

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E DA CONDIÇÃO
OVARIANA SOBRE A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA *IN VITRO*
DE GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*, Linnaeus, 1758)

LÍLIAN RIGATTO MARTINS

Botucatu - SP
Dezembro/2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E DA CONDIÇÃO
OVARIANA SOBRE A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA *IN VITRO*
DE GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*, Linnaeus, 1758)

LÍLIAN RIGATO MARTINS

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para a obtenção do título de
Doutor.

Orientadora: Prof^a Adj. Maria Denise
Lopes

Co-orientadora: Prof^a Adj. Fernanda da
Cruz Landim e Alvarenga

Botucatu - SP
Dezembro/2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Martins, Lílían Rigatto

Influência da sazonalidade e da condição ovariana sobre a produção embrionária *in vitro* de gato doméstico (*Felis catus*, Linnaeus, 1758)/Lílían Rigatto Martins – Botucatu [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Maria Denise Lopes

Co-orientadora: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Assunto CAPES: 50504002

1. Gato - Reprodução

CDD 636.80824

Palavras-chave: Ciclo Reprodutivo; Embrião; Gato; Oócito; Sazonalidade; Ultra-estrutura

Nome da autora: Lílian Rigatto Martins

Data da Defesa: 09/12/2008

Título: INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE E DA CONDIÇÃO OVARIANA SOBRE A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA *IN VITRO* DE GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*, Linnaeus, 1758)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Adj. **Maria Denise Lopes**

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - Unesp - Botucatu

Prof^a Dr^a **Mayra Elena Ortiz D'Avilla Assumpção**

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ - USP - São Paulo

Prof. Dr. **Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães**

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ - USP - São Paulo

Prof. Dr. **Nei Moreira**

Membro

Curso de Medicina Veterinária

UFPR – Campus Palotina

Prof. Adj. **Sony Dimas Bicudo**

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - Unesp - Botucatu

Dedicatória

É a vocês que dedico esta tese e tudo de bom que dela adveio; os momentos prazerosos, as oportunidades, e, acima de tudo, os desafios e os obstáculos que enfrentei e que serviram não só como mola propulsora para meu aprimoramento profissional, mas, sobretudo, para minha evolução como ser humano. Esses três anos exigiram de mim tanto quanto foi exigido daqueles que me rodeiam, que me amam e que sei que sempre estarão ao meu lado. A vocês, mãe, Leila, Lane e Leo, devo a vocês, meus amores, muito mais que um muito obrigada.

Eis que quando ela, minha orientadora de mestrado, Professora Maria Denise Lopes, achou que nosso trabalho havia terminado, surto na porta de sua sala, quatro meses após a defesa da minha dissertação perguntando se ela ainda teria paciência para mais três anos de doutorado. E teve! Confesso que testei bastante essa paciência, mas acho que no *frigor dos ovos* ela não se arrependeu. Afinal é por sua dedicação e pulso firme quando necessário que esse trabalho rendeu tantos frutos. Tenho e terei muito orgulho de ter sido sua orientada.

Mas dessa vez queria trabalhar com gatos, mais especificamente com produção de embriões de gatas e nossa idéia incluía a professora Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, cuja sala estava a dois passos dali e a quem solicitei co-orientação. Trabalhar junto foi uma experiência recompensadora. Agradeço todo auxílio, as sugestões e a ajuda com a análise e descrição da microscopia eletrônica.

Ao meu namorado e querido companheiro de todas as horas, Leonardo Assafin, que soube ser paciente e que me deu muita força durante essa caminhada.

Gostaria de agradecer aos Membros dessa Comissão Examinadora, à Prof^a Dr^a Mayra Elena Ortiz D'Avilla Assumpção, ao Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, ao Prof. Dr. Nei Moreira e ao Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo, que tão gentilmente atenderam ao convite para compor a Banca, deixando de lado seus afazeres para colaborar com sugestões e críticas, proporcionando um rico intercâmbio de informações.

Aos professores da Área de Reprodução Animal, em especial ao professor Nereu Carlos Prestes, meu orientador durante os estágios de quinto ano e durante as Iniciações Científicas e a quem, apesar de não atuarmos mais, como orientada e orientador, admiro de forma incansável. Sua atuação em minha vida profissional foi fundamental.

Gostaria ainda de agradecer ao Professor Sony Dimas Bicudo, que sempre me incentivou em todos os momentos, pelo qual nutro grande carinho e amizade e

a quem admiro não só como exemplo de profissional, mas de ser humano íntegro.

Gostaria ainda de agradecer aos demais docentes do Departamento de Reprodução Animal que contribuíram para a minha formação durante a graduação e durante o Programa de Residência; professores Cezinande de Meira, João Carlos Pinheiro Ferreira, Frederico Ozanan Papa, Eunice Oba e Marco Antonio Alvarenga.

Às minhas grandes amigas, Cláudia Barbosa Fernandes, companheira das madrugadas de trabalho, durante as quais nos revezávamos entre equínos e felinos e que muito contribuiu para o andamento desse projeto; Suzane Lílian Beier, responsável por parte das anestésias e que sempre foi e continua sendo uma pessoa referência no que faz, e Tatiana Silva Rascado, que contribuiu de forma incessante para o sucesso dessa pesquisa. A elas, meu carinho, respeito e agradecimento por todo auxílio e tudo de bom que vivemos juntas.

Gostaria também de agradecer às pessoas queridas que não contribuíram de forma direta e contínua, mas que sempre estiveram ao meu lado durante essa jornada; aos amigos Camila Bianco das Dores, Daniela Martins Paschoal, Ana Augusta Pagnano Derussi, Ieda Dalla Pria Blanco, Bethania Vieira Lopes, João Ferreira de Lima Neto, Luciana da Silva Leal e Matheus José Sudano.

Um agradecimento especial à doutoranda Ana Izabel Silva Balbin Villaverde, cujo auxílio foi imprescindível para a realização da segunda etapa do projeto, pela coleta de sêmen dos gatos.

Um agradecimento especial ao Doutorando do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Unesp de Botucatu, Bruno Watanabe Minto, pela realização de todas as cirurgias durante o ano de 2007 e parte de 2008.

À Ana Christina Novelli Silveira, minha professora de francês e “segunda mãe” por todas as conversas gostosas, pelos sábios conselhos e, é claro, pelas aulas de francês.

Ao Médico Veterinário Kleber José Barbosa, proprietário da Clínica Veterinária AUQMIA, que gentilmente cedeu seu centro cirúrgico para a realização de parte das cirurgias.

Agradeço ainda à Maria Helena Moreno, auxiliar acadêmico do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Departamento de Morfologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

À Chefe do Departamento de Ciências Ambientais Renata Cíntia Barbosa Fonseca pela fineza na cessão dos dados referentes às taxas de irradiação solar mensuradas no município de Botucatu.

Às bibliotecárias Selma Maria de Jesus, pela elaboração da ficha catalográfica e Rosemary Cristina da Silva, pela realização das correções das referências bibliográficas.

Gostaria de fazer um agradecimento especial à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que através da concessão da bolsa de estudo e da reserva técnica, proporcionou subsídios para que pudesse me dedicar integralmente à pesquisa, aprimorar meus conhecimentos e participar de reuniões científicas resultando em um número considerável de publicações.

Agradeço ainda àqueles que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Quadro 1 - Grupos de COC avaliados por microscopia eletrônica de transmissão durante os períodos I e II	52
Quadro 2 - Fórmulas utilizadas para determinar a diluição do sedimento necessária para que o volume de 10 µL adicionado à gota de fertilização contivesse 1×10^6 espermatozóides/mL	54
Quadro 3 - Número de ovários utilizados durante os períodos I e II para avaliação da maturação nuclear <i>in vitro</i>	59
Quadro 4 - Número de ovários utilizados durante os períodos I e II para avaliação da produção embrionária <i>in vitro</i>	59
Tabela 1 - Frequência relativa de COC Grau I provenientes de ovários de gato doméstico (<i>Felis catus</i>) em três condições – inativa, luteal e folicular – avaliados e classificados como degenerados ou não identificáveis (D/Ni), vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG) e metáfase I (MI) e metáfase II (MII), maturados <i>in vitro</i> durante 30 a 36 horas nos períodos I e II. Botucatu, 2008	62
Tabela 2 - Frequência relativa de clivagem, produção de mórulas e blastocistos produzidos a partir de oócitos provenientes de ovários de gato doméstico (<i>Felis catus</i>) em três condições – inativa, luteal e folicular – cultivados <i>in vitro</i> durante os períodos I e II. Botucatu, 2008 ...	63
Tabela 3 - Viabilidade de mórulas produzidas a partir de oócitos provenientes de ovários de gato doméstico (<i>Felis catus</i>) em três condições – inativa, luteal e folicular – cultivadas <i>in vitro</i> durante os períodos I e II. Botucatu, 2008	64

Figura 1 - Transporte dos ovários de gata em microtubos ou criotubos

Figura 2 - Ovários de gata classificados em inativo **(a)**, luteal **(b)** e folicular **(c)**

Figura 3 - *Slicing* de ovário de gata para obtenção de complexos *cumulus oophorus*

Figura 4 - Complexo *cumulus oophorus* de gata classificado em grau I (Lupa estereomicroscópica, aumento 600x)

Figura 5 - COC grau II de gata. COC parcialmente circundado por camadas de células do *cumulus* **(a)**. COC com citoplasma heterogêneo **(b)** (Microscópio de luz, aumento 400x)

Figura 6 - COC grau III de gata. Citoplasma fragmentado **(a)**; citoplasma com tamanho reduzido e zona pelúcida edemaciada **(b)** e oócito desnudo **(c)** (Microscópio de luz, aumento 400x)

Figura 7 - Placa de lavagem para maturação *in vitro* de COC de gata

Figura 8 - Placas *four-well* para maturação *in vitro* de COC de gata

Figura 9 - Remoção mecânica das células do *cumulus oophorus* através de pipetagem

Figura 10 - Aspecto de oócito de gata após remoção mecânica das células do *cumulus oophorus* (Microscópio de luz, aumento 1000x)

Figura 11 - Oócito de gata vesícula germinativa (VG) **(a)** e em fase de quebra de vesícula germinativa (QVG) **(b)** corados com Hoechst[®] 33342 (Microscópio de fluorescência, aumento 100x)

Figura 12 - Oócito de gata classificado em metáfase I **(a)** (aumento 400x) e oócito em metáfase II **(b)** corado com Hoechst® 33342 (Microscópio de fluorescência, aumento 200x)

Figura 13 - Oócito de gata em metáfase II corado com Hoechst® 33342. Cromossomos **(setas)** (Microscópio de fluorescência, aumento 400x)

Figura 14 - Oócito de gata classificado como degenerado ou não passível de identificação corado com Hoechst® 33342. (Microscópio de fluorescência, aumento 400x)

Figura 15 - Vagina artificial para coleta de sêmen de gato doméstico **(a)**; tubo contendo sêmen de gato antes da realização do *swim-up* **(b)**; tubos contendo meio e sêmen de gato após o *swim-up* **(c)**

Figura 16 - Oócitos de gata após partenogênese apresentando o aspecto de mórula **(a e b)** (Microscópio de luz, aumentos de 200 e 400x). Oócito de gata corado com Hoechst® 33342 após partenogênese apresentando aspecto de mórula **(c)** (Microscópio de fluorescência, aumento 400x)

Figura 17 - Zigotos de gato doméstico com duas **(seta)** e quatro **(asterisco)** células no primeiro dia de cultivo *in vitro* (D1) obtidos a partir de COC provenientes de ovários em condição luteal (Lupa estereomicroscópica, aumento 60x)

Figura 18 - Embrião de duas células corado com Hoechst® 33342, obtido a partir de COC proveniente de ovário em condição folicular (aumento 400x) **(a)**; embrião com 28 células corado com Hoechst® 33342 obtido a partir de COC proveniente de ovário em condição inativa **(b)** (aumento 400x). Microscópio de fluorescência

Figura 19 - Blastocisto após 144 horas de cultivo *in vitro* (D6) **(a)**; Blastocisto após 192 horas de cultivo *in vitro* (D8) (aumento 400x).

Embrioblasto (**asterisco**). (aumento 400x). Lupa estereomicroscópica

Figura 20 - Embrião de 8 células obtido a partir de COC proveniente de ovário em condição luteal corado com acridina *orange* e iodeto de propídeo. Células VN (viáveis e normais, com núcleos corados em verde e morfologia normal) e células NVF (não viáveis com núcleo alaranjado e cromatina fragmentada). (aumento 400x). Microscópio de fluorescência

Figura 21 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como inativo (NMI) durante o período I. Grânulos corticais (GC) na periferia, mitocôndrias (M), microvilosidades (MV), gotas de lipídio (GL) e vesículas (**seta**) (aumento 3.306x) (**a**). COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como inativo (NMI). Complexo de Golgi (CG), retículo endoplasmático liso (REL) e *nuage* (seta) (aumento 10.070x) (**b**). Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 22 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como inativo (NMI) durante o período I. Junção do tipo *gap* (GJ), microvilosidades (MV) e grânulo cortical (GC) (aumento 43.700x). Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 23 - Vista geral de um COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período I. Grânulos corticais (GC) na periferia, mitocôndrias (M), gotas de lipídio (GL) e vesículas (seta) (aumento 1862x) (**a**). COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Mitocôndrias (M), microvilosidades (MV), grânulos corticais (GC) e gotas de lipídio (GL) (aumento 7410x) (**b**). Microsc. Eletrônico de Transmissão

Figura 24 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período I. Mitocôndrias (M), Grânulos corticais (GC) não alinhados e microvilosidades (MV) (aumento 23.940x) (**a**). COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como

folicular (NMF). Grânulos corticais (GC), junções do tipo *gap* (GJ). Microvilosidades (MV) e projeção de células do *cumulus* (**seta**) (aumento 29.400x) (**b**). Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 25 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML) durante o período I. Mitocôndrias (M) e gotas de lipídio (GL) (aumento 2.470x) (**a**). COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Zona pelúcida (ZP), grânulo cortical (GC) e mitocôndria (M) (aumento 7.410x) (**b**). Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 26 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal durante o período I. Grânulos corticais (GC) na periferia, mitocôndrias (M), zona pelúcida (ZP) microvilosidades (MV), espaço perivitelínico (EPV) e prolongamento da célula do *cumulus* (**seta**) (aumento 31.920x) (**a**). COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal. Grânulos corticais (GC) e microvilosidades (MV), zona pelúcida (aumento 31.920x) (**b**). Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 27 - COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como luteal (MIVL) durante o período I. Mitocôndrias (M) dispersas pelo citoplasma. Gotas de lipídio (GL) (aumento 2.470x) (**a**). COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como luteal (MIVL). Observar espaço perivitelínico (EPV) reduzido, mitocôndrias (M) grânulos (GC), gota de lipídio (GL) (aumento 17.480x) (**b**)

Figura 28 - COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como folicular durante o período I. Grânulos corticais (GC), espaço perivitelínico (EPV) (aumento 17.480x) (**a**). COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como folicular (MIVF). Espaço perivitelínico (EPV), gotas de lipídio (GL), zona pelúcia (ZP), mitocôndrias (M) e vesículas (**seta**) (aumento 2.470x) (**b**). Microscópio Eletrônico de

Transmissão

Figura 29 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período II. Grânulos corticais (GC) na periferia, mitocôndrias (M) em associação a gotas de lipídio (GL) e vesículas (V) (aumento 5.750x). COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Grânulos corticais (GC) na periferia, mitocôndrias (M), gota de lipídio (GL) e vesículas (V) (aumento 9750x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 30 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período II. Grânulo cortical (GC) na periferia, complexo de Golgi (CG), microvilosidades (MV) e vesículas (V) (aumento 31.500x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Grânulos corticais (GC), complexo de Golgi (CG) e vesículas (V) (aumento 42.000x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 31 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período II. Mitocôndrias (M) e *nuage* (seta) (aumento 31.500x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como inativo (NMI). *Gap junction* (GJ) (aumento 31.500x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 32 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como inativo (NMI) durante o período II. Grânulos corticais (GC) na periferia, microvilosidades (MV) e vesículas (V) (aumento 57.500x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Mitocôndrias (M), gotas de lipídio (GL) (aumento 57.500x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 33 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML) durante o período II. Grânulo cortical (GC), vesícula (V) e retículo endoplasmático liso (aumento 57.500x) **(a)**. COC de gata não

maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Retículo endoplasmático liso (REL) e vesícula (V) (aumento 4.350x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 34 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML) durante o período II. Grânulos corticais (GC), *gap junctions* (GJ), microvilosidades (MV) e zona pelúcida (ZP) (aumento 6.500x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Grânulo cortical (GC), mitocôndrias (M), gotas de lipídio (GL), retículo endoplasmático liso (REL) e vesículas (V) (aumento 32.500x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 35 - COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período II. Grânulos corticais (GC), mitocôndrias (M), microvilosidades (MV) e vesículas (V) (aumento 17.000x) **(a)**. COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Zona pelúcida (ZP), mitocôndrias (M), microvilosidades (MV) e vesículas (V) (aumento 23.000x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 36 - COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como inativo (NMI) durante o período II. Gota de lipídio (GL), vesícula (V) e material sendo digerido no interior de vesícula (seta) (aumento 31.500x) **(a)**. COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como inativo (NMI). Zona pelúcida (ZP), gotas de lipídio (GL) e vesículas (V) (aumento 13.250x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 37 - COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como inativo (NMI) durante o período II. Material sendo digerido no interior de vesícula (V) e mitocôndrias (M) (aumento 13.250x) **(a)**. COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Grânulos corticais (GC) na periferia, zona pelúcida

(ZP), microvilosidades (MV), complexo de Golgi e vesículas (V) (aumento 42.000x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 38 - COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como luteal (NML) durante o período II. Mitocôndrias (M), gotas de lipídio (GL) e vesículas **(seta)** (aumento 42.000x) **(a)**. Embrião de gato doméstico produzido *in vitro* a partir de COC proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Cabeça de espermatozóide (CE), zona pelúcida (ZP), gotas de lipídio (GL) e vesículas (seta) (aumento 4.350x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 39 - Embrião de gato doméstico produzido *in vitro* a partir de COC proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Cabeças de espermatozóide (CE) e zona pelúcida (ZP) (aumento 5.750x) **(a)**. Embrião de gato doméstico produzido *in vitro* a partir de COC proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Citoesqueleto (CTE) (aumento 57.500x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão

Figura 40 - Embrião de gato doméstico produzido *in vitro* a partir de COC proveniente de ovário classificado como inativo (NMI). Porção degenerada do trofoblasto (área tracejada), blastocelo (BC) e zona pelúcida (ZP) (aumento 2450x) **(a)**. Embrião de gato doméstico produzido *in vitro* a partir de COC proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Trofoblasto (TR), blastocelo (BC), espaço perivitelínico (EPV), zona pelúcida (ZP) e material extruído para o EPV (área circundada) (aumento 5750x). Microscópio Eletrônico de Transmissão

Gráfico 1 - Taxa de irradiação mensal média durante o período de novembro de 2005 a agosto de 2008. Botucatu, 2008

	Página
Resumo	
Abstract	
INTRODUÇÃO	22
REVISÃO DE LITERATURA	25
1. Fisiologia reprodutiva da gata	25
2. Efeito do período sobre a maturação <i>in vitro</i>	26
3. Efeito do ciclo reprodutivo sobre os oócitos	29
4. Estado-da-arte na produção <i>in vitro</i> de embriões felinos	30
MATERIAL E MÉTODOS	46
Delineamento Experimental	46
Projeto Piloto 1	48
Projeto Piloto 2	48
Projeto Piloto 3	48
Projeto Piloto 4	48
Projeto Piloto 5	48
1. Local	49
2. Animais	49
3. Transporte ovariano	50
4. Classificação da condição ovariana	50
5. Obtenção e classificação dos complexos <i>cumulus oophorus</i>	50
6. Lavagem e maturação oocitária <i>in vitro</i>	51
Experimento I. Aspectos relacionados à maturação <i>in vitro</i> e análise ultra-estrutural de COC de felinos domésticos nos períodos I e II	
1. Classificação da configuração nuclear oocitária	51
2. Avaliação ultra-estrutural dos COC por microscopia eletrônica de transmissão	52
Experimento II. Produção <i>in vitro</i> e análise ultra-estrutural de embriões de felinos domésticos nos períodos I e II	
1. Coleta de sêmen e realização do <i>swim-up</i>	53
2. Fertilização <i>in vitro</i>	54
3. Cultivo <i>in vitro</i>	55

	18
4. Avaliação da viabilidade embrionária	55
5. Avaliação ultra-estrutural dos embriões por microscopia eletrônica de transmissão	56
Análise estatística	57
RESULTADOS	59
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES	83
BIBLIOGRAFIA.....	85
ANEXOS	102

MARTINS, L.R. **Influência da sazonalidade e da condição ovariana sobre a produção embrionária *in vitro* de gato doméstico (*Felis catus*, Linnaeus, 1758).** Botucatu. 2008. 107p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Testou-se a hipótese de influência da sazonalidade sobre a produção embrionária *in vitro* de gato doméstico (*Felis catus*), na cidade de Botucatu, localizada sob latitude de 22°53'09" S, no estado de São Paulo, Brasil, em associação a três condições ovarianas – inativa, luteal e folicular em dois momentos: **período I**, que compreendeu os meses de janeiro, fevereiro e março e **período II** constituído pelos meses de agosto, setembro e outubro. Realizaram-se dois experimentos: **I) Aspectos relacionados à maturação *in vitro* e análise ultra-estrutural de complexos *cumulus-oophorus* (COC) de felinos domésticos** e **II) Produção *in vitro* e análise ultra-estrutural de embriões de gato doméstico**. O objetivo do experimento I foi avaliar as taxas de recuperação e maturação *in vitro* de COC e a descrição de suas características ultra-estruturais. O experimento II visou à avaliação das taxas de clivagem, de formação de mórulas, de produção de blastocistos; à avaliação da qualidade dos embriões felinos em fase inicial de desenvolvimento e à descrição das características ultra-estruturais dos embriões obtidos. No experimento I, para verificação das taxas de recuperação oocitária e de maturação *in vitro* foram avaliados 473 oócitos grau I no período I e 482 oócitos grau I no período II, provenientes de 20 e de 10 pares de ovário, respectivamente. O número médio de oócitos obtidos por gata foi de 23,65 e 48,2 nos períodos I e II, respectivamente. Esses COC foram maturados *in vitro* e classificados quanto à configuração nuclear em vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI), metáfase II (MII) e degenerados/não identificados (D/NI). No experimento II, 386 e 568 COC durante o período I e II respectivamente, foram fertilizados com sêmen fresco e após três e oito dias de cultivo verificou-se o estágio de desenvolvimento e a viabilidade embrionária. No experimento I não foram verificadas diferenças significativas na porcentagem de oócitos em metáfase II nos dois períodos e nas três condições ovarianas. Os resultados indicam ainda que a maturação *in vitro* foi eficaz em induzir alterações morfológicas compatíveis com a maturação citoplasmática de oócitos de gatas, independente da condição ovariana. Do experimento II, pôde-se inferir que não houve diferença significativa na frequência de clivagem, de formação de mórulas e de produção

de blastocistos quando comparadas as três condições ovarianas dentro do mesmo período, o que não foi observado na comparação entre os dois períodos. Não foram verificadas diferenças significativas quanto ao número de células por mórula, de células viáveis normais e de células viáveis com núcleo fragmentado em relação às três condições ovarianas e nos dois períodos quando se avaliou a viabilidade de embriões em fase inicial. Não foi possível caracterizar os embriões produzidos em decorrência de degeneração.

Palavras-chave: Gato; Oócito, Embrião, Sazonalidade; Ciclo Reprodutivo, Ultra-estrutura.

MARTINS, L.R. **Effect of season and ovarian status on *in vitro* embryo production of domestic cat (*Felis catus*)**. Botucatu. 2008. 107p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

The hypothesis of season effect at Botucatu, 22°53'09" S, Sao Paulo State, Brazil, on *in vitro* embryo production of domestic cat (*Felis catus*), was tested in association with three ovarian conditions – inactive, luteal and follicular during two seasons: **season I**, which comprehended the months of January, February and March and **season II**, constituted by the months of August, September and October. This study was divided in two experiments: **I) *In vitro* oocyte maturation and ultrastructural analysis of cumulus-oocyte complexes (COC) of domestic cats** and **II) *In vitro* embryo production and ultrastructural analysis of embryo of domestic cats**. The aim of the experiment I was to analyze the COC recovery rate and *in vitro* nuclear maturation (IVM) rate and the description of its ultrastructural characteristics. The experiment II aimed to evaluate cleavage and morulae rates and blastocyst formation; to evaluate the quality of domestic cat embryos and to describe ultrastructural characteristics of these embryos. In experiment I, to evaluate COC recovery rate and *in vitro* maturation rate; 473 Grade I COC recovered from 20 ovarian pairs and 482 Grade I COC recovered from 10 ovarian pairs were evaluated during season I and season II, respectively. These COC were *in vitro* matured and classified according to nuclear configuration as germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase I (MI), metaphase II (MII) and degenerated/non-identified (D/NI). In experiment II, 368 and 568 COC recovered from ovaries during season I and II, respectively, were *in vitro* fertilized with fresh semen and after three and eight days of culture the development stage and embryo viability were analyzed. In experiment I, no significant difference was verified in the percentage of oocytes in MII in both seasons and considering the three conditions. These results indicate that *in vitro* maturation was efficient in induce the morphological changes compatible with cytoplasmic maturation of cat oocytes, independently of the ovarian status. From experiment II, It could be inferred that no significant difference was verified in the frequency of cleaved embryos and morulae and blastocyst formation when comparing the three ovarian conditions in the same season, but it could be observed between both periods. No significant differences were verified in relation to the number of cells/morulae, the number of viable cells and

non-viable cells with fragmented nucleus in relation to the three ovarian conditions and to both seasons when embryos on initial development were analyzed. It was not possible to characterize the embryos produced due to degeneration.

Key-words: Cat; Oocyte; Embryo; Seasonality; Reproductive Cycle; Ultrastructure

Introdução

Felinos domésticos são primariamente animais de companhia não havendo interesse em sua reprodução em larga escala como observado em outros animais domésticos (FARSTAD, 2000).

Entretanto, o gato doméstico além de ser um valioso modelo para o desenvolvimento de técnicas *in vitro* é utilizado também como receptor de embriões de várias espécies de pequenos felídeos selvagens devido às similaridades fisiológicas entre eles (POPE, 2000; POPE et al., 2004).

Sabe-se que a maioria das 36 espécies de felídeos selvagens, é hoje, classificada como ameaçada, vulnerável ou em perigo de extinção devido à perda de seu *habitat* natural ou à caça ilegal, determinando o desaparecimento

local e o isolamento das populações (POPE, 2000; PAZ, 2004). Ademais, a formação de ilhas de mata impede a troca de informações genéticas podendo ocasionar a diminuição da variabilidade gênica das populações envolvidas (PAZ, 2004).

De acordo com a Lista Nacional de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (Instrução Normativa Ministério do Meio Ambiente n.03 de 27 de maio de 2003), os membros da família *Felidae* descritos são a onça-pintada (*Panthera onca*), a onça-parda (*Puma concolor capricornensis*) e pequenos felídeos, como a jaguatirica (*Leopardus pardalis mitis*), o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) e o gato-palheiro (*Oncifelis colocolo*).

Dessa forma, a utilização do gato doméstico no estudo de biotécnicas é importante, uma vez que a realização dessas tecnologias em felinos selvagens é de baixa exeqüibilidade, devido ao pequeno número de exemplares existentes em zoológicos e reservas (FARSTAD, 2000).

Embora o uso de animais em pesquisas biomédicas tenha diminuído 61% ao longo dos últimos 30 anos, o gato doméstico ainda tem sido utilizado amplamente como modelo experimental em pesquisas principalmente no estudo da fisiopatologia da visão; da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS); de doenças do sistema nervoso (LONG et al., 2003) e de anormalidades e defeitos metabólicos homólogos a doenças humanas (MIGAKI, 1982). Além disso, existem doenças genéticas que acometem gatos e que são análogas às dos humanos, como a doença autossômica dominante do rim policístico; a atrofia de retina; a hiperoxalúria tipo 2; a doença de armazenagem do glicogênio tipo IV e o hipotireoidismo.

Gatos também são ótimos modelos para o estudo de patologias hereditárias no homem relacionadas à armazenagem de lisossomos, como a mucopolissacaridose I, IV e VII, a gangliosidose e a esfingomielinose. Essas similaridades contribuem para seu valor no entendimento e no tratamento de doenças genéticas humanas. Esse tipo de investigação geralmente requer animais maiores que camundongos – modelo clássico de estudo - que exibam fenótipos mais próximos daqueles dos humanos. Ainda, filogeneticamente, gatos são mais próximos dos humanos; o mapa genético do gato apresenta um alto nível de semelhança com o dos humanos quando comparado aos roedores ou a outros animais de laboratório (MIGAKI, 1982).

Uma vez que o número de exemplares de felídeos silvestres disponíveis na natureza e em cativeiro é reduzido, e que o sucesso dos sistemas de produção embrionária *in vitro* é ainda limitado nessa espécie, fazem-se necessárias investigações sobre fatores intra e extra-laboratoriais que possam resultar no favorecimento ou no decréscimo dessa produção. Assim, o estudo da influência da sazonalidade e da condição ovariana sobre a produção embrionária *in vitro* na espécie felina é essencial, de forma a serem estabelecidos os períodos do ano ou fases do ciclo reprodutivo mais favoráveis à indução de estros, à realização de aspiração folicular, à recuperação de oócitos em maior número e de melhor qualidade, à maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos e à produção *in vitro* de embriões, limitando o estresse no manejo de animais silvestres a períodos do ano em que os sistemas de produção embrionária *in vitro* apresentem maior eficácia.

Revisão de Literatura

1. Fisiologia reprodutiva da gata

Sob condições naturais, os gatos domésticos são poliétricos estacionais - embora muitas vezes seja uma espécie não sazonal - e podem gerar duas ou ocasionalmente três ninhadas por ano, com um a cinco filhotes em cada ninhada (POPE, 2000).

Os gatos atingem a puberdade quando apresentam 80% do peso adulto, fenômeno que pode ocorrer tão precocemente quanto aos quatro meses de idade, bem como, tão tardiamente como aos 18 meses, com a média variando de seis a nove meses (CLINE et al., 1980). Raças orientais como o Siamês e o Birmanês podem apresentar o primeiro estro bem precocemente, entretanto, raças de pelo longo e as fêmeas da raça Manx podem apresentar fisiologicamente, um comportamento de estro mais tardio, com 11 a 21 meses de idade (JOHNSTON et al., 2001).

A atividade sexual se concentra nos meses em que se inicia o aumento na duração dos dias e diminui nos meses em que a luminosidade diária decresce. A secreção de melatonina é controlada pelo fotoperíodo, apresentando altas concentrações durante a fase escura, inibindo assim a secreção de gonadotrofinas (GRAHAM et al., 2004). Embora as gatas possam ser cobertas o ano todo na região equatorial, a estação de cobertura torna-se mais definida com o aumento da latitude a partir do equador (HERRON, 1977; HURNI, 1981; LEYVA et al., 1989; TSUTSUI et al., 1989a; TSUTSUI et al., 1989b).

Assim como outros mamíferos domésticos, como o coelho (*Oryctolagus cuniculus*, Linnaeus 1758), o furão (*Mustela putorius furo*, Linnaeus 1758) e o vison (*Mustela vison*, Linnaeus 1758), o gato doméstico apresenta, peculiarmente, ovulação induzida, ocorrendo 24 a 48 horas após o coito, embora possa ser desencadeada espontaneamente em algumas gatas, por estímulos visuais ou por ação de feromônios na ausência de coito (CLINE et al., 1980; FARSTAD, 2000).

O ciclo estral da gata é composto pelo proestro, estro, interestro, diestro e anestro.

O ciclo estral da gata dura em média 14 a 19 dias (podendo variar de 4 a 30 dias) em gatas expostas a 14 horas de luminosidade diária constante e que não tiveram a ovulação induzida (JOHNSTON et al., 2001).

O anestro prolongado é resultante da diminuição e conseqüente encurtamento do número de horas de luminosidade diária (CLINE et al., 1980).

O proestro é observado em um pequeno número de fêmeas e quando ocorre se manifesta dura em média de $1,2 \pm 0,8$ dias (SHILLE et al., 1979).

O estro é o estágio em que há receptividade para a monta e ocorre no pico da atividade folicular e de secreção de estradiol. A duração do estro é influenciada pela ocorrência da ovulação. Durante o estro ocorre a liberação de hormônio luteinizante (LH), cuja magnitude da onda está relacionada ao número de coberturas. Somente cerca de metade das gatas cobertas uma única vez é capaz de secretar quantidade necessária de LH para induzir a ovulação. (CONCANNON et al., 1980).

O interestro é o período que sucede um estro e precede o próximo em gatas que não ovularam e dura em média 8 a 10 dias (JOHNSTON et al., 2001).

O diestro é a fase marcada pela predominância de progesterona que segue o estro de gatas que ovularam (JOHNSTON et al., 2001).

O anestro é a ausência sazonal de atividade cíclica. As concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona encontram-se em níveis basais durante esta fase (JOHNSTON et al., 2001).

2. Efeito do período do ano sobre a maturação *in vitro*

Spindler e Wildt (1999) foram os primeiros pesquisadores a descrever o efeito da estação do ano sobre a maturação *in vitro*, sobre a taxa de fertilização e sobre a produção *in vitro* de embriões de gato doméstico. Esses autores verificaram que oócitos recuperados de ovários de gatas durante a estação de anestro na América do Norte - que compreende os meses de julho a novembro – apresentaram uma baixa taxa de extrusão do corpúsculo polar, inferior a 20%. O desenvolvimento embrionário até o estágio de quatro células foi inferior a 10% e nos meses de setembro e outubro nenhum embrião se desenvolveu até o estágio de blastocisto.

Outros estudos têm confirmado este efeito associado à quiescência ovariana e ao reduzido crescimento folicular, incluindo pesquisas em outras regiões geográficas e em estações do ano que diferem da estação reprodutiva na América do Norte (FREISTEDT et al., 2001a).

Freistedt et al. (2001b) estudaram o efeito da sazonalidade sobre produção embrionária de gatos domésticos, na Alemanha - levando em consideração as variações circanuais do hemisfério Norte – e associaram esse efeito às condições ovarianas, denominadas, em seu experimento como folicular (ovários contendo pelo menos um folículo aparente com mais de 2 mm de diâmetro em um dos ovários); luteal (ovários com pelo menos um corpo lúteo em um dos ovários); recentemente ovulado (ovários com um ou mais corpos hemorrágicos e um dos ovários); intermediário (ovários com folículos de 1 a 2 mm em pelo menos um ovário) ou inativo (par de ovários sem estruturas aparentes, na superfície e ao corte). Consideraram estação I os meses de

janeiro a março, estação II, os meses de abril a junho, estação III, os meses de julho a setembro e estação IV, os meses de outubro a dezembro. A proporção de ovários nas condições de ovulação recente, folicular e luteal foi superior nas estações II e III e a proporção de ovários inativos ou intermediários foi maior nas estações I e IV. Não observaram diferenças na taxa de obtenção oocitária por fêmea em nenhuma das estações. No entanto, as taxas de clivagem foram superiores nas estações II e III que nas estações I e IV. A proporção de blastocistos observada no dia 6 foi similar nas estações I, II e III, porém significativamente menor na estação IV. No dia 8, a maior proporção de blastocistos foi observada na estação III, seguida pelas estações II, I e IV. A taxa de clivagem foi superior em ovários da fase luteal (57,4%) e levemente inferior nos ovários de condição folicular (53,4%), porém a taxa de produção de blastocistos no dia 8 foi semelhante em todas as condições ovarianas.

Hurni (1981), estudando a reprodução em gato doméstico e sua relação com a duração do dia, afirmou que em latitudes tropicais não existe efeito sazonal sobre a distribuição de ninhadas durante o ano.

No Brasil, pouco se sabe sobre o comportamento reprodutivo estacional das gatas. No entanto, Tebet et al. (1997), estudando a sazonalidade reprodutiva em gatas domésticas na região de Botucatu, localizada na latitude de 22°53'09" S, no estado de São Paulo, Brasil, constataram notória variação de forma gradual na incidência de estro durante os meses do ano, limitando a estação reprodutiva na região, entre os meses de julho, agosto e setembro e definindo os meses de dezembro a maio, como período de diminuição na frequência de estros.

Pesquisas recentes estabeleceram que os felídeos selvagens machos da América Latina apresentam variações sazonais pequenas na maioria das características reprodutivas (SWANSON e BROWN, 2004).

Outros estudos no Brasil conduzidos por Morato et al. (2004) investigaram o efeito da sazonalidade sobre as características seminais e endócrinas em onça-pintada. Esses autores observaram níveis de andrógenos superiores na estação úmida quando comparados à estação seca.

Morais et al. (2002) concluíram que, dentre as pequenas diferenças sazonais observadas, picos de produção espermática foram obtidos durante os

meses de verão, embora uma qualidade espermática alta tenha sido observada durante todos os meses do ano.

Moreira et al. (2001) avaliaram a atividade ovariana e a sazonalidade em felídeos silvestres no sul do Brasil. Os resultados não sugerem haver evidência de sazonalidade gonadal nas fêmeas de gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), tanto na atividade folicular como na luteal. Nas jaguatiricas (*Leopardus pardalis mitis*), alterações cíclicas na excreção de estrógeno foram observadas durante cada mês do ano; entretanto, apenas uma fêmea ciclou continuamente. Nas outras duas jaguatiricas, períodos de anestro com vários meses de duração foram observados. Não foi possível concluir que as fêmeas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) não apresentaram sazonalidade, porque a ciclicidade estral foi observada em apenas uma das duas fêmeas. Na fêmea que ciclou, um período de anestro foi observado da metade de outubro até o final de dezembro. Esses dados demonstram similaridades entre as três espécies de felídeos do gênero *Leopardus*, incluindo evidências de que são poliétricas, porém apresentam períodos inexplicáveis de inatividade ovariana. Apenas as gatas-maracajá diferiram, exibindo ovulações espontâneas ocasionais, não induzidas por cópula. Esse autor sugere que os mecanismos ovulatórios variam dentro da família *Felidae*, talvez regulados em maior ou menor grau pela espécie e mesmo respostas individuais específicas a estímulos ainda não identificados.

Compreender as causas desses períodos de inatividade ovariana é importante para determinar porque essas espécies reproduzem tão pouco em cativeiro, apesar dos intensivos esforços reprodutivos pelos zoológicos brasileiros e por outras instituições espalhadas pelo mundo (MOREIRA, 2001).

As variações do período têm sido descritas em vários felídeos selvagens (SEAL et al., 1987; JOHNSTON et al., 1994; BROWN et al., 1997), mas na maioria das vezes com o intuito de examinar apenas a ciclicidade ovariana versus quiescência reprodutiva. Poucos trabalhos, entretanto, consideram a influência do período sobre as variações na qualidade dos gametas e produção embrionária (SPINDLER e WILDT, 1999).

3. Efeito do ciclo reprodutivo sobre os oócitos

Além do efeito do período e das condições de cultivo oocitário, outros fatores também influenciam a competência meiótica e o desenvolvimento *in vitro* de embriões dessa espécie. Dentre eles, a fase do ciclo reprodutivo e a idade da fêmea doadora de oócitos sobre a qualidade e o número médio de oócitos obtido e sobre a competência de desenvolvimento embrionário *in vitro* devem ser levados em consideração.

A fase do ciclo reprodutivo no qual a gata se encontra é pode ser determinado por observação das estruturas presentes na superfície e ao corte em ambos os ovários. A condição inativa é aquela em que há ausência de estruturas foliculares com diâmetro inferior a 2 mm em sua superfície e ao corte em ambos os ovários; a condição luteal é caracterizada pela presença de um ou mais corpos lúteos em pelo menos um ovário, enquanto que a condição folicular pode ser demonstrada pela existência de pelo menos um folículo maduro visível com mais de 2 mm de diâmetro em pelo menos um ovário (SPINDLER e WILDT, 1999).

Em estudo recente, do total de 16.558 oócitos obtidos de 198 pares de ovário o número médio de oócitos e o número médio de oócitos grau I foi significativamente maior em ovários em condição inativa (111,1 e 19 oócitos, respectivamente) do que em ovários em condição folicular (67,1 e 11,4 oócitos respectivamente) (NAOI et al., 2007). Observou-se ainda diferença significativa na proporção de oócitos grau I entre os estágios folicular e luteal (14,9% x 20,2%).

Esses dados foram também observados no experimento conduzido por Freistedt et al. (2001a), que relataram que o número médio de COC grau I foi afetado pelo ciclo reprodutivo da fêmea doadora, no qual obteve um número maior de oócitos coletados de ovários na condição ovariana inativa. Entretanto, Spindler e Wildt (1999) sugeriram que as taxas de COC grau I coletadas ao longo do ano não são influenciadas pela fase do ciclo estral no qual a fêmea se encontra.

Sabe-se que a proporção de embriões clivados e que se desenvolvem até a fase de blastocisto diminui significativamente com o decréscimo da qualidade dos oócitos recuperados, independente do estágio reprodutivo da doadora (JOHNSTON et al., 1989).

4. Estado-da-arte na produção *in vitro* de embriões felinos

Há muitas variações com relação aos resultados obtidos entre os laboratórios que desenvolvem pesquisas envolvendo produção embrionária *in vitro* de gato doméstico.

Para transporte, os ovários são geralmente acondicionados em soluções salinas a 4°C como o DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*) com pH médio de 7,4; acrescidas de antibióticos como a associação penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) (SPINDLER e WILDT, 1999; FREISTEDT et al., 2001). Essa forma de transporte permite que os ovários sejam geralmente processados entre 1 a 6 horas (SPINDLER e WILDT, 1999), podendo se estender até 8 horas (FREISTEDT et al., 2001b) após a gonadectomia.

Algumas vezes essas soluções de transporte podem conter ainda antimicóticos como a anfotericina B (JOHNSTON, 1989).

Outra opção para transporte é a utilização de solução fisiológica 0,9% a 35°C, feito geralmente em garrafas térmicas, nas quais os ovários podem ser armazenados entre 1 e 6 horas antes da remoção dos oócitos (KARJA et al., 2006a, 2006b).

Naoi et al. (2007) investigaram os efeitos da temperatura de armazenamento por 24 horas sobre a taxa de maturação dos oócitos provenientes desses ovários. Os autores armazenaram os ovários a 4°C (frio), a 23-25°C (temperatura ambiente) ou a 38°C (em estufa). O maior percentual de oócitos que atingiram a fase de metáfase II foi do grupo de ovários mantido a 4°C (53,4%), enquanto que os oócitos que permaneceram em temperatura ambiente e em estufa atingiram, respectivamente, os percentuais de 20% e 2,4%. Essa informação apresenta enorme impacto sobre os programas de conservação. Laboratórios com equipamentos e pessoal especializado em produção embrionária *in vitro* de felinos são poucos e estão geograficamente dispersos. O transporte de ovários em baixas temperaturas associado ao transporte à distância, permitiria a produção de embriões de animais geneticamente valiosos, sendo dessa forma um grande avanço no uso da biotecnologia para reprodução *pós-mortem*.

Com relação à obtenção e liberação intra-folicular oocitária, durante a última década, muito progresso foi feito no campo da reprodução assistida nos felinos domésticos. A praticidade da recuperação de oócitos, da maturação *in vitro*, da fertilização *in vitro*, do cultivo de embriões *in vitro* e da transferência para receptoras têm sido demonstradas nessa espécie (POPE, 2000). Entretanto, múltiplos fatores, incluindo o armazenamento de gônadas (WOLFE e WILDT, 1996; WOOD et al., 1997; JEWGENOW et al., 1997; POPE et al., 1999a), a qualidade de complexos *cumulus oophorus* (COC) recuperados e os protocolos usados para maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e CIV afetam a eficiência da produção *in vitro* (PIV) de embriões felinos (POPE et al., 1997; JOHNSTON et al., 1989; POPE et al., 1999b).

Os oócitos representam uma rica fonte de material genético a ser utilizada na instituição de bancos genéticos, auxiliando na preservação de espécies ameaçadas de extinção, principalmente em relação à possibilidade de coleta de material de animais convalescentes e *post-mortem* (SILVA et al., 2004).

O foco das pesquisas atuais tem sido a melhoria no número e na qualidade de oócitos recuperados e na otimização do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Os oócitos felinos podem ser recuperados por laparotomia (POPE et al., 1993) ou de laparoscopia (GOODROWE et al., 1988) em animais submetidos a protocolos de superovulação (KANDA et al., 1995) ou na ausência dos mesmos.

A laparoscopia é efetiva, pois permite a visualização do estado reprodutivo, particularmente da anatomia e da função ovariana, além de ser um procedimento minimamente invasivo comumente utilizado para deposição de sêmen congelado em gato doméstico e felídeos silvestres (FARSTAD et al., 2000).

Para gatos domésticos, Goodrowe et al. (1988) relataram a coleta laparoscópica de oócitos que foram fertilizados *in vitro* com sêmen a fresco. Quando os embriões em desenvolvimento atingiram o estágio de quatro células foram transferidos para o oviduto das fêmeas receptoras e cinco de seis fêmeas ficaram prenhes.

Para a remoção dos oócitos do ovário, alguns autores preferem a realização do *slicing* ou fatiamento feito diretamente sobre placas contendo meios de cultivo tamponados que funcionam também como meios de lavagem a ser realizada previamente à maturação *in vitro*. Esses meios geralmente são meios simples, como o H-MEM (*Hepes Minimum Essential Medium*) e TCM (*Tissue Culture Medium*) 199 (TSUJIOKA et al., 2008) e contém em sua grande maioria o tampão Hepes. Podem ainda ser suplementados com piruvato, glutamina, BSA, penicilina e estreptomicina.

Nagano et al. (2008) mantiveram os ovários em solução salina a temperatura ambiente por até 4 horas após a coleta e transferiram para o TCM-199 contendo álcool polivinílico, HEPES, bicarbonato de sódio e gentamicina. Esses mesmos autores obtiveram os oócitos por dissecação dos folículos antrais com agulha 25G sob lupa estereomicroscópica.

Kitiyant et al. (2003) transportaram os ovários em solução salina 0,9% a 37°C. Recuperaram os COC aspirando os folículos com uma agulha 20G contendo TALP-HEPES.

Entretanto, não há diferenças quanto à taxa de maturação e à produção de blastocistos quando o *slicing* é realizado em PBS (*Phosphate buffered saline*) a 37°C (KARJA et al., 2006a; NAOI et al., 2007).

A técnica para obtenção de COC deve ser também levada em consideração. Dentre as metodologias descritas que permitem a recuperação dessas estruturas na espécie felina, a aspiração folicular (JOHNSTON et al., 1989; BOGLIOLO et al., 2001; KITIYANANT et al., 2003) e o *slicing* (FREISTED et al., 2001; GÓMEZ et al., 2003) são as mais utilizadas. A primeira, embora apresente maior praticidade, permite a recuperação de um número de COC inferior se comparada à segunda. Dados relativos a esta afirmação podem ser verificados em publicações como a de Johnston et al. (1989), que relata a obtenção de 20 COC grau I/fêmea utilizando-se a técnica de aspiração folicular enquanto que o número de oócitos grau I obtido pela técnica de *slicing* em média é superior a 30 COC/fêmea (MARTINS et al., 2006c).

A recuperação de oócitos incluídos em folículos antrais com a utilização de ultra-som é uma técnica que tem sido extensivamente utilizada em bovinos,

sendo que os resultados indicam a possibilidade de coletas repetidas tanto em fêmeas gestantes quanto nas não gestantes. A adaptação dessa técnica em felídeos seria uma importante alternativa, por se tratar de um procedimento menos invasivo e por permitir a coleta de oócitos sem os riscos que envolvem procedimentos cirúrgicos como a laparoscopia e a laparotomia.

A aspiração folicular após laparotomia também é utilizada em ovários de gato doméstico (LUVONI e PELLIZZARI, 2000; LOPES, 2002), entretanto as taxas de recuperação oocitária são inferiores quando comparadas às do *slicing*. Em felídeos selvagens, utiliza-se a aspiração folicular por laparoscopia para recuperação oocitária (WILDT e ROTH, 1997; HOWARD, 1999).

Outro fator importante a ser avaliado é a qualidade oocitária, que afeta enormemente a taxa de maturação *in vitro* em gato doméstico (JOHNSTON et al., 1989; POPE et al., 1997; WOOD e WILDT, 1997) e geralmente somente COC classificados como grau I são utilizados, embora existam pesquisadores que utilizem COC grau II (FREISTED et al., 2001a; KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2003).

Os COC felinos têm aparência escura em decorrência de alta concentração intracelular de lipídios. Ademais, a zona pelúcida é composta de uma bicamada lipídica e a camada interna parece ter a função de barreira parcial para a penetração espermática afetando o número e o tipo de espermatozóide que penetra o oócito (ANDREWS et al., 1992). Os COC felinos são classificados em graus I, II e III, embora alguns autores adotem uma classificação envolvendo oócitos grau IV, sendo esses considerados degenerados.

Assim como nas demais espécies domésticas e silvestres, COC felinos são classificados com base na coloração do citoplasma, da aderência das células do *cumulus* e no número de camadas de células a granulosa que o circundam (JOHNSTON et al., 1989).

COC grau I são aqueles que apresentam ooplasma uniforme e fortemente pigmentado e duas ou mais camadas de células do *cumulus* firmemente aderidas. Já COC grau II apresentam ooplasma uniforme e fortemente pigmentado e menos que duas camadas de células do *cumulus* firmemente aderidas. COC grau III ooplasma granulado e não-uniforme e menos pigmentado e células da corona radiata esparsas e os grau IV, são

aqueles que apresentam ooplasma com regiões pálidas e contorno irregular ou estão degenerados. Alguns autores (WOOD e WILDT, 1997; KITIYANANT et al., 2003) consideram grau I apenas aqueles oócitos com citoplasma escuro e homogêneo circundados completamente por cinco ou mais camadas de células do *cumulus* e aqueles com menos de cinco camadas são considerados como grau II. Para esses mesmos autores, oócitos grau III são aqueles que não estão completamente circundados por células do *cumulus* e não apresentam citoplasma homogêneo e grau IV são aqueles oócitos desnudos e sem citoplasma homogêneo. Ademais, o sucesso na produção embrionária de gato doméstico é proporcional à qualidade do COC. COC grau III e IV apresentam baixa taxa de maturação e não se desenvolvem após a fertilização.

Com relação à taxa de obtenção média de COC por fêmea, Naoi et al. (2007) obtiveram 83,62 oócitos por fêmea considerando todos os graus. Nagano et al. (2008) obtiveram 745 oócitos a partir de 42 pares de ovários, totalizando 17,73 COC/fêmea utilizando apenas folículos antrais.

Lopes (2002) recuperou 42,3 COC graus I, II e III por fêmea utilizando a técnica de punção com seringa e agulha. Cerca de 30,99% desses oócitos foram classificados como grau I. Outro aspecto interessante a ser relatado foi o número de oócitos recuperado em fêmeas púberes e pré-púberes (27,6 x 69,1/fêmea). Embora fêmeas pré-púberes forneçam um número maior de COC, eles apresentam baixa competência em atingir o estágio de metáfase II.

Devido ao fato de gatas apresentarem ovulação induzida, a habilidade de maturar oócitos *in vitro* consiste em uma interessante abordagem para o estudo dos mecanismos de controle da manutenção e do desenvolvimento intrafolicular desse gameta que ocorrem em momentos diferentes do período periestro (JOHNSTON et al., 1989). Nesse contexto, a avaliação ultra-estrutural oocitária e embrionária pode revelar aspectos importantes deste mecanismo.

Goodrowe et al. (2000) demonstraram que oócitos intrafoliculares não ovulados *in vivo* são capazes de se desenvolver a termo e produzirem filhotes vivos.

Wood et al. (1997) relataram que o gato doméstico apresenta uma alta incidência natural de atresia folicular (aproximadamente 65%) responsável pela redução do número de oócitos de qualidade disponíveis para maturação *in vitro*. Estes mesmos autores questionaram ainda se a maioria dos oócitos é

capaz de completar o processo de maturação citoplasmática, um pré-requisito crucial em outros mamíferos para a ativação oocitária, fertilização e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (EPPIG, 1996).

As taxas de maturação oocitária *in vitro* são relativamente elevadas em gatos, variando de 40 a 60%, na dependência da qualidade oocitária e da suplementação do meio.

Spindler e Wildt (1999), avaliando o efeito das estações do ano sobre as taxas de maturação *in vitro* observaram que estas taxas foram superiores durante dezembro a abril $61,8\% \pm 4,7\%$ a $77,2 \pm 0,1\%$. Em maio a julho as taxas foram de $22,2 \pm 9,2\%$ a $38,6 \pm 8,5\%$ e em novembro foi de $37,1 \pm 0,7\%$.

De acordo com os resultados de Nagano et al. (2008) a maioria dos oócitos se encontra na fase de vesícula germinativa imediatamente após a remoção do folículo. Observaram ainda que 8,3% do total de oócitos já se encontravam no estágio de metáfase II antes da maturação *in vitro*.

Um aspecto importante a ser avaliado é a composição do meio de cultivo. As pesquisas desenvolvidas com gato doméstico descrevem tanto o uso de meios simples como complexos e uma grande variedade de suplementações.

Os meios mais comumente utilizados para a maturação *in vitro* têm sido o TCM 199 - *Tissue Culture Medium* (KARJA et al., 2006a, SKRZYSZOWSKA et al., 2002), o MEM - *Minimum Essential Medium* (HERRICK e SWANSON, 2003), o SOF – *Synthetic Oviductal Fluid* (BOGLIOLO et al., 2001, MERLO et al., 2008) e menos comumente o DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (KITIYANANT et al., 2003).

Bogliolo et al. (2001) concluíram que a maturação *in vitro* em SOF apresentou resultados superiores quando comparado em TCM-199 após 24 e 40 horas de maturação (80% e 82,8% x 66,7 e 64,4%, respectivamente).

A suplementação de hormônios e a fonte de proteínas e macromoléculas parecem ser críticas para a obtenção de boas taxas de maturação *in vitro*. As fontes protéicas e os soros geralmente utilizados são a albumina sérica bovina, e o soro fetal bovino (SFB). As concentrações de BSA variam de 3 mg/mL (FREISTEDT et al., 2001a) a 4 mg/mL (SPINDLER e WILDT, 1999, KARJA et al., 2006a). Já o SFB é utilizado geralmente na concentração de 10% (KITIYANANT et al., 2003).

Gonadotropinas têm um efeito positivo, mas soro bovino e soro de gata em estro têm um efeito negativo quando comparado à albumina sérica bovina. Ademais, antioxidantes como a cisteína aumentam significativamente as taxas de maturação que atingem 70% (LUVONI e CHIGIONI, 2006). No que diz respeito aos agentes antioxidantes deve-se ter em mente que um importante componente da maturação citoplasmática oocitária parece ser a transcrição de certas enzimas que podem proteger o oócito contra produtos intermediários do metabolismo do oxigênio. Entretanto, oócitos cultivados *in vitro* são expostos à alta concentração de oxigênio o que leva a um maior risco de inativação enzimática, à peroxidação lipídica e a alterações no DNA celular causadas por espécies oxigênio reativas (LUVONI e CHIGIONI, 2006).

In vivo, a glutatona (GSH) e a glutatona peroxidase têm um importante papel no sistema de defesa celular prevenindo danos oxidativos, o que seria desejável no cultivo *in vitro*.

Embora os aminoácidos constituintes envolvidos na síntese de GSH sejam a glicina, o glutamato e a cisteína, a síntese de GSH é dependente da disponibilidade de cisteína no meio. Isso foi também demonstrado durante a maturação *in vitro* em felinos. Quando a cisteína foi adicionada ao meio de maturação *in vitro*, observou-se um aumento na produção embrionária (LUVONI e CHIGIONI, 2006).

Entretanto a cisteína é bastante instável, sendo rapidamente oxidada em cistina. Em oócitos suínos e bovinos, e agora mais recentemente em felinos, a presença de outros componentes do grupo dos tióis como o β -mercaptoetanol (25 μ M) e de cisteamina (100 μ M) foram capazes de reduzir a cistina em cisteína e em promover a recaptação de cisteína e aumentar a síntese de GSH oocitária (LUVONI e CHIGIONI, 2006).

Há relato de que a adição de cisteína (0,1 mM) sozinha ou em associação ao β -mercaptoetanol (25 μ M) no meio de maturação *in vitro* impede a depleção de GSH oocitária e melhora o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (LUVONI e CHIGIONI, 2006).

Com relação ao emprego de gonadotropinas devem ser levados em consideração que, fisiologicamente, as variações circanuais nos padrões dos hormônios reprodutivos ou nas concentrações de receptores são fatores que

podem ser responsabilizados por afetarem a qualidade e o desenvolvimento oocitário. O hormônio folículo estimulante (FSH) é considerado essencial, não somente para os folículos em desenvolvimento, mas também para a viabilidade folicular geral e controle da atresia (ERICKSON e DANFORTH, 1995).

As gonadotropinas têm um papel importante e acredita-se que ajam não só sobre as células de suporte oocitárias, mas também diretamente sobre os oócitos. Atualmente já se sabe que os receptores de FSH não são expressos somente nas células da granulosa e nas células de Sertoli. Em oócitos humanos e suínos foi observada a presença de receptores de FSH na superfície oocitária. Os receptores de FSH puderam ser observados na superfície de folículos primários durante o desenvolvimento folicular e persistiram até o estágio pré-ovulatório, indicando que o FSH pode ter um papel fisiológico também no desenvolvimento de folículos pré-antrais (PATSOULA et al., 2003).

O FSH é conhecido como uma fonte de suplementação importante para o sucesso da maturação *in vitro* quando os oócitos são coletados durante a estação reprodutiva (JOHNSTON et al., 1989; WOOD et al., 1995). Por esse motivo Spindler e Wildt (1999) especularam se as baixas concentrações de FSH circulante ou se a falta de receptores para FSH poderia contribuir para a baixa eficiência de maturação *in vitro* durante a estação de anestro. Permanece incerto se a taxa de maturação nuclear baixa observada durante o período de quiescência estacional é devida a uma competência meiótica reduzida ou uma falha do FSH em atingir concentrações adequadas para induzir a maturação nuclear ou ambos os fatores.

Méduri et al. (2002) observaram a ausência ou uma marcante diminuição dos receptores de FSH nas células da granulosa, nos oócitos ou em ambos, quando estudaram a ação deste hormônio em humanos e em suínos. Sugeriram que a ausência deste pode tanto ser um fator secundário à atresia, quanto pode ser o principal desencadeador.

Patsoula et al. (2001) afirmaram que a presença de RNAm para receptores de FSH nos oócitos, zigotos e embriões indica um papel das gonadotropinas na modulação do reinício da meiose e na progressão do processo de maturação oocitária, bem como um efeito benéfico no desenvolvimento embrionário inicial em camundongos.

A presença de receptores de FSH em oócitos oferece novas perspectivas não somente para uma melhoria no desenvolvimento embrionário *in vitro*, mas também para o tratamento de oócitos imaturos com FSH durante a maturação *in vitro*. Isso é de particular importância nos procedimentos de ICSI, no qual a estrutura morfológica dos oócitos desnudos pode ser acessada de forma mais detalhada e precisa (LOUTRADIS et al., 1999).

O piruvato representa a principal fonte de energia no processo de maturação oocitária e é utilizado em concentrações que variam de 0,1 a 1 mM (SPINDLER e WILDT, 1999).

No processo de maturação oocitária em felinos domésticos o emprego de glutamina pode variar de 1,0 mM (SPINDLER e WILDT, 1999) a 2,0 mM (SKRZYSZOWSKA et al., 2002).

Com relação ao uso de antibióticos e de antimicóticos, o mais comumente descrito na literatura é a associação de penicilina (100 UI/mL) com estreptomicina (100 mg/mL) ou a, geralmente na concentração de 100 µg/mL (KARJA et al., 2006a) e algumas vezes pode haver o acréscimo de soluções antimicóticas como a anfotericina B.

Não há relato da utilização de progesterona em meios de maturação *in vitro* de felinos domésticos, assim o único hormônio esteróide utilizado é o estrógeno na concentração usual de 1 µg/mL de meio (KARJA et al., 2006a) sendo também encontrado relato de 2,5 µg/mL (HERRICK e SWANSON, 2003).

A respeito do tempo de maturação *in vitro*, pode-se afirmar que a taxa de maturação *in vitro* nos gatos domésticos é relativamente alta (40 a 70%) sendo que esta se completa após 24 horas de cultivo. Outra parte dos oócitos matura entre 24 e 48 horas, embora a maior porcentagem de oócitos maturados seja obtida entre 42 e 45 horas de cultivo (GÓMEZ et al., 2006).

Nagano et al. (2008) verificaram que após 30 horas de maturação *in vitro* a porcentagem de oócitos em metáfase II atingiu um pico (75,5%) e não se alterou com 30 a 48 horas de cultivo.

Com a finalidade de servir como doador de citoplasto em transferências nucleares, quanto maior o tempo de maturação *in vitro*, mais afetado é o desenvolvimento embrionário (KITIYANANT et al., 2003). Estes autores

observaram que um período de maturação *in vitro* prolongado de 43 horas resultou em baixa taxa de fusão (58%), baixo desenvolvimento embrionário até o estágio de mórula (28%) e nenhum blastocisto foi obtido. Entretanto, quando oócitos foram maturados *in vitro* por 24 a 35 horas, obtiveram-se taxas de fusão de 71 e 72%, respectivamente, a porcentagem de embriões clonados que atingiram o estágio de mórula foi de 54 e 36%, respectivamente e a formação de blastocistos foi de 8 e 9%, respectivamente.

Para avaliar a taxa de maturação *in vitro* é necessária a remoção das células do *cumulus oophorus* para a visualização da placa metafásica do oócito.

Embora alguns autores realizem o desnudamento dos COC com pipeta de vidro em meio contendo hialuronidase (solução a 0,2%) (SPINDLER e WILDT, 1999), em felinos a remoção celular é facilmente realizada sem auxílio enzimático.

Assim como nas demais espécies a configuração nuclear pode ser evidenciada com a utilização do fluorocromo Hoechst® 3342 somente, fixando-se os oócitos em solução de formaldeído a 2% e solução 0,04% de Triton X-100 e corando com Hoechst® 33342 e submetendo à avaliação em microscópio de fluorescência com excitação de 330 a 380 nm. Pode-se ainda utilizar a coloração de orceína acética que permite a visualização em microscópio de luz (JOHNSTON et al., 1989)

Consideram-se maturados aqueles oócitos que apresentam configuração nuclear nas fases de telófase I ou metáfase II.

Além da qualidade oocitária, variáveis espermáticas também podem afetar o processo de fertilização *in vitro* e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário. Gatos domésticos têm sido classificados em dois grupos, baseados na porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais presente no ejaculado - normospermicos apresentam acima de 60% de espermatozóides morfolologicamente normais e teratospermicos, menos de 40% de espermatozóides normais. Foi relatada diferença de qualidade de interação entre espermatozóide e oócito entre esses dois grupos retratando diferentes qualidades de interação oocitária.

Diferentemente do cão, espermatozóides provenientes da cauda do epidídimo de gatos domésticos penetram facilmente os oócitos maturados *in*

vitro, tanto a fresco (40,7% de clivagem – GOODROWE e HAY, 1993) ou após descongelação (25,3% de clivagem – LENGWINAT e BLOTTNER, 1994).

O sêmen para a fertilização *in vitro* pode ser obtido por coleta com vagina artificial, por eletroejaculação ou por colheita da cauda do epidídimo de gatos castrados (KARJA et al., 2006a). Há ainda autores que após a descongelação diluem o sêmen em meio de fertilização *in vitro* e o adicionam aos oócitos sem seleção prévia (KARJA et al., 2006a).

Existem ainda duas formas de seleção espermática para realização da fertilização *in vitro*, o uso do *Percoll* e a técnica de *swim-up*, sendo esta última a mais utilizada em gato doméstico. A taxa de fertilização utilizando sêmen após o *swim-up* foi de 94,6% para animais normospérmicos e 53,2% para animais teratospérmicos (HOWARD et al., 1993).

Os meios mais comumente utilizados para realização do *swim-up* são TALP, Ham's F-10, Brackett & Oliphant (BO) (KARJA et al., 2006a) ou BO modificado. Estes meios geralmente são acrescidos de BSA, agentes capacitantes como a cafeína (MARTINS et al., 2006a) e a teofilina (NAGANO et al., 2008).

Há dois tipos de meio de cultivo para fertilização *in vitro*; os simples e os complexos. Os meios simples são meios que são compostos por solução salina balanceada acrescida de proteína e substratos energéticos, e os compostos são meios que contêm os mesmos componentes dos meios simples, porém são suplementados com vitaminas, aminoácidos e traços de minerais.

Para a fertilização *in vitro* em gato doméstico relata-se o uso dos meios Ham's F-10, TALP - Albumina Lactato Piruvato de Tyrode (TSUJIOKA et al., 2007); mKRBm - Krebs Ringer bicarbonato modificado -, SOF – Fluido Sintético de Oviduto - (MERLO et al., 2008), SOFm (modificado), MK-1 (Solução salina balanceada de Earle modificada) (KANDA et al., 1998).

Com relação ao cultivo *in vitro*, a redução na taxa de clivagem e no desenvolvimento *in vitro* de oócitos felinos maturados *in vitro*, quando comparada aos oócitos maturados *in vivo*, evidencia as divergências temporais que ocorrem entre a maturação nuclear e a citoplasmática (GÓMEZ et al., 2000).

Diferenças morfológicas entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* incluem uma falha ou uma redução na capacidade de compactação no estágio de mórula (ROTH et al., 1997).

Um sistema fechado de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ é preconizado para a realização do cultivo embrionário, pois o desenvolvimento embrionário é beneficiado quando comparado ao cultivo em 5% de CO₂ em ar (GÓMEZ et al., 2003).

O desenvolvimento embrionário é caracterizado por uma progressão de eventos ordenados, incluindo divisão, diferenciação e morte celular.

A maioria das ocorrências de morte celular no embrião são por apoptose, que é um processo comumente observado em tecidos nos quais ocorrem altas taxas de mitose e em células com relativamente pouco citoplasma (ZAKERI et al., 2002)

Em bovinos, a porcentagem de núcleos com fragmentação de DNA diminui na fase de mórula, mas aumenta novamente durante a fase de blastocisto (BYRNE et al., 1999).

O número de células embrionárias e a viabilidade são indicadores da qualidade embrionária, pois quanto maior o número de blastômeros e menor a quantidade de células não viáveis, melhor a qualidade do embrião.

Em um embrião em desenvolvimento, células em apoptose são geralmente circundadas por inúmeras células em divisão e diferenciação, tornando difícil sua identificação. Há um grande número de métodos disponíveis para avaliação da viabilidade embrionária, inclusive técnicas específicas de coloração (ZAKERI et al., 2002).

A coloração com acridina *orange*, quando bem empregada, mostra-se bastante efetiva. Esse método de coloração é indicado para embriões pequenos ou em estágios iniciais de desenvolvimento (ZAKERI et al., 2002).

A acridina *orange* interage com o DNA celular e o faz refletir a coloração verde, mas também interage com o RNA, porém este reflete a cor alaranjada. Sendo assim, uma célula corada com acridina *orange* terá o citoplasma vermelho-alaranjado e o núcleo verde, sendo ela viável ou não. A interpretação da morfologia da cromatina é importante para a determinação das células em apoptose ou não (COLIGAN et al., 1992). A associação da acridina *orange* com

iodeto de propídeo, capaz de penetrar células mortas, faz com que células vivas possam ser diferenciadas das mortas.

Vários estudos têm sido direcionados à fertilização *in vitro* e ao desenvolvimento embrionário inicial *in vivo* (DRESSER et al., 1987; ROTH et al., 1997) e *in vitro* (GOODROWE et al., 1988; POPE et al., 1993; DONOGHUE et al., 1993b; ROTH et al., 1997; WOLFE e WILDT, 1996; WOOD e WILDT, 1997). Estas investigações têm utilizado métodos de avaliação da qualidade dos COC e dos embriões e métodos de determinação das taxas de maturação *in vitro* que incluem a observação em lupas estereomicroscópicas e em microscópios de fluorescência, respectivamente.

A maturação oocitária coincide com o final do desenvolvimento folicular e inclui dois eventos celulares: a finalização do processo de meiose, desde o estágio de vesícula germinativa até a formação da segunda placa metafásica (metáfase II) e a maturação citoplasmática, onde alterações moleculares e estruturais conferem ao ovócito maduro a capacidade de suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (BEVERS et al., 1997). Algumas dessas alterações incluem a redistribuição de organelas celulares, como grânulos corticais, mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, e a habilidade do ovócito realizar exocitose dos grânulos corticais (DUCIBELLA et al., 1990). O oócito adquire também a capacidade de descondensar a cromatina do espermatozóide após a fertilização (USUI e YANAGIMACHI, 1976).

Durante o crescimento e desenvolvimento oocitário, a íntima associação entre o oócito e as células do *cumulus*/granulosa é um requisito para o crescimento folicular normal e a aquisição da competência de desenvolvimento do oócito (EPPIG et al., 1996; CARABATSOS et al., 2000, MATZUK et al., 2002). As células da granulosa provêm precursores metabólicos como açúcares, aminoácidos e nucleotídeos essenciais para a aquisição dessa competência oocitária (BROWER e SCHULTZ, 1982; WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Ademais, uma comunicação unidirecional das células do *cumulus* para o oócito mediada pelas *gap junctions* tem sido reconhecida como fundamental para o início da maturação oocitária em resposta a tratamentos com gonadotropinas, tanto em animais domésticos quanto de laboratório

(FAGBOHUN e DOWNS, 1991; CARABATSOS et al., 2000; VOZZI et al., 2001).

Desde a década de 90 sabe-se que a comunicação entre o oócito e as células que o circundam não é simplesmente unidirecional, mas bidirecional (BUCCIONE et al., 1990; VANDERHYDEN e ARMSTRONG, 1990; VANDERHYDEN et al., 1990; VANDERHYDEN et al., 1992; SIMON et al., 1997; EPPIG et al., 2002; MATZUK et al., 2002).

Por exemplo, fatores secretados pelo oócito facilitam a expansão do *cumulus* (VANDERHYDEN e ARMSTRONG, 1990; VANDERHYDEN et al., 1990), a proliferação das células da granulosa (VANDERHYDEN et al., 1992), a supressão de receptores de LH nas células do *cumulus* (EPPIG et al., 1997) e influenciam a ovulação (MATZUK et al., 2002). Dessa forma, durante todo o crescimento e maturação oocitários, a associação das células do *cumulus* é essencial não só para o normal funcionamento oocitário, mas também para a função do folículo dentro do qual o COC reside.

A localização de organelas continua a mudar dentro do citoplasma com o progresso da maturação meiótica. As mitocôndrias alteram sua localização da periferia do oócito para regiões mais centrais com o progresso da meiose (VAN BLERKOM e RUNNER, 1984; KRISHER e BAVISTER, 1998; STOJKOVIC et al., 2001). No momento da quebra da vesícula germinativa, gotas de lipídios dentro do citoplasma aumentam em número e em tamanho, enquanto o complexo de Golgi diminui (HYTTEL et al., 1997). Assim que o oócito progride na meiose até a metáfase I e então progride à metáfase II, as gotas de lipídios continuam a aumentar, o complexo de Golgi continua a regredir e as mitocôndrias se tornam mais associadas às gotas de lipídio dentro do citoplasma (HYTTEL et al., 1997; STOJKOVIC et al., 2001). Ademais, os microtúbulos se reorganizam e os grânulos corticais são redistribuídos e se tornam mais espaçados e localizados sob o oolema (HYTTEL et al., 1997; STOJKOVIC et al., 2001).

A utilização da microscopia eletrônica de transmissão permite avaliar, além das alterações nucleares, as alterações que envolvem a maturação citoplasmática, cujos mecanismos ainda são pouco compreendidos.

Essas informações indicam a necessidade de pesquisas no campo da

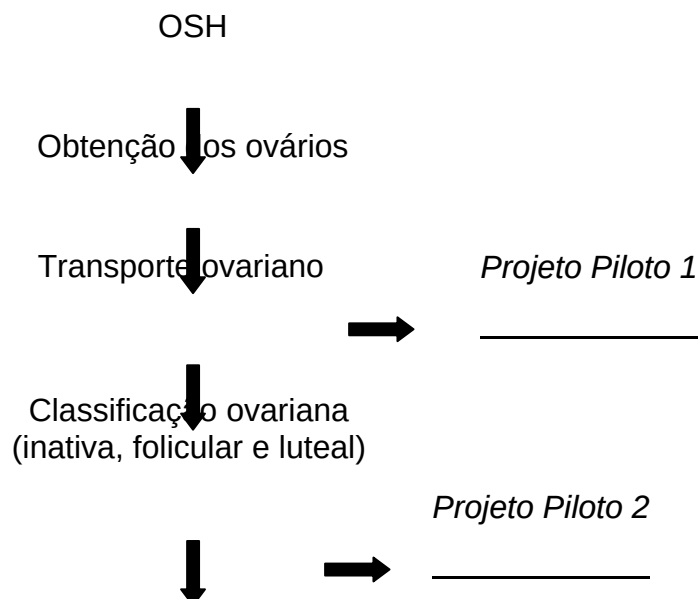
maturação *in vitro* e da fertilização *in vitro* em felinos. Em vista do exposto, a presente pesquisa tem ao objetivo de testar em felinos domésticos a seguinte hipótese:

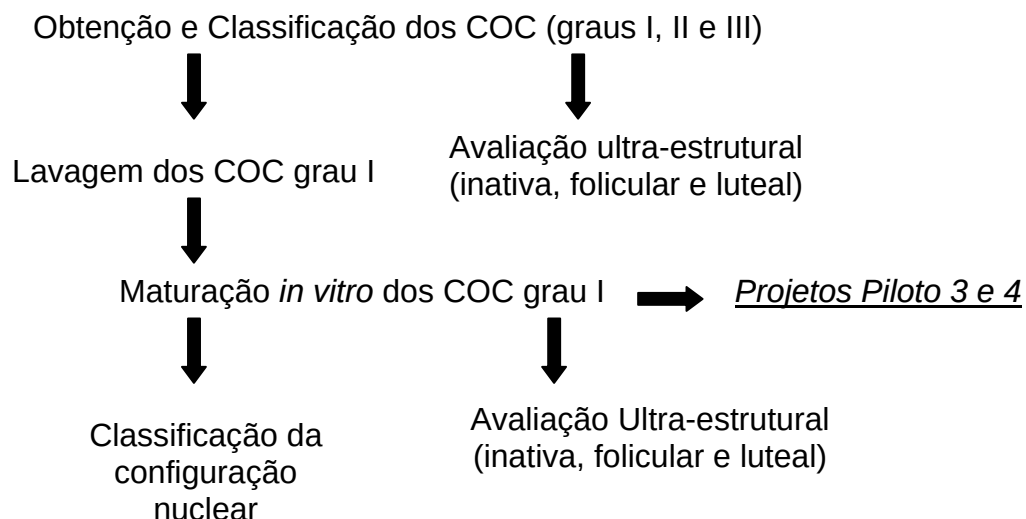
A sazonalidade e a condição ovariana influenciam a qualidade oocitária, a maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* e conseqüentemente a produção *in vitro* de embriões de gato doméstico na região de Botucatu, localizada na latitude de 22°53'09"S, no estado de São Paulo, Brasil?

Para testar a hipótese levantada, realizou-se o experimento em dois períodos do ano: **período I**, que compreende os meses de janeiro, fevereiro e março e **período II**, constituído pelos meses de agosto, setembro e outubro em associação a três condições ovarianas, **inativa**, **luteal** e **folicular**.

Delineamento Experimental

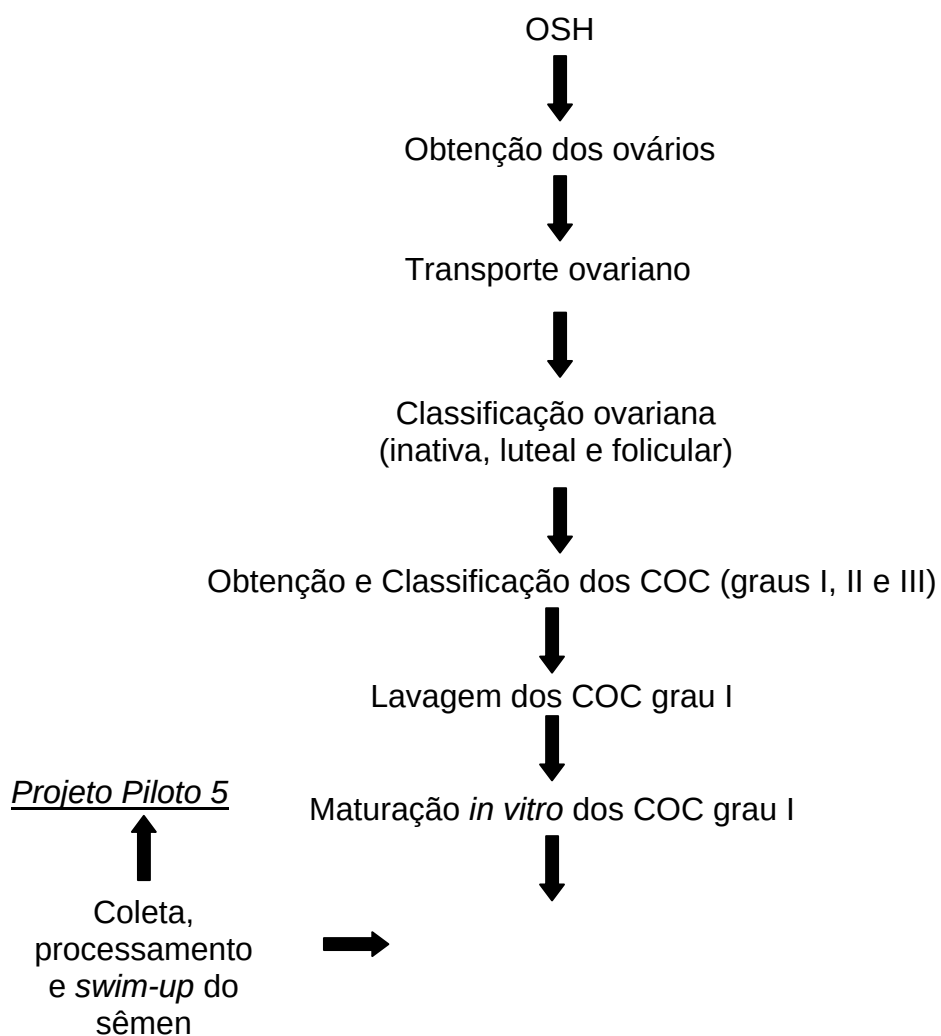
- I) **Aspectos relacionados à maturação *in vitro* e análise ultra-estrutural de COC de felinos domésticos nos períodos I e II**
1. A avaliação das taxas de recuperação oocitária;
 2. A avaliação da taxas de maturação oocitária *in vitro*;
 3. A descrição e análise das características citoplasmáticas ultra-estruturais dos oócitos coletados;

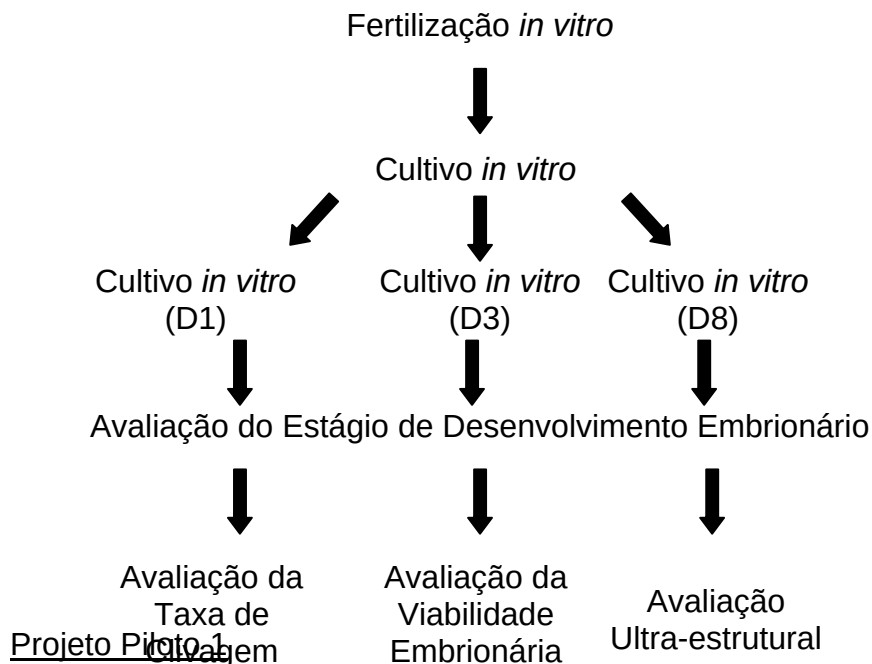




II) Produção *in vitro* e análise ultra-estrutural de embriões de felinos domésticos nos períodos I e II

1. A avaliação da eficiência na produção de embriões felinos, classificação do estágio de desenvolvimento e de viabilidade;
2. A descrição e análise das características citoplasmáticas ultra-estruturais dos embriões produzidos *in vitro*.





Averiguou-se a temperatura de transporte dos ovários a ser empregada após a OSH. Foram avaliadas as taxas de recuperação de COC grau I e a taxa de maturação *in vitro* quando os ovários foram transportados em DPBS a 4°C e a 38°C.

Projeto Piloto 2

Outro fator estudado foi o efeito sobre as taxas de maturação *in vitro* da realização do *slicing* em placa de Petri contendo PBS; em PBS acrescido de BSA, antibióticos e solução antimicótica ou em meio de maturação *in vitro*.

Projeto Piloto 3

Dois meios de maturação *in vitro* foram testados, TCM 199 e DMEM, ambos com a mesma suplementação descrita no **Anexo D**.

Projeto Piloto 4

A duração da maturação *in vitro* também foi um aspecto avaliado, pois é interessante haver uma compatibilidade de horário entre o término da

maturação *in vitro* e o momento da fertilização *in vitro*. Dessa forma, avaliou-se o efeito da maturação *in vitro* na espécie felina após 12, 24, 36 e 48 horas de cultivo. Posteriormente comparou-se a taxa de maturação *in vitro* nos períodos de 30 e 36 horas.

Projeto Piloto 5

Além dos fatores relacionados aos oócitos, o sêmen utilizado, bem como seu processamento e seleção poderiam contribuir para o aumento ou decréscimo das taxas de clivagem, formação de mórula e produção de blastocistos. Dessa forma, priorizou-se pelo uso de um único macho doador de sêmen, normospérmico, durante todo o decorrer do experimento.

Com relação aos meios utilizados para seleção espermática, foi realizado um trabalho no qual foram comparados quatro meios; Ham's F-10, Ham's F-10 suplementado com cafeína, TALP e TALP suplementado com cafeína.

Os itens 1 a 6 são comuns aos dois experimentos: **I) Aspectos relacionados à maturação *in vitro* e análise ultra-estrutural de COC de felinos domésticos nos períodos I e II e II) Produção *in vitro* e análise ultra-estrutural de embriões de gato doméstico nos períodos I e II.**

1. Local

Os experimentos desenvolveram-se no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS), do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no Centro de Microscopia Eletrônica do Departamento de Morfologia, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

2. Animais

Gatas com idade superior a um ano e peso corporal condizente com o tamanho corpóreo foram submetidas a jejum alimentar e hídrico de doze e duas horas, respectivamente, para realização de ovariosalpingohisterectomia (OSH).

Para realização do experimento I foram submetidas à OSH, 42 fêmeas e foram utilizados 30 pares de ovário – 12 pares de ovários não foram utilizados, uma vez que não pertenciam a animais com as características acima descritas. Para a realização do experimento II, 120 fêmeas foram submetidas à OSH, sendo que foram utilizados 90 pares de ovário.

Para realização da OSH, as fêmeas foram submetidas ao protocolo anestésico descrito no **Anexo B**.

3. Transporte ovariano

Os ovários foram transportados ao Laboratório Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) em criotubos (Sarstedt®, Brasil) ou em tubos de 1,5 mL (Eppendorf®, Brasil) em 1 mL de *Dulbecco's phosphate buffered saline* a 4°C; (DPBS, Nutricell®, Brasil) acrescido de 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma®, EUA) (JOHNSTON et al., 1989) e foram processados dentro de no máximo 4 horas após a remoção (**figura 1**).

4. Classificação da condição ovariana

Os ovários foram dissecados e liberados de tecido adiposo e vasos adjacentes. Após dissecação, os ovários foram colocados em placa de Petri plástica com dimensões de 60 x 15 mm (Ingámed®, Brasil) contendo 5 mL de DPBS (Nutricell®, Brasil) aquecido a 38°C. Cada ovário foi cortado com lâmina de bisturi no sentido longitudinal oposto à face de inserção dos vasos e ligamento ovariano.

Os ovários foram classificados de acordo com Spindler e Wildt (1999) com base em sua condição em: inativa (sem estruturas aparentes em sua superfície), luteal (presença de um ou mais corpos lúteos) e folicular (pelo menos 1 folículo visível com mais de 2 mm de diâmetro) (**figura 2**).

5. Obtenção e classificação dos complexos *cumulus oophorus* (COC)

Procedia-se, então, o fatiamento ou *slicing* (**figura 3**) utilizando-se somente a ponta do bisturi para que os cortes fossem delicados e evitou-se raspar a superfície ovariana de forma a não permitir a liberação de folículos íntegros, sendo liberados os complexos *cumulus oophorus* (COC).

Sob lupa estereomicroscópica (MZ 125, Leica[®], Alemanha) os COC foram selecionados e classificados em graus I, II e III (**figuras 4, 5 e 6**). COC grau I são aqueles que apresentam ooplasma uniforme e fortemente pigmentado e duas ou mais camadas de células do *cumulus* firmemente aderidas. COC grau II apresentam ooplasma uniforme e fortemente pigmentado e menos que duas camadas de células do *cumulus* firmemente aderidas. COC grau III apresentam ooplasma granuloso e não-uniforme e menos pigmentado e células da coroa radiata esparsas ou aqueles COC desnudos (JOHNSTON et al., 1989).

Para realização do experimento, foram utilizados somente COC grau I.

6. Lavagem e maturação oocitária *in vitro*

Grupos de 10 COC Grau I foram lavados por três vezes no meio de lavagem (**figura 7**) descrito no **Anexo C**.

Em seguida, os oócitos foram maturados em grupos de 20 a 30, em placas do tipo *four-well* (Nunc[®], Dinamarca ou Ingámed[®], Brasil) (**figura 8**), contendo em cada poço 400 µL do meio descrito no **Anexo D** por 30 a 36 horas a 38°C em atmosfera de 5% de O₂, 5% CO₂ e 90% N₂.

I) Aspectos relacionados à maturação *in vitro* e análise ultra-estrutural de COC de felinos domésticos nos períodos I e II

1. Classificação da configuração nuclear oocitária

Decorrido o período de maturação, as células do *cumulus* foram removidas mecanicamente através do uso de pipeta de vidro confeccionada a partir de capilar de vidro para determinação de hematócrito, não havendo necessidade do uso de hialuronidase (**figura 10**).

Os oócitos foram corados com Hoechst® 33342 e classificados quanto à configuração nuclear. A classificação adotada consiste na visualização das estruturas denominadas vesícula germinativa - **VG** (núcleo com carioteca preservada e sem condensação da cromatina) (**figura 11a**); quebra da vesícula germinativa - **QVG** (caracterizada pela ruptura da carioteca e início da condensação cromossômica; corresponde à diacinese da Prófase I) (**figura 11b**); metáfase I - **MI** (caracterizada pela presença de um grupamento de cromossomos condensados) (**figura 12a**); metáfase II – **MII** (caracterizada pela presença da placa metafásica e do corpúsculo polar) (**figuras 12b e 13**) e degenerados ou aqueles não passíveis de identificação – **D/NI** (**figura 14**) (JOHNSTON et al., 1989)

2. Avaliação ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão

Foram selecionados aleatoriamente 5 COC imediatamente após a classificação dos COC grau I e 5 COC após a maturação *in vitro*. A distribuição dos grânulos corticais e mitocôndrias e a presença de *gap junctions* entre as células do *cumulus* e o oócito, bem como o grau de involução de complexos de Golgi, a presença de microvilosidades, vesículas e gotas de lipídios e o tamanho do espaço perivitelínico foram utilizados para determinar o grau de maturidade citoplasmática.

De acordo com a microscopia eletrônica de transmissão, durante os dois períodos, as amostras foram divididas como demonstrado no **quadro 1**.

Quadro 1 - Grupos de COC avaliados por microscopia eletrônica de transmissão durante os períodos I e II.

COC não maturados provenientes de ovários na condição inativa (NMI)	COC maturados <i>in vitro</i> provenientes de ovários na condição inativa (MIVI)
--	---

COC não maturados provenientes de ovários na condição luteal (NML)	COC maturados <i>in vitro</i> provenientes de ovários na condição luteal (MIVL)
COC não maturados provenientes de ovários na condição folicular (NMF)	COC maturados <i>in vitro</i> provenientes de ovários na condição folicular (MIVF)

Para realização da análise ultra-estrutural as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,4 por 24 horas e depois fixadas em tetróxido de ósmio, no mesmo tampão. Após a desidratação em uma série crescente de acetona, as amostras foram incluídas em Epon. Cortes semi-finos (1-2 μ m) foram corados em azul de toluidina para visualização da amostra. Cortes ultrafinos foram realizados com lâmina de diamante, montados em grades de cobre e corados com acetato de uranil e citrato de chumbo. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips® CM 100 (Philips, Holanda).

II) Produção *in vitro* e análise ultra-estrutural de embriões de felinos domésticos nos períodos I e II

1. Coleta de sêmen e realização do *swim-up*

Após o período de maturação oocitária *in vitro* procedia-se à preparação do meio de *swim-up* para seleção dos espermatozóides a serem utilizados na fertilização *in vitro*.

O meio de *swim-up* encontra-se disposto no **Anexo E**. Depois de pronto, era mantido por pelo menos duas horas a 38°C em estufa com 5% CO₂ para estabilização do pH.

Para realização do *swim-up*, o sêmen era obtido de um único macho de gato doméstico por vagina artificial (**figura 15a**).

Esse animal encontrava-se alojado no gatil da Pós-Graduação e, embora apresentasse sêmen com características desejáveis e pré-determinadas (motilidade não inferior a 90% e porcentagem de espermatozóides normais, não inferior a 85%), seu sêmen era avaliado previamente e posteriormente à realização do *swim-up*.

Ao sêmen obtido foi acrescido igual volume de meio para *swim-up* e centrifugado a 300xg por 10 minutos. Esse procedimento visava à obtenção de um sedimento concentrado e a retirada do plasma seminal, sabidamente deletério para espermatozóides submetidos a processos de seleção como o *swim-up* (MARTINS et al., 2006a).

O sobrenadante foi então aspirado e descartado. Quatro tubos de 1,5 mL eram colocados em estante, contendo cada um, 250 µL de meio para *swim-up* (figuras 15 b e c).

O volume do sedimento era determinado e um quarto do volume total era lentamente adicionado ao fundo de cada tubo que era incubado por 60 minutos a 38°C em estufa de 5% de CO₂ em ar para permitir que os espermatozóides migrassem para a parte superior do meio.

Após 60 minutos, o sobrenadante foi aspirado, a motilidade espermática avaliada em microscópio com contraste de fase (200X) sendo expressa em porcentagem. Durante o processo de incubação do sêmen na estufa e findo o processo de maturação oocitária, gotas de fertilização com 90 µL de meio de fertilização eram dispostas em placas de Petri (Corning®, EUA) e cobertas com óleo mineral (Sigma®, EUA). Em cada gota eram acondicionados 10 oócitos.

Decorrido o período de *swim-up*, 200 µL de sobrenadante de cada tubo foi removido e acondicionado em outro tubo de 1,5 mL que foi então centrifugado a 300xg durante 4 minutos. Posteriormente, o sobrenadante era removido e o volume do sedimento determinado. Um microlitro do sedimento era removido para cálculo de concentração espermática e um microlitro era utilizado para determinação da motilidade espermática e do vigor. A concentração de espermatozóides contida no sedimento foi determinada em câmara de Neubauer, após diluição do sêmen em água destilada (1/10, 1/20, 1/50 ou 1/100) e expressa em espermatozóides/mL.

2. Fertilização *in vitro*

O meio utilizado para realização da fertilização *in vitro* encontra-se descrito no **Anexo F**. Para agilizar a determinação do volume de meio a ser acrescentado ao sedimento a fim de que fosse obtida a concentração de 1 x

10^6 espermatozoides/mL contidos em 10 μ L de meio a ser adicionado à gota de fertilização, convencionou-se a utilização das fórmulas dispostas no **quadro 2**.

Quadro 2 - Fórmulas utilizadas para determinar a diluição do sedimento necessária para que o volume de 10 μ L adicionado à gota de fertilização contivesse 1×10^6 espermatozoides/mL.

Concentração desejada em 10 μ L	Diluição	Fórmula
1×10^6 espermatozoides/mL	1/10	$V_t (\mu\text{L}) = V_i (\mu\text{L}) \times m \times n \times 0,5$
	1/20	$V_t (\mu\text{L}) = V_i (\mu\text{L}) \times m \times n$
	1/50	$V_t (\mu\text{L}) = V_i (\mu\text{L}) \times m \times n \times 2,5$
	1/100	$V_t (\mu\text{L}) = V_i (\mu\text{L}) \times m \times n \times 5$

Onde V_i é o volume inicial, ou seja, o volume do sedimento; V_t é o volume final; n é a média do número de espermatozoides contados nos dois lados da câmara de Neubauer e m é a motilidade expressa em porcentagem.

Após ajuste da diluição, dez microlitros da solução final foi acrescida à gota de fertilização contendo dez oócitos e mantido em estufa com 5% CO_2 em ar durante 20 a 22 horas. Uma gota não era fertilizada para observação das estruturas formadas por partenogênese (**figuras 16a, b e c**).

3. Cultivo *in vitro*

Decorrido o período de fertilização *in vitro*, as células do *cumulus* eram removidas mecanicamente através de pipetagem, sem a necessidade de utilização de hialuronidase.

Determinava-se, após a fertilização *in vitro*, a taxa de clivagem através da contagem de estruturas formadas por mais de dois blastômeros (**figura 17 e 18**).

Os presumíveis zigotos eram então transferidos para meio de cultivo utilizado do dia 1 (D1) ao dia 3 (D3) descrito no **Anexo G**. Depois de pronto, era mantido por duas horas a 38°C em estufa com 5% CO_2 para estabilização do pH.

Após 72 horas de cultivo *in vitro*, os zigotos eram avaliados e somente aqueles que apresentavam clivagem (**figuras 18 a e b**) eram transferidos para o meio de cultivo utilizado do dia 4 (D4) ao dia 8 (D8), descrito no **Anexo H**. Decorridos oito dias após a fertilização *in vitro*, eram contabilizado o número de blastocistos (**figuras 19a e b**)

4. Avaliação da viabilidade embrionária

Para avaliar a qualidade das mórulas produzidas no experimento 1, foram selecionadas aleatoriamente mórulas do grupo de oócitos provenientes de ovários nas três condições.

Após 72 horas de cultivo *in vitro*, as mórulas eram removidas da gota de fertilização, colocada sobre lâmina microscópica contendo 5 µL da associação dos corantes acridina *orange*, iodeto de propídeo e recobertos com lamínula aderida à lâmina por gotas de cola de silicone para determinação do número de células e porcentagem de células com núcleo fragmentado. As lâminas eram preparadas em ambiente escuro e a leitura foi realizada em microscopia de fluorescência (filtro azul, excitação: 450 a 490nm).

A solução de acridina *orange* mais iodeto de propídeo foi preparada diluindo-se 100 µg de acridina *orange* (Sigma A-6014) mais 100 µg de iodeto de propídeo em 1 mL de PBS (COLIGAN et al., 1992). A solução foi armazenada em frasco âmbar (Corning®), protegida da luz, sob refrigeração a 4°C até o momento do uso.

Células viáveis com morfologia nuclear normal apresentaram cromatina verde brilhante com estrutura organizada e foram denominadas de **VN** (viáveis com núcleo normal).

Células inviáveis com coloração da cromatina laranja brilhante, devido à penetração do iodeto de propídeo, mas a estrutura nuclear organizada, bem como células com núcleo laranja altamente condensado ou fragmentado foram denominadas **NVF** (não viável com fragmentação de DNA) (**figura 20**).

5. Avaliação ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão

Foram selecionados aleatoriamente 5 embriões de cada condição ovariana nos dois períodos. Buscou-se realizar a descrição morfológica dos embriões de gato doméstico produzidos no sistema de cultivo *in vitro* proposto.

A análise ultra-estrutural foi realizada pelo Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Unesp, Campus de Botucatu utilizando-se a mesma metodologia descrita para avaliação dos COC.

Análise Estatística

Após a obtenção dos resultados laboratoriais foi determinada a proporção de oócitos recuperados; as taxas de maturação *in vitro* e a produção e a qualidade embrionária nas duas estações - períodos I e II - em associação à condição ovariana e então submetida à análise estatística.

Os valores em porcentagem descritos nas **Tabelas 1 e 2** foram analisados estatisticamente por teste Qui-quadrado a 5% de probabilidade. Os grupos foram comparados quanto aos períodos e quanto às condições ovarianas sobre as populações oocitárias utilizando-se o Teste Qui-quadrado ($\alpha = 0,05$).

Para análise estatística dos valores médios de células viáveis ou com núcleo em fragmentação por mórula (**Tabela 3**) foi realizado o procedimento GLM (*General Linear Model*), do programa computacional SAS® (1996), obtendo-se as análises de variância e as médias estimadas, sendo essas comparadas através do teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

O reflexo da sazonalidade e das três condições ovarianas sobre as características ultra-estruturais oocitárias e embrionárias foi determinado de forma descritiva.

Resultados

O número de ovários utilizados, bem como o número de COC obtidos para a realização do **Experimento I** encontra-se disposto no **quadro 3**.

Quadro 3 - Número de ovários utilizados durante os períodos I e II para avaliação da maturação nuclear *in vitro*.

Condição Ovariana	Período I		Período II	
	Nº de pares de ovários	Nº de COC	Nº de pares de ovários	Nº de COC
Inativa	10	237	01	49
Luteal	08	191	07	332
Folicular	02	45	02	101
Total	20	473	10	482

O número de ovários utilizados, bem como o número de COC obtidos para a realização do **Experimento II** encontra-se disposto no **quadro 4**.

Quadro 4 - Número de ovários utilizados durante os períodos I e II para avaliação da produção embrionária *in vitro*.

Condição Ovariana	Período I		Período II	
	Nº de pares de ovários	Nº de COC	Nº de pares de ovários	Nº de COC
Inativa	10	247	02	95

Luteal	04	96	08	376
Follicular	02	43	02	97
Total	18	386	12	568

Os dados referentes à taxa de insolação mensal no período de janeiro de 2005 a setembro de 2008, bem como a taxa de irradiação (cal/cm^2) mensal média do referido período podem ser analisados no **gráfico 1**.

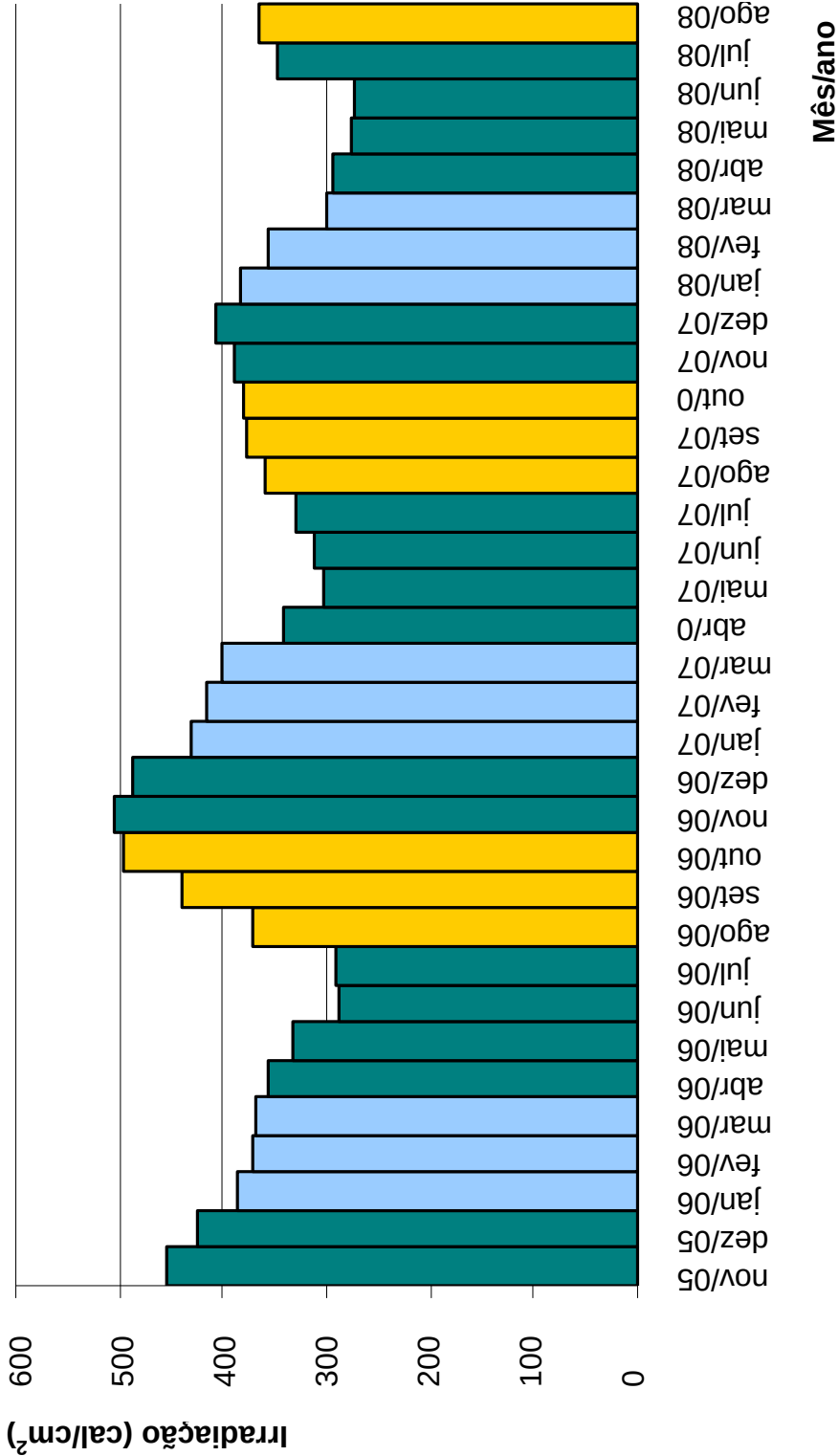


Gráfico 1- Taxa de irradiação mensal média durante o período de novembro de 2005 a agosto de 2008. Botucatu, 2008

Foram recuperados 473 COC grau I no período I e 482 no período II. No período I foram avaliados 445 COC grau I e no período II foram avaliados 458. O total de perdas por pipetagem ou esmagamento foi de 5,90 % e 4,98% durante o experimento, nos períodos I e II, respectivamente. COC grau II e III não foram contabilizados.

O número médio de COC obtidos por gata pertencente ao período I e II foi de $23,65 \pm 1,36\%$ e $48,2 \pm 2,2\%$ COC/fêmea, respectivamente. Gatas que apresentavam ovários na condição folicular forneceram um número menor de oócitos por ovário, entretanto, a maioria deles foi classificada como grau I.

Os dados referentes à classificação da configuração nuclear de COC grau I provenientes de ovários nas três condições encontram-se dispostos na **tabela 1**.

No período II, durante a maturação *in vitro* de oócitos provenientes de ovários nas três condições ovarianas, puderam ser observadas após 30 horas de maturação, estruturas semelhantes a mórulas, obtidas por partenogênese (**figuras 18, 19 e 20**).

Oócitos pertencentes ao período II que se desenvolveram até o estágio semelhante à mórula através de partenogênese foram classificados à parte e totalizaram 2,8%.

Foram obtidos 386 oócitos grau I no período I e 568 no período II os quais foram destinados à fertilização *in vitro* e ao cultivo *in vitro*.

Os valores relativos à frequência relativa de COC grau I com relação à fase de desenvolvimento embrionário provenientes de ovários nas três condições durante os períodos I e II encontram-se dispostos na **tabela 2**.

O número médio de células por mórula, o número médio de células com fragmentação de DNA e o número médio de células não viáveis com núcleo em fragmentação para as três condições ovarianas durante os períodos I e II encontram-se dispostos na **tabela 3**.

Tabela 1- Frequência relativa de COC Grau I provenientes de ovários de gato doméstico (*Felis catus*) em três condições – inativa, luteal e follicular – avaliados e classificados como degenerados ou não identificáveis (D/NII), vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG) e metáfase I (MI) e metáfase II (MII), maturados *in vitro* durante 30 a 36 horas nos períodos I e II. Botucatu, 2008

Configuração nuclear	Condição Ovariana					
	Inativa		Luteal		Follicular	
	Período I	Período II	Período I	Período II	Período I	Período II
VG	1,46	2,60	1,35	2,45	1,90	1,27
QVG	6,08	7,11	6,47	6,14	6,84	6,92
MI	11,70	11,53	11,06	12,48	10,29	12,73
MII	75,14	75,72	75,36	75,21	76,38	75,28
D/NII	5,62	3,04	5,76	3,72	4,59	3,8

(p<0,05) pelo Teste Qui-quadrado

Tabela 2 - Frequência relativa de clivagem, produção de mórulas e blastocistos produzidos a partir de óocitos provenientes de ovários de gato doméstico (*Felis catus*) em três condições – inativa, luteal e folicular – cultivados *in vitro* durante os períodos I e II. Botucatu, 2008

Configuração nuclear	Condição Ovariana					
	Inativa		Luteal		Folicular	
	Período I	Período II	Período I	Período II	Período I	Período II
Fertilizados	272	102	162	198	134	86
Clivados	24,63 ^a	64,7 ^b	21,60 ^a	64,14 ^b	24,62 ^a	63,95 ^b
Mórulas	16,54 ^a	41,17 ^b	12,96 ^a	40,41 ^b	16,41 ^a	39,54 ^b
Blastocistos	8,09^a	23,53^b	8,64^a	23,73^b	8,21^a	24,41^b

^{a0} Letras diferentes entre si na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo Teste Qui-quadrado

Tabela 3 - Viabilidade de mórulas produzidas a partir de óocitos provenientes de ovários de gato doméstico (*Felis catus*) em três condições – inativa, luteal e folicular – cultivadas *in vitro* durante os períodos I e II. Botucatu, 2008

Condição ovariana (mórulas avaliadas)	Período I		Período II		Período I		Período II		Período I		Período II	
	Média células por mórula (n)		Média células VN (n) (%)		Média células NVF (n) (%)		Média células VN (n) (%)		Média células NVF (n) (%)		Média células VN (n) (%)	
Inativa (20)	10,7 ± 2,27	10,26 ± 2,25	9,9 ± 2,12	92,52	9,65 ± 1,75	91,04	0,8 ± 0,69	7,48	0,95 ± 0,88	8,96	1,11 ± 1,1	10,48
Luteal (20)	10,3 ± 1,56	10,5 ± 1,43	9,25 ± 1,55	89,8	9,4 ± 1,5	89,52	1,05 ± 1,05	10,19	1,11 ± 1,1	10,48	1 ± 0,97	9,48
Folicular (20)	10,35 ± 2,36	10,55 ± 2,11	9,8 ± 2,14	94,69	9,55 ± 1,53	90,52	0,65 ± 0,67	5,31	1 ± 0,97	9,48	1 ± 0,97	9,48

p < 0,05 pelo Teste de Tukey.

VN: células viáveis com núcleo normal

NVF: células não viáveis, núcleo fragmentado.

As características ultra-estruturais de COC não maturados provenientes de ovários nas condições inativa, luteal e folicular durante o período I encontram-se documentadas nas **figuras 21 a 26**. As **figuras 27 e 28** referem-se aos COC maturados *in vitro* durante o período I. Os COC não maturados provenientes de ovários nas três condições acima citadas durante o período II encontram-se dispostos nas **figuras 29 a 34**. Os COC maturados *in vitro* durante o período II podem ser visualizados nas **figuras 35 a 38a**. As características dos embriões obtidos nesse experimento podem ser visualizadas nas **figuras 38b a 40**.

Características ultra-estruturais dos COC provenientes de ovários nas condições inativa, luteal e folicular:

- **COC não maturados provenientes de ovários na condição inativa:** foram caracterizados pela presença de aglomerados de mitocôndrias (M) na zona cortical do ooplasma. O espaço perivitelínico (EPV) não se encontrava bem desenvolvido e a superfície do oócito continha muitas microvilosidades (MV) que se estendem até a zona pelúcida. Gotas lipídicas (GL) e vesículas estão distribuídas uniformemente no ooplasma, exceto na região cortical (**figura 21**). Esses COC apresentavam estruturas denominadas *nuage*, que correspondem a um grânulo cortical rodeado por mitocôndrias. Embora o motivo de seu aparecimento ainda não possa ser explicado, sabe-se que esse conjunto de organelas dispostas dessa forma é característico de COC imaturos (**figura 22**). Grânulos corticais estão presentes somente na periferia do citoplasma dos COC não maturados provenientes de ovários na condição inativa (**figura 23 e 31**).
-
- **COC não maturados provenientes de ovários na condição folicular** são caracterizados pela distribuição homogênea de mitocôndrias no ooplasma. Apresentam MV na superfície e o EPV também não é bem desenvolvido. Suas gotas de lipídio parecem menores que as observadas nos COC não maturados provenientes de ovários na

condição inativa e COC não maturados provenientes de ovários na condição luteal (**figura 23**). A quantidade de grânulos corticais nos COC não maturados provenientes de ovários na condição folicular apresentou-se maior na região periférica, embora também possam ser observados em outras regiões do ooplasma (**figura 24**).

-
- **COC não maturados provenientes de ovários na condição luteal** foram caracterizados por aglomerados mitocondriais periféricos, mas grandes aglomerados podem também ser vistos em outras regiões do citoplasma (**figura 25**). A região periférica ocupada por esses aglomerados é mais estreita nos COC não maturados provenientes de ovários na condição luteal que nos COC não maturados provenientes de ovários na condição inativa e COC não maturados provenientes de ovários na condição folicular. As gotas de lipídio são maiores nos COC não maturados provenientes de ovários na condição luteal comparadas aos MNI e COC não maturados provenientes de ovários na condição folicular. Os grânulos corticais estão presentes somente na região periférica do citoplasma e a quantidade é menor se comparada aos COC não maturados provenientes de ovários na condição inativa e COC não maturados provenientes de ovários na condição folicular (**figura 26**). Suas MV não são tão desenvolvidas quanto aos dos COC não maturados provenientes de ovários na condição inativa e COC não maturados provenientes de ovários na condição folicular (**figura 27**).
- **COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição folicular** são caracterizados pela presença de numerosas vesículas pequenas na região cortical; apresentam o maior EPV (**figuras 28 a 31**) comparado aos COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição inativa e COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição luteal e as projeções das células do *cumulus* estão quase ausentes.

Semelhantemente aos COC não maturados durante o período I, puderam-se observar as mesmas características nas estruturas não maturadas durante o período II, como aglomerados mitocondriais associadas a gotas de lipídio, complexo de Golgi bem desenvolvidos, além da visualização de estruturas denominadas *nuage*. *Gap junctions* puderam também ser observadas em COC não maturados.

- **COC não maturados *in vitro* e provenientes de ovários em condição folicular** apresentaram aglomerados de mitocôndria em regiões centrais associados a gotas de lipídio diferindo de COC não maturados provenientes de ovários em condição luteal, que foram caracterizados por aglomerados de mitocôndrias próximos à periferia.

A presença de grande quantidade de retículo endoplasmático liso pôde ser constatada em COC não maturados provenientes de ovários em condição folicular e luteal (**figuras 33 e 34**).

COC maturados *in vitro* apresentaram distribuição uniforme de mitocôndrias (**figuras 35 a 38a**).

Em decorrência de problemas ocorridos durante o processamento dos embriões para realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão, os embriões apresentaram graus variados de degeneração não sendo possível uma descrição detalhada das estruturas. Assim sendo, a comparação entre os dois períodos e entre as três condições ovarianas não foram realizadas, permanecendo como objetivos futuros a serem cumpridos.

As estruturas identificadas nestes embriões podem ser observadas nas **figuras 38b a 40**.

Discussão

Considerações iniciais

As metodologias utilizadas para a realização dessa pesquisa foram intensamente investigadas antes de sua aplicação, uma vez que seriam utilizadas nas demais pesquisas envolvendo a espécie felina desenvolvidas no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular - LANÇA, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus de Botucatu.

Projeto Piloto 1

Após a realização de várias rotinas de maturação *in vitro* pôde-se constatar que quando realizado sob a temperatura de 4°C, os oócitos conservavam suas características qualitativas e a porcentagem de metáfase II obtida não se alterava, quando comparados àqueles processados imediatamente após sua remoção.

O transporte nessa temperatura mostrou-se eficaz quando os ovários eram processados dentro de, no máximo, seis horas, o que pôde ser comprovado pela constância nas taxas de maturação *in vitro*. Isso também foi constatado por Naoi et al. (2007), que compararam temperaturas de transporte e armazenamento dos ovários a 4°C, à temperatura ambiente (23-25°C) e a 38°C após 0, 6, 12 e 18 horas. Constataram que somente oócitos armazenados por um período inferior a 6 horas foram capazes de se desenvolver até a fase de blastocisto e que, quando essas gônadas foram armazenadas em temperaturas superiores a 23°C, podia-se verificar um decréscimo na competência meiótica oocitária.

A temperatura de transporte ideal de 4°C favorece o acondicionamento de ovários obtidos em clínicas particulares, que podem conservá-los em geladeira até que todos os animais sejam castrados. Permite ainda o transporte de ovários de felídeos geneticamente valiosos entre zoológicos ou áreas de conservação e os laboratórios especializados em biotecnologia voltados para a espécie felina, que são pouco numerosos. Ademais o transporte desses órgãos pode ser realizado de forma simples e prática em caixas de isopor contendo gelo reciclável.

Projeto Piloto 2

Verificou-se não haver diferença sobre a qualidade oocitária e sobre as taxas de maturação *in vitro* quando o *slicing* era realizado em qualquer um dos compostos citados acima. Dessa forma optou-se pela realização do *slicing* em PBS aquecido a 38°C, uma vez que era mais prático e menos oneroso. As porcentagens de metáfase II obtidas nas condições descritas nesse experimento encontram-se em conformidade com as de outros pesquisadores que realizaram o *slicing* em PBS suplementado (LUVONI e PELLIZZARI, 2000; NAOI et al., 2007) ou em meio de maturação *in vitro* (SPINDLER e WILDT, 2002; GÓMEZ et al., 2003).

Adotou-se essa prática e não foi observada diferença quando a mesma fora realizada em meio de maturação ou em DMPBS.

Projeto Piloto 3

O DMEM mostrou-se mais eficiente quando comparado ao primeiro com relação às taxas de maturação *in vitro*.

Katska-Ksiazkiewicz et al. (2002) compararam o efeito de dois meios de cultivo, TCM 199 e SOF, sobre a maturação *in vitro* de oócitos felinos. Esses autores não observaram diferenças significativas na porcentagem de oócitos em metáfase II (37,5 x 43,2%, respectivamente). Já Bogliolo et al. (2001) relataram o benefício da utilização do SOF na maturação *in vitro* após 24 e após 40 horas de cultivo (80% e 82,8%) em relação ao TCM199 (66,7% e 64,4%). Quando se testou o DMEM associado ou não ao IGF-I e ao bFGF, verificou-se que a suplementação era responsável por um acréscimo na porcentagem de metáfase II da ordem de 25 a 30%. Fatores de crescimento como o IGF-I e o bFGF são responsáveis pela regulação dos processos de foliculogênese e maturação oocitária.

Da mesma forma, a suplementação do meio de cultura com IGF-I, por exemplo, tem um efeito benéfico no desenvolvimento do embrião antes da implantação, estimulando a proliferação celular em bovinos (KOLLE et al., 1998). A suplementação com bFGF no meio de maturação em felinos mostrou-se superior quando comparada ao meio sem suplementação (MERLO et al.,

2006). Acredita-se que a utilização desse fator durante a maturação *in vitro* favoreça os processos de clivagem e o desenvolvimento de blastocistos pelo aumento da atividade mitogênica (MARKKULA e MAKAREVICH, 2001). Ademais, os efeitos do IGF-1 no desenvolvimento embrionário pré-implantação são mediados por receptores com elevada afinidade para este fator de crescimento (MATSUI et al., 1997).

Projeto Piloto 4

Sendo que as porcentagens de metáfase II obtidas foram de 25%, 51%, 61% e 68%, respectivamente (MARTINS et al., 2006b). Entretanto, apesar da porcentagem de oócitos em metáfase II, após 48 horas de maturação ter sido superior, verificou-se, em etapas posteriores, que esses oócitos apresentaram menor taxa de clivagem, de formação de mórulas e de produção de blastocistos quando comparados à maturação *in vitro* realizada por 36 horas. Embora o período de 48 horas fosse extremamente conveniente à rotina, necessitava-se de um período menor. Para tanto, comparou-se a taxa de maturação *in vitro* durante esses dois períodos e verificou-se a não existência de diferença estatística significativa entre eles (43,28% x 47,43%) (MARTINS et al., 2006c).

Katska-Ksiazkiewicz et al. (2002) compararam o efeito do tempo de maturação sobre as porcentagens de oócitos que se encontravam em metáfase II. Sugeriram a presença de duas “ondas” de maturação nuclear no gato doméstico. A primeira “onda” ocorre dentro das primeiras 26 horas de cultivo e que provavelmente a maioria desses oócitos matura por volta da 17^a a 18^a hora de cultivo; a segunda “onda” de maturação nuclear ocorre após 28 a 30 horas de cultivo. Acredita-se que a existência dessas duas “ondas” possa refletir a existência de duas populações oocitárias com, no mínimo, dois graus diferentes de “pré-maturação” e que requerem períodos diferentes de cultivo *in vitro*.

Projeto Piloto 5

Desse teste, depreendeu-se que os meios utilizados foram igualmente eficazes na preservação de características espermáticas desejáveis e na

seleção de amostras com baixo índice de patologia espermática. O meio Ham's F-10 encontra-se disponível comercialmente; dessa forma optou-se por seu uso devido à praticidade, enquanto que o meio TALP requeria prévia pesagem de sais e diluição para sua confecção. Com relação à adição de cafeína verificou-se que essa substância não influenciou a motilidade progressiva, embora, um estado de hiperativação, necessário ao processo de fertilização tenha sido verificado (MARTINS et al., 2006a).

Além dos fatores acima descritos, pôde-se constatar que fatores extrínsecos também afetam todo o sistema de cultivo como a qualidade do gás utilizado nas estufas e a frequência com que as estufas de cultivo são abertas. Alguns desses fatores, isoladamente ou em associação contribuem para a diminuição da produção embrionária e até mesmo com episódios de contaminação.

Recuperação oocitária

De acordo com os resultados obtidos inicialmente, pôde-se verificar que existe um efeito positivo do período II sobre a qualidade oocitária. COC grau I provenientes de ovários coletados durante o período II foram mais numerosos **(473 x 482)**, independente da condição ovariana estudada. Para caracterizar COC grau I, adotou-se a classificação utilizada por Johnston et al. (1989), como sendo aqueles que apresentam citoplasma escuro e homogêneo circundado por pelo menos duas camadas de células do *cumulus*.

Durante a revisão de literatura, pôde-se verificar a existência de outra classificação dada por Wood e Wildt (1997) e Kitiyanant et al. (2003), que consideram COC grau I apenas aqueles oócitos com citoplasma escuro e homogêneo circundados completamente por cinco ou mais camadas de células do *cumulus*. Nesse contexto, se tivesse sido utilizada a classificação de Wood e Wildt (1997) e Kitiyanant et al. (2003), verificar-se-ia, durante o período II que esses COC predominavam, enquanto que durante o período I, a visualização dessas estruturas era rara.

A respeito das condições ovarianas – inativa, luteal e folicular – não foi identificado nenhum reflexo da condição hormonal sobre a qualidade oocitária. COC provenientes de ovários em quaisquer das condições avaliadas não

apresentavam qualidade diferente. Essa constatação também foi relatada em outros estudos prévios (JOHNSTON et al., 1989; SPINDLER e WILDT, 1999)

O número de COC grau I/fêmea obtidos durante o período II também foi superior ao do período I ($48,2 \pm 2,2\%$ x $23,65 \pm 1,36\%$ COC/fêmea, respectivamente). Possivelmente a explicação para esse fato se dê pelo relato de Wood et al. (1997), que verificaram alta incidência natural de atresia folicular (aproximadamente 65%) responsável pela redução do número de COC grau I disponíveis para maturação *in vitro* que esta espécie apresenta em determinadas épocas do ano. Sabe-se que sazonalidade em gatos é induzida por alterações na secreção de GnRH que afetam as concentrações de FSH, que por sua vez regulam o crescimento folicular (ERICKSON e DANFORTH, 1995). Variações circanuais nos padrões de secreção hormonal ou nas concentrações de receptores poderiam afetar a qualidade oocitária (SPINDLER e WILDT, 1999).

Embora o número de COC coletados de ovários nas três condições ovarianas não tenha diferido dentro de um mesmo período, ovários em condição folicular foram encontrados em menor quantidade, no entanto, embora esses ovários apresentassem um número bem variável de COC/ovário, esses, quase em sua totalidade foram classificados como grau I.

A porcentagem de COC grau I recuperada não foi afetada pela condição ovariana, assim como relatados nos experimentos de Spindler e Wildt (1999) e Johnston et al. (1989).

Nesse experimento, com o intuito de otimizar as taxas de maturação *in vitro* e de produção embrionária, não foram utilizados COC graus II e III, bem como seu número não foi contabilizado. Observou-se que o tempo despendido com a contagem de tais estruturas, contribuía para a diminuição da qualidade ou até mesmo com a degeneração dos COC grau I que seriam utilizados posteriormente.

Outro aspecto a ser relatado é a inclusão, nessa pesquisa, de fêmeas comprovadamente adultas, evidenciado pelo peso corporal ou por informação segura colhida com o proprietário. Ovários de fêmeas pré-púberes ou com histórico etário desconhecido foram descartados. Sabe-se que fêmeas pré-púberes fornecem um número de COC superior ao das adultas. Isso pôde ser

verificado no experimento de Lopes (2002), que recuperou 69,1 COC/fêmea pré-púbere e 27,6 de fêmeas adultas, entretanto aquelas apresentaram taxas de maturação *in vitro* inferiores a estas. Armstrong et al. (1994) afirmaram que COC provenientes de ovelhas pré-púberes apresentam ainda um potencial limitado para serem fertilizados e se tornarem embriões viáveis *in vitro*. Em felinos, há diferenças significativas nas taxas de maturação *in vitro*, quando os COC de fêmeas pré-púberes e fêmeas adultas foram cultivados por 36 horas (32% x 61%) (MARTINS et al., 2006b).

Maturação *in vitro*

Com relação às taxas de maturação *in vitro*, não foram evidenciadas diferenças entre os dois períodos e entre as condições ovarianas. Entretanto, quando se compararam os achados da maturação citoplasmática documentados pela microscopia eletrônica de transmissão com a maturação nuclear, identificou-se um descompasso entre as duas, evidenciando que a coloração utilizada para determinação de maturidade nuclear é parcialmente falha nessa espécie, ao mesmo tempo em que se sugere que as condições de cultivo *in vitro* não são ideais.

Os resultados obtidos referentes às taxas de maturação nuclear *in vitro* são condizentes com os valores descritos na literatura para espécie felina, que variam entre 50 a 60% (WOOD et al., 1997) e com experimentos mais recentes que têm atingido valores próximos a 85% (KITIYANANT et al., 2003).

Quando são selecionados apenas COC grau I, não são observadas diferenças sobre a taxa de maturação em decorrência de esses oócitos apresentarem, dentro de um mesmo período, qualidade semelhante. Provavelmente características relacionadas às concentrações de receptores de FSH, às variações referentes à secreção de GnRH, ou relacionados à concentração de antioxidantes tenham sido compensadas pelo próprio meio de maturação *in vitro* e pela qualidade dos oócitos selecionados. Comizzoli et al. (2003) verificaram que durante a denominada estação não reprodutiva no Hemisfério Norte (julho a novembro), a suplementação de FSH, cisteína e ácido ascórbico foi responsável pelo aumento na porcentagem de oócitos em metáfase II, embora a concentração de FSH no meio de maturação *in vitro* para

oócitos bovinos não apresente benefícios aparentes durante a estação não-reprodutiva (IZADYAR et al., 1998; CHOI et al., 2001). Outros autores sugerem que a suplementação com FSH pode atingir de forma ampla todos os receptores disponíveis, facilitando a comunicação entre as células somáticas e o oócito (EPPIG et al., 2000; TANGHE et al., 2002; WEBB et al., 2002).

O meio utilizado no experimento objeto dessa tese utilizou em ambos os períodos concentrações suficientemente altas de FSH e cisteína no meio de maturação *in vitro*, fator que pôde ser responsável pela ausência de diferença entre as taxas de metáfase II nos períodos e nas condições ovarianas estudadas.

Acredita-se que, se fossem incluídos COC grau II nesse experimento, possivelmente seriam evidenciadas porcentagens diferentes de oócitos em metáfase II. Spindler e Wildt (1999) verificaram diferenças nas taxas de maturação nuclear quando consideraram diferentes épocas do ano. As porcentagens mais elevadas de maturação *in vitro* foram observadas durante os meses de dezembro a abril no Hemisfério Norte, enquanto que as mais baixas puderam ser observadas durante os meses de agosto a outubro.

Outro fator a ser levado em consideração são as condições de cultivo entre laboratórios que diferem substancialmente. As variações podem ser demonstradas pelas diferentes temperaturas e tempos de transporte e armazenamento ovariano, pela classificação oocitária, pelas concentrações de gases (5% CO₂ em ar x 5% O₂, 5% CO₂ em ar e 90% N₂) e principalmente pela utilização de diferentes meios de maturação *in vitro* e variadas suplementações. Ademais, até mesmo oócitos aparentemente classificados como grau I podem apresentar características difíceis de serem detectadas quando observados sob lupa, o que pode causar variações na sua capacidade de maturação *in vitro*.

Taxa de clivagem, formação de mórulas e produção de blastocistos

Com relação às taxas de clivagem, de formação de mórula e produção de blastocisto, não se verificou influência da condição ovariana, entretanto há marcante efeito do período sobre esses parâmetros (vide **tabela 2**).

Nas condições descritas nessa pesquisa observou-se uma alta incidência de bloqueio no desenvolvimento durante a transição de mórula para blastocisto, de aproximadamente 50%. Sob diferentes condições de cultivo, um grande número de embriões de gato produzidos *in vitro* se desenvolve até o estágio de mórula, porém acaba não evoluindo para blastocisto (JOHNSTON et al., 1991; ROTH et al., 1994). Em outras espécies o bloqueio no desenvolvimento embrionário pode ocorrer devido a modificações em substratos energéticos ou em outros componentes do meio de cultivo ou pelo co-cultivo embrionário com células do oviduto (WHITE et al., 1989; GANDOLFI e MOOR, 1989).

Diferentemente do que foi relatado por Johnston et al. (1991), alterações na composição do meio de cultivo embrionário no gato, têm a capacidade de melhorar as taxas de clivagem e produção de blastocistos. Isso pôde ser verificado em outro experimento realizado no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), utilizando o meio SOF para o cultivo embrionário. Esse protocolo foi responsável pela ocorrência da taxa de clivagem de 53% e pela taxa de produção de blastocisto de 33%, utilizando-se o mesmo gato (RASCADO, 2008*).

Em outras espécies, o bloqueio no desenvolvimento embrionário ocorre em estágios iniciais (8 a 16 células). No gato, o bloqueio ocorre com 5 a 8 células durante o cultivo *in vitro*. Acredita-se que esse bloqueio se dê pela ausência de fatores uterinos específicos que seriam responsáveis pela compactação e formação do blastocisto.

Segundo Spindler e Wildt (1999), para a espécie felina, uma produção satisfatória de blastocistos é aquela superior a 25%. Em seu estudo, rotinas de fertilização *in vitro* realizadas durante os meses de fevereiro a junho resultaram em frequências satisfatórias de produção de blastocisto, enquanto que as taxas mais baixas se concentraram nos meses de julho a outubro ($0,06$ a $3,16 \pm 1,9\%$). A maior produção de blastocisto pôde ser verificada durante os meses de fevereiro a abril ($45,1 \pm 6,3$ a $50,3 \pm 6,2$).

Não foi observada diferença nas taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto dentro de um mesmo

* Comunicação pessoal

período, indicando que a condição ovariana da fêmea doadora não tem efeito aparente sobre o desenvolvimento oocitário e produção embrionária. Talvez essa constatação seja reflexo da ausência de diferenças entre as taxas de metáfase II e clivagem quando as três condições foram comparadas.

Avaliação da qualidade embrionária

Avaliou-se a qualidade das mórulas produzidas nas três condições ovarianas e nos dois períodos estudados representada pela quantidade total de células viáveis e a porcentagem de morte celular através da análise da fragmentação do DNA, como indicadores de qualidade embrionária no terceiro dia de cultivo embrionário *in vitro*.

A quantidade de células por embrião no terceiro dia de cultivo embrionário não foi diferente significativamente quando comparados os dois períodos e as três condições ovarianas. Pôde-se verificar que as condições de cultivo e o meio de cultivo *in vitro* utilizados até esta fase de desenvolvimento embrionário foram eficazes na manutenção da qualidade embrionária.

O número médio de células viáveis com núcleo normal (VN) também não foi diferente entre os seis grupos (inativo, luteal e folicular nos dois períodos); assim como não houve diferenças entre as porcentagens de células viáveis.

As taxas de fragmentação de DNA observadas em todos os grupos estudados foram sempre inferiores a 10,48% das células totais, indicando a baixa frequência de ocorrência de morte celular. Porcentagem semelhante pôde ser verificada no experimento desenvolvido por Ponchirolli (2006), que realizou a mesma avaliação em mórulas provenientes de oócitos bovinos cultivados *in vitro*, obtendo taxas de fragmentação de DNA sempre inferiores a 15%.

As mórulas obtidas no terceiro dia de cultivo foram avaliadas utilizando uma solução corante composta por acridina *orange* e iodeto de propídeo. Essa coloração se mostrou eficiente para embriões felinos em estágio inicial de desenvolvimento, possibilitando tanto a contagem do número de células, quanto à avaliação da viabilidade celular e integridade nuclear. Zakeri e Lockshin (2002) já haviam verificado a eficiência dessa coloração na avaliação

de fragmentação de DNA em embriões bovinos em estágio inicial de desenvolvimento.

Não há relato na literatura de estudos que utilizaram a acridina *orange* para avaliação dos índices de fragmentação de DNA em embriões felinos, portanto o método empregado nesse trabalho foi uma adaptação de uma coloração utilizada para verificar índice de apoptose em embriões bovinos em estágios iniciais de desenvolvimento (PONCHIROLLI, 2006) que se baseou em uma técnica descrita previamente para determinação da taxa de apoptose em linfócitos de ratos (COLIGAN et al., 1992).

Uma desvantagem dessa técnica de coloração em relação a outras técnicas, como o teste cometa ou TUNEL é que esta não permite a avaliação de embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento, como blastocistos. Com o desenvolvimento do embrião, os blastômeros aumentam em quantidade e diminuem em tamanho, tornando difícil a avaliação da morfologia nuclear sob microscópio de fluorescência, cujo aumento atingia 1000 x.

As taxas de fragmentação de DNA foram baixas e esses resultados coincidem com os obtidos por Frei et al. (1989), que já haviam demonstrado que a apoptose é observada em embriões bovinos após o estágio de oito a 16 células, mórulas e blastocistos. Matwee et al. (2000) mostraram que a apoptose não é observada em zigotos (dois pró-núcleos) e embriões de duas ou três a sete células. Além disso, a porcentagem de núcleos com fragmentação de DNA diminui na fase de mórula, mas aumenta novamente durante a fase de blastocisto no caso de embriões bovinos (BYRNE et al., 1999).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Questiona-se muito se a maioria dos oócitos é capaz de completar o processo de maturação citoplasmática, um pré-requisito crucial para a ativação oocitária, fertilização e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (EPPIG, 1996). Alguns processos relacionados à maturação citoplasmática são utilizados na espécie felina, dentre eles a determinação da quantidade de glutatona e a descondensação citoplasmática (POPE et al.,

1993), a distribuição de grânulos corticais (ROTH et al., 1994) e a formação de pronúcleos (SCHRAMM e BAVISTER, 1995).

Nas condições descritas neste estudo verificaram-se características ultra-estruturais pela microscopia eletrônica de transmissão, capazes de diferir oócitos não maturados de oócitos maturados *in vitro*, bem como peculiaridades capazes de caracterizar as três condições ovarianas – inativa, luteal e folicular. Não foram observadas, entretanto, diferenças de características de maturação citoplasmática nos dois períodos estudados.

Um dado relevante é que as taxas de maturação *in vitro* obtidas neste experimento não diferiram quando foram comparados COC provenientes de ovários das três condições ovarianas – inativa, luteal e folicular, entretanto foram visualizadas diferenças marcantes com relação às características citoplasmáticas ultra-estruturais nessas três condições. Ressalta-se que COC não maturados apresentaram características peculiares ao estado de imaturidade e que COC que sofreram maturação *in vitro* puderam ser caracterizados como tal baseando-se nas características de maturação citoplasmática descritas para COC de outras espécies e de felídeos selvagens.

Por outro lado, as taxas de clivagem, formação de mórula e produção de blastocistos diferiu entre os dois períodos, sem se alterar nas três condições ovarianas. Sabe-se que a maturação nuclear e citoplasmática em felinos domésticos pode ser assíncrona (SPINDLER e WILDT, 1999), como descrito para outras espécies (GROSS et al., 1996; GOUDET et al., 1997; SINGH et al., 1997).

Durante os dois períodos, algumas características foram comuns aos três tipos de oócitos maturados *in vitro*; entretanto, algumas diferenças entre eles são bem visíveis. Aglomerados de mitocôndrias não foram mais observados; tendo havido migração em direção à região central do ooplasma e os grânulos corticais estavam presentes em pequeno número na região periférica dos COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição inativa, dos COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição folicular e dos COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição luteal, embora eles pudessem ser observados em número ainda menor na região central do ooplasma dos COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição folicular.

Nos COC maturados, os complexos de Golgi foram observados perifericamente e não eram tão desenvolvidos como nos COC não maturados. Ademais *gap junctions* não foram observadas em COC maturados. O EPV era menor nos oócitos não maturados do que nos maturados.

A quantidade de microvilosidades nos COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição inativa era similar à dos COC não maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição inativa. Esse achado também pôde ser verificado nos COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição luteal e nos COC não maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição luteal.

As gotas de lipídio e vesículas dos COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição inativa não estavam presentes na região periférica do ooplasma como puderam ser observadas nos COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição folicular e dos COC maturados *in vitro* provenientes de ovários na condição luteal.

Interessantemente, COC maturados *in vitro* durante o período II apresentaram menor quantidade de grânulos corticais na periferia quando comparados àqueles não maturados, diferentemente do descrito para outras espécies (CRAN, 1985; HYTTEL et al., 1986, 1988; GRØNDAHL et al., 1995) e até mesmo para o tigre (GJØRRET et al., 2002).

A ampla variedade de características ultra-estruturais citoplasmáticas presentes nos COC provenientes das três condições ovarianas aqui estudadas demonstra que pode não existir uma clara correlação entre a morfologia do COC avaliado sob lupa estereomicroscópica e seu real estágio de maturação.

Deve-se levar em consideração que a competência meiótica e o desenvolvimento embrionário também estão relacionados a outros fatores, como a síntese de proteínas específicas e um pronunciado aumento na atividade kinase que inicia uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações (AVERY et al., 1998).

Como já mencionado nos resultados, os embriões produzidos *in vitro* sofreram degeneração devido a problemas em seu processamento, dessa forma, não foram feitas comparações dessas estruturas produzidas nos dois períodos nem nas três condições ovarianas mencionadas anteriormente.

Entretanto, um estudo que avaliou as características ultra-estruturais de COC de tigre Siberiano (GJØRRET et al., 2002) descreveu a presença de gotas citoplasmáticas e alta fragmentação celular presente no espaço perivitelínico como características próprias da espécie, o que também foi constatado nos embriões degenerados de gato doméstico. Nesse estudo de 2002, os autores relataram que as células embrionárias apresentavam múltiplos núcleos, porém apenas um nucléolo, evidenciando fragmentação nuclear. Além disso, Gjørret et al. (2002) observaram que os embriões de tigre Siberiano resultantes de CIV apresentavam alta variabilidade morfológica. Disso depreende-se que novos estudos devem ser realizados para averiguação das características ultra-estruturais de embriões felídeos produzidos *in vitro* e que devem ser comparados àqueles produzidos *in vivo*, numa tentativa de evidenciar possíveis falhas e deficiências durante o cultivo *in vitro*.

Conclusões

1. Os períodos I e II influenciaram as taxas de recuperação oocitária que foram superiores durante o período II.
2. Os períodos I e II não influenciaram as taxas de maturação *in vitro* na espécie felina, que foram da ordem de 75% em ambos os períodos.

3. Os períodos I e II influenciaram as taxas de clivagem, formação de mórula e produção de blastocistos, que foram superiores no período II.
4. As condições ovarianas – inativa, luteal e folicular, não tiveram influência sobre as taxas de recuperação oocitária, sobre as taxas de maturação *in vitro* e nem sobre as taxas de clivagem, formação de mórula e produção de blastocistos.
5. Não houve influência da sazonalidade e da condição ovariana sobre a qualidade embrionária *in vitro* até a fase de mórula, apresentando resultados satisfatórios durante os períodos I e II, com taxas não inferiores a 89,52% de células viáveis pela avaliação feita com acridina *orange* e iodeto de propídeo.
6. COC provenientes de ovários na fase inativa, luteal e folicular apresentaram diferentes características de maturação citoplasmática *in vitro* pela microscopia eletrônica de transmissão.

Bibliografia

Bibliografia*

ANDREWS, J.C.; HOWARD, J.G.; BAVISTER, B.D.; WILDT, D.E. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with salt-stored zona pellucida penetration assay. **Mol. Reprod. Dev.**, v.31, p.200-207, 1992.

AVERY, B.; HAY-SCHMIDT, A.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Embryo development, oocyte morphology, and kinetics of meiotic maturation in bovine oocytes exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. **Mol. Reprod. Dev.**, v.50, p.334–344, 1998.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, V. 47, P. 1322, 1997.

BOGLIOLO, L.; LEONI, G.; LEDDA, S.; NAITANA, S.; ZEDDA, M.; CARLUCCIO, A.; PAU, S. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p.955-967, 2001.

BROWER, P.T.; SCHULTZ, R.M. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. **Dev. Biol.**, v.90, p.144–153, 1982.

BROWN, J.; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H. Reproductive patterns in male and female Pallas' cats determined by fecal steroid metabolite analysis. **Biol. Reprod.**, v.56, n.1, p.88, 1997.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol. Reprod.**, v.43, p.543–547, 1990.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J; BRISON, D.R; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **J. Reprod. Fertil.**, 117: 97- 105; 1999.

CARABATSOS, M.J.; SELLITTO, C.; GOODENOUGH, D.A.; ALBERTINI, D.F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. **Dev Biol.**, v.226, p.167–179, 2000.

CHOI, Y.H.; CARNEVALE, E.M.; SEIDEL, G.E. SQUIRE, E.L. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. **Theriogenology**, v.56, p.661–670, 2001.

CLINE, E.M.; JENNINGS, L.L.; SOJKA, N.J. Breeding laboratory cats during artificially induced estrus. **Lab. Anim. Sci.**, v.30, n.6, p.1003-1005, 1980.

COLIGAN, J.E.; KRUISBEEK, A.M.; MARGULIES, D.H.; SHEVACH, E.M.; STROBER, W. Immunological assay for mouse lymphocyte. In: **Current Protocols in Immunology**. Eds. Greene Publishing and Wiley Inter Science, New York, 1992.

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.

CONCANNON, P.W.; HODGSON, B.; LEIN, D. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. **Biol. Reprod.**, v.23, p.11-117, 1980.

CRAN, D.G. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. **J. Reprod. Fertil.**, v.74, p.237–245, 1985.

DRESSER, B.L.; SEHLHORST, C.S.; WACHS, K.B.; KELLER, G.L.; GELWICKS, E.J.; TURNER, J.L. Hormonal stimulation and embryo collection in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 28, p.915-927, 1987.

DUCIBELLA, T.; DUFFY, P.; REINDOLLAR, R.; SU, B. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin – stimulated meiotic maturation and aging *in vivo* . **Biol. Reprod.**, 43: 870- 876, 1990.

EPPIG, J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.8, p.485-489, 1996.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biol. Reprod.**, v.56, p.976–984, 1997.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.99, p.2890-2894, 2002.

ERICKSON, G.F.; DANFORTH, D.R. Ovarian control of follicle development. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.172, p.736-747, 1995.

FABIAN, D.; KOPPEL, J.; MADDUX-HYTTEL, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, v.64, p. 221-31, 2005.

FAGBOHUN, C.F.; DOWNS SM. Metabolic coupling and ligand-stimulated meiotic maturation in the mouse oocyte-cumulus cell complex. **Biol. Reprod.**, v.45, p.851–859, 1991.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.375-387, 2000.

FIRST, N.L; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.; SIRARD, M. Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. In: Meiotic inhibition: **Molecular control of meiosis**. Philadelphia, PA, Alan R Liss Inc, 1- 46, 1988.

FREI, R.E.; SCHULTZ, G.A.; CHURCH, R.B. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16 cell stage of embryogenesis in the cow. **J. Reprod. Fertil.**, 117: 97- 105; 1989.

FREISTEDT, P.; STOJKOVIC, M.; WOLF, E. Energy status of nonmatured and *in vitro*-matured domestic cat oocytes and of different stages of *in vitro*-produced embryos: enzymatic removal of the zona pellucida increases

adenosine triphosphate content and total cell number of blastocysts. **Biol. Reprod.**, v. 65, p.793-798, 2001a.

FREISTEDT, P.; STOJKOVIC, M.; WOLF, E. Efficient *in vitro* production of cat embryos in synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. **Biol. Reprod.**, v. 65, p.9-13, 2001b.

GÓMEZ, M.C.; POPE, E.; HARRIS, R.; MIKOTA, S.; DRESSER, B.L. Development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. **Theriogenology**, v.60, p.239-251, 2003.

GÓMEZ, M.C.; POPE, C.E.; DRESSER, B.L. Nuclear transfer in cats and its application. **Theriogenology**, v.66, p.72-81, 2006.

GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; WILDT, D.E. Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol-17 and progesterone profiles in domestic cats (*Felis catus*) at natural or induced oestrus. **J. Reprod. Fertil.**, v.82, p.553-561, 1988.

GOODROWE, K.L.; HAY, M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.40, p.967-975, 1993.

GOODROWE, K.L.; WALKER, S.L.; RYCKMAN, D.P.; MASTROMONACO, G.F.; HAY, M.A.; BATEMAN, H.L.; WADDELL, W.T. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.389-403, 2000.

GJØRRET, J.O.; CRICHTON, E.G.; LOSKUTOFF, N.M.; ARMSTRONG, D.L.; HYTTEL, P. Ultrastructure of oocyte maturation, fertilization, and early embryo development *in vitro* in the Siberian tiger (*Panthera Tigris Altaica*). **Mol. Reprod. Dev.**, v.63, p.79-88, 2002.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; GERARD, N.; PALMER, N. Equine oocyte competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.39, p.355-372, 1997.

GRAHAM, L.H.; SWANSON, W.F.; WILDT, D.E.; BROWN, J.L. Influence of oral melatonin on natural and on gonadotropin-induced ovarian function in domestic cat. **Theriogenology**, v.61, p., 1061-76, 2004.

GRØNDAHL, C.; HYTTEL, P.; GRØNDAHL, M.L.; ERIKSEN, T.; GOTFREDSEN, P.; GREVE, T. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. **Mol. Reprod. Dev.**, v.42, p.94–105, 1995.

GROSS, V.; DUBEY, A.; PENZIAS, A.S.; LAYMAN, L.; REINDOLLAR, R.; DUCILLA, T. Biochemical study of individual zonae from human oocytes that failed to undergo fertilization in intracytoplasmic sperm injection. **Mol. Hum. Reprod.**, v.2, p.959-965, 1996.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Mol. Hum. Reprod**, v.3, p.919- 925, 1997.

HERRICK, J.R.; SWANSON, W.F. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, p.1503-1513, 2003.

HERRON, M.A. Feline Reproduction. **Vet. Clin. North Am.**, v.7, p.715-722, 1977.

HOWARD, J.G.; DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; WILDT, D.E. Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. **Biol. Reprod.**, v.49, p.131-139, 1993.

HOWARD, J.G. **Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores**. In: FOWLER, M.E., MILLER, R.E. Zoo & wild animal medicine, vol. 4. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1999

1999. p. 449–57.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H.G.; KAUFMANN, P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. **Anat. Embryol. Berl.**, v.200, p. 1-18, 1999.

HURNI, H. Daylength and breeding in the domestic cat. **Lab. Anim.**, v.15, p.229-233, 1981.

HYTTEL, P.; XU, K.P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v.78, p.615–625, 1986.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23–32, 1997.

IZADYAR F, ZEINSTRA E AND BEVERS MM (1998) Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, p.339–345, 1998.

JEWGENOW, K.; WOOD, T.C.; WILDT, D.E. DNA degradation in mural granulosa cells of non- and slightly atretic follicles of fresh and cold-stored domestic cat embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 48, 350-355, 1997.

JOHNSTON, L.A.; O'BRIEN, E.; WILDT, D.E. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. **Gamete Res.**, v.24, p.343-356, 1989.

JOHNSTON, L.A.; ARMSTRONG, D.L.; BROWN, J.L. Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (*Panthera uncia*). **J. Reprod. Fertil.**, v.10, p.29-236, 1994.

JOHNSTON, S.D.; ROOT-KOOSTRITZ, M.V.; OLSON, P.N.S. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 2001. 592p.

JURISCOVA, A; VARMUZA, S; CASPER, R.F. Programmed cell death and human embryo fragmentation. **Mol. Hum. Reprod**, v. 2, p. 93- 98; 1996.

JURISCOVA, A; ROGERS, I; FASCIANI, A; CASPER, R.F; VARMUZA, S. Effects of maternal age and conditions of fertilization on programmed cell death during murine preimplantation embryo development. **Mol. Hum. Reprod**, v.4, p.139- 145; 1998.

KANDA, M.; OIKAWA, H.; NAKAO, H.; TSUTSUI, T. Early embryonic development *in vitro* and embryo transfer in the cat. **J. Vet. Med. Sci**, v.57, n.4, p.641-646, 1995.

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. Vet. Med. Sci.**, v.60, n4, p.423-431, 1998.

KARJA, N.W.K.; OTOI, T.; WONGSRIKEAO, P.; SHIMIZU, R.; MURAKAMI, M.; AGUNG, B.; FAHRUDIN, M.; NAGAI, T. *In vitro* development and post-thaw survival of blastocysts derived from delipidated zygotes from domestic cats. **Theriogenology**, v.65, p.415-423, 2006a.

KARJA, N.W.K.; 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 nuclear cell transfer. **Theriogenology**, v.66, p.1237-1242, 2006b.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; RYŃSKA, 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.

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

KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v.49, p.103–114, 1998.

LENGWINAT, T.; BLOTTNER, S. *In vitro* fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v.35, p.291-301, 1994.

LEVY, R. Genetic regulation of preimplantation embryo survival. **Int. Rev. Cytol.**, v.210, p.1-37, 2001.

LEYVA, H.; MADLEY, T.; STABENFELDT, G.H. Effect of melatonin on photoperiod responses, ovarian secretion of oestrogen, and coital responses in the domestic cat. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 39, p.135-142, 1989.

LOFSTEDT, R.M. The estrous cycle of the domestic cat. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.**, v.4, p.52-58, 1982.

LONG, C.R.; WALKER, S.C.; TANG, R.T.; WESTHUSIN, M.E. New commercial opportunities for advanced reproductive technologies in horses, wildlife, and companion animals. **Theriogenology**, v.59, p.139-149, 2003.

LOPES, M.D. **Análise histológica, ultra-estrutural e avaliação da maturação nuclear de oócitos de gatas domésticas (*Felis catus*)**. 2002. 138f. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

LOUTRADIS, D.; DRAKAKIS, P.; KALLIANIDIS, K.; MILINGOS, S.O.; DENDRINOS, S.; MICHALAS, S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. **Fertil. Steril.**, v.72, p.240-244, 1999.

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. Culture strategies for maturation of carnivore oocytes. **Theriogenology**, v.66, suplement.6-7, p.1471-1475, 2006.

MARKKULA, M.; MAKAREVICH, A.V. Insulin-like growth factor-I increases the ratio of proliferating cell nuclear antigen positive cells of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p.432 (abstract), 2001.

MARTINS, L.R.; CARNICELLI, P.; LOPES, M.D.; LANDIM-ALVARENGA, F.C., VILLAYERDE, A.I.S.B.; TACONELLI, C.A. Comparación entre dois medios utilizados na selección de espermatozoides provenientes del epididimo e ducto deferente de gatos domésticos normospermicos (*Felis catus*). **CD-ROM. VI Panvet** - Santiago, Chile, 2006a.

MARTINS, L.R.; FERNANDES, C. B.; DORES, C.B.; LIMA NETO, J. F.; BLANCO, I. D. P.; DERUSSI, A. A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; LOPES, M. D. Maduração *in vitro* de oócitos de gatas domésticas adultas e pré-púberes por períodos de 12, 24, 36 e 48 horas. **Anais do VI Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**, 218, 2006b.

MARTINS, L.R.; FERNANDES, C.B.; CARNICELLI, P.; LOPES, M.D.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; TACONELLI, C.A. Comparación de la eficacia de la maduración *in vitro* de los oócitos de las gatas domesticas después de 30 y 36 horas. **CD-ROM. VI Panvet** - Santiago, Chile, 2006c.

MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor- I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. **Theriogenology**, v.48, p.605-16, 1997.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zigote**, 8: 57- 68; 2000.

MATZUK, M.M.; BURNS, K.H.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v.296, p.2178–2180, 2002.

MÉDURI, G.; CHARNAUX, N.; DRIANCOURT, M.A.; COMBETTES, L.; GRANET, P.; VANIER, B.; LOOSFELT, H.; MILGROM, E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? **J. Clin. Endocr. Metab.**, v.87, p.2266-2276, 2002.

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**, in press, 2008.

MIGAKI, G. Compendium of inherited metabolic diseases in animals. In: MIGAKI, G., DESNICK, R.J., PATTERSON, D.F. **Animal models of inherited metabolic diseases**. New York: Alan R. Liss, 1982, p.473-501.

MORAIS, R.N.; MUCCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L.H.; SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. Seasonal analysis of seminal characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.2027-2041, 2002.

MORATO, R.G.; VERRESCHI, I.T.N.; GUIMARAES, M.A.B.V.; CASSARO, K.; PESSUTI, C.; BARNABE, R.C. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v.61, p.1273-1281, 2004.

MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. Tese (Doutorado) 2001. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001

MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; MORAES, W.; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; PASQUALI, O.L.; GOMES, M.L.F.; MORAIS, R.N.; WILDT, D.E.; BROW, J.L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo. Biol.**, v.20, p.103-116, 2001.

NAGANO, M.; UCHIKURA, K.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M. Effect of duration of *in vitro* maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes. **Theriogenology**, in press, 2008.

NAOI, H.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; SHIMAMURA, T.; KARJA, N.W.K.; AGUNG, B.; SHIMIZU, R.; TANIGUCHI, M.; NAGAI, T. Developmental competence of cat oocytes store at various temperature for 24 h. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, p.271-277, 2007.

NEUBER, E; LUETJENS, C.M; CHAN, A.W.S; SCHATTEN, G.P. Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, 57: 2193- 2202; 2002.

O'NEIL, C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v. 58: 1303-9, 1998.

PATSOULA, E.; LOUTRADIS, D.; DRAKAKIS, P.; KALLIANIDIS, K.; BLETSA, R.; MICHALAS, S. Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v.121, p.455-461, 2001.

PATSOULA, E.; LOUTRADIS, D.; DRAKAKIS, P.; MICHALAS, L.; BLETSA, R.N.; MICHALAS, S. Messenger RNA expression for the follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor in human oocytes and preimplantation-stage embryos. **Fert. Ster.**, v.79, n.5, p.1187-1193, 2003.

PAZ, R.C.R. **Bioteecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos**

selvagens: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*. 2004. 148f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

POPE, C.E.; GELWICKS, E.J.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. *In vitro* fertilization in domestic and nondomestic cats including sequences of early nuclear events, *in vitro* development, cryopreservation and successful intra and interspecies embryo transfer. **J. Reprod. Fertil.**, v.47, p.189-201, 1993.

POPE, C.E.; MCRAE, M.A.; PLAIR, B.L.; 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. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.51, p.69-82, 1997.

POPE, C.E.; SCHMID, R.; O'BRIEN, E.; DRESSER, B.L. *In vitro* development of domestic cat embryos after recovery of oocytes from ovaries either freshly collected or stored 24 h at 4°C. **Biol. Reprod.**, v.60, n.1, p.69-82, 1999a.

POPE, C.E.; SCHMID, R.; DRESSER, B.L. *In vitro* development of domestic cat embryos produced by *in vitro* fertilization is enhanced by addition of cysteine to the maturation medium and a reduced O₂ atmosphere. **Theriogenology**, v.51, p.291, 1999b.

POPE, C.E.; GOMEZ, M.C.; DRESSER, B.L. *In vitro* embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 5., 2004, São Paulo. **Abstracts...** São Paulo, 2004. p.108-109.

ROTH, T.L.; WOLFE, B.A.; LONG, J.A.; HOWARD, J.; WILDT, D.E. Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and

laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. **Biol. Reprod.**, v.57, p.165-171, 1997.

SEAL, U.S.; TILSON, R.L.; PLOTKA, E.D.; REINDL, N.J.; SEAL, M.F. Behavioral indicators and endocrine correlates of estrus and anestrus in Siberian Tigers. In: TILSON, R.L.; SEAL, U.S. (Eds.) **Tigers of the World**. Park Ridge: Noyes Publications, p.244-254, 1987.

SHILLE, V.M.; LUNDSTROM, K.E.; STABENFELDT, G.M. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol 17- β concentrations in plasma: Relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. **Biol. Reprod.**, v.21, p.953-963, 1979.

SILVA, A.R.; MORATO, R.G.; SILVA, L.D.M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Anim. Reprod. Sci.**, v.81, p.159-175, 2004.

SIMON, A.M.; GOODENOUGH, D.A.; LI, E.; PAUL, D.L. Female infertility in mice lacking connexin 37. **Nature**, v.385, p.525-529, 1997.

SINGH, B.; MENG, L.; RUTLEDGE, J.M.; ARMSTRONG, D.T. Effects of epidermal growth factor and follicle-stimulating hormone during *in vitro* maturation on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** v.46, p.401-407, 1997.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2001.

SKRZYSZOWSKA, M.; KATSKA, L.; RYŃSKA, B.; KANIA, G.; SMORAG, Z.; PIEŃKOWSKI, M. *In vitro* developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. **Theriogenology**, v.58, p.161-1621, 2002.

SPINDLER, R.E.; WILDT, D.E. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. **Biol. Reprod.**, v.61, p.188-194, 1999.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONCALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biol. Reprod.**, v.64, p.904–909, 2001.

SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.21-34, 2004.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Mol. Reprod. Dev.**, v.61, p.414–424, 2002.

TEBET, J.; LOPES, M.D.; BICUDO, S.D.; PRESTES, N.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Sazonalidade reprodutiva em gatas domésticas – levantamento retrospectivo de ocorrências obstétricas registradas nos arquivos da FMVZ-Botucatu. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.21, n.2, p. 27-29, 1997.

TSUJIOKA, T.; OTZDORFF, B.; BRAUN, J.; HOCHI, S. Effect of post-IVF developmental kinetics on *in vitro* survival of vitrified-warmed domestic cat blastocysts. **Reprod. Dom. Anim.**, in press, 2008.

TSUTSUI, T.; SATO, M.; KURSAWA, N.; HATTORI, I.; MATSUNAGA, H.; MURAO, I.; STABENFELDT, G.H. Embryo transfer in cat during the nonbreeding season. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v.51, p.871-877, 1989a.

TSUTSUI, T.; SKAI, Y.; MATSUI, Y.; SATO, M.; YAMANE, I.; MURAO, I.; STABENFELDT, G.H. Induced ovulation in cats using porcine pituitary gland preparation during the non-breeding season. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v.51, p.677-683, 1989b.

USUI, N.; YANAGIMACHI, R. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. **J. Ultrastruct. Res.**, 57: 289-308, 1976.

VANDERHYDEN, B.C.; ARMSTRONG, D.T. Role of *cumulus* cells and serum on *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes. **Biol. Reprod.**, v.40, p.720-728, 1989.

VANDERHYDEN, B.C.; CARON, P.J.; BUCCIONE, R.; EPPIG, J.J. Developmental pattern of the secretion of *cumulus* expansion enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. **Dev. Biol.**, v.140, p.307-317, 1990.

VANDERHYDEN, B.C.; TELFER, E.E.; EPPIG, J.J. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.46, p.1196–1204, 1992.

VAN BLERKOM, J.; RUNNER, M.N. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. **Am. J. Anat.**, v.171, p.335–355, 1984.

VAN SOON, A.; VAN VLAENDEREN, I.; MAHMOUDZADEH, A.R.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v. 38, p. 905-19, 1992.

VOZZI, C.; FORMENTON, A.; CHANSON, A.; SENN, A.; SAHLI, R.; SHAW, P.; NICOD, P. ; GERMOND, M. ; HAEFLIGER, J.A. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.619-628, 2001.

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. The physiology of reproduction. 2 ed. New York:Raven Press, p.79-115, 1994.

WEBB, R.J.; MARSHALL, F.; SWANN, K.; CARROLL, J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase in mammalian oocytes **Dev. Biol.**, v.246, p.441–454, 2002.

WILDT, D.E.; ROTH, T.L. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. **Int. Zoo Yrbk.**, v.35, p.164–172, 1997.

WOLFE, B.A.; WILDT, D.E. Development of blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized *in vitro* after prolonged cold storage. **J. Reprod. Fertil.**, v.106, p.135-141, 1996.

WOOD, T.; BYERS, A.P.; JENETTE, B.E.; WILDT, D.E. Influence of protein and hormone supplementation on *in vitro* maturation and fertilization of domestic cat eggs. **J. Reprod. Fertil.**

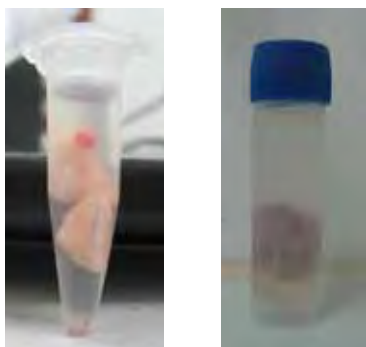


Figura 1 - Transporte dos ovários de gata em microtubos ou criotubos em DPBS.



Figura 2 - Ovários de gata classificados em inativo (a), luteal (b) e folicular (c).



Figura 3 - *Slicing* de ovário de gata para obtenção de complexos *cumulus oophorus*.

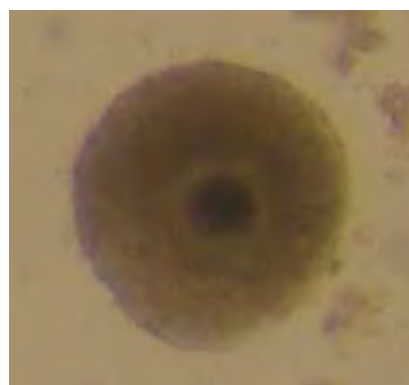


Figura 4 - Complexo *cumulus oophorus* de gata classificado em grau I (Lupa estereomicroscópica, aumento 600x)

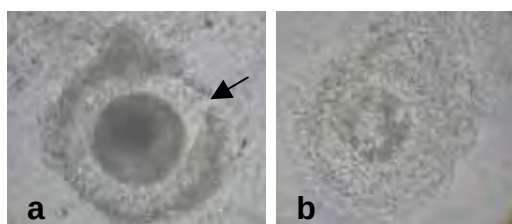


Figura 5 - COC grau II de gata. COC parcialmente circundado por camadas de células do *cumulus* (a). COC com citoplasma heterogêneo (b) (Microscópio de luz, aumento 400x)

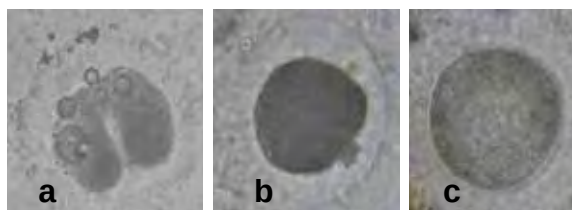
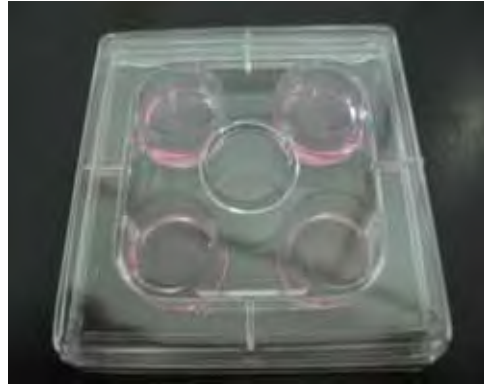
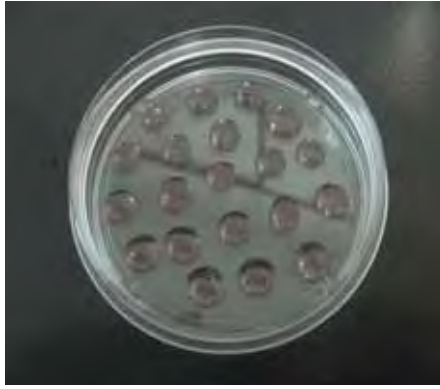


Figura 6 - COC grau III de gata. Citoplasma fragmentado (a); citoplasma com tamanho reduzido e zona pelúcida edemaciada (b) e oócito desnudo (c) (Microscópio de luz, aumento 400x).



Figuras 7 e 8 - Placa de lavagem e placas *four-well* preparadas para maturação *in vitro* de oócitos de gata.

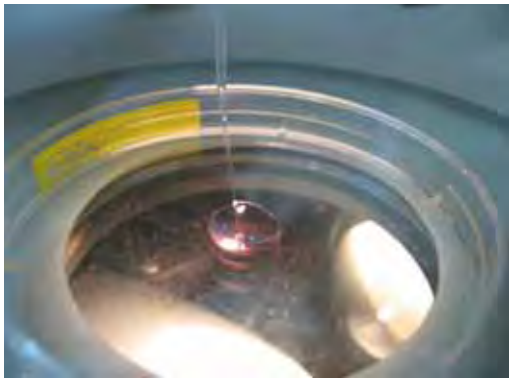


Figura 9 - Remoção mecânica das células do *cumulus oophorus* através de pipetagem.

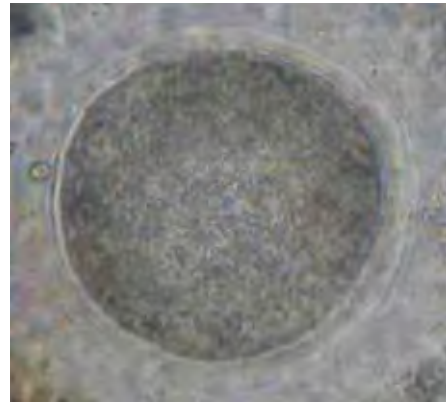


Figura 10 - Aspecto de oócito de gata após remoção mecânica das células do *cumulus oophorus* (Microscópio de luz, aumento 1000x).

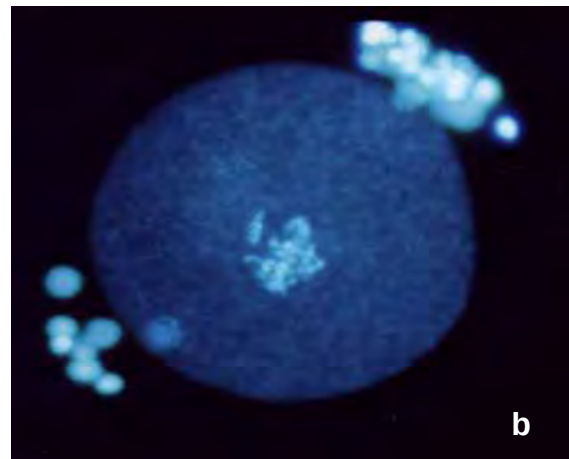
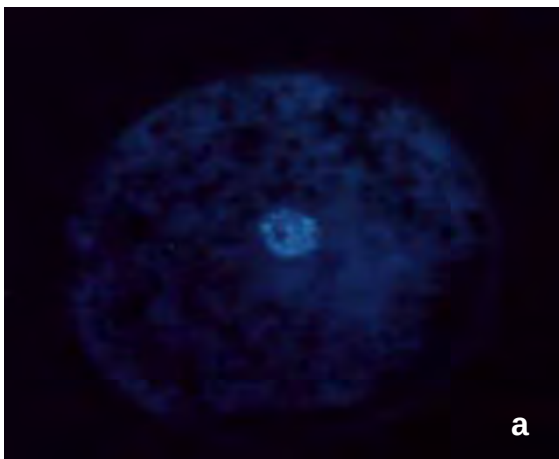


Figura 11 - Oócito de gata vesícula germinativa (VG) **(a)** e em fase de quebra de vesícula germinativa (QVG) **(b)** corados com Hoechst[®] 33342 (Microscópio de fluorescência, aumento 100x).

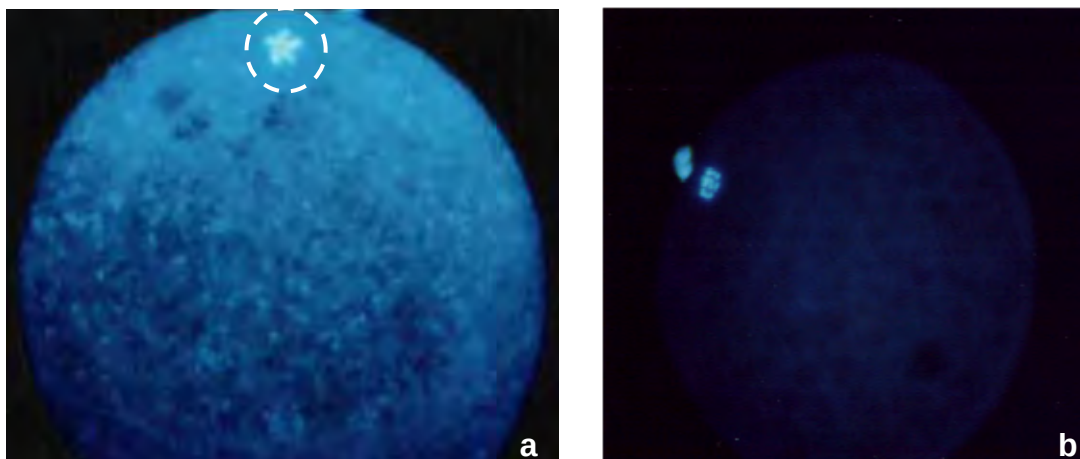


Figura 12 - Oócito de gata classificado em metáfase I **(a)** (aumento 400x) e oócito em metáfase II **(b)** corado com Hoechst® 33342 (Microscópio de fluorescência, aumento 200x).

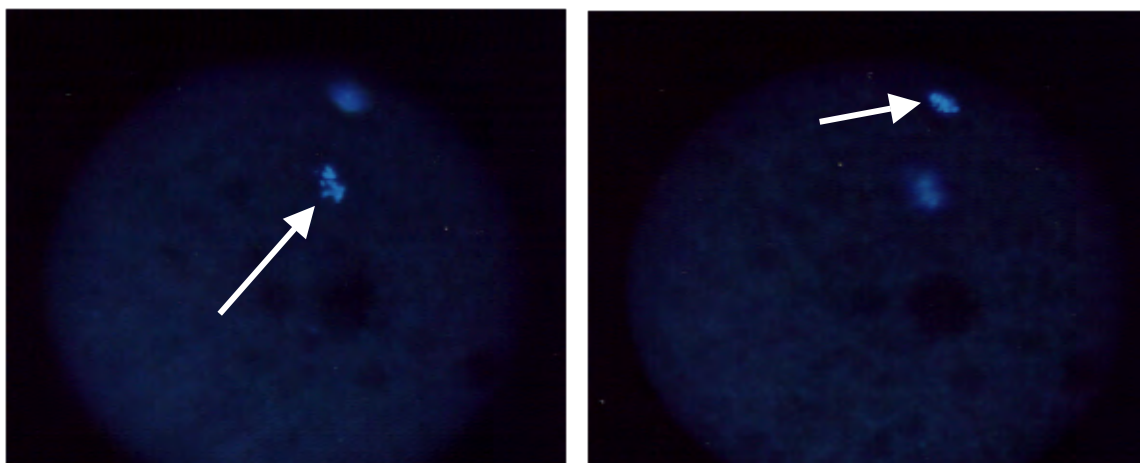


Figura 13 - Oócito de gata em metáfase II corado com Hoechst® 33342. Cromossomos **(setas)** (Microscópio de fluorescência, aumento 400x).



Figura 14 - Oócito de gata classificado como degenerado ou não passível de identificação corado com Hoechst® 33342. (Microscópio de fluorescência, aumento 400x).

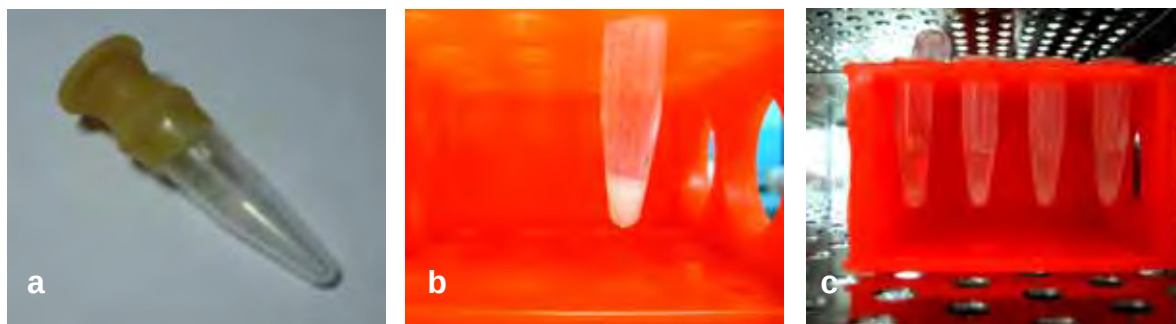


Figura 15: Vagina artificial para coleta de sêmen de gato doméstico **(a)**; tubo contendo sêmen de gato antes da realização do *swim-up* **(b)**; tubos contendo meio e sêmen de gato após o *swim-up* **(c)**.

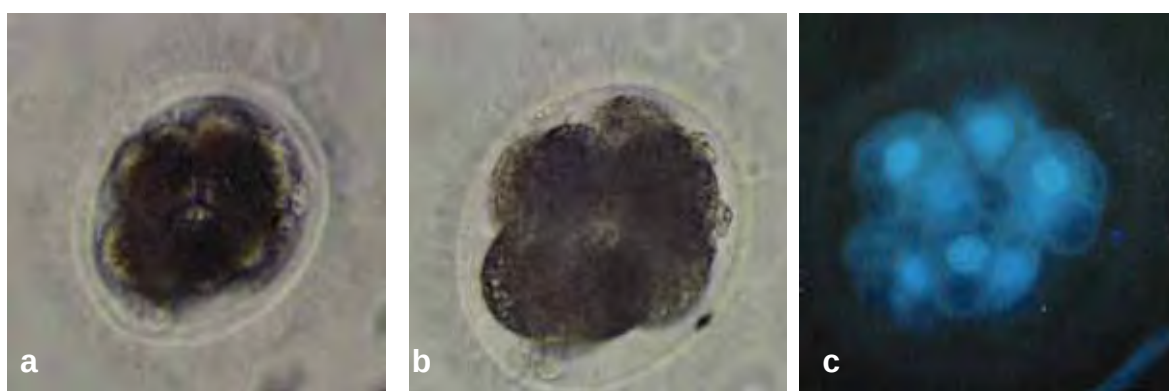


Figura 16 - Oócitos de gata após partenogênese apresentando o aspecto de mórula **(a e b)** (Microscópio de luz, aumentos de 200 e 400x). Oócito de gata corado com Hoechst® 33342 após partenogênese apresentando aspecto de mórula **(c)** (Microscópio de fluorescência, aumento 400x).



Figura 17 - Zigotos de gato doméstico com duas **(seta)** e quatro **(asterisco)** células no primeiro dia de cultivo *in vitro* (D1) obtidos a partir de COC provenientes de ovários em condição luteal (Lupa estereomicroscópica, aumento 60x).

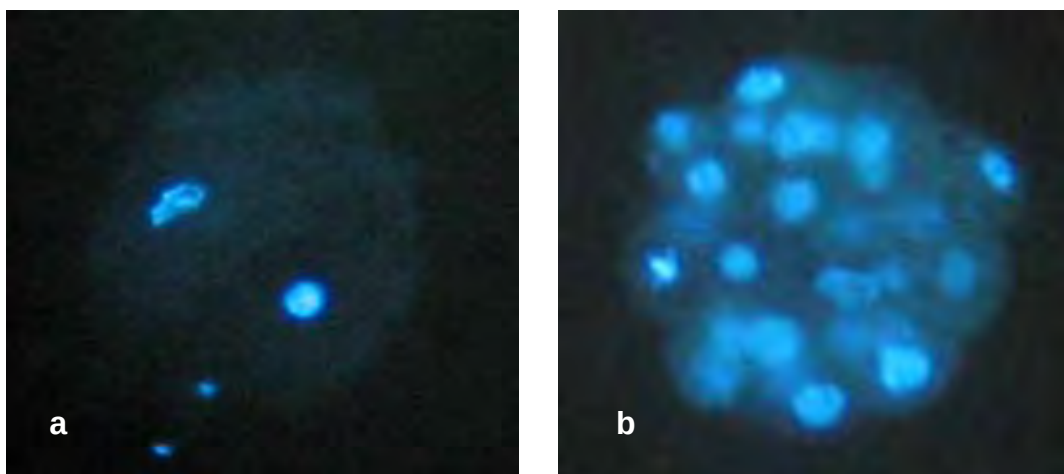


Figura 18 – Embrião de duas células corado com Hoechst® 33342, obtido a partir de COC proveniente de ovário em condição folicular (aumento 400x) **(a)**; embrião com 28 células corado com Hoechst® 33342 obtido a partir de COC proveniente de ovário em condição inativa **(b)** (aumento 400x). Microscópio de fluorescência.

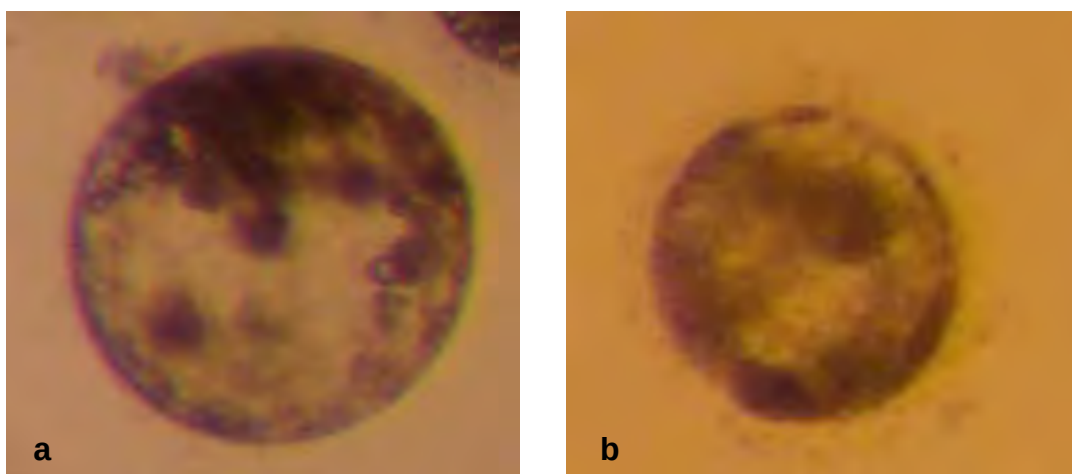


Figura 19 - Blastocisto após 144 horas de cultivo *in vitro* (D6) **(a)**; Blastocisto após 192 horas de cultivo *in vitro* (D8) (aumento 400x). Embrioblasto **(asterisco)**. (aumento 400x). Lupa estereomicroscópica.

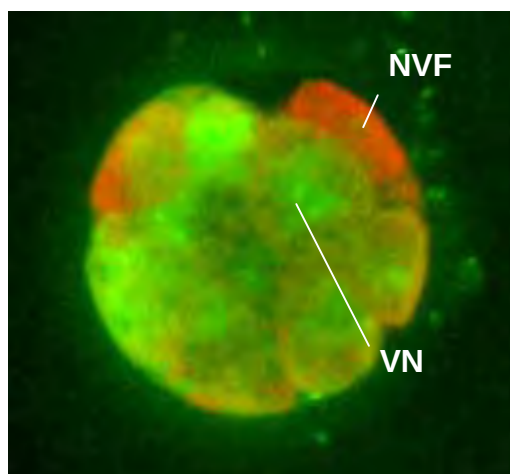


Fig. 20 - Embrião de 8 células obtido a partir de COC proveniente de ovário em condição luteal corado com acridina *orange* e iodeto de propídeo. Células VN (viáveis e normais, com núcleos corados em verde e morfologia normal) e células NVF (não viáveis com núcleo alaranjado e cromatina fragmentada). (aumento 400x). Microscópio de fluorescência.

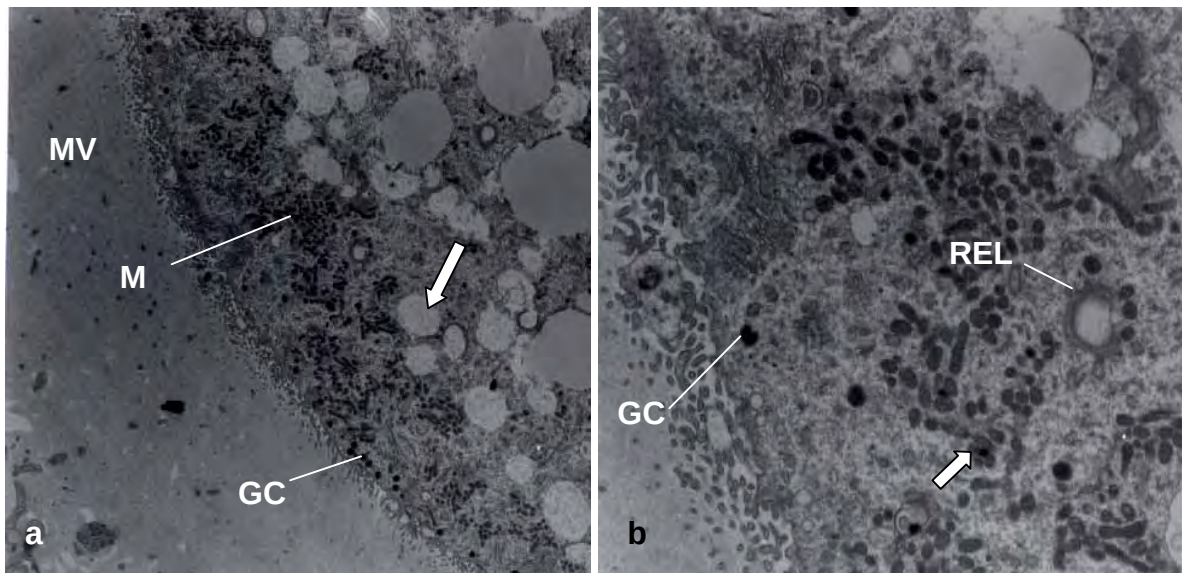


Figura 21 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como inativo (NMI) durante o período I. Grânulos corticais (GC) na periferia, mitocôndrias (M), microvilosidades (MV), gotas de lipídio (GL) e vesículas (**seta**) (aumento 3.306x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como inativo (NMI). Complexo de Golgi (CG), retículo endoplasmático liso (REL) e *nuage* (seta) (aumento 10.070x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

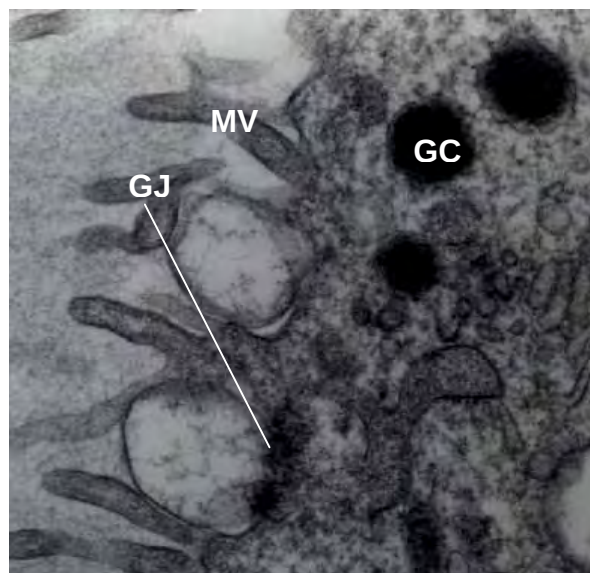


Figura 22 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como inativo (NMI) durante o período I. Junção do tipo *gap* (GJ), microvilosidades (MV) e grânulo cortical (GC) (aumento 43.700x). Microscópio Eletrônico de Transmissão.

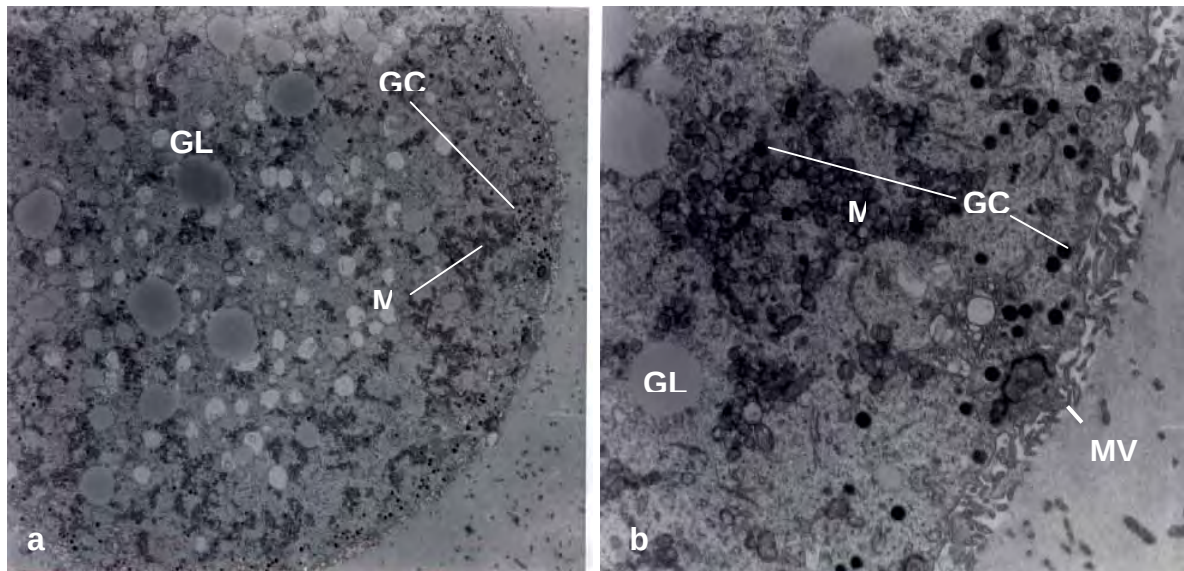


Figura 23 - Vista geral de um COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período I. Grânulos corticais (GC) na periferia, mitocôndrias (M), gotas de lipídio (GL) e vesículas (seta) (aumento 1862x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Mitocôndrias (M), microvilosidades (MV), grânulos corticais (GC) e gotas de lipídio (GL) (aumento 7410x) **(b)**. Microsc. Eletrônico de Transmissão.

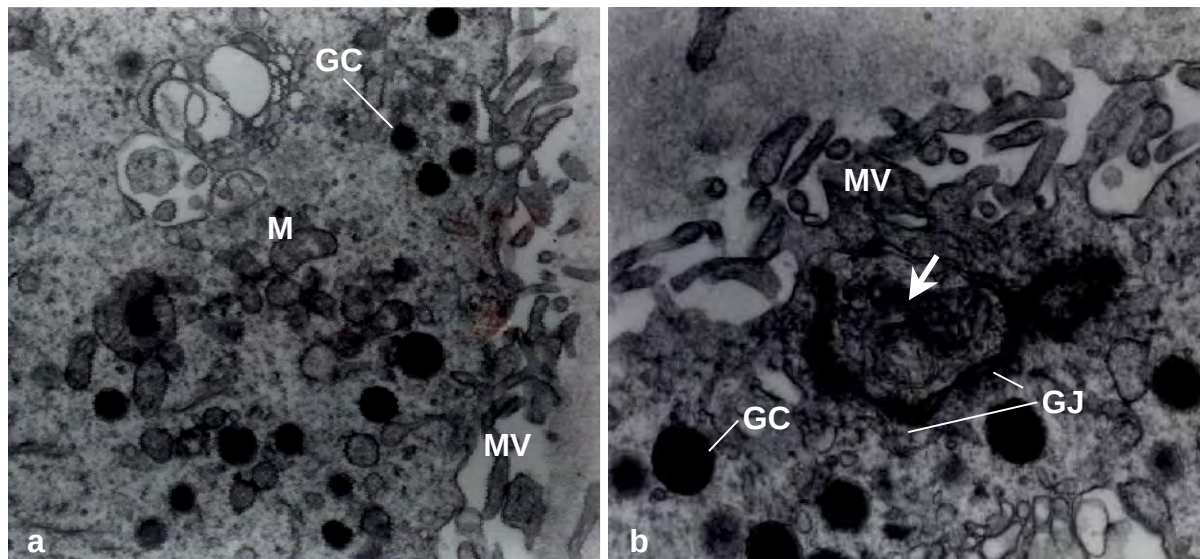


Figura 24 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período I. Mitocôndrias (M), Grânulos corticais (GC) não alinhados e microvilosidades (MV) (aumento 23.940x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Grânulos corticais (GC), junções do tipo *gap* (GJ). Microvilosidades (MV) e projeção de células do *cumulus* (**seta**) (aumento 29.400x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

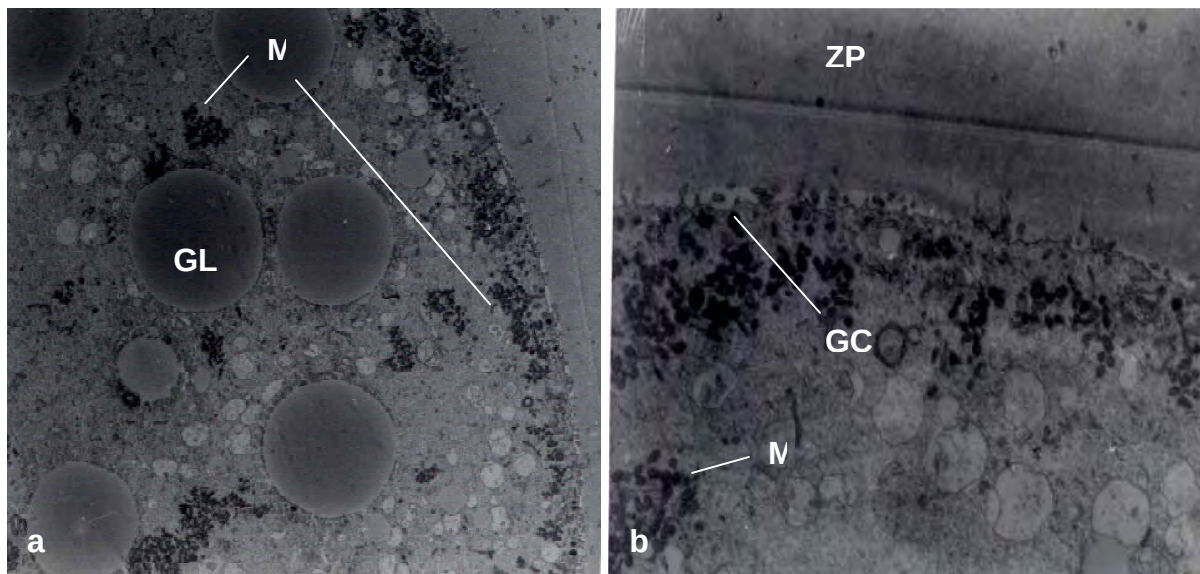


Figura 25 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML) durante o período I. Mitocôndrias (M) e gotas de lipídio (GL) (aumento 2.470x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Zona pelúcida (ZP), grânulo cortical (GC) e mitocôndria (M) (aumento 7.410x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

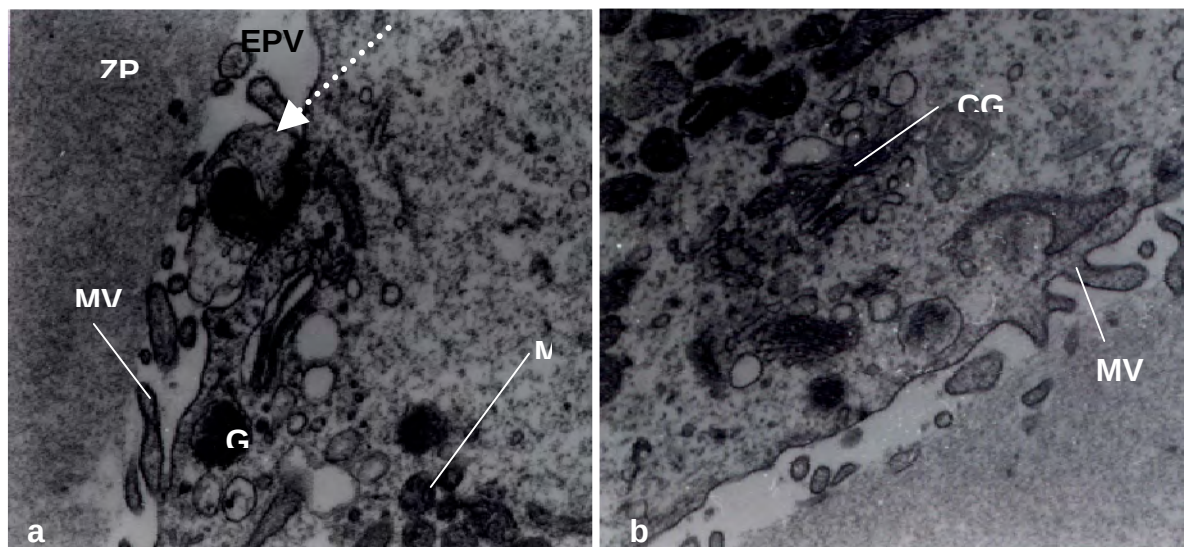


Figura 26 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal durante o período I. Grânulos corticais (GC) na periferia, mitocôndrias (M), zona pelúcida (ZP) microvilosidades (MV), espaço perivitelínico (EPV) e prolongamento da célula do *cumulus* (**seta**) (aumento 31.920x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal. Grânulos corticais (GC) e microvilosidades (MV), zona pelúcida (aumento 31.920x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

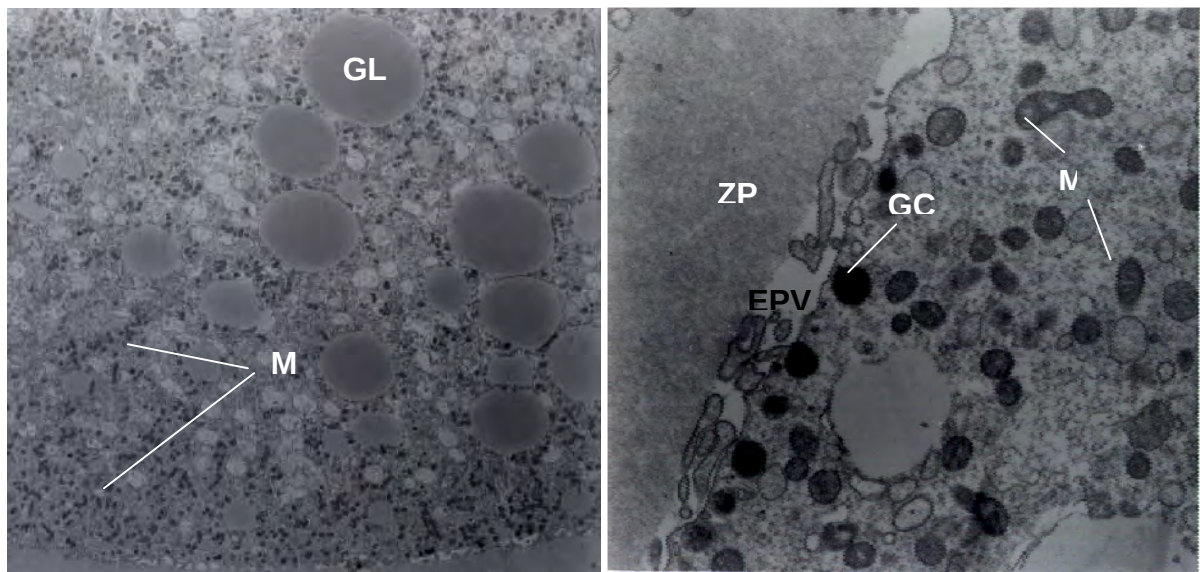


Figura 27 - COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como luteal (MIVL) durante o período I. Mitocôndrias (M) dispersas pelo citoplasma. Gotas de lipídio (GL) (aumento 2.470x) **(a)**. COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como luteal (MIVL). Observar espaço perivitelínico (EPV) reduzido, mitocôndrias (M) grânulos (GC), gota de lipídio (GL) (aumento 17.480x) **(b)**.

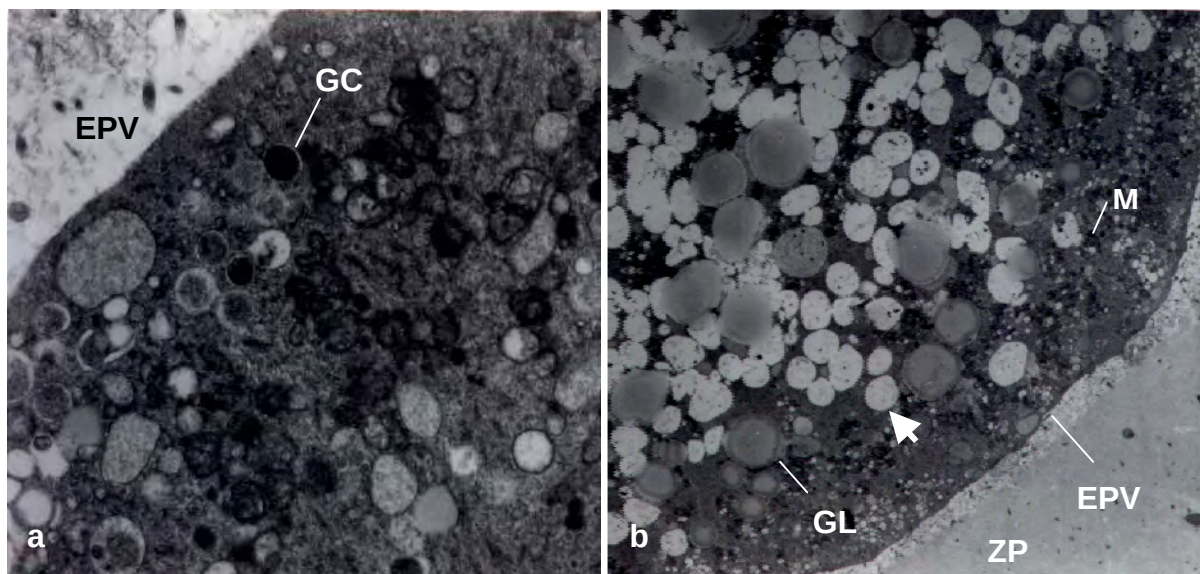


Figura 28 - COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como folicular durante o período I. Grânulos corticais (GC), espaço perivitelínico (EPV) (aumento 17.480x) **(a)**. COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como folicular (MIVF). Espaço perivitelínico (EPV), gotas de lipídio (GL), zona pelúcia (ZP), mitocôndrias (M) e vesículas (seta) (aumento 2.470x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

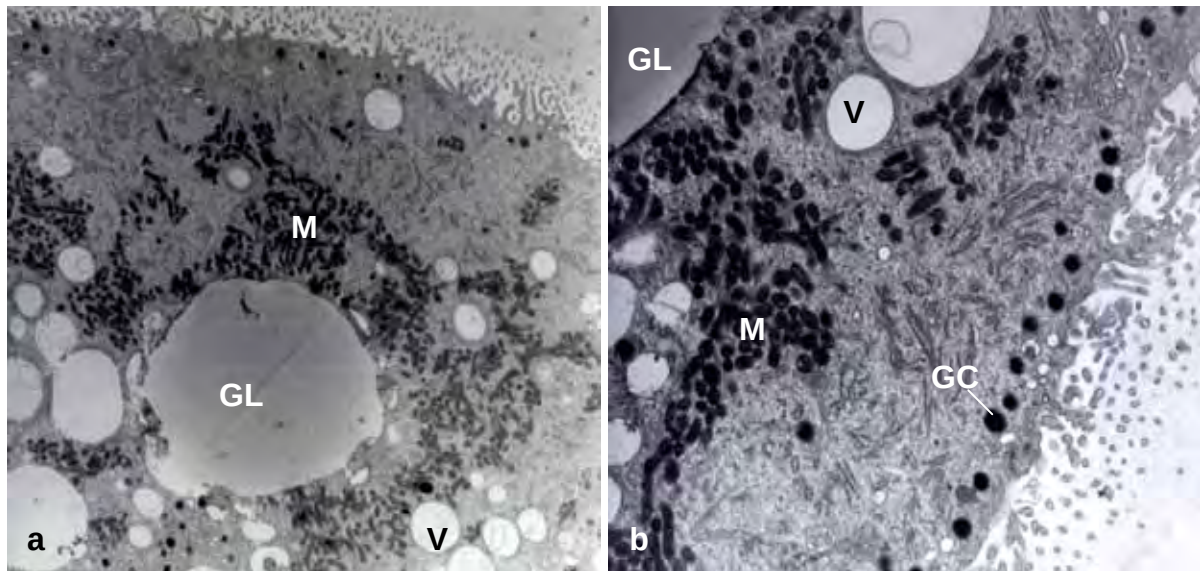


Figura 29 – COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período II. Grânulos corticais (GC) na periferia, mitocôndrias (M) em associação a gotas de lipídio (GL) e vesículas (V) (aumento 5.750x). COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Grânulos corticais (GC) na periferia, mitocôndrias (M), gota de lipídio (GL) e vesículas (V) (aumento 9750x) **(b)**. Microsc. Eletr. de Transmissão.

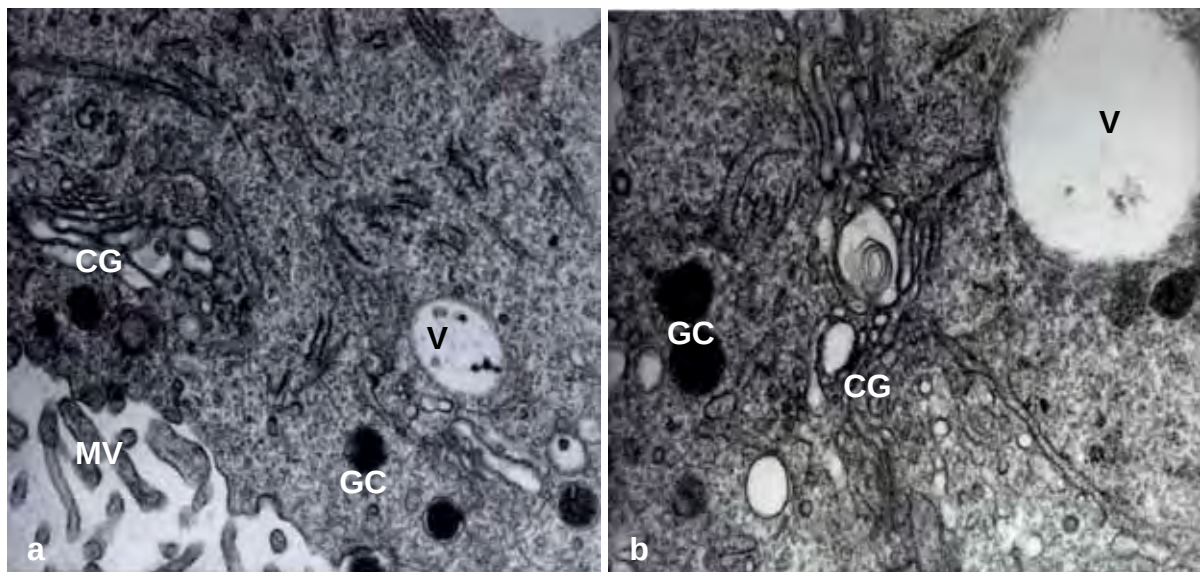


Figura 30 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período II. Grânulo cortical (GC) na periferia, complexo de Golgi (CG), microvilosidades (MV) e vesículas (V) (aumento 31.500x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Grânulos corticais (GC), complexo de Golgi (CG) e vesículas (V) (aumento 42.000x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

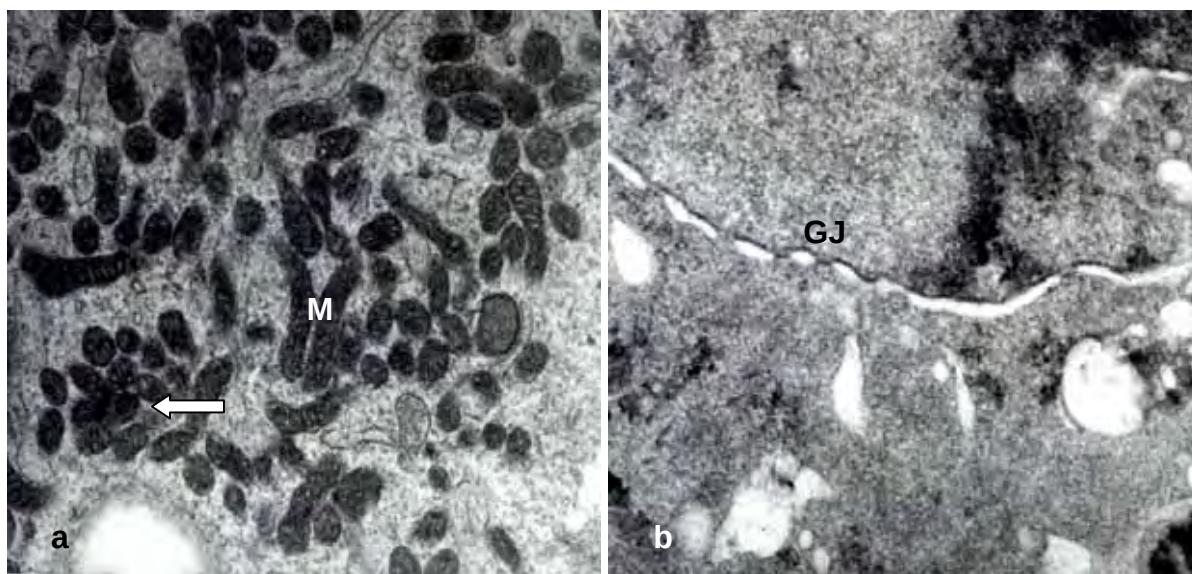


Figura 31 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período II. Mitocôndrias (M) e *nuage* (seta) (aumento 31.500x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como inativo (NMI). *Gap junction* (GJ) (aumento 31.500x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

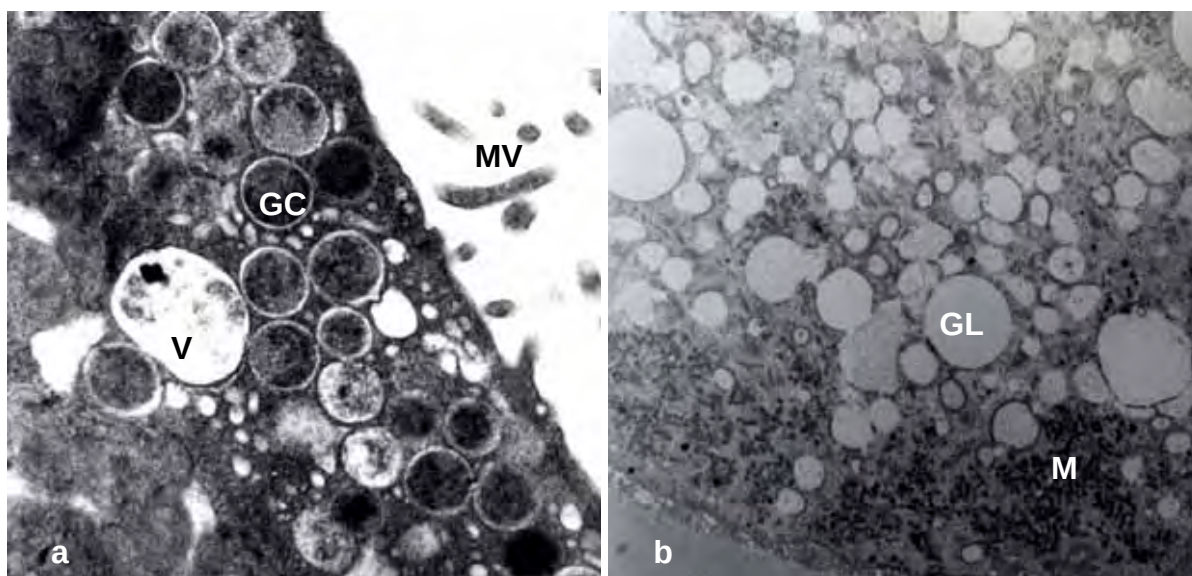


Figura 32 – COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como inativo (NMI) durante o período II. Grânulos corticais (GC) na periferia, microvilosidades (MV) e vesículas (V) (aumento 57.500x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Mitocôndrias (M), gotas de lipídio (GL) (aumento 57.500x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

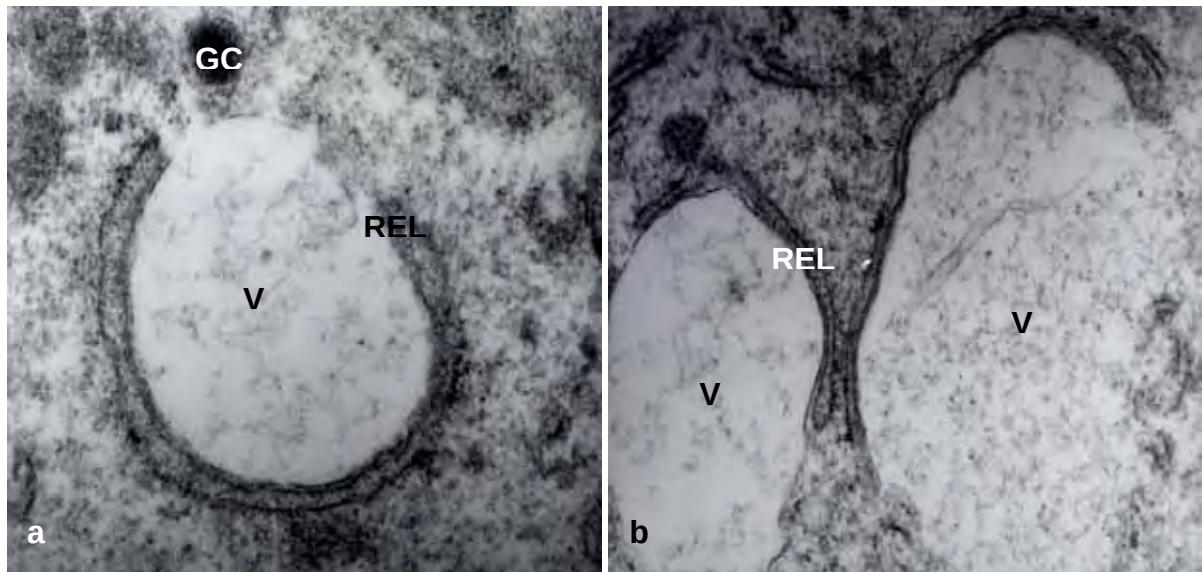


Figura 33 – COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML) durante o período II. Grânulo cortical (GC), vesícula (V) e retículo endoplasmático liso (aumento 57.500x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Retículo endoplasmático liso (REL) e vesícula (V) (aumento 4.350x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

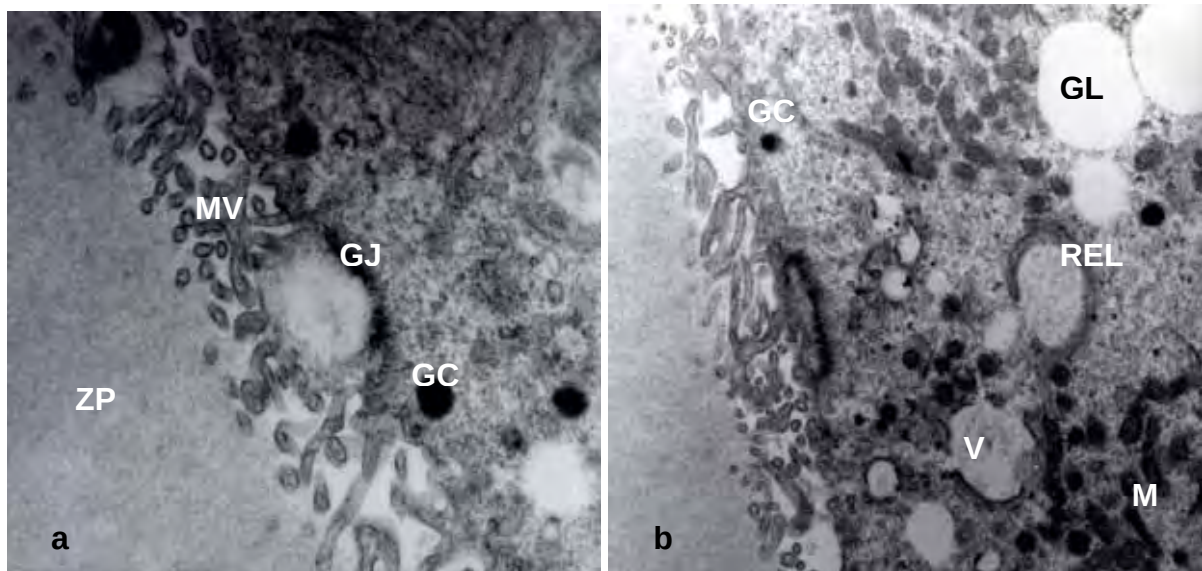


Figura 34 - COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML) durante o período II. Grânulos corticais (GC), *gap junctions* (GJ), microvilosidades (MV) e zona pelúcida (ZP) (aumento 6.500x) **(a)**. COC de gata não maturado proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Grânulo cortical (GC), mitocôndrias (M), gotas de lipídio (GL), retículo endoplasmático liso (REL) e vesículas (V) (aumento 32.500x) **(b)**. Micr. Eletrônico de Transmissão.

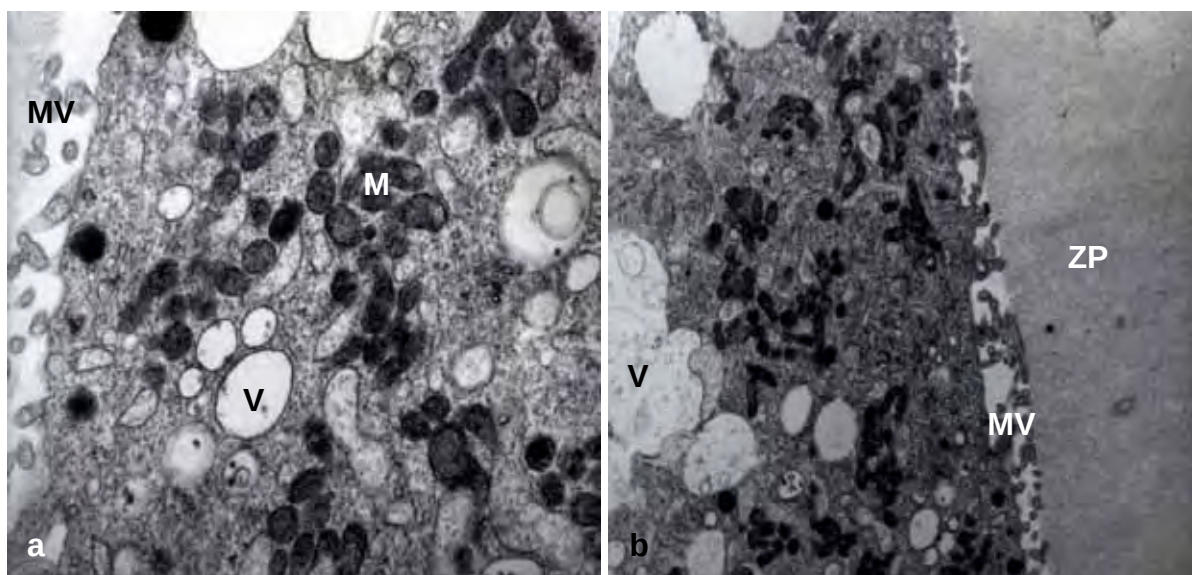


Figura 35 - COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como folicular (NMF) durante o período II. Grânulos corticais (GC), mitocôndrias (M), microvilosidades (MV) e vesículas (V) (aumento 17.000x) **(a)**. COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Zona pelúcida (ZP), mitocôndrias (M), microvilosidades (MV) e vesículas (V) (aumento 23.000x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

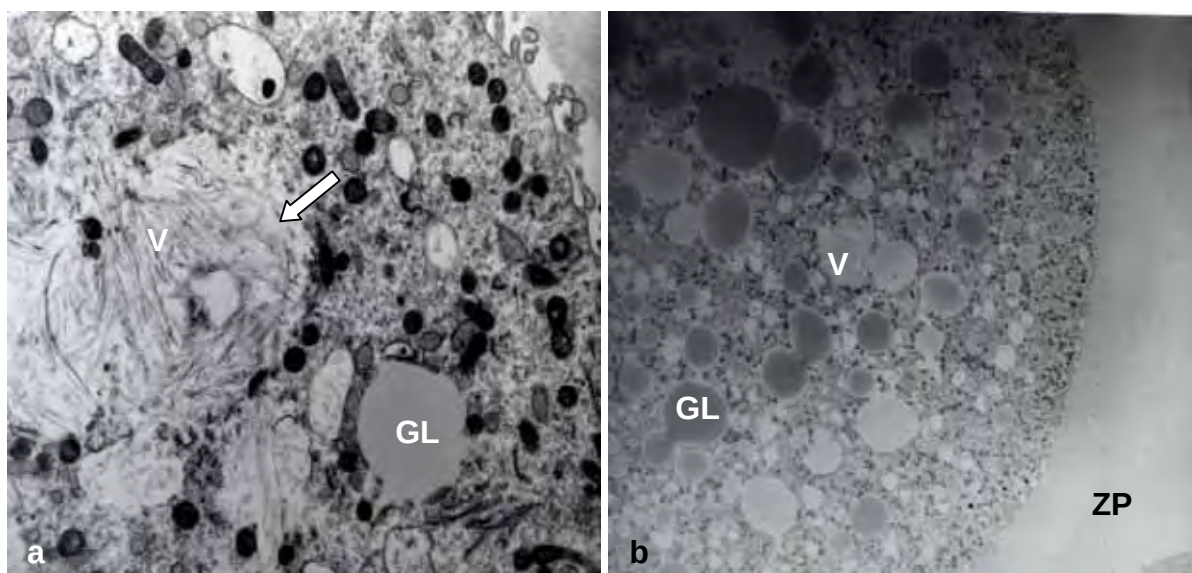


Figura 36 - COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como inativo (NMI) durante o período II. Gota de lipídio (GL), vesícula (V) e material sendo digerido no interior de vesícula (seta) (aumento 31.500x) **(a)**. COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como inativo (NMI). Zona pelúcida (ZP), gotas de lipídio (GL) e vesículas (V) (aumento 13.250x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

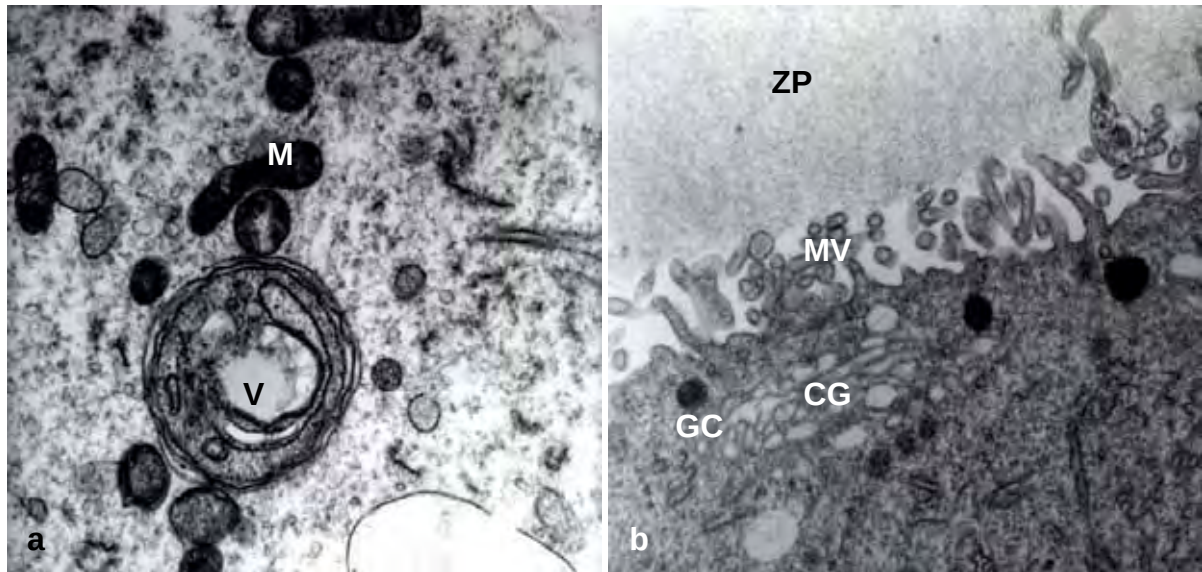


Figura 37 – COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como inativo (NMI) durante o período II. Material sendo digerido no interior de vesícula (V) e mitocôndrias (M) (aumento 13.250x) **(a)**. COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Grânulos corticais (GC) na periferia, zona pelúcida (ZP), microvilosidades (MV), complexo de Golgi e vesículas (V) (aumento 42.000x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

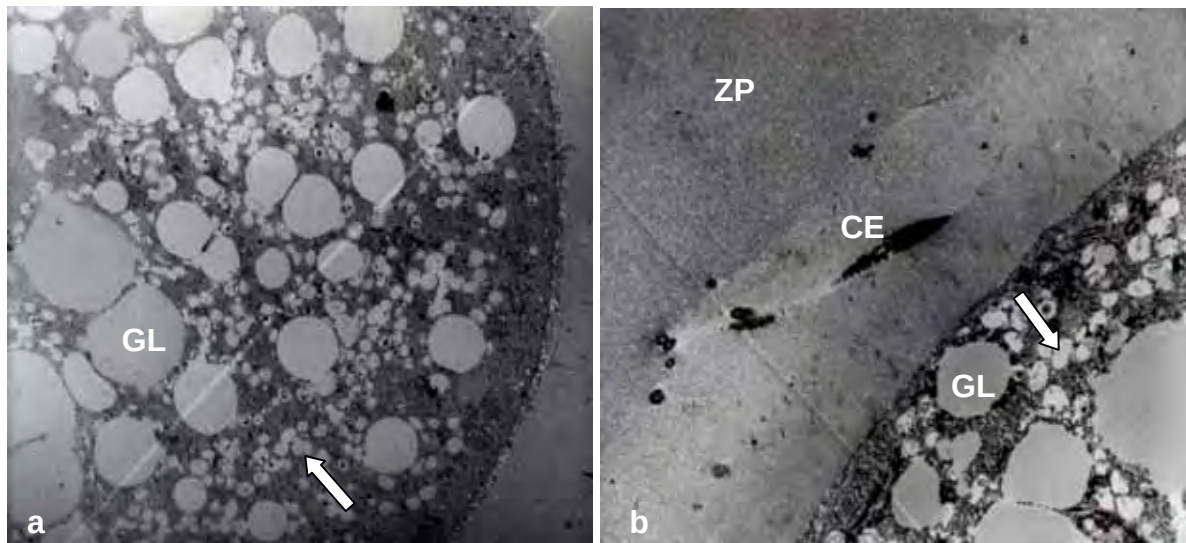


Figura 38 – COC de gata maturado *in vitro* proveniente de ovário classificado como luteal (NML) durante o período II. Mitocôndrias (M), gotas de lipídio (GL) e vesículas (seta) (aumento 42.000x) **(a)**. Embrião de gato doméstico produzido *in vitro* a partir de COC proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Cabeça de espermatozóide (CE), zona pelúcida (ZP), gotas de lipídio (GL) e vesículas (seta) (aumento 4.350x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

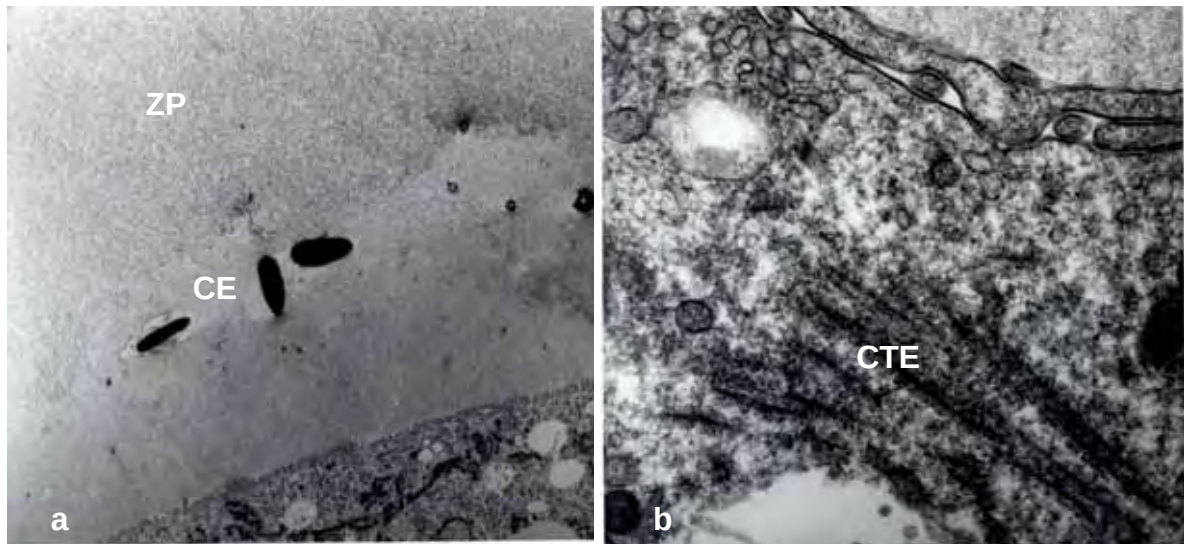


Figura 39 – Embrião de gato doméstico produzido *in vitro* a partir de COC proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Cabeças de espermatozóide (CE) e zona pelúcida (ZP) (aumento 5.750x) **(a)**. Embrião de gato doméstico produzido *in vitro* a partir de COC proveniente de ovário classificado como folicular (NMF). Citoesqueleto (CTE) (aumento 57.500x) **(b)**. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

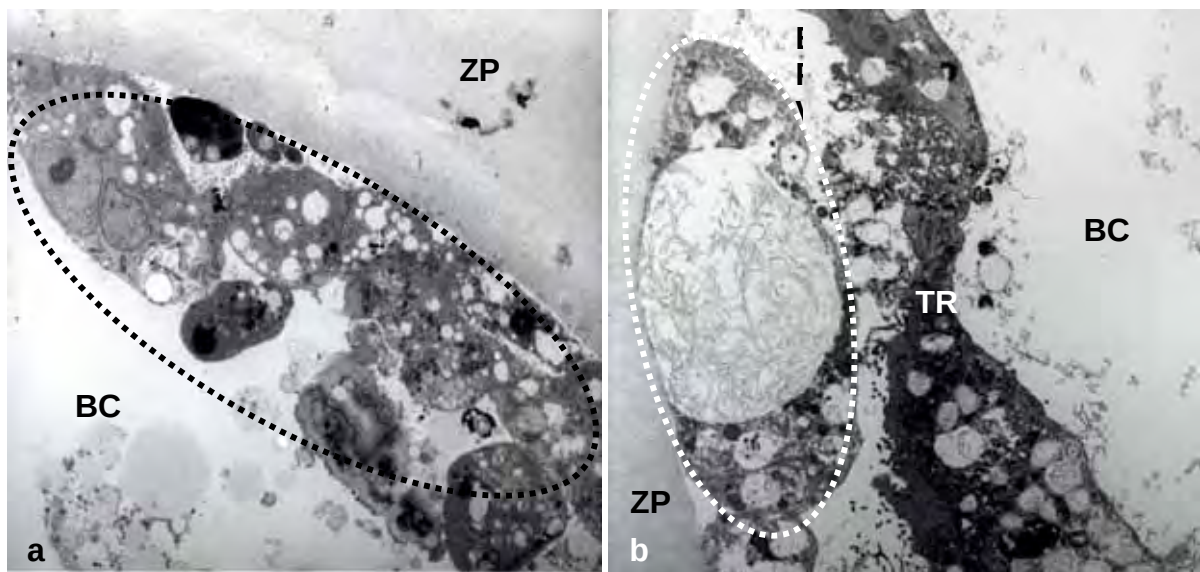


Figura 40- Embrião de gato doméstico produzido *in vitro* a partir de COC proveniente de ovário classificado como inativo (NMI). Porção degenerada do trofoblasto (**área tracejada**), blastocoele (BC) e zona pelúcida (ZP) (aumento 2450x) **(a)**. Embrião de gato doméstico produzido *in vitro* a partir de COC proveniente de ovário classificado como luteal (NML). Trofoblasto (TR), blastocoele (BC), espaço perivitelínico (EPV), zona pelúcida (ZP) e material extruído para o EPV (**área circundada**) (aumento 5750x). Microscópio Eletrônico de Transmissão