Acta Scientiae Veterinariae 36(Supl. 2): s179-s186, 2008.

ISSN 1678-0345 (Print)
ISSN 1679-9216 (Online)

FECUNDAÇÃO *IN VITRO* NO GATO DOMÉSTICO

Lílian Rigatto Martins*; Maria Denise Lopes

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., s/n. CEP 18.618-000 Botucatu – SP. Tel./Fax: 14 3811-6249. lirigatto@yahoo.com.br (*) Autor para correspondência

Resumo: A fertilização *in vitro*, como biotecnologia aplicada a felinos domésticos e selvagens, é uma ferramenta valiosa não só para o melhoramento da própria técnica, mas também para o tratamento da infertilidade e aumento de populações. Para o sucesso da técnica é necessário o prévio conhecimento da fisiologia da espécie e a compreensão dos mecanismos que interferem em seus resultados, como a influência do fotoperíodo, da seleção oocitária e espermática e da maturação *in vitro*. **Palavras-chave**: gato, oócito, maturação *in vitro*, fertilização *in vitro*

Introdução

Nesse texto serão abordados os principais aspectos que envolvem a maturação e a fertilização *in vitro* no gato doméstico. De forma complementar, a proposta inclui também a apresentação de parte dos resultados obtidos com o experimento desenvolvido no Laboratório de Fertilização *in vitro* e Terapia Celular da Unesp, Campus de Botucatu, envolvendo os efeitos da sazonalidade e da condição ovariana sobre o processo de produção embrionária em gato doméstico.

1. Efeito do fotoperíodo sobre a maturação *in vitro*

Spindler e Wildt (1999) verificaram que oócitos recuperados de ovários de gatas durante a estação de anestro na América do Norte - julho a novembro – apresentaram uma baixa taxa de extrusão do corpúsculo polar, inferior a 20% e menos de 10% dos embriões se desenvolveu até o estágio de quatro células; porcentagem que caiu para 0% nos meses de setembro e outubro com embrião se desenvolvendo até o estágio de blastocisto.

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, 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 outubro a maio, como período de inatividade ovariana.

2. Efeito do ciclo reprodutivo sobre os oócitos

A fase do ciclo reprodutivo em que a gata se encontra, no gato doméstico, se dá através da classificação ovariana e consiste na observação das estruturas presentes em 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 um ou em ambos os ovários, enquanto que a condição folicular pode ser demonstrada pela existência de pelo menos 1 folículo maduro visível com mais de 2 mm de diâmetro em pelo menos um ovário (SPINDLER e WILDT, 1999).

Em um 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 significantemente 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%).

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 em que a fêmea se encontra.

Assim como em nosso estudo, não foi observada diferença nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto, indicando que a condição ovariana da fêmea doadora não tem efeito aparente sobre o desenvolvimento oocitário e produção embrionária. O que pudemos observar foi que o número de oócitos grau I obtidos de ovários nas condições luteal e inativa foi semelhante, enquanto que os ovários na condição folicular forneciam um número sempre menor de oócitos.

3. Obtenção e liberação oocitária

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

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. A recuperação também pode ser feita por aspiração dos folículos ou dissecção folicular sob lupa com uma agulha (LUVONI e PELLIZZARI, 2000; LOPES, 2002).

4. Transporte, Temperatura e Tempo de processamento ovariano

Para transporte os ovários são geralmente acondicionados em soluções salinas como o DPBS (Dulbecco phosphate buffered saline) acrescidas de antibióticos a 4°C (SPINDLER e WILDT, 1999; FREISTEDT *et al.*, 2001) ou ainda em solução fisiológica a 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).

Em nosso laboratório, o transporte em DMPBS a 4°C mostrou-se eficiente para a conservação dos ovários e para a manutenção da qualidade oocitária.

5. Qualidade dos COC

Os COC felinos têm aparência bem escura em decorrência de alta concentração intracelular de lipídios e são classificados em graus I, II e III. Alguns autores adotam uma classificação envolvendo oócitos grau IV, sendo esses considerados degenerados.

COC felinos são classificados com base na coloração do citoplasma, na aderência das células do cumulus e no número de camadas de células a granulosa que o circundam.

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.

6. 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) obteve 745 oócitos a partir de 42 pares de ovário, 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 eram grau I. Outro aspecto interessante a ser relatado é 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 para atingir a fase de MII.

Nossos resultados mostram que durante o Fotoperíodo I, 20 pares de ovário foram utilizados. Entretanto, durante o fotoperíodo II, 10 pares de ovário foram suficientes para obter um número semelhante de oócitos (473 x 445, respectivamente para o fotoperíodo I e II). Dez ovários inativos, 8 luteais e 2 foliculares foram utilizados durante o Fotoperíodo I. Durante o Fotoperíodo II foram utilizados 07 pares na condição inativa, 03 na luteal e 01 na folicular.

Em nosso laboratório, o número médio de ovócitos obtidos por gata pertencente ao Fotoperíodo I foi 23,65. Para as fêmeas do fotoperíodo II, este valor foi 48,2 oócitos/fêmea. Gatas que apresentam ovários na condição folicular forneceram um número menor de oócitos por ovário, entretanto, a maioria deles foi classificada como grau I. os resultados desse experimento demonstram que gatas castradas durante o Fotoperíodo II fornecem um maior número de oócitos/gata do que aquelas castradas durante o Fotoperíodo I.

7. Maturação oocitária *in vitro*

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.

Em nosso experimento, as taxas de maturação *in vitro* durante os dois fotoperíodos se mantiveram próximas a 75%.

Durante o Fotoperíodo I a porcentagem de oócitos que apresentaram a configuração nuclear de VG, QVG, MI, MII e degenerados foi de: inativos 1,46%; 6,08%; 11,7%; 75,14% e 5,62%; luteal; 1,35%; 6,47%; 11,06%; 75,36% e 5,76%, e finalmente na condição folicular; 1,9%; 6,84%; 10,29%; 76,38% e 4,59%. Durante o Fotoperíodo II, foi

possível verificar os seguintes valores: inativo 2,6%; 7,11%; 11,53%; 75,72% e 3,04%; luteal; 2,45%; 6,14%; 12,48%; 75,21 e 3,72% e folicular; 1,27%; 6,92%; 12,73; 75,28% e 3,8%. Não foi observada nenhuma diferença estatística na proporção de oócitos na fase de MII nas duas condições reprodutivas (MARTINS *et al.*, 2007).

Spindler e Wildt (1999) avaliando o efeito das estações do ano sobre as taxas de MIV observaram que foram superiores durante dezembro a abril: 61,8% ± 4,7% a 77,2 ± 0,1%. Em maio a julho as taxas foram de 22,2 ± 9,2% a 38,6 ± 8,5% e em Novembro foi de 37,1 ± 0,7%.

Os meios mais comumente utilizados para a MIV têm sido o TCM 199 - Tissue culture medium (KARJA *et al.*, 2006a, SKRZYSZOWSKA *et al.*, 2002), MEM - Minimum essential medium (HERRICK e SWANSON, 2003), SOF – Synthetic oviductal fluid (BOGLIOLO *et al.*,. 2001, MERLO *et al.*, 2008) e menos comumente o DMEM - Dulbecco modified Eagle medium (KITIYANANT *et al.*, 2003). Em nosso laboratório utilizamos o DMEM para a maturação *in vitro* e esse meio se mostrou eficaz para tanto.

Meios de MIV de felinos requerem a utilização de gonadotrofinas como FSH, HMG e LH, fontes de energia, sendo o piruvato seu a principal representante, fontes protéicas e os soros como a albumina sérica bovina e o soro fetal bovino (FCS). Requerem ainda agentes antioxidantes como a cisteína, a associação cisteína-BME e a cisteamina, antibióticos e estradiol.

Uma alta porcentagem de oócitos de gata matura *in vitro* (40 a 70%) e completa a maturação durante as primeiras 24 horas de cultivo. Uma outra parte restante dos oócitos matura entre 24 e 48 horas. (GÓMEZ *et al.*, 2006).

Em estudo realizado em nosso laboratório, observamos não haver diferença entre as taxas de maturação *in vitro* quando submetidos ao cultivo durante 30 ou 36 horas.

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

8. Obtenção e seleção espermática para FIV

O sêmen para realização da fertilização *in vitro* pode ser obtido por coleta com vagina artificial, por eletroejaculação ou por coleta da cauda do epidídimo de gatos castrados, a fresco ou descogelado (KARJA *et al.*, 2006a).

Existem ainda duas formas de seleção espermática para realização da FIV, o uso do Percoll e através da técnica de swin-up, sendo esta última a mais utilizada.

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

9. Fertilização *in vitro*

A maioria dos felinos selvagens se reproduz em cativeiro, mas incompatibilidades comportamentais ou genéticas freqüentemente ocorrem. A aplicação de biotécnicas como a fertilização *in vitro* permite um manejo mais efetivo das populações em cativeiro de determinadas espécies. Além disso, a FIV tem apresentado sucesso em pelo menos um terço das espécies de felídeos selvagens através da transferência desses embriões em gatos domésticos (POPE, 2000).

São relatados o uso dos meios Ham F-10, TALP - Tyrode's solution (TSUJIOKA *et al.*, 2007); mKRB - modified Krebs Ringer bicarbonate -, SOF (MERLO *et al.*, 2008), MK-1 (KANDA *et al.*, 1998).

Considerações Finais

As biotécnicas da reprodução progrediram muito mais em felinos do que em caninos na última década, embora as taxas de prenhez após a MIV, CIV e a TE ainda sejam relativamente baixas. Assim melhoria dessas técnicas associada ao enxerto de tecido ovariano, à criopreservação de folículos, oócitos ou embriões, com subseqüente transferência a fêmeas receptoras, pode tornar essas técnicas praticáveis para o uso em felídeos selvagens.

Além disso, nossos experimentos têm apresentado resultados repletos de peculiaridades e demonstrado quão particular essa espécie pode se mostrar.

Referências Bibliográficas

FREISTEDT, P, STOJKOVIC, P, WOLF, E, STOJKOVIC, M. Energy status of nonmatured and *in vitro*-matured domestic cat oocytes and different stages of *in vitro*-produced embryos: enzymatic removal of the zona pellucida increases adenosine triphosphate content and total cell numbers. Biol Reprod 2001; 65:793- 98.

GÓMEZ, MC, POPE, CE, DRESSER, BL. Nuclear transfer in cats and its application. Theriogenology 2006; 66:72-81.

GOODROWE, KL, HOWARD, JG, WILDT, DE. Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol-17

beta and progesterone profiles in domestic cats (Felis catus) at natural or induced oestrus. J Reprod Fertil 1988; 82:553-61.

HERRICK, JR, SWANSON, WF. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. Theriogenology 2003; 59:1503-13.

KANDA, M, OIKAWA, H, NAKAO, H, TSUTSUI, T. Early embryonic development *in vitro* and embryo transfer in the cat. J Vet Med Sci 1995; 57:4:641-46.

KANDA, M, MIYAZAKI, T, 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 1998; 60:423-31.

KARJA, NWK, 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 2006a; 65:415-23.

KARJA, NWK, 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 2006b; 66:1237-42.

KITIYANANT, Y, SAIKHUN, J, PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for *in vitro* maturation. Theriogenology 2003; 59:1775-86.

LOPES, MD. Análise histológica, ultra-estrutural e avaliação da maturação nuclear de oócitos de gatas domésticas (Felis catus). Tese, Universidade Estadual Paulista, Botucatu 2002.

LUVONI, CG, PELLIZZARI, P. Embryo development *in vitro* of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. Theriogenology 2000; 53:1529-40.

MARTINS, LR, FERNANDES, CB, LANDIM-ALVARENGA, FC, LOPES, MD. Effect of season and ovarian status on *in vitro* nuclear maturation of domestic cat oocytes. Biol Reprod Suppl 2007; 142-3.

MERLO, B, IACONO, E, REGAZZINI, M, ZAMBELLI, D. Cat blastocysts produced *in vitro* form oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved eletroejaculated semen. Theriogenology 2008; in press.

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

NAOI, H, OTOI, T, MURAKAMI, M, SHIMAMURA, T, KARJA, NWK, AGUNG, B, SHIMIZU, R, TANIGUCHI, M, NAGAI, T. Developmental competence of cat oocytes store at various temperature for 24 h. J Reprod Dev 2007; 53:271-7.

POPE, CE. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. Theriogenology 2000; 53:163-74.

SKRZYSZOWSKA, M, KATSKA, L, RYC´SKA, B, KANIA, G, SMORAG, Z, PIEC´KOWSKI, M. *In vitro* developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. Theriogenology 2002; 58:1615-21.

SPINDLER, RE, WILDT, DE. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. Biol Reprod 1999; 61:188-94.

TEBET, JM, LOPES, MD, BICUDO, SD, PRESTES, NC, LANDIM-ALVARENGA, FC. Sazonalidade reprodutiva de gatas domésticas – levantamento retrospectivo de ocorrências obstétricas registradas nos arquivos da FMVZ-Botucatu. Rev Bras Reprod Anim 1997; 21:27-9.

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

WOOD, T.C., WILDT, D.E. Effect of the quality of cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. J Reprod Fertil 1997; 110:355-60.

Martins L.R. & Lopes M.D. 2008. **Fecundação *in vitro* no gato doméstico. *In vitro fertilization of domestic cat***.
Acta Scientiae Veterinariae. 36(Supl. 2): s179-s186.

IN VITRO FERTILIZATION OF DOMÉSTIC CAT

Lílian Rigatto Martins*; Maria Denise Lopes

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., s/n. CEP 18.618-000 Botucatu – SP. Tel./Fax: 14 3811-6249. lirigatto@yahoo.com.br (*) Autor para correspondência

Abstract

In vitro fertilization, as a biotechnology applied to domestic and wild felids, is a valuable tool not only for the technique's improvement but also for the treatment of infertility and propagation of some populations. The previous knowledge of the physiology of the species and the understanding of mechanisms that interfere in their results are necessary for the technique success, as daylength influence, oocyte and spermatic selection and *in vitro* maturation.
Key-words: cat, oocyte, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization

Introduction

The aim of this talk is to review the main aspects involving *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) of domestic cat. It also intends to present and discuss some results of our experiment developed at *In vitro* Fertilization and Cellular Therapy Laboratory from Unesp, Campus of Botucatu, involving the seasonal effects and ovarian condition on embryo production in domestic cat.

1. Seasonal effects on *in vitro* maturation

Spindler and Wildt (1999) verified that oocytes harvested from cat ovaries during non-breeding season in North America (July to November) presented the lowest rate of polar body extrusion (lower than 20% and less than 10% of the embryos developed to four-cell stage. On September and October no embryo developed to the blastocyst stage.

The knowledge about seasonal behavior of domestic cat in Brazil is very restrict. However, Tebet *et al.* (1997), studying the reproductive seasonality of domestic cat in Botucatu, verified a marked and gradual variation on estrous incidence throughout the year, limiting the local breeding season from July to September and defining the months of October to May as the ovarian inactivity period.

2. Effects of reproductive condition on oocytes

The stage of reproductive cycle of female domestic cat donors is characterized by the ovarian condition and consists of the observation of apparent structures on the surface of both ovaries. Inactive condition is characterized by the absence of follicular structures with more than 2 mm in diameter; luteal condition is characterized by the presence of one or more corpus luteum in at least one ovary, while follicular condition is demonstrated by the existence of one or more follicles larger than 2 mm in diameter in at least one ovary (SPINDLER e WILDT, 1999).

In a recent study, from 16558 COC obtained from 198 ovary pairs, the average number of COC and the average number of grade I COC were significantly higher in the inactive ovary condition (111.1 e 19 COC, respectively) compared to the follicular condition (67.1 e 11.4 COC, respectively) (NAOI *et al.*, 2007). The authors also demonstrated that there was a significant difference on the proportion of grade I COC comparing follicular and luteal conditions (14.9% x 20.2%). However, Spindler e Wildt (1999) suggested that the average number of grade I COC collected throughout the year is not influenced by reproductive cycle stage of the donor.

In our study, there were no statically differences between cleavage rates and embryo development to blastocyst stage, indicating that the ovarian condition of the female has no apparent effect on oocyte competence and embryo production. We could also observe a similar percentage of grade I COC obtained from luteal and inactive condition ovaries, while follicular condition ovaries provided always a lower number of COC.

3. Oocyte recovery and harvesting

Feline oocytes can be obtained after ovariohysterectomy (POPE *et al.*, 1993) or laparoscopy (GOODROWE *et al.*, 1988) after superovulation protocols (KANDA *et al.*, 1995) or in absence of them.

For oocyte harvesting, some authors prefer to mince ovaries with a scalpel blade - slicing - in Petri dishes containing buffered culture media or saline solution. Oocyte harvesting can also be performed through follicular aspiration or follicular dissection with needle under stereomicroscope (LUVONI e PELLIZZARI, 2000; LOPES, 2002).

4. Ovarian transport, temperature and processing period

Ovaries are generally transported and kept in saline solutions as DPBS (Dulbecco phosphate buffered saline) supplemented with antibiotics at 4°C (SPINDLER e WILDT, 1999; FREISTEDT *et al.*, 2001) or in 0.9% physiological solution at 35°C in thermos, during 1 to 6 hours before oocyte recovering (KARJA *et al.*, 2006a, 2006b).

In our laboratory, the transport in DMPBS at 4°C was efficient for ovary conservation and to maintain oocyte quality.

5. Cumulus Oophorus Complex quality

Feline COC have a dark appearance due to high lipid cytoplasmic content and are classified as grade I, II and III. Some authors adopt a distinct classification which includes a grade IV that represents degenerated oocytes. They are classified according to cytoplasmic color, cumulus cell adherence and number of surrounding layers.

Grade I COC exhibit uniform and dark-pigmented cytoplasm surrounded by more than two layers of firmly adhered cumulus cells. Grade II COC presents uniform cytoplasm and less than two surrounding layers. Grade III COC presents granulated, non-uniform, and less pigmented ooplasm surrounded by few cumulus cell layers; and grade IV are those with pale cytoplasm and irregular shape or degenerated. Some authors (WOOD e WILDT, 1997; KITIYANANT *et al.*, 2003) consider as grade I COC those exhibiting uniform and dark-pigmented cytoplasm surrounded by more than five layers of cumulus cells firmly adhered.

6. Oocyte recovery rate

Naoi et al (2007) recovered 83.62 oocytes per female considering all COC grades. Nagano *et al.* (2008) recovered 745 oocytes from antral follicles of 42 ovary pairs, a total of 17.73 COC/female.

Lopes (2002) recovered 42.3 grade I, II and III COC/female through follicular aspiration and around 30.99% of them were grade I COC. Another interesting aspect to be mentioned is the number of oocytes recovered from pre-pubertal and pubertal donors (27.6 x 69.1/female). Although pre-pubertal females provide a high number of COC, they present low competence to reach MII stage.

During non-breeding season, 20 ovary pairs were able to produce about as many oocytes as 10 ovarian pairs did during the breeding season in our laboratory (473 x 445, respectively). Ten inactive ovaries, 8 luteal and 2 follicular were used during no-breeding season. During breeding season, 07 inactive, 03 luteal and 01 follicular ovarian pairs were used.

In our laboratory, the mean number of oocytes/female during non-breeding season was 23.65. During breeding season the mean number was 48.2 oocytes per female. Donors with follicular ovary condition provided a lower number of oocytes per ovary; however, most of them were classified as grade I. Based on these finding, it appears that during breeding season it is possible to retrieve a higher number of oocytes/female than those during non-breeding season.

7. ***In vitro*** **oocyte maturation**

In vitro maturation rates are relatively high, around 40 to 60%, depending on oocyte quality and media supplementation.

In our laboratory, IVM rates in both seasons were around 75%.

During non-breeding season the percentage of oocytes with the nuclear configuration GV, GVBD, MI, MII and degenerated/non-identified were: inactive 1.46%; 6.08%; 11.7%; 75.14% and 5.62%; luteal; 1.35%; 6.47%; 11.06%; 75.36% e 5.76%,and follicular; 1.9%; 6.84%; 10.29%; 76.38% and 4.59%. During breeding season, it was observed: inactive 2.6%; 7.11%; 11.53%; 75.72% and 3.04%; luteal; 2.45%; 6.14%; 12.48%; 75.21 and 3.72% e follicular; 1.27%; 6.92%; 12.73; 75.28% e 3.8%. No statistic difference was observed in oocytes reaching MII in any ovarian condition or season (MARTINS *et al.*, 2007).

Spindler e Wildt (1999) evaluated seasonal effects on IVM rates and observed that a higher percentage of oocytes, when recovered from December to April, completed nuclear maturation 61.8% ± 4.7% a 77.2 ± 0.1%. During May to July the percentages were 22.2 ± 9.2% to 38.6 ± 8.5% and during November it was 37.1 ± 0.7%.

The most commonly used media for IVM are TCM 199 - Tissue Culture medium (KARJA *et al.*, 2006a, SKRZYSZOWSKA *et al.*, 2002), MEM - Minimum essential medium (HERRICK e SWANSON, 2003), SOF – Synthetic oviductal fluid (BOGLIOLO *et al.*, 2001, MERLO *et al.*, 2008) and less commonly, DMEM - Dulbecco modified Eagle medium (KITIYANANT *et al.*, 2003). In our laboratory we have been used DMEM for IVM and this media has been effective.

IVM felid media needs supplementation with gonadotrophins, such as FSH, HMG and LH, energy sources, as pyruvate, protein sources and sera as bovine serum albumin (BSA) and fetal calf serum (FCS). They also require antioxidants such as cistein, cistein-BME and cisteamine; antibiotic and estradiol.

A high percentage of domestic cat oocytes undergo IVM (40 a 70%) and complete maturation to metaphase II during the first 24 hours of culture. Additional oocytes also mature between 24 and 48 hours (GÓMEZ *et al.*, 2006). In our laboratories, we observed no difference in IVM rates after 30 or 36 hours of culture.

Similarly, Nagano *et al.* (2008) observed that after 30 hours of IVM culture, the percentage of oocytes at metaphase II reached a peak (75.5%), with no further increase after 36 or 48 hours of IVM culture.

8. Semen collection and selection for IVF

Semen for IVF can be collected either from epididymides after orchiectomy; with artificial vagina, or eletroejaculation; and it can be used fresh or frozen-thawed (KARJA *et al.*, 2006a).

There are also two methods for spermatic selection for IVF; Percoll and swim-up technique that is the most used.

The most commonly used media for sperm selection through swim-up are TALP, Ham F-10, Brackett & Oliphant (BO) (KARJA *et al.*, 2006a), BO modified. These media are generally supplemented with capacitating agents such as caffeine (MARTINS *et al.*, 2006) and teofiline (NAGANO *et al.*, 2008).

9. *In vitro* **fertilization**

Most of wild felid species reproduce in captive conditions, but behavioral or genetic incompatibilities may happen. Developing biotechniques such as IVF could play an important role in managing some captive species. IVF has been successful used in at least one third of the wild felid species with subsequent embryo transfer to domestic cats (POPE, 2000).

The most used culture media for IVF are Ham F-10, TALP - Tyrode solution (TSUJIOKA *et al.*, 2007); mKRB - modified Krebs Ringer bicarbonate - SOF (MERLO *et al.*, 2008) and MK-1 (KANDA *et al.*, 1998).

Concluding Remarks

Biotechnology has developed much further in cats than in canines although the pregnancy rate after IVM, IVF, *in vitro* culture and embryo transfer is still relatively low.

Improvement of these techniques associated to ovarian tissue grafting; follicle, oocyte or embryo cryopreservation with subsequent transfer into females may render these techniques feasible for use in endangered wild felids.

Our experiments have presented results full of peculiarities and they have demonstrated how singular this species can be.

References

FREISTEDT, P, STOJKOVIC, P, WOLF, E, STOJKOVIC, M. Energy status of nonmatured and *in vitro*-matured domestic cat oocytes and different stages of *in vitro*-produced embryos: enzymatic removal of the zona pellucida increases adenosine triphosphate content and total cell numbers. Biol Reprod 2001; 65:793- 98.

GÓMEZ, MC, POPE, CE, DRESSER, BL. Nuclear transfer in cats and its application. Theriogenology 2006; 66:72-81.

GOODROWE, KL, HOWARD, JG, WILDT, DE. Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol-17 beta and progesterone profiles in domestic cats (Felis catus) at natural or induced oestrus. J Reprod Fertil 1988; 82:553-61.

HERRICK, JR, SWANSON, WF. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. Theriogenology 2003; 59:1503-13.

KANDA, M, OIKAWA, H, NAKAO, H, TSUTSUI, T. Early embryonic development *in vitro* and embryo transfer in the cat. J Vet Med Sci 1995; 57:4:641-46.

KANDA, M, MIYAZAKI, T, 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 1998; 60:423-31.

KARJA, NWK, 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 2006a; 65:415-23.

KARJA, NWK, 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 2006b; 66:1237-42.

KITIYANANT, Y, SAIKHUN, J, PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for *in vitro* maturation. Theriogenology 2003; 59:1775-86.

LOPES, MD. Análise histológica, ultra-estrutural e avaliação da maturação nuclear de oócitos de gatas domésticas

(*Felis catus*). Thesis, Universidade Estadual Paulista, Botucatu 2002.

LUVONI, CG, PELLIZZARI, P. Embryo development *in vitro* of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. Theriogenology 2000; 53:1529-40.

MARTINS, LR, FERNANDES, CB, LANDIM-ALVARENGA, FC, LOPES, MD. Effect of season and ovarian status on *in vitro* nuclear maturation of domestic cat oocytes. Biol Reprod Suppl 2007; 142-3.

MERLO, B, IACONO, E, REGAZZINI, M, ZAMBELLI, D. Cat blastocysts produced *in vitro* form oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved eletroejaculated semen. Theriogenology 2008; in press.

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

NAOI, H, OTOI, T, MURAKAMI, M, SHIMAMURA, T, KARJA, NWK, AGUNG, B, SHIMIZU, R, TANIGUCHI, M, NAGAI, T. Developmental competence of cat oocytes store at various temperature for 24 h. J Reprod Dev 2007; 53:271-7.

POPE, CE. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. Theriogenology 2000; 53:163-74.

SKRZYSZOWSKA, M, KATSKA, L, RYC´SKA, B, KANIA, G, SMORAG, Z, PIEC´KOWSKI, M. *In vitro* developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. Theriogenology 2002; 58:1615-21.

SPINDLER, RE, WILDT, DE. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. Biol Reprod 1999; 61:188-94.

TEBET, JM, LOPES, MD, BICUDO, SD, PRESTES, NC, LANDIM-ALVARENGA, FC. Sazonalidade reprodutiva de gatas domésticas – levantamento retrospectivo de ocorrências obstétricas registradas nos arquivos da FMVZ-Botucatu. Rev Bras Reprod Anim 1997; 21:27-9.

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

WOOD, T.C., WILDT, D.E. Effect of the quality of cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. J Reprod Fertil 1997; 110:355-60.