente desnudos), com rompimento de zona pelúcida, extravasamento de citoplasma e com alteração no formato foram classificados como de morfologia anormal (Figura 3D).

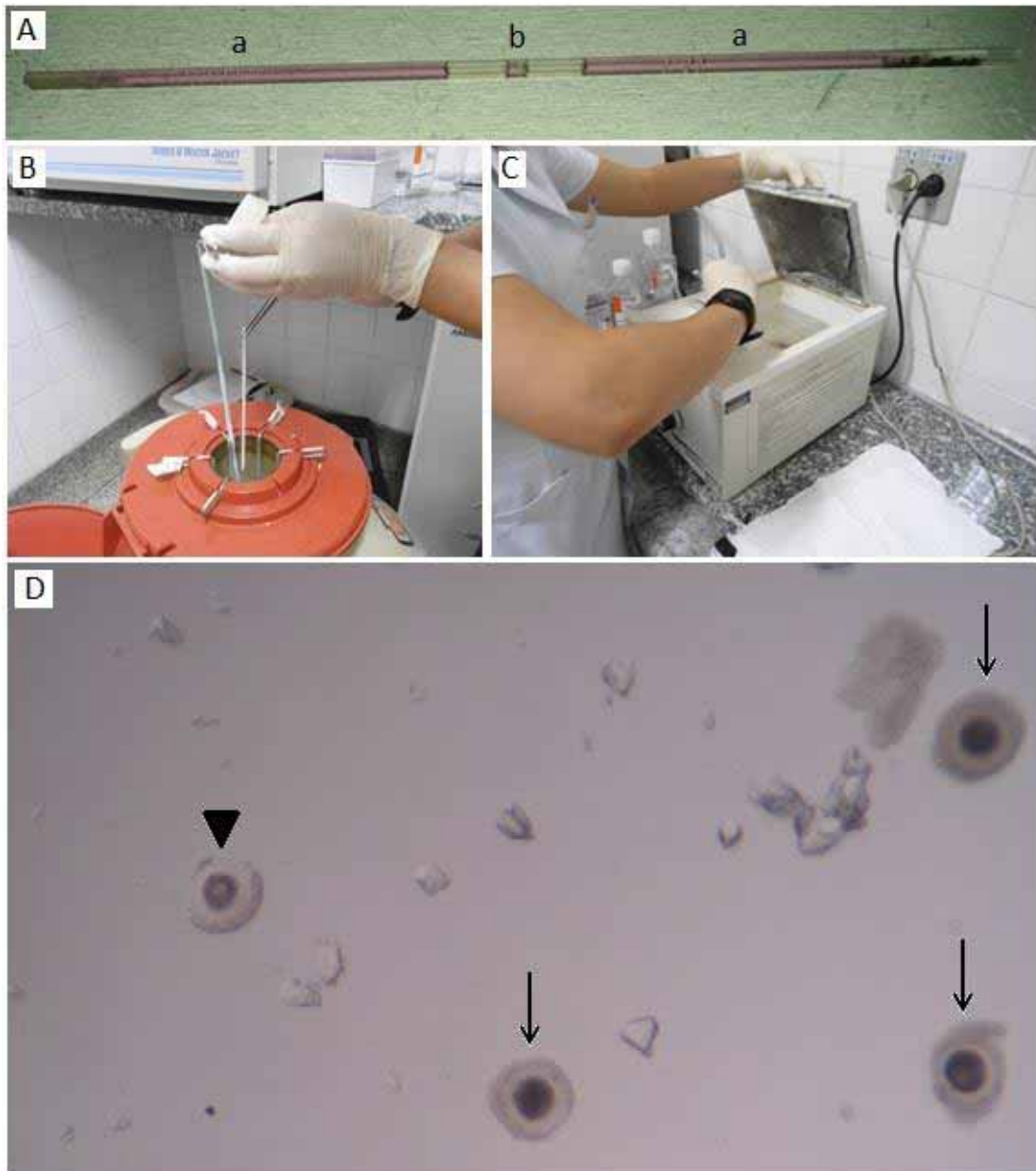


Figura 3. A) Palheta de 0,25 mL pronta para vitrificação. a = Solução de sucrose 0,2 M. b = Meio de vitrificação contendo cinco oócitos. B) Descongelamento da palheta pela sua exposição à temperatura ambiente por 10 segundos, seguida de C) imersão em banho maria a 38°C por 30 segundos. D) Oócitos de gatas domésticas logo após a descongelamento classificados como morfologicamente normais (setas) e com morfologia anormal (cabeça da seta) (aumento de 20x). Jaboticabal 2014.

### 3.6. Avaliação da viabilidade oocitária

Após o descongelamento das palhetas e avaliação morfológica, todos os oócitos do experimento I também foram avaliados quanto a viabilidade, sendo submetidos a coloração cFDA/*Trypan Blue* e classificados de acordo com o método proposto por Cocchia et. al. (2010).

Os oócitos foram imersos em solução estoque de cFDA durante 15 minutos à 38,5°C (utilizando 2µL de solução por oócito), em seguida foram lavados apenas 1 vez em solução de PBS. Em uma lâmina foi colocado uma gota de 3 µL de *Trypan Blue* 0,4%, e nela foi colocado de 5 a 10 oócitos, em seguida foram recobertos com a lamínula e preenchido por capilaridade com solução de PBS, a lâmina foi lida imediatamente após o processamento, em microscópio ótico.

De acordo com Cocchia et. al. (2010), COC's corados somente pelo cFDA (amarelo), em que a coloração azul não penetrou na membrana plasmática (membrana íntegra) foram considerados viáveis (Figura 4A). COC's corados de *Trypan Blue* (azul; indicando ruptura da membrana plasmática) foram considerados inviáveis (Figura 4B), assim como quando somente as células do *cumulus* foram coradas em azul e o oócito em amarelo (*cumulus* inviável, oócito viável; Figura 4 C) e quando somente o oócito foi corado em azul e as células do *cumulus* em amarelo (oócito inviável, *cumulus* viável; Figura 4D).

### 3.7. Maturação *in vitro* (MIV) e avaliação das taxas de maturação nuclear

Somente os oócitos de morfologia normal do experimento II foram submetidos à MIV, a fim de se avaliar a capacidade da meiose ser retomada após a vitrificação.

O meio utilizado foi o Krebs's ringer bicarbonato suplementado com albumina sérica bovina (3 mg/mL), penicilina G potássica 100 UI/mL e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL), FSH e LH (0,5 UI/mL).

Os oócitos foram lavados duas vezes em meio de cultivo e depois colocados em placas de Petri contendo gotas de 100 µL de meio Krebs's modificado (máximo de 10 oócitos por gota) e recobertos com óleo mineral. Em seguida, as placas foram transferidas para estufa à 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

As amostras foram avaliadas quanto ao estágio de maturação nuclear após 36 horas de cultivo pela coloração Hoescht 33342 (Figura 4E a 4H). Para isso as células do *cumulus* foram retiradas dos oócitos, através de aspiração repetidamente em gota de 200 $\mu$ L de PBS/PVA com pipeta de 100 $\mu$ L. Então os oócitos foram transferidos para solução de paraformaldeído 4% durante 5 minutos à temperatura ambiente, e na sequência lavados 3 vezes em solução PBS/PVA, sendo transferidos para solução de triton 1% durante 10 minutos. Em seguida, foram novamente lavados 3 vezes em solução PBS/PVA e transferidos para lâmina contendo gota de 5 $\mu$ L de solução Hoescht, a qual foi recoberta por lamínula e selada com esmalte. A leitura foi feita com microscópio de fluorescência, com comprimento de onda 330-385 nm. Oócitos frescos foram cultivados, corados e utilizados como controle.

### **3.8. Análise Estatística**

Os efeitos dos tratamentos foram verificados pelo teste qui-quadrado  $\chi^2$  a 5 % de probabilidade. Para isso, foi utilizado o programa SAS (Statistical Analysis System) para Windows (2008).

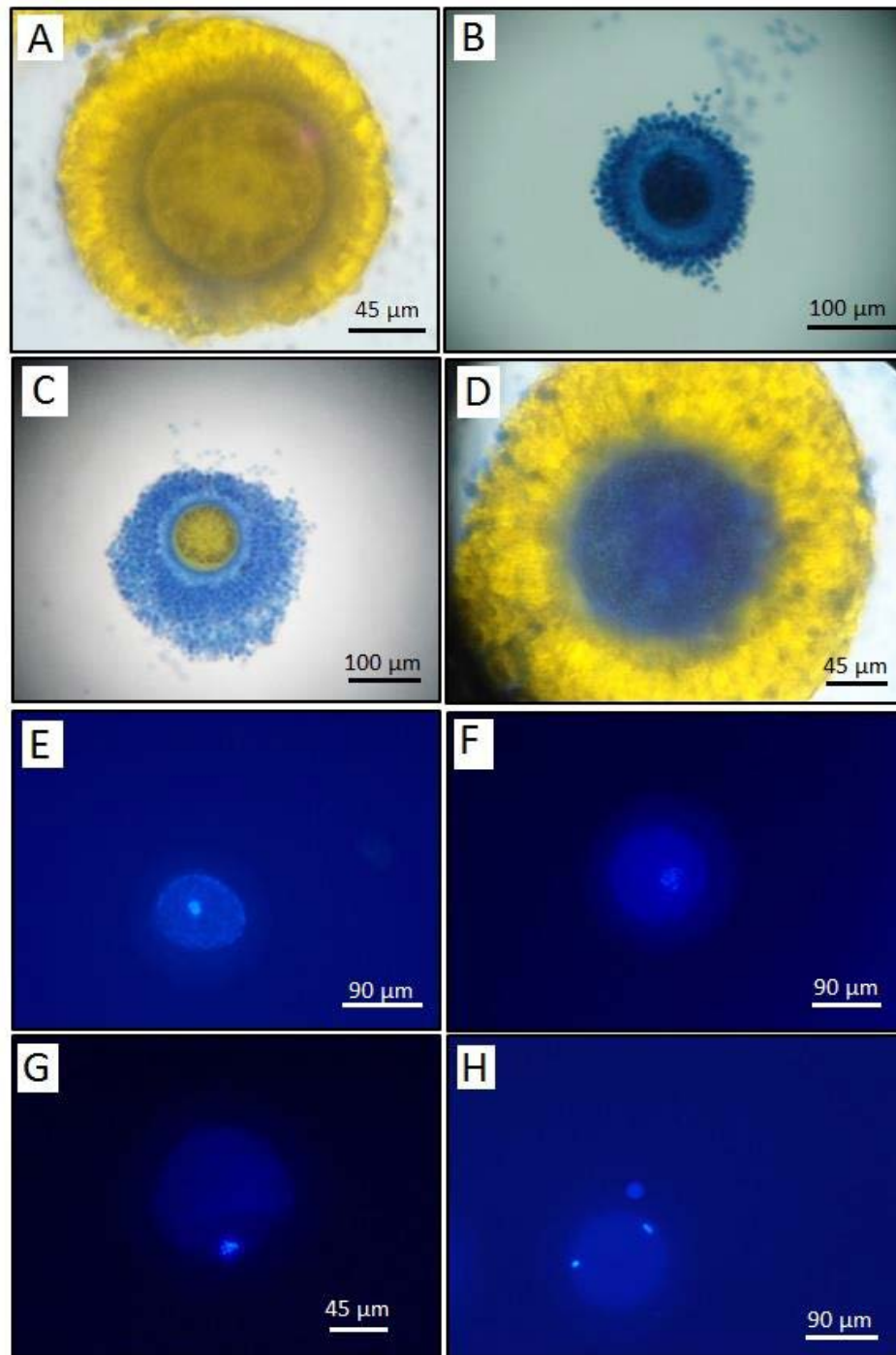


Figura 4. Fotomicrografias de complexos oócito-*cumulus* (COC) de gatas domésticas corados pelo cFDA/*Trypan Blue* (A) COC viável. (B) COC inviável. (C) COC inviável com oócito viável, células do *cumulus* inviável. (D) COC inviável com oócito inviável, células do *cumulus* viável. Coloração HOESCHT 33342 (E) Vesícula germinativa. (F) Quebra de vesícula germinativa. (G) Metáfase I. (H) Metáfase II. (Figuras A e D aumento de 40x, as outras figuras aumento de 20x). Jaboticabal 2014.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Recuperação de oócitos

Foram recuperados 1011 oócitos, de 30 gatas, classificados como grau I. No entanto, foram considerados nesta pesquisa apenas 887 oócitos. Os demais (12,26%) foram perdidos durante o procedimento de vitrificação, coloração ou maturação.

### 4.2. Experimento I – Vitrificação de oócitos em quatro meios

Na avaliação das características morfológicas pós-descongelamento, não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,2857$ ; Tabela 1). Entretanto, quando foi realizada a coloração cFDA/*Trypan Blue* com o intuito de verificar a viabilidade dos oócitos, houve diferença significativa entre os grupos, sendo que o G1 e o G2 apresentaram um percentual maior de oócitos viáveis pós-descongelamento comparados ao G3 e ao G4 ( $p= 0,018$ ), mas não diferiram entre si (Tabela 1).

Tabela 1. Número absoluto e relativo (%) de oócitos pós-descongelamento apresentando morfologia normal e classificados como viáveis após coloração com o cFDA/*Trypan Blue* nos quatro grupos experimentais. Jaboticabal 2014.

Grupo	Morfologia (número de oócitos)		Normal (%)	Viabilidade (número de oócitos)		Viável (%)
	Normal	Anormal		Viável	Não viável	
G 1	41	29	58,57 <sup>a</sup>	25	45	35,71 <sup>a</sup>
G 2	41	35	53,95 <sup>a</sup>	28	48	36,84 <sup>a</sup>
G 3	36	29	55,38 <sup>a</sup>	10	55	15,38 <sup>b</sup>
G 4	36	38	48,65 <sup>a</sup>	11	63	14,68 <sup>b</sup>

G1 = 3M etilenoglicol (EG)+ 2M dimetilsulfóxido (DMSO)

G2 = 3M EG+ 3M 1,2 propanediol (PrOH)

G3 = 1,5M EG + 1M DMSO

G4 = 1,5M EG + 1,5M PrOH

Letras iguais não diferem pelo teste do qui-quadrado  $\chi^2$  ( $p>0,05$ ).

### 4.3. Experimento II - Vitrificação de oócitos com vitamina E

Na avaliação morfológica pós-descongelamento observou-se que o grupo G 0,6mMol foi o que teve a maior quantidade de oócitos com morfologia normal e o G 0,4mMol foi o que obteve pior resultado ( $p=0,0032$ ; Tabela 2). Estes oócitos considerados morfolologicamente normais foram submetidos a maturação *in vitro* e, portanto, não foram corados para avaliação de viabilidade. Oócitos frescos foram cultivados, corados e utilizados como controle.

Tabela 2. Número absoluto e relativo (%) de oócitos criopreservados em três concentrações de vitamina E (0,4 mMol; 0,6 mMol; 0,8 mMol) e sem a adição de vitamina E apresentando morfologia normal e anormal pós-descongelamento. Jaboticabal 2014.

Grupo	Morfologia (número de oócitos)		Normal (%) <sup>1</sup>
	Normal	Anormal	
G 0 (n= 69)	45	24	65,2 <sup>b</sup>
G 0,4 (n=65)	31	34	47,7 <sup>c</sup>
G 0,6 (n=70)	62	8	88,6 <sup>a</sup>
G 0,8 (n=56)	35	21	62,5 <sup>b</sup>

G0 = 3M etilenoglicol (EG) + 3M 1,2 propanediol (PrOH)

G0,4= 3M EG+3M PrOH + 0,4 mMol vitamina E

G0,6 = 3M EG+3M PrOH + 0,6 mMol vitamina E

G0,8 = 3M EG + 3M PrOH + 0,8 mMol vitamina E

<sup>1</sup>Letras diferentes diferem pelo teste do qui-quadrado  $\chi^2$  ( $p<0,05$ ).

Oócitos vitrificados em meio contendo vitamina E foram capazes de retomar a meiose *in vitro* após a descongelamento, não havendo diferença entre os grupos ( $p>0,05$ ;Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da vitrificação de oócitos em meios com diferentes concentrações de vitamina E sobre a retomada da meiose e percentual de degenerados. Jaboticabal, 2014.

Grupos experimentais	Nº de oócitos avaliados	Nº VG (%)	Nº Retomada da meiose (%)	D/NI (%)
G0	45	5 (11,11) <sup>a</sup>	20 (44,44) <sup>a</sup>	20 (44,44) <sup>a</sup>
G 0,4	31	9 (29,03) <sup>b</sup>	13 (41,93) <sup>a</sup>	9 (29,03) <sup>a</sup>
G 0,6	62	12 (19,35) <sup>b</sup>	29 (46,77) <sup>a</sup>	21 (33,87) <sup>a</sup>
G 0,8	35	6 (17,14) <sup>b</sup>	20 (57,14) <sup>a</sup>	9 (25,71) <sup>a</sup>
Controle	131	30 (22,9) <sup>b</sup>	63 (48,09) <sup>a</sup>	38 (29) <sup>a</sup>

G0 = 3M etilenoglicol (EG) + 3M 1,2 propanediol (PrOH)

G0,4= 3M EG+3M PrOH + 0,4 mMol vitamina E

G0,6 = 3M EG+3M PrOH + 0,6 mMol vitamina E

G0,8 = 3M EG + 3M PrOH + 0,8 mMol vitamina E

VG = Vesícula germinativa

D/NI = Degenerados/Não identificados

Letras iguais não diferem pelo teste do qui-quadrado  $\chi^2$  ( $p>0,05$ ).

Em relação ao estágio de maturação nuclear, embora se tenha observado os maiores percentuais de metáfase I no G 0,6, não houve diferença significativa entre este e os demais grupos, mas foi estatisticamente inferior ao grupo controle ( $p=0,0052$ ). De forma similar, não foi encontrada diferença estatística entre as taxas de MII, mesmo com o G 0,6 sendo o único grupo criopreservado a apresentar oócitos neste estágio de maturação ( $p=0,0052$ ).

Tabela 4. Número absoluto e relativo (%) de oócitos felinos classificados segundo seu status meiótico após terem sido congelados em concentrações distintas de vitamina E, descongelados e cultivados *in vitro* por 36 horas. Jaboticabal 2014.

Tratamento (N <sup>o</sup> oócitos)	Número (%) <sup>1</sup> de oócitos em diferentes estádios de maturação nuclear				
	VG	QVG	MI	MII	D/NI
G 0 (n=45)	5 (11,11) <sup>b</sup>	19 (42,22) <sup>a</sup>	1 (2,22) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	20 (44,44) <sup>a</sup>
G 0,4 (n=31)	9 (29,03) <sup>a</sup>	13 (41,93) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	9 (29,03) <sup>a</sup>
G 0,6 (n=62)	12 (19,35) <sup>a</sup>	20 (32,26) <sup>a</sup>	6 (9,68) <sup>b</sup>	3 (4,84) <sup>b</sup>	21 (33,87) <sup>a</sup>
G 0,8 (n=35)	6 (17,14) <sup>a</sup>	19 (54,28) <sup>a</sup>	1 (2,86) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>b</sup>	9 (25,71) <sup>a</sup>
Controle (n=131)	30 (22,9) <sup>a</sup>	6 (4,58) <sup>b</sup>	37 (28,24) <sup>a</sup>	20 (15,27) <sup>a</sup>	38 (29) <sup>a</sup>

G0 = 3M etilenoglicol (EG) + 3M 1,2 propanediol (PrOH)

G0,4= 3M EG+3M PrOH + 0,4 mMol vitamina E

G0,6 = 3M EG+3M PrOH + 0,6 mMol vitamina E

G0,8 = 3M EG + 3M PrOH + 0,8 mMol vitamina E

VG = Vesícula germinativa;

QVG = Quebra de vesícula germinativa;

MI = Metáfase I

MII = Metáfase II

D/NI = Degenerados/Não identificados

<sup>1</sup>Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste do qui-quadrado  $\chi^2$  ( $p<0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A criopreservação de gametas vem sendo utilizada em diversas espécies por permitir seu armazenamento por tempo indeterminado, mantendo sua atividade funcional, sem alterar sua genética (WHITTINGHAM, 1980). Em felinos, as pesquisas a respeito da criopreservação de oócitos apresentam resultados conflitantes em relação ao método mais viável, ao estágio em que o gameta deve ser congelado, bem como quais crioprotetores e/ou suplementos melhor protegem os gametas dos danos causados pela baixa temperatura.

De maneira geral, tanto o congelamento lento como a vitrificação podem afetar severamente a sobrevivência e fisiologia dos oócitos (GARDNER et al., 2007), comprometendo de forma irreversível a capacidade de se transformar em um embrião viável (BRAMBILLASCA et al. 2013). Oócitos descongelados frequentemente apresentam rompimento de zona pelúcida ou oolema e degeneração do citoplasma, por isso a avaliação da integridade morfológica imediatamente pós-descongelamento tem sido utilizada por diversos autores como um parâmetro não invasivo indicativo de criolesão (PRENTICE; ANZAR, 2011).

Com o intuito de minimizar os danos causados pela baixa temperatura, tem-se utilizado associação de crioprotetores de modo a reduzir suas concentrações individuais e promover um sinergismo para proteção celular. Os crioprotetores podem ser classificados, de acordo com a sua permeabilidade à membrana celular, em permeáveis (GLI, DMSO, EG e PrOH) e em não permeáveis, estes divididos em carboidratos (sacarose, glicose, lactose, trealose e raffinose) e em polímeros (ficoll, dextran e polivinil pirrolidona). Estudos demonstraram que o etilenoglicol (EG) seria o crioprotetor ideal (SHAW et al. 1997), pois possui maior permeabilidade de membrana e menor citotoxicidade que os demais (MARTINO et al. 1996; CHA et al., 2000; DINNYES et al., 2000). Além disso foi relatado que o 1,2-propanediol (PrOH), tem uma baixa toxicidade e favorável capacidade de suportar maturação e fertilização após o descongelamento (LIM et al., 1999). Assim soluções contendo associação entre crioprotetores permeáveis (normalmente contendo o EG) e não permeáveis parecem ser mais vantajosas do que soluções contendo apenas um crioprotetor permeável (SHAW et al., 2000). Comizzoli et al. (2004) relatou que a

qualidade e formação de blastocistos é influenciada pelas concentrações de EG ou PrOH (0,75M, 1,5M e 3M), pois a exposição de oócitos imaturos de gatas a 0°C por 30 minutos aumentou a taxa de anormalidade dos fuso em oócitos de metáfase II, além de ter diminuído a porcentagem de clivagem dos embriões.

Em vista disto, o experimento I do presente trabalho foi delineado para testar a associação de crioprotetores (EG com PrOH ou DMSO), em duas concentrações distintas, como meio de vitrificação para oócitos de gatas domésticas, sendo avaliados após o descongelamento em relação às alterações morfológicas e ao percentual de gametas viáveis. Pudemos notar que, após a descongelamento, aproximadamente metade dos oócitos, em todos os grupos, apresentaram morfologia normal, ou seja, sem sinais evidentes de ruptura da membrana ou comprometimento das células do *cumulus*, independentemente do protocolo utilizado.

Diferentemente, os resultados da viabilidade pós-descongelamento revelaram que o G1 e G2 apresentaram maior percentual de oócitos viáveis quando comparados aos demais, correspondendo a 35,71% e 36,84%, respectivamente. Estes grupos continham o dobro da concentração de crioprotetores empregados no G3 e G4, o que pode ter contribuído para evitar a formação de cristais de gelo intracelular, fenômeno responsável pela ruptura da membrana plasmática das células durante o procedimento de criopreservação. Por outro lado, altas concentrações de crioprotetores apresentam efeito tóxico (FULLER; PAYNTER, 2004), acarretando alterações bioquímicas, danos osmóticos e na estrutura e função da célula, modificações que podem comprometer o desenvolvimento oocitário/embrionário pós-descongelamento. Embora estas modificações não possam ser identificadas através da coloração empregada neste estudo (cFDA/*Trypan Blue*), o fato de termos encontrado discrepância entre os resultados da avaliação morfológica e da viabilidade celular ratifica a importância de se considerar outras formas de se avaliar os criodanos, tal como a realização de cultivo *in vitro*, visto que oócitos morfológicamente normais podem ou não retomar a meiose em condições laboratoriais (LUVONI et al., 1997).

A porcentagem de oócitos viáveis dos grupos com melhores resultados foi em torno de 35 a 36%, um pouco abaixo do percentual de 45,3% encontrado por

Cocchia et al. (2010). Esta diferença pode ser devido ao uso de palhetas que comportam maior volume de solução de vitrificação quando comparado ao OPS e, portanto, correspondem à menor taxa de resfriamento (COCCHIA et al., 2010). Entretanto Alves et al. (2012) utilizando a associação de 15% DMSO + 15% EG + 0,5 M sucrose no dispositivo *cryotop* obtiveram uma porcentagem de oócitos viáveis de 20,6%, um pouco menor do que a obtida na presente pesquisa.

Recentemente Pope et al. (2012) realizaram a vitrificação de oócitos maduros *in vivo* e *in vitro* com o método *cryotop* e obtiveram mais de 90% de oócitos morfológicamente normais após o descongelamento. Estes, após terem sido submetidos à técnica de ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoide) resultaram no nascimento de quatro filhotes. Assim mesmo utilizando apenas a morfologia para avaliar os efeitos dos crioprotetores, os pesquisadores confirmaram que o uso de uma técnica de vitrificação com volume mínimo é o ideal para se minimizar os criodanos e obter sucesso no desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Sabe-se que o procedimento de criopreservação pode ter como consequência o estresse oxidativo, principalmente à peroxidação lipídica, resultando em danos celulares, que podem ser atenuados ou anulados por meio da adição de agentes antioxidantes às soluções de criopreservação (MICHAEL et al., 2007). Em vista disso, propusemos o experimento II no qual testamos três concentrações de vitamina E (0,4 mMol, 0,6 mMol e 0,8 mMol) adicionadas à um dos meios de vitrificação do experimento I (EG+PrOH), com o intuito de verificar sua ação na preservação da integridade morfológica do oócito e, posteriormente, no desenvolvimento pós cultivo *in vitro*.

Os resultados revelaram que a adição de vitamina E na concentração de 0,6 mMol promoveu maior percentual de oócitos morfológicamente normais (88,6%) quando comparado ao grupo sem suplementação de vitamina E (65,2%), ou aos grupos suplementados com 0,4 mMol (47,7%) e 0,8 mMol (62,5%) e semelhante a porcentagem de oócitos morfológicamente normais obtida por Pope et al. (2012), em torno de 90%.

Com relação a retomada da meiose não houve diferença estatística entre os quatro grupos, que obtiveram uma taxa de retomada de meiose variando de 44 a 57%, percentuais que também não diferiram estatisticamente do obtido para o grupo

controle (48,09%). Os valores do presente estudo estão de acordo com os de Alves et al. (2012) que obtiveram uma taxa de retomada da meiose de 53,8% usando o dispositivo *cryotop* e a associação de 15% DMSO com 15% EG e 0,5M sucrose. Entretanto, foram superiores aos reportados no trabalho de Apparício et al. (2013) no qual, 37,5% dos oócitos vitrificados em palhetas de 0,25 mL e usando um kit para vitrificação de embriões bovinos, retomaram a meiose após 36 horas de cultivo *in vitro*.

Quando as taxas de metáfase II são computadas isoladamente, observamos em nosso trabalho que apenas oócitos criopreservados em meio contendo 0,6mMol de vitamina E foram capazes de completar a maturação, embora em percentual inferior ao do grupo controle (4,84% vs. 15,27%, respectivamente). Luciano et al. (2009) comparando as taxas de maturação de oócitos vitrificados e congelados pelo processo lento reportaram que respectivamente 14,1% e 32,5% dos oócitos, foram capaz de completar a maturação. Comparando-se os procedimentos, é importante ressaltar que os referidos autores utilizaram meio contendo 20% de EG e 20% de DMSO em palhetas OPS, dispositivo que comporta pequena quantidade de meio e, conseqüentemente, contribui para a viabilidade oocitária pós-descongelação. Ainda assim, a avaliação por microscopia eletrônica feita por esses autores revelou que oócitos criopreservados pela técnica de congelamento lento preservam melhor a organização do citoesqueleto, enquanto que o processo de vitrificação induz à uma perda da organização.

Considerando que os elementos do citoesqueleto participam do processo de maturação oocitária (através da redistribuição de organelas e reorganização da cromatina), a ausência de oócitos em metáfase II nos grupos G 0, G 0,4 e G 0,8 do presente trabalho pode ser decorrente dos criodanos causados nessas estruturas e, avaliando por este prisma, a suplementação com 0,6mmol de vitamina E pode ter exercido um efeito protetor, permitindo que um pequeno percentual de oócitos, completassem a maturação nuclear. Essa hipótese é reforçada quando consideramos também as taxas de metáfase I que, embora tenham sido inferiores aos do grupo controle, foram superiores no grupo G 0,6.

Os resultados do presente trabalho evidenciaram que o procedimento de criopreservação causa efeitos deletérios nos componentes celulares, como descrito

por Bilodeau et al. (2001), visto que a maioria dos oócitos apresentou quebra de vesícula germinativa, mas foram incapazes de atingir estágios mais avançados de desenvolvimento (como a metáfase I e II), mesmo submetendo ao cultivo apenas oócitos morfológicamente normais.

Sabe-se que a criopreservação de oócitos imaturos pode induzir lesões nas membranas de células do *cumulus* que desempenham papel importante na maturação do oócito pelas junções *gap* (GILCHRIST et al., 2004; GOUD et al., 2000), além de danificar os microfilamentos, responsáveis pela migração dos grânulos corticais para a periferia do oócito durante o processo de maturação (LUCIANO et. al., 2009), alterações que limitam a obtenção de embriões a partir de oócitos criopreservados. Portanto, a avaliação pós descongelação baseada apenas na morfologia é insuficiente para determinar os efeitos danosos dos crioprotetores e deve estar sempre associada ao cultivo oocitário e/ou desenvolvimento embrionário *in vitro*.

No presente estudo, a adição de vitamina E ao meio de vitrificação preservou a integridade morfológica do oócito, mas foi incapaz de impedir modificações estruturais importantes que comprometeram a capacidade dos oócitos de retomar meiose *in vitro* e atingir estágios avançados de maturação. É possível que a utilização de outros dispositivos que contenham mínima quantidade de meio crioprotetor (como o *cryoloop* ou *cryotop*) associados com a vitamina E possa melhorar os índices de maturação e permitir o desenvolvimento embrionário.

A criopreservação de oócitos ainda é considerada uma técnica experimental em todas as espécies, pois as taxas adequadas de sobrevivência, fertilização e desenvolvimento embrionário de oócitos congelados ainda têm de ser determinadas (COCCHIA et al., 2010). O presente estudo é o primeiro a relatar a adição de vitamina E ao meio de vitrificação de oócitos de gatas domésticas e, portanto, ainda precisa ser lapidado para identificar os componentes ideais dos meios e suas concentrações, de modo a ajustar a técnica de criopreservação para a espécie felina visando melhorar os procedimentos de reprodução assistida e no futuro, implementá-los na criação de bancos de oócitos criopreservados.

## 6. CONCLUSÃO

A associação de 3 M de etilenoglicol com 2M de dimetilsulfóxido e/ou 3 M de 1,2 propanediol na criopreservação de oócitos provenientes de gatas domésticas permitiu preservar um percentual maior de oócitos com morfologia normal e viáveis após descongelamento. A adição de vitamina E na concentração de 0,6mMol foi mais benéfica para manter a integridade morfológica do oócito e permitiu que alguns oócitos atingissem o estágio de metáfase II após cultivo *in vitro*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproduction Biology Endocrinology**, v.3, p.28, 2005.
- AGCA Y., LIU J., PETER A. T., CRITSER E. S., CRITSER J. K. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. **Mol. Reprod. Dev.**, V.49 P. 408–415, 1998.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.79-86, 2010.
- APPARICIO, M.; RUGGERI, E.; LUVONI, G.C. Vitrification of Immature Feline Oocytes with a Commercial Kit for Bovine Embryo Vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 240-244, 2013.
- ALVES, A.E.; KOZEL, A. C.; LUVONI, G. C. Vitrification with DAP 213 and Cryotop of *Ex Situ* and *In Situ* Feline Cumulus–Oocyte Complexes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 1003-1008, 2012.
- BARIL, G.; TRALDI, A-L.; COGNIÉ, Y.; LEBOEUF, B.; BECKERSC, J.F.; MERMILLODA, P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**, v.56, p.299-305, 2001.
- BILODEAU J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.56, p. 275–86, 2001.
- BOS-MIKICH, A.; WOOD, M.J.; CANDY, C.J. WHITTINGHAM, D.G. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 53 p. 780-785, 1995.
- BRAMBILLASCA F.; GUGLIELMO M.C.; COTICCHIO, G.; RENZINI, M.M.; DAL CANTO, M.; FADINI, R. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. **J Assist Reprod Genet**, 2013.
- BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v.63, p.2126-2135, 2005.
- BRISTOL-GOULD, S.K.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis Catus*). **Theriogenology**, v. 66, p 5-13, 2006.

BYERS, A.P.; DONOGHUE, A. M.; ROTH, T. L.; WILDT, D. E. Oocyte nuclear maturation at the time of oocyte aspiration is independent of “in vitro” fertilization potential in the domestic cat. **Journal Experimental Zoology**, v. 270, p. 399-404, 1994.

CAO, G.; CUTLER, R.G. High concentration of antioxidants may not improvedefense against oxidative stress. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.17, p.189-201, 1997.

CHA K.Y.; CHUNG, H.M.; LIM, J.M.; KO, J.J.; HAN, S.Y.; CHOI, D.H.; YOON, T.K. Freezing immature oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.169, p.43-47, 2000.

CHEN, S.U; LIEN, Y.R.; CHAO, K.H.; HO, H.N.; YANG, Y.S.; LEE, T.Y. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing – a review article. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.202, p.101–107, 2003.

COCCHIA, N.; CIANI, F.; RUSSO, M.; EL RASS, R.; ROSAPANE, I; AVALLONE, L.; TORTORA, G.; LORIZIO, R. Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSs) using a cryoprotectant mixture. **Cryobiology**, v.60, p. 229–234 , 2010.

COMIZZOLI P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. Effect of 1,2-Propanediol Versus 1,2-Ethenediol on Subsequent Oocyte Maturation, Spindle Integrity, Fertilization, and Embryo Development In Vitro in the Domestic Cat. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 598–604, 2004.

COMIZZOLI P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. In vitro compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes. **Reproduction Domestic Animals**, Suppl. 24, v.4 , p. 269–274, 2009.

CRITSER, J.K.; AGCA, Y.; GUNASENA, K.T. The cryobiology of mammalian oocytes. In: KAROW, A.M.; **Reproductive tissue banking. Scientific principles**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 329–57.

DATTENA, M.; ACCARDO, C.; PILICHI, S.; ISACHENKO, V.; MARA L.; CHESSA B.; CAPPAL P. Comparasion of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. **Theriogenology**, v. 62, p. 481-493, 2004.

DINARA, S.; SENGOKU, K.; TAMATE, K.; HORIKAWA, M.; ISHIKAWA, M. Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. **Human Reproduction**, v. 16, n.9, p. 1976-1981, 2001.

DINNYES, A.; DAI, Y. P.; JIANG, S.; YANG, X. Z. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Biology Reproduction**, v. 63, p. 513-518, 2000.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p. 285-302, 2002.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. 785p.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**, v.43, p.1-16, 1997.

FULLER S. & PAYNTER S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reprod. Biomed. Online**. V.9, p. 680–691, 2004.

GALIGUIS, J.; GÓMEZ, M.C.; LEIBO, S.P.; EARLE POPE, C. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes. **Cryobiology**, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.012>.

GARDNER DK, SHEEHAN CB, RIENZI L, KATZ-JAFFE M, LARMAN MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. **Theriogenology**, v. 67, p. 64–72, 2007.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.82, p. 431–446, 2004.

GOMEZ, M.C.; POPE, C.E.; GIRALDO, A.; LYONS, L.A.; HARRIS, R.F.; KING, A.L.; COLE, A.; GODKE R.A.; DRESSER B.L. Birth of African wildcat cloned kittens born from domestic cats. **Cloning Stem Cells**, v.6, n.3, p.247–258, 2004.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas, aplicadas à reprodução animal. 2 ed. In: SILVA, L.D.M.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; LIMA, A.K.F.; SILVA, T.F.P. **Biotécnicas aplicadas à reprodução de Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2008. p. 181-200.

GOUD, A.P.; GOUD, P.T.; QIAN, C.; VAN DER, E.J.; MAELE, G.V.; DHONT, M. Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured MII oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions. **Fertility and Sterility**, v.74, p. 487–494, 2000.

GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; SCHMIDT, P.M.; WILDT, D.E. Reproductive biology of domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and *in vitro* fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.30, p.73-90, 1989.

GREEN, R.E. **Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos**. 2005. 21f. Monografia (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

GRUFFYDD-JONES, T.J. Some aspects of reproduction in cats. **Advances in Small Animal Practice**, v.7, p.68-77, 1955.

GUBERMUTH, D.F.; NEWTON, L.; DAELS, P.; CONCANNON, P. Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.51, p.177-184, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford, 1999.

HOCHI, S.; ITO, K.; HIRABAYASHI, M.; UEDA, M.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 49, p. 787-796, 1998.

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, S.D.; ROOT, M.V.; OLSON, P.N.S. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: Saunders, p.592, 2000.

KASAI, M.; KOMI, J.H.; TAKAKAMO, K.; ISUDERA, H.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 89, p. 91-97, 1990.

KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v.62, p.1186-1197, 2004.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W. B.; AND GARDNER, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop containerless technique. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 5, p. 1073–1078, 1999.

LEGGE, M.; SELLENS, M.H. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. **Human Reproduction**, v.6, p. 867-871, 1991.

LIM J. M., KO J. J., HWANG W. S., CHUNG H. M., NIWA K. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 51, p. 1303–1310, 1999.

LUCIANO, A.M.; CHIGIONI, S.; LODDE V.; FRANCIOSI, F.; LUVONI, G.C.; MODINA, S.C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. **Cryobiology**, v.59, p. 90–95, 2009.

LUVONI G. C., PELLIZZARI P, BATTOCCHIO M,: Effects of slow and ultrarapid freezing on morphology and resumption of meiosis in immature cat oocytes. **J Reprod Fertil Suppl** 51, 93–98. 1997.

LUVONI, G. C.; PELLIZZARI, P. Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. **Theriogenology**, v.53, p.1529–1540, 2000.

LUVONI, G. C.; CHIGIONI, S. Cultural strategies for maturation of carnivore's oocytes. In: International symposium on canine and feline reproduction, V, 2004, Embu das Artes, São Paulo. Abstracts Book: **Basic and Applied Research on Domestic, Exotic and Endangered Carnivores**. Embu das Artes, São Paulo, Brazil, p.30.

LUVONI, G. C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v. 63, p. 41-59, 2005.

LUVONI, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v.66, p. 101–111, 2006.

LUVONI, G. C., TESSARO I., APPARICIO, M., RUGGERI E., LUCIANO A. M., MODINA S. C. Effect of Vitrification of Feline Ovarian Cortex on Follicular and Oocyte Quality and Competence. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.385–391, 2012.

MAHMOUDZADEH, A.R.; VAN SOOM, A.; VAN VLAENDEREN, I.; DE KRUIF, A. A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on in vitro survival of vitrified bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 1291-1302, 1993.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase**. 2006. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology Reproduction**, v. 54, p.1059-1069, 1996.

MASSIP A. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. **Reprod. Nutr. Dev.** v.43, p.325–330, 2003.

MATSUMOTO, H.; JIANG, J. Y.; TANAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, n. 2, p. 139-144, 2001.

MERLO, B.; IACONO, E.; REGAZZINI, M.; ZAMBELLI, D. Cat blastocysts produced in vitro from oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved electroejaculated semen. **Theriogenology**, v.70, p. 126–130, 2008.

MICHAEL A.; ALEXOPOULOS C.; PONTIKI E.; HADJIPAVLOU-LITINA D.; SARATSIS P.; BOSCO C.; Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.68, p. 204-212, 2007.

MICHAEL A.J.; ALEXOPOULOS C.; PONTIKI E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA D. J.; SARATSIS P.; VERVERIDIS H. N.; BOSCO C. M. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science** , v. 112, p. 119-135, 2009.

MURAKAMI, O.M.; KARJA, N.W.K.; WONGSRIKEAO, P.; AGUNG, B.; SUZUKI, T. Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose, **Cryobiology**, v.48, p. 341–348, 2004.

NAITANA, S.; LEDDA, S.; LOI, P.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; DATTENA, M. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserved ovine embryos at different stages of development. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 247-256, 1997.

OLSON, S.E.; SEIDEL JR, G.E. Culture of in vitro-produced bovine embryos with Vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. **Biology Reproduction**, v.62, p.248-252, 2000.

PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, p. 127-149, 1996.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.15, p. 651– 658, 2000.

PARKS, J.E. Hypothermia and mammalian gametes. In: KAROW, A.M.; CRITSER, J.K. **Reproductive tissue banking. Scientific principles**. San Diego: Academic Press; 1997 p. 229–61.

PAYNTER, S.J. Current status of cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Human Reproduction Update**, v. 6, p. 449-456, 2000.

PEDRO, P.; YOKOYAMA, E.; ZHU,S.E.; YOSHIDA,N.; VALDEZ JR., D.M.; TANAKA, M.; EDASHIGE, K.; KASAI, M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. **The Journal of Reproduction and Development**. v.51, p. 235–246, 2005.

PEREIRA R. M., MARQUES C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**. V. 9, p. 267–277, 2008.

PRENTICE J. R., ANZAR M. Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. **Vet Med Int.** v.21, p.1–11, 2011.

POPE, C.E.; MCRAE, M.A.; PLAIR, B.R.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, (Suppl. 51), p. 69–82, 1997.

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

POPE, C.E.; GÓMEZA, M.C.; KAGAWAB, N.; KUWAYAMAC, M.; LEIBOA, S.P.; DRESSERA, B.L. In vivo survival of domestic cat oocytes after vitrification, intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. **Theriogenology**, v.77, p.531-538, 2012.

ROOT, M.V.; JOHNSTON, S.D.; OLSON, P.N.S. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.31, p.429-433, 1995.

SANTOS, E.C.S. **Efeito dos métodos de vitrificação, OPS e SSV, com adição de bloqueador sintético de gelo, sobre a viabilidade de oócitos de camundongos e bovinos.** 2008. 48f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, 2008.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, p. 01-19, 2011.

SAUNDERS, K.M.; PARKS, J.E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.61, p.178–187, 1999.

SHAW, J.M.; KULESHOVA, L.L.; MAC FARLANE, D.R.; TROUSON, A.O. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, ficoll or dextran. **Cryobiology**, v.35, p. 219-229, 1997.

SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p.59-72, 2000.

SCHMIDT, P.M.; CHAKRABORTY, P.K.; WILDT, D.E. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat II. Relationships during pregnancy, arturition, lactation and the postpartum estrus. **Biology of Reproduction**, v.28, p.657-671, 1983.

SCHNEIDER, V.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v. 21, p.68-79, 1984.

STACHECKI, J. J.; COHEN, J. An overview of oocyte cryopreservation. **Reproductive Biomedicine online**, n.2, v.9, p. 152-163, 2004.

TURATHUM, B.; SAIKHUN, K.; SANGSUWAN, P.; KITIYANANT, Y. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 70, 2010.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, n. 1, p. 53–58, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.61, p.357–364, 2000.

VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C. H.; STANDAERT, V.; BOLLEN, N.; ROOSEDAAL, E. van.; VANDERVORST, M.; SCHOYSMAN, R.; ZECH, N. Vitrification of blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. **Human reproduction**, v. 18, n. 7, p. 1504-1511, 2003.

VERSTEGEN, J.P. Physiology and endocrinology of reproduction in female cats. In: SIMPSON, G.; ENGLAND, G.; HARVEY, M. **Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology**. Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association, p.11-16, 1998.

WANG X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, p.1272-1277, 2002.

WHITTINGHAM, D.G. Principles of embryo preservation. In: Ashwood-Smith MJ, Farrant J (eds), **Low Temperature Preservation In Medicine and Biology**. Uk; Pitman Medical Ltda., p. 65-83, 1980.

WOLFE, B.A.; WILDT, D.E. Development to blastocysts from in vitro maturation and fertilization of domestic cat oocytes following prolonged cold storage ex situ. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, n.1, p.135-141, 1996.

WOOD, M.J.; BARROS, C.; CANDY, C.J.; CARROLL, J.; MELENDEZ, J.; WHITTINGHAM, D.G. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethyl sulphoxide. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 489-495, 1993.

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. **Journal Reproduction and Fertility** v. 104, p. 315-323, 1995.