

ADOLFO LIMA NETO

**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE GATAS DOMÉSTICAS, EM  
MEIO TCM 199 MODIFICADO, FRESCOS E PREVIAMENTE CONGELADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L32d  
2005

Lima Neto, Adolfo, 1975-

Desenvolvimento *in vitro* de embriões de gatas domésticas, em meio TCM 199 modificado, frescos e previamente congelados / Adolfo Lima Neto. – Viçosa : UFV, 2005.  
xiv, 54f. : il. ; 29cm.

Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Felídeo - Reprodução. 2. Felídeo - Embrião - Criopreservação. 3. Felídeo - Desenvolvimento *in vitro*. 4. Tecidos (Anatomia e fisiologia) - Cultura e meios de cultura. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.089264

ADOLFO LIMA NETO

**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE GATAS DOMÉSTICAS, EM  
MEIO TCM 199 MODIFICADO, FRESCOS E PREVIAMENTE CONGELADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 31 de outubro de 2005.

---

Prof. Eduardo Paulino da Costa  
(Conselheiro)

---

Prof. Cláudio César Fonseca  
(Conselheiro)

---

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

---

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho

---

Prof. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula  
(Orientador)

*Pois tu formaste o meu interior, tu me teceste no seio de  
minha mãe. Graças te dou, visto que por modo  
assombrosamente maravilhoso me formaste; as tuas  
obras são admiráveis, e a minha alma o sabe muito  
bem; os teus olhos me viram a substância ainda  
informe, e no teu livro foram escritos todos os meus dias,  
cada um deles escrito e determinado, quando nenhum  
deles havia ainda.*

*Sl.139:13, 14,16.*

A Deus, pela vida e por mais esta oportunidade.

Aos meus pais, Emilio e Romilda, aos meus irmãos,  
Daniela, Alexandre e Aline, pelo apoio e compreensão.

À toda minha família, pelo incentivo constante.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A empresa “Cultilab” pela parceria e apoio a este trabalho.

Ao Professor e amigo Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, pela orientação, apoio, paciência, amizade e confiança e construída durante dois e meio anos.

Ao Professor Eduardo Paulino da Costa, por viabilizar a realização deste trabalho e pelas suas colaborações.

Ao Professor José Domingos Guimarães, pela amizade, sugestões e conselhos.

Aos membros da banca de tese pelas valiosas sugestões e considerações ao presente trabalho.

Ao Professor Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho, da Universidade Estadual de Santa Cruz, pelo incentivo e amizade desde a iniciação científica.

Ao Professor Cláudio Coutinho Bartolomeu da Universidade Estadual de Santa Cruz pela amizade e incentivo na área da reprodução animal.

À Rose, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Medicina Veterinária, pela paciência e auxílio.

Aos amigos de pós Anselmo Santos, Alessandra Ferreira, Vinício Araújo, Laura Mourão, Maria Alice, Giorgia Haas, Talita, Rodrigo Martins, Karine, Ligia, Letícia Fagundes, Rafael, Amanda, Chico, Caroline, Paulo Guilherme, Reno Roldi, Morgana, Erik Castilho, Rogério, Éder, Bianca, Miller Palhão, Herbert, Napoleão e Jair Duarte pelo companheirismo.

Aos amigos e companheiros de luta, Marcelo Santana, Luiz Chieregatto, Priscilla Sarti, João Bosco, Eduardo Ávila e Juliano Peixoto pela contribuição no trabalho.

Aos amigos e companheiros de república Everton Takerara, Guilherme Cardinelli, Antônio Machado e Icaro Martins.

À amiga Lelena pela amizade e gratidão.

Aos amigos e irmãos Renner Maia e Manoel de Souza Bispo.

Aos irmãos, de todas as horas Charles Bispo, Flávio Lopes, Pedro Leite, Iolando e especialmente a um dos meus maiores incentivadores, o Dr. Rogério Fürst, pela amizade e convivência e apoio neste trabalho.

A Carla Sarkis, Mônica Toledo, Thais, Jana Melo, Rebeca Marques, Leonardo Lanna, Luana Maressa, Marcelo Rosado, Luciana, Camila Netto, Clóvis e Daniela, pela colaboração no experimento.

À amiga e madrinha Dr.<sup>(a)</sup> Larissa Pires Barbosa pela amizade, conselhos e incentivo.

Ao José Cândido “Seu Nenzinho” e o Divino do laboratório de Reprodução animal.

A Nilza do nosso gatil experimental e Luciano do Laboratório de Anatomia animal.

A Paula Rita Koster pelo apoio e boa vontade em ajudar ao experimento, cedendo seus animais.

Ao Mingal “o gato” e seus pais (proprietários) João e Flávia Girão, sempre prontos a ajudar.

Aos residentes e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, especialmente do setor de clínica e cirurgia de pequenos animais, pela contribuição durante todo o curso.

A todos àqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos animais que participaram deste experimento.

## **BIOGRAFIA**

Adolfo Lima Neto, filho de Emilio Maron Lima e Romilda Motta Lima, nasceu em Ilhéus, no Estado da Bahia, em 23 de fevereiro de 1975.

Em fevereiro de 1995 iniciou curso de Medicina Veterinária, na Universidade de Alfenas (UNIFENAS), Alfenas-MG, onde estudou por um ano.

Em agosto de 1997 transferiu-se para o curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-BA, graduando-se em 02 de fevereiro de 2003. Ingressou, em agosto de 2003, no Curso de Pós-Graduação (Mestrado) do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), área de concentração em Reprodução e Produção animal, Viçosa-MG, submetendo-se à defesa de tese em 31 de outubro de 2005.

## ÍNDICE

|                                                                                                                                                                                                                           | <b>Página</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| LISTA DE TABELAS.....                                                                                                                                                                                                     | ix            |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                                                                                                                                                     | x             |
| RESUMO.....                                                                                                                                                                                                               | xi            |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                                                             | xiii          |
| 1.0 INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                                                                       | 1             |
| 2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                                                                                                                                            | 3             |
| 2.1 Ciclo estral da gata doméstica.....                                                                                                                                                                                   | 3             |
| 2.2 Endocrinologia da reprodução na gata doméstica.....                                                                                                                                                                   | 6             |
| 2.3 Biotecnologias aplicadas a reprodução de felinos.....                                                                                                                                                                 | 8             |
| 2.3.1 Inseminação artificial.....                                                                                                                                                                                         | 8             |
| 2.3.2 Indução da atividade ovariana e ovulação.....                                                                                                                                                                       | 9             |
| 2.3.3 Coleta e transferência de embriões.....                                                                                                                                                                             | 10            |
| 2.3.4 Congelamento de embriões.....                                                                                                                                                                                       | 12            |
| 2.3.4.1 Mecanismos da criopreservação e crioinjúrias.....                                                                                                                                                                 | 14            |
| 2.3.4.2 Crioprotetores.....                                                                                                                                                                                               | 15            |
| 2.3.4.3 Métodos de criopreservação.....                                                                                                                                                                                   | 17            |
| 2.4 Referências Bibliográficas.....                                                                                                                                                                                       | 21            |
| 3.0 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões de gatas domésticas, em meio TCM 199 modificado, frescos e previamente congelados com glicerol, associado à sacarose. Uso potencial da técnica em felinos silvestres..... | 30            |
| 3.1 RESUMO.....                                                                                                                                                                                                           | 30            |
| 3.2 Development <i>in vitro</i> of embryos of domestic cats, in medium TCM 199 modified, fresh and previously frozen with glycerol, associate with sucrose. Potential use of the technique in wild felines.....           | 31            |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 3.3 ABSTRACT.....                   | 31 |
| 3.4 INTRODUÇÃO.....                 | 32 |
| 3.5 MATERIAL E MÉTODOS.....         | 33 |
| 3.6 RESULTADOS.....                 | 38 |
| 3.7 DISCUSSÃO.....                  | 43 |
| 3.8 CONCLUSÕES.....                 | 49 |
| 3.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 50 |

## LISTA DE TABELAS

| Tabela                                                                                                                                                                                                                         | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Substâncias contidas no meio base comercial Embriocare <sup>®</sup> para lavagem uterina e manutenção, congelamento e descongelamento embrionário.....                                                                       | 35     |
| 2 Meio de cultivo usado para embriões felinos.....                                                                                                                                                                             | 36     |
| 3 Classificação e quantificação dos embriões coletados de gatas com manifestação natural do cio.....                                                                                                                           | 38     |
| 4 Classificação e quantificação dos embriões coletados de gatas por indução da atividade ovariana e da ovulação. Número de corpos lúteos e folículos ovarianos.....                                                            | 39     |
| 5 Estágio embrionário e grau de qualidade no pré-cultivo, número de blastocistos expandidos, taxa de desenvolvimento e número médio de blastômeros, após 24h de cultivo de embriões, de gato doméstico.....                    | 41     |
| 6 Estágio embrionário e grau de qualidade no pré-congelamento, número de blastocistos expandidos, taxa de desenvolvimento e número médio de blastômeros, após 24h de cultivo de embriões descongelados, de gato doméstico..... | 42     |

## LISTA DE FIGURAS

| Figuras                                                                                                                                       | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Inter-relação entre possíveis estágios do ciclo estral de gatas domésticas.....                                                             | 4      |
| 2 Esquema de ovulação, fertilização do ovócito e desenvolvimento embrionário em gatas domésticas.....                                         | 11     |
| 1 Representação esquemática da curva de congelamento padrão.....                                                                              | 37     |
| 2 Embriões de felino, a fresco no estágio de mórula.....                                                                                      | 40     |
| 3 Embriões de felino, congelados e descongelados no estágio de blastocisto expandido de grau I pós-cultivo em estufa de CO <sub>2</sub> ..... | 42     |

## RESUMO

Lima Neto, Adolfo, M.S. Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2005.  
**Desenvolvimento *in vitro* de embriões de gatas domésticas, em meio TCM 199 modificado, frescos e previamente congelados.** Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Conselheiros: Eduardo Paulino da Costa e Cláudio César Fonseca.

Foram utilizados um total de 48 embriões nos estágios de mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto, nos graus I e II, obtidos de 14 gatas domésticas adultas. Dois animais apresentaram manifestação natural do cio e 12 animais foram induzidos artificialmente à atividade ovariana e ovulação. Para tal receberam uma única aplicação de 150 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e 84h após, uma única aplicação de 100 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG). Todos os animais foram acasalados naturalmente e seis dias após a primeira cópula, todas as gatas foram submetidas a laparotomia, e por meio da técnica de lavagem transcornual adaptada, foram coletados os embriões, os quais foram classificados de acordo com IETS (1998). Vinte e sete foram cultivados em meio TCM 199 modificado, em estufa de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, sendo então avaliados quanto ao seu estágio de desenvolvimento, qualidade e número de blastômeros, observando-se uma taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto expandido grau I de 77,7%, com um número médio de 161±15,8

blastômeros. Em 21 embriões foi testada a congelabilidade em meio comercial a base de 10% glicerol associado a  $0,1\text{molL}^{-1}$  de sacarose. Após o descongelamento, em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , nas mesmas condições de cultivo, observou-se uma taxa de desenvolvimento, até o estágio de blastocisto expandido grau I, de 38,1% com um número médio de  $139,1 \pm 11,8$  blastômeros. Desta forma, embora o protocolo de congelamento e descongelamento tenha reduzido em 51% a taxa de desenvolvimento de embriões felinos, com uma queda ( $P < 0,01$ ) do número de blastômeros, mostrou-se viável, com promissor uso *in vivo* em felinos domésticos e silvestres.

## ABSTRACT

Lima Neto, Adolfo, M.S. Universidade Federal de Viçosa, October of 2005.  
**Development *in vitro* of embryos of domestic cats, in medium modified TCM 199, fresh and previously frozen.** Adviser: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Committee members: Eduardo Paulino da Costa and Cláudio César Fonseca.

In this study a total of 48 embryos were used in the compacts morulae, initial blastocysts and blastocysts stages in the degrees I and II, obtained from 14 adult domestic cats. Two animals presented natural manifestation of the oestrus and 12 animals were artificially induced to ovarian activity and ovulation. They received one only application of 150 IU of gonadotropins equine corionic (eCG) and 84h after, one application of 100 IU of gonadotropins human corionic (hCG), and all the animals were coupled naturally. Six days after the first mating, all cats were submitted to laparotomy, and through an adapted transcornual technique the embryos were collected and classified in agreement with IETS (1998). 27 of these were cultivated in a TCM 199 modified with a controlled CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 hours. The embryos were classified by development stage, quality and blastomeres number, observing a development index until expanded blastocysts in degree I of 77.7% with an average of 161±15,8 blastomeres was reached. In 21 embryos the freezing technique was tested in a commercial medium with 10% of glycerol associated with 0,1molL<sup>-1</sup> of sucrose. After the unfreezing, in 37°C water

with the same cultivation conditions, a developmental index of 38.1%, was observed until the stage of expanded blastocysts in degree I, with average number of  $139.1 \pm 11.8$  blastomeres. Although the freezing and unfreezing protocols, had reduced the developmental index of feline embryos by 51% and reduce the blastomeres number ( $P < 0.01$ ), it was considerate a viable technique in domestic and wild felines.

## 1.0 INTRODUÇÃO

Os gatos domésticos, ao longo dos séculos, tiveram relacionamento variável com o homem, passando de animais venerados e sagrados no antigo Egito, até largamente perseguidos, como figuras abomináveis, na Idade Média européia. Os primeiros gatos domésticos apareceram no Egito, por volta de 1600 Antes de Cristo, e no âmbito social estes animais tornaram-se integrantes do cotidiano das pessoas devido principalmente à sua habilidade em controlar pragas em navios e ambientes domésticos, e daí então a serem criados como animais de estimação (ROBINSON, 1977).

Situada dentro da ordem Carnívora, a família Felidae é constituída por quatro subfamílias com 18 gêneros e 37 espécies estando todas, com exceção do *Felis catus*, ameaçadas de extinção. Oito espécies ocorrem em território brasileiro: gato do mato (*Leopardus tigrinus*), gato maracajá (*Leopardus wiedii*), gato palheiro (*Oncifelis colocolo*), gato mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*), gato geoffroyi (*Oncifelis geoffroyi*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), onça pintada (*Panthera onca*) e onça parda (*Puma concolor*) (NOWAK, 1991).

Por descender de felinos selvagens (*Felis catus silvestres*) o gato doméstico pode ser utilizado como excelente modelo experimental, para viabilizar pesquisas em reprodução de felídeos selvagens em risco de extinção (POPE et al., 1993; POPE, 2000).

Os avanços da degradação ambiental têm como consequência direta a redução e a fragmentação dos inúmeros ecossistemas, o que limita as trocas genéticas e promovem consangüinidade (WILDT et al., 1992; SWANSON, et al., 1996; BITTENCOURT, 2003). Aliado a isto, a caça ilegal e o tráfico de animais têm levado uma grande diversidade de espécies a sofrerem rápido declínio em seu número, com consequente perda da diversidade genética. Neste contexto,

técnicas de reprodução assistida se transformaram em importantes ferramentas de otimização do desempenho reprodutivo de espécies silvestres. Dentre estas, a coleta e avaliação de sêmen, a indução hormonal do estro, o congelamento de gametas e embriões, a fertilização *in vitro* e a transferência de embriões intra e inter espécies, são atualmente as mais preconizadas para a conservação de felídeos silvestres ameaçados de extinção (GUIMARÃES, 2001).

Estas biotecnologias reprodutivas visam principalmente a manutenção de variabilidade genética nas populações em cativeiro e em vida livre, além da proliferação destes animais. A criopreservação de embriões pode favorecer práticas para o intercâmbio de material genético entre instituições e mesmo para populações de vida livre, diminuindo os custos com o transporte e o estresse dos animais envolvidos (SWANSON, et al., 1996; BITTENCOURT, 2003).

## **2.0 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 CICLO ESTRAL DA GATA DOMÉSTICA**

A gata doméstica é classicamente definida como uma espécie poliestral sazonal nos países com marcante sazonalidade climática. Segundo JEMMETT & EVANS (1977), nestes países, mais da metade dos animais de raças de pelo curto ciclaram durante todo o ano e animais de raças de pelo longo apresentam um período de anestro. Em condições de laboratório, com 12 a 14 horas de luz/dia, o anestro pode ser reduzido ou mesmo eliminado em gatas (POPE, 2000). Nas condições climáticas brasileiras, onde poucos relatos foram observados, ÁVILA et al., (2003) descrevem que na Zona da Mata mineira, gatas mantidas em condições de iluminação natural, sem haver cópula, ciclaram durante todo o ano, não sendo observada a presença de anestro. A duração do ciclo estral da gata, quando esta não copula, é de 14 a 21 dias (GOODROWE et al., 1989). Estes animais são ovuladores reflexos, ou seja, a ovulação só ocorre depois do coito, e este induz a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez leva o aumento sérico do hormônio luteinizante (LH), culminando com a ovulação (WILDT et al., 1980; JOHNSON & GAY, 1981; GOODROWE et al., 1989). Porém a ovulação pode ocorrer espontaneamente em algumas gatas (JOHNSTON et al., 1996; JOHNSTON et al., 2001).

Enquanto uma simples cópula é suficiente para estimular a liberação de LH na coelha, outra ovuladora induzida (HILLIARD et al., 1964), a gata usualmente necessita de múltiplas cópulas para a ovulação ocorrer em alta proporções (GOODROWE et al., 1989). Entretanto WILDT et al., (1980); WILDT et al., (1981); SCHIMIDT et al., (1983) citam que uma única cópula seja capaz de induzir a ovulação em algumas gatas.

Outros estímulos que não a cópula natural, incluindo estimulação direta da vagina e a administração de hormônios como a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e o hormônio liberador de Gonadotrofinas (GnRH), mostraram ser eficientes em induzir a liberação de ovócitos maduros (HAMMER et al., 1970; SOJKA et al., 1970; BOWEN, 1977; WILDT& SEAGER, 1978; CLINE et al., 1980; GOODROWE et al., 1989; HOWARD, et al., 1992; POPE et al., 1993; POPE,2000).

Os estágios do ciclo estral estão descritos na figura 1 e incluem: pró-estro, estro, pós-estro, diestro e anestro (JOHNSTON et al., 2001).

O pró-estro é dificilmente observado na gata doméstica (SHILLE et al., 1979; CHRISTIANSEN, 1988), sendo que a maioria das gatas entram diretamente no próximo estágio, o estro (JOHNSTON et al., 2001). Quando o pró-estro ocorre é caracterizado pelo ato da gata se esfregar contra qualquer objeto, sem que ocorra sua aceitação pelo macho. A duração deste estágio é de zero a dois dias (JOHNSTON et al., 2001). A fase do pró-estro está associada ao rápido crescimento folicular e abrupto aumento nas concentrações de estrógeno circulante.

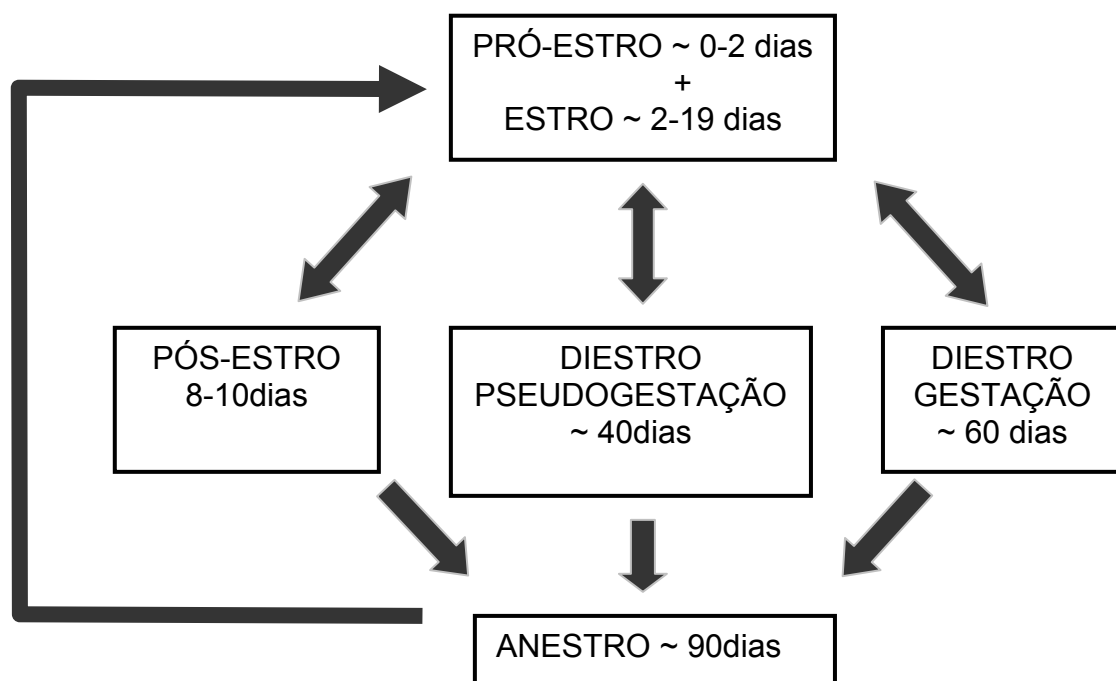


Figura 1-Inter-relação entre possíveis estágios do ciclo estral de gatas domésticas (JOHNSTON et al., 2001).

O estro é de fácil observação durando em média de 6 dias (SHILLE et al., 1979; CHRISTIANSEN, 1988; POPE, 2000) sendo caracterizado pela aceitação do macho pela fêmea. É neste estágio que ocorre a máxima atividade folicular e maior secreção de estrógenos na fêmea. As características comportamentais durante o estro são: sapateamento e agachamento dos membros, hiperextensão dos membros pélvicos causando lordose, lateralização da cauda e apresentação da vulva para a monta. Muitas fêmeas fazem vocalização para chamar a atenção dos machos (JOHNSTON et al., 2001).

Naqueles ciclos que não ocorre o coito, o próximo estágio é denominado de pós-estro, caracterizado por um período interestral observado em animais que não foram induzidos a ovular; sua duração é de 8 a 10 dias.

Naqueles ciclos onde houve cópula segue-se o diestro que é a fase luteal do ciclo estral, uma vez que os animais foram induzidos a ovular. Em animais que falharam na concepção a duração deste período é em torno de 40 dias sendo denominado de pseudogestação (VERHAGE et al., 1976; GOODROWE et al., 1989; JOHNSTON et al., 2001). Nas gatas que tiveram sucesso na concepção a persistência luteal dura por todo período gestacional para a manutenção deste.

O último estágio do ciclo estral é denominado de anestro sendo determinado pela ausência “sazonal” da atividade ovariana. Este estágio é bem caracterizado nos países com estações climáticas bem definidas (CHAKRABORTY, et al., 1979; JOHNSTON et al., 2001). Já nos países ditos de clima tropical, como no Brasil, esta inatividade sazonal não ocorre, ou pelo menos é bem menos intensa, interferindo apenas na duração dos estágios, visto que no verão, os ciclos se intensificam, sendo mais curtos nesta época (ÁVILA et al., 2003). A detecção das diferentes fases do ciclo estral da gata é possível através de esfregaço vaginal (SHILLE et al., 1979; CLINE et al., 1980; TONIOLO et al., 1995; ÁVILA et al., 2003).

SHILLE et al., (1979) relacionaram as concentrações plasmáticas de  $17\beta$ -estradiol com o comportamento estral e cornificação do epitélio vaginal, concluindo que a porcentagem de células totalmente cornificadas aumentou de 5 para 40% do total da população de celular e as células parcialmente cornificadas, com núcleo intacto, diminuíram de 45 para 6%, progressivamente, do primeiro ao quarto dia da fase folicular; as células não cornificadas, geralmente em baixo percentual durante todo o ciclo (1 a 6%), estavam ausentes nos dias 4 a 7 da fase

folicular e as células parcialmente cornificadas, com núcleos degenerados, não mudaram muito durante o ciclo (40 a 50%).

A morfologia externa ovariana durante o período ovulatório tem sido fotograficamente documentada (WILDT et al., 1977; WILDT et al., 1980). Os folículos maduros são identificados como suaves proeminências na superfície ovariana (3 a 5 mm de diâmetro), em marcante contraste com os avermelhados e proeminentes corpos hemorrágicos pós-ovulatórios. O corpo hemorrágico dá lugar ao corpo lúteo (CL) que possui cor alaranjada e diâmetro aproximadamente de 4,5mm, aos 12-16 dias após a cópula (DAWSON & FRIEDGOOD, 1940; WILDT et al., 1981).

## **2.2 ENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO NA GATA DOMÉSTICA**

O comportamento estral ocorre durante o pico de crescimento folicular com elevação do  $17\beta$ -estradiol no plasma acima de  $70 \text{ pmol.L}^{-1}$ , ocorrendo simultaneamente a cornificação da mucosa vaginal (SHILE et al., 1979). A flutuação nas concentrações séricas de  $17\beta$  estradiol está relacionada com a dinâmica folicular, sendo causada principalmente pela maturação e ruptura do folículo (WILDT et al., 1981). Os autores comentam ainda que não existe qualquer relação direta entre a concentração ou duração de  $17\beta$  estradiol circulante com menor ou maior resposta do LH, porém títulos maiores que  $20 \text{ pg/ml}$  de  $17\beta$  estradiol plasmático estão relacionados com a receptividade sexual da fêmea e intensa atividade folicular.

As concentrações séricas de LH permanecem  $<10\text{ng/ml}$  até que estímulo suficiente, copulatório ou outro, inicie a sua liberação pela hipófise. Perfil similar é observado para gatas que ovulam com uma única cópula (WILDT et al., 1980). Quando múltiplas cópulas ocorrem com intervalos menores que 2 horas, o pico de LH é alcançado rapidamente e declina a valores basais com 12-24h depois da cópula (CONCANNON et al., 1980; JOHNSON & GAY, 1981; SHILLE et al., 1983; GLOVER et al., 1985). Cópulas ocorrendo a cada 3h aumentam a duração da liberação de LH e os valores permanecem elevados por 24h após a cópula inicial

eventualmente decrescendo a valores basais 38h após o primeiro coito (WILDT et al., 1980, 1981; SCHIMIDT et al., 1983). As concentrações observadas no pico de LH após a cópula (50-70 ng/ml) (WILDT et al., 1980, 1981; SCHIMIDT et al., 1983) são 10 a 50% menores que os níveis máximos que a hipófise é capaz de produzir. O pico de LH após a administração de GnRH exógeno chega a 540 ng/ml e 115 ng/ml em fêmeas no estro e no anestro, respectivamente (CHAKRABORTY et al., 1979).

Durante um estro com cópula, as concentrações de progesterona circulantes permanecem <1ng/ml até ocorrer o pico de LH. PAAPE et al., (1975) estimaram que a ovulação ocorre 48h antes do aumento da progesterona. Contudo, amostragem de sangue mais freqüente tem determinado que o aumento da progesterona é coincidente com a ovulação, ocorrendo no máximo 44-60h após o pico de LH (WILDT et al., 1981; SCHIMIDT et al., 1983).

Evidências endócrinas e histológicas indicam que na gata pseudogestante o CL permanece funcional por 35-44 dias (PAAPE et al., 1975; VERHAGE et al., 1976; WILDT et al., 1981). O pico de progesterona sérica acontece por volta do 14º dia depois da cópula (60-90 ng/ml), este pico é sustentado até o 41º dia e então decresce a valores basais (VERHAGE et al., 1976; WILDT et al., 1981; JOHNSTON et al., 2001).

Análises endócrinas sugerem que o CL permanece funcional por toda a gestação da gata, regredindo próximo ou até mesmo no parto (VERHAGE et al., 1976; SCHIMIDT et al., 1983). O CL está completamente regredido na fêmea não lactante em poucos dias pós-parto. A implantação dos embriões começa no dia 13 após a cópula, depois da ruptura da zona pelúcida no dia 12 (DRESSER et al., 1988) e a gestação dura em média 66 dias variando de 62 a 71 dias da primeira cópula (TSUTSUI & STABENFELDT, 1993; ROOT et al., 1995; JOHNSTON et al., 1996; JOHNSTON et al., 2001).

A duração da fase luteal é definida como o intervalo após a cópula, quando as concentrações de progesterona sérica são >1 ng/ml (SHILLE et al., 1979; WILDT et al., 1981). A administração de prostaglandina F-2α (PGF-2α) durante a fase luteal não causa a regressão do corpo lúteo formado como resultado de uma cópula com um macho vasectomizado (SHILLE et al., 1979) ou por administração de hCG (WILDT et al., 1979). O corpo lúteo de gatas tratadas com PGF2α no momento do pico de progesterona (dias 11-15) não decresce em tamanho, e a

progesterona circulante não é afetada ou diminui somente transitoriamente. A histerectomia na gata não causa a regressão do CL e a partir daí concluiu-se que o útero não desempenha papel na luteólise (SHILLE et al., 1979; WILDT et al., 1979; WHEELER et al., 1994).

A progesterona sérica geralmente tem um pico perto do dia 26 da gestação (Dia 1= dia do pico de LH), embora exista considerável variação individual (SCHIMIDT et al., 1983). Entre gatas, o pico de progesterona tem sido mensurado de 11 a 60 dias após a ovulação e em concentrações de 13,5 a 57,0 ng/ml, sugerindo que os níveis circulantes desse hormônio são um pobre critério para identificação da gestação (SCHIMIDT et al., 1983). Os níveis de progesterona na gata prenhe são sustentados por 25-28 dias a mais que na gata pseudogestante, declinando vagarosamente e alcançando valores basais perto ou no próprio parto (VERHAGE et al., 1976; SCHIMIDT et al., 1983).

## **2.3 BIOTECNOLOGIAS APLICADAS A REPRODUÇÃO DE FELINOS**

### **2.3.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

O sucesso no processo de inseminação artificial em felídeos é dependente do sítio de deposição do sêmen no trato genital feminino; taxas baixas de gestação são observadas com a deposição intravaginal do sêmen (PLATZ et al., 1978). Segundo HOWARD et al., (1992), fêmeas anestesiadas apresentam comprometimento no transporte espermático. Desta forma foi desenvolvida a técnica de Inseminação intra-uterina (HOWARD et al., 1992), apesar de mesmo esta apresentar resultados dependentes do momento da anestesia, ou seja, se for feita no período pré-ovulatório apenas algumas fêmeas ovularão e a taxa de prenhez é baixa, mas se a intervenção cirúrgica for realizada no período pós-ovulatório, todas as gatas ovularão a taxa de prenhez se eleva para 50% (HOWARD et al., 1992; DONOGHUE et al., 1996). Em procedimentos de ovulação induzida, esta ocorre cerca de 25 a 27 horas após a injeção de hCG. Assim, a anestesia para a inseminação artificial deve ser feita cerca de 36 horas

após a aplicação do hCG, tendo em vista que a viabilidade do ovócito é de pelo menos 14 horas in vivo (HOWARD et al., 1992).

### **2.3.2 INDUÇÃO DA ATIVIDADE OVARIANA E OVULAÇÃO**

A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) ou o hormônio folículo estimulante (FSH), podem ser utilizados para a indução de atividade ovariana e a gonadotrofina coriônica humana (hCG), pode ser utilizada para indução da ovulação em felídeos (HOWARD et al., 1992; PLATZ, et al.,1978; POPE et al., 1993; POPE et al.,1998), com resultados semelhantes aos observados na reprodução natural (CLINE et al., 1980). Devido sua longa meia vida plasmática, de aproximadamente 120 h, uma única injeção de eCG estimula a atividade folicular em felídeos, ao contrário do FSH, que deve ser ministrado em várias séries diárias devido sua curta persistência circulatória (CLINE et al., 1980).

As induções da atividade ovariana e da ovulação devem ser iniciadas no estágio pós-estro, o qual pode ser determinado pela ausência de comportamento do estro ou acompanhamento por citologia vaginal. Vários protocolos (variações de intervalo e dosagens) já foram testados, tendo resultados variados em relação ao número de embriões obtidos, bem como na qualidade dos mesmos. Os melhores resultados foram obtidos utilizando 100 UI hCG após 80-84h da aplicação de 150 UI de eCG (POPE et al., 1998; DONOGHUE et al.,1992; GOODROWE et al., 1988).

Em procedimentos de transferências de embriões, as fêmeas receptoras podem estar naturalmente sincronizadas ao serem acasaladas com gatos vasectomizados (KRAEMER et al., 1979) ou serem sincronizadas através do uso de gonadotrofinas exógenas (GOODROWE et al., 1989; POPE et al., 1993; POPE et al., 1998; POPE, 2000; SANTANA, 2005).

Segundo SWANSON et al., (1995), o uso das gonadotrofinas para indução da atividade ovariana em intervalos muito curtos estimula a síntese de imunoglobulinas que neutralizariam o efeito das gonadotrofinas. Para prevenir isto,

um intervalo de aproximadamente seis meses deve ser observado entre os tratamentos hormonais (SWANSON et al., 1996).

### 2.3.3 COLETA E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Fisiologicamente na gata, cerca de 3 a 7 folículos se desenvolvem até um diâmetro de 1 a 2 mm durante o pró-estro (CHRISTIANSEN, 1988; GOODROWE et al., 1989). Depois da cópula, os folículos ativados aumentam em tamanho e, na ovulação, o ovócito é liberado juntamente com as células do *cumulus oophorus* (GOODROWE et al., 1989). A ovulação ocorre de 24 a 50 horas após o coito (CHRISTIANSEN, 1988) sendo que a maioria dos embriões sofre sua primeira clivagem 64h após o coito, permanecendo na tuba uterina durante as 136h iniciais após o primeiro coito. A partir desse período os embriões entram no útero como mórula compacta 4,5 a 5 dias após a ovulação, ocorrendo deste momento uma migração transuterina (SWANSON et al., 1994). Até a implantação do mesmo no 13º dia após a cópula (DRESSER et al., 1988). Na figura 2 estão resumidas a cronologia dos eventos de ovulação, fertilização do ovócito e desenvolvimento embrionário em gatas domésticas.

A recuperação de embriões na gata doméstica deve ser feita entre 6 e 9 dias após a cópula (KRAEMER et al., 1979). Segundo SWANSON et al., (1996), esta coleta é feita principalmente por laparotomia, através da canulação e lavagem dos cornos uterinos em separado. SANTANA et al., (2004), descrevem a técnica de coleta transcornual, indicando esta como menos traumática e mais eficaz.

Segundo IETS (1998) os embriões coletados podem ser classificados de acordo com sua morfologia como:

EXCELENTE ou BOM - (GRAU I) - Massa embrionária simétrica e esférica, com blastômeros (células) individuais uniformes em tamanho, cor e densidade. As irregularidades devem ser relativamente menores e ao menos 85% do material celular deve ser de massa embrionária viável e intacta. Este julgamento deve ser baseado na porcentagem de células embrionárias representadas pelo material

extravasado no espaço perivitelino. A zona pelúcida (ZP) deve ser lisa e não apresentar superfície côncava ou plana.

REGULAR - (GRAU II) - Irregularidades moderadas na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 50% do material celular deve compor a massa embrionária viável, intacta.

POBRE - (GRAU III) - Irregularidades maiores na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material deve formar a massa embrionária viável, intacta.

DEGENERADO - (GRAU IV) - Embriões em degeneração, ovócitos ou embriões de uma célula não viáveis.

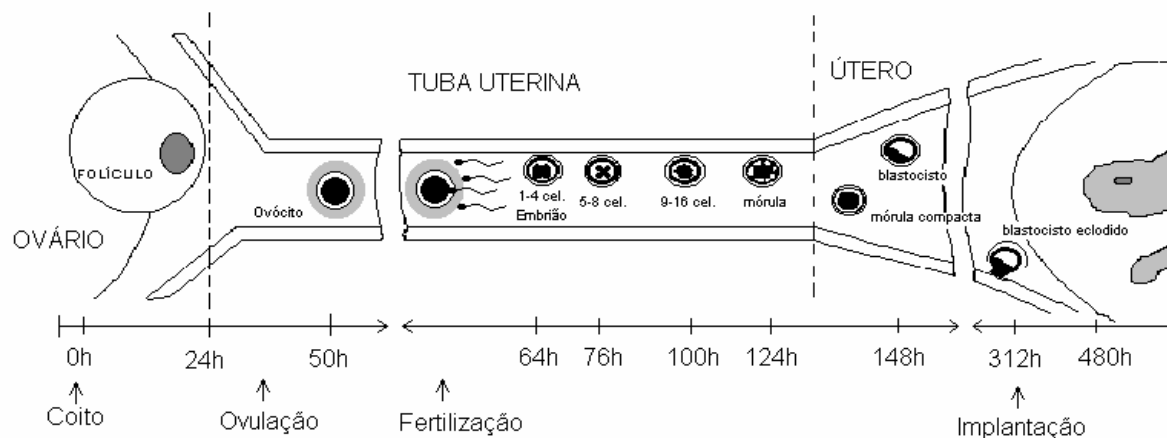


Figura 2- Esquema de ovulação, fertilização do ovócito e desenvolvimento embrionário em gatas domésticas (modificado de: SWANSON et al., 1994).

A transferência de embriões (TE) é uma biotecnologia que permite a maximização reprodutiva de animais de domésticos com características fenotípicas e produtivas desejáveis, além da aplicabilidade para espécies ameaçadas de extinção. Esta técnica fundamenta-se na correta sincronização do ciclo em fêmeas doadoras e receptoras compatíveis (REINCHENBACH et al., 2002).

A recuperação de embriões e sua transferência intra e inter específica tem sido alcançada em felídeos (BOWEN et al., 1982; POPE et al., 1993; POPE, 2000). O primeiro sucesso de TE em gatas domésticas ocorreu em 1979, a partir de 47 embriões coletados de nove gatas e transferidos a fresco para nove gatas receptoras, resultando em quatro filhotes nascidos de duas gestações (KRAEMER et al., 1979).

DRESSER et al., (1988) obtiveram o primeiro sucesso com a transferência de embriões felinos criopreservados. Em POPE et al., (1994) obtiveram três filhotes vivos a partir da transferência de embriões felinos obtidos por fertilização *in vitro* e criopreservados.

Na América Latina, o primeiro relato na obtenção de filhotes felinos vivos em técnica de transferência de embriões foi descrito por SANTANA (2005), através da indução artificial da atividade ovariana e da ovulação com o uso de gonadotrofinas, coleta e transferência embriões cirúrgica de por meio de laparotomia com lavagem transcornual dos cornos uterinos utilizando meio de lavagem Talp Hepes. O mesmo utilizou 16 gatas domésticas, com a obtenção de seis embriões por animal, os quais foram inovulados à fresco em quatro receptoras, obtendo-se seis filhotes.

#### **2.3.4 CONGELAMENTO DE EMBRIÕES**

A inseminação artificial, assim como a transferência, e principalmente a criopreservação de embriões, tornaram-se técnicas rotineiras em espécies domésticas, firmando-se como ferramenta auxiliar a outras biotecnologias reprodutivas. O congelamento de embriões visa manter o metabolismo embrionário em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado (RODRIGUES, 1992). Esta técnica tem sido considerada uma alternativa promissora, principalmente na formação de bancos de germoplasma de embriões de espécies de interesse comerciais, raras e em processo extinção (ALLER et al., 1995).

Os primeiros relatos de congelamento de embriões foram apresentados por WHITTINGHAM et al., (1972) e WILMUT (1972), que descrevem a viabilidade de

embriões de camundongos de resistirem ao processo de congelação e descongelação. Estes autores empregaram o glicerol como crioprotetor base, em procedimentos de banhos sucessivos em soluções de concentrações crescentes. Esta técnica possibilitou o congelamento comercial de embriões de mamíferos, tornando-se a metodologia mais difundida como técnica convencional LEIBO (1983) desenvolveu o método “one-step”, no qual os embriões são congelados a partir de uma única diluição crioprotetora de glicerol, sendo associada à sacarose no momento do descongelamento.

Desde então, muitos crioprotetores vem sendo empregados em concentrações diferentes ou mesmo em combinação de dois ou mais deles, de acordo com o protocolo de congelamento (IM et al., 1997; YOUNG et al., 1998). Estas soluções são adicionadas em uma ou mais etapas, sendo os embriões criopreservados com diferentes curvas de resfriamento até o congelamento podendo, em alguns casos, proceder-se diretamente o congelamento a partir da temperatura ambiente (LANDIM-ALVARENGA, 1995). Da mesma maneira, no descongelamento a temperatura de aquecimento têm variado entre 20 a 37°C, em banho-maria ou ao ar, e a posterior retirada do crioprotetor realizada em um ou mais passos (LANDIM-ALVARENGA, 1995).

Os primeiros trabalhos com congelamento de embriões felinos são descritos por DRESSER et al., (1988) a partir de mórulas e blastocistos recuperados de doadoras induzidas artificialmente. Estes embriões foram resfriados, em taxas controladas, e congelados em meio PBS adicionado a 15% de soro fetal bovino e glicerol a 10%, produzindo gestação em cinco de 11 animais inovulados, com o nascimento de 17 filhotes.

POPE et al., (1994) verificaram a viabilidade da criopreservação de embriões de gatos produzidos *in vitro*, com o resfriamento controlado de embriões nos estágios de duas a quatro células, a uma temperatura de -30°C em meio de 1,4 molL<sup>-1</sup> de propanodiol e 0,125 molL<sup>-1</sup> de sacarose. Os mesmos autores observaram o desenvolvimento pós criopreservação obtendo taxas de 73 a 82% de desenvolvimento *in vitro* até os estágios de mórula e blastocisto.

#### **2.3.4.1 MECANISMOS DE CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOINJÚRIAS**

A sensibilidade dos embriões à criopreservação varia em função da espécie e grau de desenvolvimento embrionário. Neste contexto, a taxa de resfriamento, a concentração e associação de crioprotetores são os fatores determinantes de sucesso na criopreservação (GORDON, 1994).

Os mecanismos de ação dos crioprotetores, não estão totalmente elucidados. De acordo com MAZUR (1970), ao submeter-se uma suspensão celular contendo crioprotetores a temperaturas ao redor de  $-5^{\circ}\text{C}$ , tanto as células como o meio circundante permanecem descongelados devido ao abaixamento do ponto de solidificação pelas substâncias crioprotetoras. Entre  $-5$  e  $-15^{\circ}\text{C}$  normalmente ocorre a formação de gelo no meio extracelular, mas as células continuam descongeladas e super-resfriadas. A água super-resfriada do interior da célula tem um potencial químico maior do que a água do meio extracelular parcialmente congelada e, dessa forma, a água sai da célula para se congelar externamente. Se a congelação for lenta a célula perde água com rapidez adequada, não sofrendo a formação de cristais intracelulares. Por outro lado, se a célula for resfriada rapidamente, esta não perde água com rapidez suficiente para manter o equilíbrio, provocando a formação de cristais intracelulares levando à lise das membranas.

Segundo LANDIM-ALVARENGA (1995), o gelo intracelular não resulta da cristalização espontânea da água celular, mas sim do contato com o gelo extracelular, que cresce através dos canais aquosos na membrana; a membrana é uma barreira à passagem dos cristais de gelo a temperaturas ao redor de  $-10^{\circ}\text{C}$ , mas deixa de ser barreira em temperaturas menores.

MAZUR (1970) considerou que no processo de congelamento celular há estreita relação entre velocidade e aparecimento de lesões celulares. A medida que a velocidade de congelamento aumenta, ocorre um aumento da sobrevivência embrionária, até que se atinja uma relação ideal, com índice de sobrevivência máximo. As lesões que ocorrem antes do congelamento total são respostas aos efeitos da concentração de solutos, e as que ocorrem após o congelamento relacionam-se à formação de cristais intracelulares.

Se a taxa de resfriamento celular for muito lenta produz-se o chamado efeito solução, que caracteriza-se pela formação de gelo constituído praticamente de água pura, na solução que envolve as células, ao iniciar o congelamento. Os sais contidos na solução concentram-se cada vez mais, o ponto de congelamento vai diminuindo e as células, por sua vez, respondem a essa crescente concentração de eletrólitos, cedendo água ao meio (desidratação), a que leva à diminuição do volume da célula e destruição da membrana citoplasmática (ALLER et al., 1995).

Por outro lado, se a taxa de resfriamento for muito rápida, isto é, a água interna não possuir tempo hábil para sair da célula, congelar-se-á intracelularmente levando a formação desordenada de cristais de gelo, lesando a célula (ALLER et al., 1995). Se o descongelamento posterior for lento, os cristais sofrerão reorganização (recristalização migratória) provocando danos mecânicos às organelas celulares (ALLER et al., 1995).

#### **2.3.4.2 CRIOPROTETORES**

Os crioprotetores, segundo NIEMANN (1991), são substâncias utilizadas nos processos de criopreservação de embriões e devem ser adicionados ao meio para que haja proteção do embrião durante o congelamento e descongelamento. Os crioprotetores podem ser divididos em duas categorias: os intracelulares ou penetrantes e os extracelulares ou não penetrantes (NIEMANN, 1991). Na primeira categoria estão substâncias de baixo peso molecular, como os álcoois (glicerol, DMSO, etilenoglicol, 1,2 propanodiol, metanol e etanol).

HUBÁLEK (2003) relata que todos os crioprotetores intracelulares têm ação hidrofílica elevada, devido à presença de grupos químicos formados por um hidrogênio forte, especialmente os formados pelos grupos que contém hidroxila, amidas, sulfóxidos e, em menor intensidade, para os que possuem os grupos carboxila e aminas. Por outro lado, os crioprotetores que não penetram nas células formam uma camada viscosa na superfície celular, causando o influxo parcial da água e impedindo a formação de cristais de gelo no interior da célula.

Os crioprotetores intracelulares possuem a habilidade de reduzir a concentração de eletrólitos extracelulares, prevenindo o “efeito de solução”. Os crioprotetores de baixo peso molecular, como o glicerol, penetram nos blastômeros promovendo a saída de água, minimizando a formação de gelo intracelular e estabilizando as membranas celulares. Este crioprotetor tem sido amplamente utilizado em grande variedade de células de mamíferos, em concentrações que variam de 1.0 a 4.0 molares (ALLER et al., 1995).

Os crioprotetores extracelulares ou não penetrantes incluem os açúcares tais como galactose, glicose, trealose, manitol, sorbitol e sacarose. Isoladamente apresentam efeito estabilizador sobre as membranas, porém, não apresentam efeito crioprotetor eficaz (CROWE et al., 1983). Sua principal utilização é em associação aos crioprotetores intracelulares uma vez que, por possuir alto peso molecular, permanecem no meio extracelular promovendo um período inicial de saída de água, com posterior ingresso dos crioprotetores intracelulares (ALLER et al., 1995; FRIEDLER et al., 1988). A adição de açúcares como sacarose, dextrose e trealose aumentam a sobrevivência *in vitro* de blastocistos após a vitrificação (SAITO et al., 1994).

Os crioprotetores são usualmente diluídos em solução salina tamponada (Phosphate Buffered Saline - PBS) acrescida de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) ou 10% de soro fetal bovino (SFB). No entanto, tem sido relatada também a diluição em meios como TCM-199 (Medium culture tissule -199) (HAMANO et al., 1992; OTOI et al., 1993; PALASZ & MAPLETOFT, 1996; PAPIS et al., 1999), H-CZB (MARTINO et al., 1996), TCM-199/Hepes (VAJTA et al., 1998), acrescidos ainda de diferentes concentrações de antibióticos (OTOI et al., 1995; OTOI et al., 1998).

De acordo com SCHNEIDER & MAZUR (1984), quando o embrião é exposto a um crioprotetor que penetra na célula, como o glicerol, ele inicialmente se retrai devido à perda de água causada pela hiperosmolaridade inicial do meio extracelular, uma vez que o embrião é muito mais permeável à saída da água do que à entrada do crioprotetor. Esta retração irá continuar até que o efluxo de água seja balanceado com o influxo do crioprotetor, sendo que o índice de entrada do crioprotetor irá depender do seu coeficiente de permeabilidade e da temperatura da solução. O equilíbrio é atingido quando o embrião retorna ao seu volume inicial.

Para LEIBO (1983), o intervalo de tempo em que ocorre o retorno ao volume inicial está relacionado com: a espécie do embrião em questão, o estágio de desenvolvimento, a relação superfície/volume, as características intrínsecas do crioprotetor e a temperatura a qual o embrião é exposto.

Apesar dos efeitos benéficos do crioprotetor, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após a criopreservação. Deve-se levar em consideração que os próprios crioprotetores apresentam efeito tóxico, limitando a concentração em que podem ser utilizados (FAHY, 1986). Alguns crioprotetores, em altas concentrações, podem alterar em demasia a polaridade do meio lesando as membranas (ARNOLD et al., 1983). A ação tóxica dos crioprotetores pode ainda se dar sobre a organização dos filamentos de actina que, juntamente com o processo de criopreservação, pode desnaturar criticamente as funções das organelas e a citoarquitetura do embrião (DOBRINSKY, 2002).

Assim após o descongelamento deve-se remover o crioprotetor do interior da célula, preferencialmente de forma lenta, através de banhos em soluções de concentrações decrescentes, uma vez que a re-entrada brusca de água no meio intracelular também leva à lise das membranas (LANDIM-ALVARENGA, 1995).

#### **2.3.4.3 MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO**

Uma vez coletados, embriões de boa qualidade (grau I e II) podem ser mantidos em meio de cultivo, à temperatura ambiente, por períodos de 6 até 12 horas ou mantidos em geladeira, à temperatura de 2°C a 8°C até 12 horas, sem que haja perdas significativas da vitalidade embrionária. Após este período os embriões começam a entrar num processo lento de degeneração e devem ser transferidos rapidamente para as receptoras (REICHENBACH et al., 2002). Embriões de qualidade inferior (grau III) são bem mais sensíveis e quanto maior o tempo de permanência nestas condições, menores serão, a viabilidade embrionária e a taxa de gestação (REICHENBACH et al., 2002).

A criopreservação de embriões por técnicas de congelamento apresentam uma variada série de protocolos e as mais freqüentes envolvem a utilização de um único crioprotetor intracelular, como glicerol, etilenoglicol ou propanodiol, ou a associação destes a crioprotetores extracelulares como a sacarose, trealose ou galactose (DOBRINSKY, 2002).

Os métodos de congelamento consideram principalmente a concentração do crioprotetor, a taxa de exposição das células ao mesmo e a velocidade de resfriamento (SHAW et al., 2000). O uso dos crioprotetores nas concentrações e períodos preconizados é uma tentativa de manutenção do equilíbrio entre danos osmóticos e tóxicos, utilizando diferentes concentrações de crioprotetores e controlando a formação de gelo através da congelação do meio extracelular e desidratação do embrião (SHAW et al., 2000).

A velocidade de resfriamento é também denominada curva de resfriamento, e envolve uma série de procedimentos objetivando a redução gradual da temperatura do embrião, previamente adicionado em meio crioprotetor, até seu armazenamento em nitrogênio líquido. WHITTINGHAN (1980) descreve uma metodologia para resfriamento e congelamento de embriões, a qual tornou-se padrão para os procedimentos na conservação de embriões mamíferos. Esta curva padrão define, após o equilíbrio do embrião ao meio crioprotetor em temperatura ambiente, um resfriamento inicial de  $-2^{\circ}\text{C}$  por minuto, até  $-7^{\circ}\text{C}$ , o “seeding” que consiste na indução da solidificação do meio e um resfriamento final de  $-0,3$  a  $-0,5^{\circ}\text{C}$  por minuto até  $-32^{\circ}\text{C}$ , com posterior imersão em nitrogênio líquido.

A antecipação do congelamento do meio contendo os embriões, ao longo da curva de congelamento, é denominada “seeding”. Este congelamento é induzido pelo contato do invólucro com um instrumento previamente imerso em nitrogênio líquido (WILLADSEN et al., 1974), e é extremamente necessário para que a formação dos cristais de gelo no espaço extracelular induza a uma lenta retirada de água do meio intracelular, permitindo assim as condições adequadas para o congelamento espontâneo do embrião (LEIBO & MAZUR, 1978; PALASZ & MAPLETOFT, 1996).

Para o monitoramento da curva de resfriamento pode-se utilizar alguns artifícios mecânicos, como o uso direto do botijão de nitrogênio líquido, fazendo

um resfriamento através de aproximação controlada dos embriões à lâmina de nitrogênio. Esta curva pode ainda ser feita com o uso de equipamento próprio programável, pois vários tipos de aparelhos são completamente automatizados e capazes de obter padrões controlados de criopreservação com ou sem nitrogênio líquido (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Além dos procedimentos clássicos para o congelamento de embriões, recentemente novas metodologias vêm sendo descritas. A vitrificação se destaca como técnica promissora, sendo um procedimento simples, menos oneroso e que requer menos tempo, do que os métodos de congelação convencionais (DOBRINSKY, 2002; KULESHOVA & LOPATA, 2002). A vitrificação é considerada um método rápido de congelamento, sendo definida como a solidificação de um líquido pela extrema elevação da viscosidade durante o processo de resfriamento (FAHY, 1986). DOBRINSKY (2002) e KULESHOVA & LOPATA (2002) afirmam que este processo provoca a solidificação das células, evitando completamente a formação de cristais de gelo intra ou extracelular. É um protocolo baseado na desidratação do embrião através da sua breve exposição à soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguida da imersão direta em nitrogênio líquido. Estas altas concentrações de crioprotetores e a rápida curva de congelamento leva à solidificação sem que ocorra cristalização (MARTINO et al., 1996). Para a vitrificação são necessárias altas concentrações de crioprotetores, o que pode aumentar o risco de danos osmóticos e tóxicos, porém, a alta velocidade de resfriamento e aquecimento resulta em rápida passagem através da temperatura perigosa, ao redor de 0°C, o que minimiza os danos causados pelo resfriamento que prejudicam, predominantemente, estruturas ricas em lipídeos (VAJTA, 1997).

Ainda dentro dos métodos de vitrificação existe a chamada OPS (Open Pulled Straw), desenvolvida por VAJTA et al., (1997), e considerada como método ultra-rápido de congelamento para embriões. Nesta técnica, a taxa de resfriamento é de 20000°C/min, o que a difere da vitrificação rápida, onde as taxas são de apenas 2000°C /min (KULESHOVA & LOPATA, 2002). A OPS diferencia-se ainda por apresentar redução do volume das soluções, contato direto entre a solução e o material resfriado e diminuição da espessura da parede da palheta. A OPS oferece menos vulnerabilidade, com redução dos danos causados pelo frio, devido à velocidade de resfriamento, porém aumenta o risco

de contaminação, pois o meio fica em contato direto com o nitrogênio líquido (VAJTA et al., 1998).

Embora existam, vários métodos para a criopreservação embriões, em se tratando de embriões felinos, para estes, são utilizados métodos de congelamento convencionais (método three-step) os mesmos utilizados para embriões de bovinos (DESSER et al., 1988).

## 2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLER, J.F.; ALBERIO, R.H.; IOVANNITTI, B.; CABOCEVILA, J. Criopreservación de embriones mamíferos. 1ª Parte. Características generales de la congelación. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.76, nº 2, p.132-136,1995.
- ARNOLD, K.; PRATSCH, L.; GAWRIS, H.K. Effect of poly (ethylene glycol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. **Biochimica Biophysica Acta**, v.782, p.121-128,1983.
- ÁVILA, E.C; PAULA, T.A.R.; COUTINHO, A.C.R.; MINAMI, A.; ARAÚJO A.C. 2003. Avaliação do ciclo estral de gatas domésticas (*Felis catus*) através de colpocitologia. In: **XIII Simpósio de Iniciação Científica**, 2003, Viçosa. Anais, Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, p.760, 2003.
- BITTENCOURT, V.L. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do Lobo Guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illger, 1811) adulto. Viçosa: UFV, 2003, p. 8-10, **Tese de Mestrado**, Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- BOWEN, R. A. Fertilization in vitro of feline ova by spermatozoa from the ductus deferens. **Biology of Reproduction**, V.17, p.144-147,1977.
- BOWEN, R. A.; OLSON, P. N.; OLSON, J. D. & NETT, T. M. Concentration of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. **Biology of Reproduction**, v.27, p.1196-1206,1982.
- CHAKRABORTY, P.L.; WISDT, D.E.; SEAGER, S.W.W.J. Serum LH and ovulatory response to LH-RH in the oestrous and anestrus domestic cat. **Laboratory Animal Science**, v.29, p.338-344,1979.
- CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**, Ed. Manole Ltda, São Paulo, p.230,1988.
- CLINE, E.M.; JENNINGS, L.L.; SOJKA, N.J. Breeding laboratory cats during artificially induced oestrus. **Laboratory Animal Science**, v. 30 p.1003-1005, 1980.
- CONCANNON, P.; HODGSON, B.; LEIN, D. Reflex LH release in oestrous cats following single and multiple copulations. **Biology of Reproduction**, v.23, p.111-117,1980.

- CROWE, J.; CROWE, L.; MOURADIAN, R. Stabilization of biological membranes at low water activities. **Cryobiology**, v.20, p.346-356,1983.
- DAWSON, A.B.; FRIEDGOOD H.B. The time and sequence of pre-ovulatory changes in the cat ovary after mating or mechanical stimulation of the cervix uteri. **Anatomical Record**, v.76, p.411, 1940.
- DOBRINSKY J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.
- DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; MUNSON, L.; BROWN, J.L.; WILDT, D.E. Influence of gonadotrophin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v.46, p. 972-980, 1992.
- DONOGHUE, A. M.; BYERS, A. P.; JOHNSTON, L.A.; ARMSTRONG, D.L.; WILDT, D.E. Timing of ovulation after gonadotrophin induction and its importance to successful intrauterine insemination in tiger (*Panthera tigris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.107, n°1, p.53-58,1996.
- DRESSER, B. L.; GELWICKS, E. J.; WACH, K. B.; KEELER, G. L. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. **The Journal Experimental Zoology**, v. 246, n°2, p.180-186,1988.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13,1986.
- FRIEDLER, S.; GIUDICE L.C.; LAMB E.J. Cryopreservation of embryos and ova. **Fertility and Sterility**, v.49, p.743-64,1988.
- GLOVER, T.E.; WATSON, P.F.; BONNEY, R.C. Observations on variability in LH release and fertility during oestrus in the domestic cat (*Felis catus*). **Journal of Reproduction Fertility**, v. 75, p.145-152,1985.
- GOODROWE, K.L.; WALL, R.J.; O'BRIEN, S.J.; SCHMIDT, P.M.S.; WILDT, D.E. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v.39, p.355-372,1988.
- GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; SCHMIDT, P.N.; WILDT, D.E. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement v.39, p.73-90, 1989.

- GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. CAB International nº11. Cambridge:UK at the University Press, Storage and Cryopreservation of Oocyte and Embryos, p.293-328, 1994.
- GUIMARÃES, M.A.B.V. Aplicação de técnicas de reprodução assistida em animais silvestres mantidos em cativeiro. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.25, nº 2, p.116-117, 2001.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**, 7ª edição, Manole, p.435-446, 2004.
- HAMANO, S.; KOIKEDA, S.; KUWAYAMA, M.; NAGAI, T. Full-term development of in vitro matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. **Theriogenology**, v.38, p.1085-1090, 1992.
- HAMMER, C. E.; JENNINGS, L.; SOJIKI, N. J. Cat (*Felis catus*) spermatozoa require capacitation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.477-480. 1970.
- HILLIARD, J.G.; HAYWARD, J.N.; SAWYER, C.H. Post coital patterns of secretion of pituitary gonadotropin and ovarian progesterone in the rabbit. **Endocrinology**, v.75, p. 957-961, 1964.
- HOWARD, J.G.; BARONE, M.A.; DONOGHUE A.M.; WILDT, D.E. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, p.175-186, 1992.
- HUBALÉK, Z. Protectants used in cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.46, p. 205-229, 2003.
- IM, K.S.; KANG, J.K.; KIM, H.S. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and pre-incubation before insemination on development capacity of frozen-thawed bovine oocytes. **Theriogenology**, v.47, p. 881-891, 1997.
- JEMMETT, J.E. & EVANS, J. M. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. **Journal Small Animal Practice**, v.18, p.31-37, 1977.
- JOHNSON, L.M.; GAY, V.L. Luteinizing hormone in the cat. Mating induced secretion. **Endocrinology**, v.109, nº1, p.247-252, 1981.
- JOHNSTON, S.D.; ROOT, M.V.; OLSON, P.N.S., Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.261-274, 1996.

- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. The feline oestrous cycle. **Canine and Feline Theriogenology**, cap.25, p.396-405,2001.
- KRAEMER, D.C.; FLOW, B.L.; SCHRIVIER, M.D.; KINNEY, G.M.; PENNYCOOK, J.W. Embryo transfer in the non human primate, feline and canine. **Theriogenology**, v.11, p.51-62,1979.
- KULESHOVA, L.L.; LOPATA A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, v.78, p.449-454, 2002.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C. Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões equinos. 95p. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1995.
- LEIBO, S.P. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Cryo-latters**, v.4, p.387-400,1983.
- LEIBO, S.P.; MAZUR P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: DANIEL Jr., J.C. (Ed.) **Methods in Mammalian Reproduction**, New York: Academic Press, p.179-201,1978.
- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1059-1069,1996.
- MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v.199, p.939-949,1970.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.
- NOWAK, R.M. Wallker's mammals of the world. 5<sup>Th</sup> ed **Johns Holpkins Univpress**, vol.II, p.1192-1193,1991.
- OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; KONDO, S.; SUZUKI, T. Development capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants. **Theriogenology**, v.40, p. 801-807,1993.
- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; SUZUKI, T. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. **Cryobiology**, v.32, p.455-460,1995.

- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHOKAWA, S.; SUZUKI, T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. **Cryobiology**, v.37, p.77-85,1998.
- PAAPE, S.R.; SHILLE, V.M.; SETO, H.; STABENFELDT, G.H., Luteal activity in the pseudopregnant cat. **Biology of Reproduction**, v.13, p.470-474, 1975.
- PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, p.127-149, 1996.
- PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine in vitro matured oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.51, n°1, p.173, 1999.
- PLATZ, C.C.; WILDT, D.E.; SEAGER, S.W.J. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.52, p. 519-527,1978.
- POPE, C.E.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopreservation and successful intra and interspecies embryo transfer. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. v.47, p.189-201,1993.
- POPE, C.E.; MCRAE, M.A.; PLAIR, B.L.; KLELLER, G.L.; DRESSER, B.L. Successful in vivo development of in vitro fertilized two to four –cell cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. **Theriogenology**, v.42, p.513-525,1994.
- POPE, C. E.; JOHNSON, C.A.; MCRAE, M.A.; KELLER, G. L.; DRESSER B. L. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.53, p.221-236,1998.
- POPE, C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids **Theriogenology**, v.53, n°1, p.163-174,2000.
- REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. et al., Transferência de embriões bovinos . In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. (Ed.) **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Varela, p.127-178. 2002.
- ROBINSON, R. **Genetics for Cat Breeders**, Pergamon Press 2ªed. v.58, p.1-11,1977.

- RODRIGUES, J.L. Aspectos da congelação de embriões bovinos In: **Reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões**, 7., Jaboticabal 1992. Anais, Jaboticabal, p.55-79,1992.
- ROOT, M. V.; JOHNSTON, S. D.; OLSON, P. N. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. **Journal American Animal Hospital Association**, v.31,nº5, p.429-433, 1995.
- SAITO, N.; IMAI K.; TOMIZAWA M. Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. **Theriogenology**, v.41, p.1053-1060,1994.
- SANTANA, M.L.; LIMA NETO, A.; ÁVILA, E.C.; ALMEIDA, M.R.; TOLEDO,C.S.; CHIEREGATTO L.C.; PAULA, T.A.R.; COSTA, E.P. 2004. Técnica de lavagem uterina transcornual para coleta de embriões em gatas domésticas (*Felis catus*) para uso potencial em felídeos silvestres. In: **Congresso Brasileiro ABRAVAS**, Jaboticabal, SP, p.20, 2004.
- SANTANA, M.L.; Colpocitologia indução da atividade ovariana e da ovulação e transferência de embriões em gatos domésticos. Viçosa: UFV, 2005 p. 8-10, **Tese de Mestrado**, Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- SCHIMIDT, P.M.; CHAKRABORTY, P. K.; WILDT, D.E. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behaviour in the cat. II Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum oestrus. **Biology of Reproduction**, v.28, p. 657-671,1983.
- SCHNEIDER, V.; MAZUR P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v.21, p.68-79, 1984.
- SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p.59-72, 2000.
- SHILLE, V.M.; LUNDSTROM, K.E.; STANBENFELDT, G.H. Follicular function in the domestic cat as determinited by estradiol-17 $\beta$  concentrations in plasma: Relation to oestrous behaviours and cornification of exfoliated vaginal epithelium. **Biology of Reproduction**, v.21, p.953-963, 1979.

- SHILLE, V. M.M; MUNRO, C.; FARMER, S. W.; PAPKOFF, H.; STABENFELDT, G. H. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.69, nº1, p.29-39,1983.
- SOJKA, N.J.; JENNINGS, L.L.; HAMMER, C.E. Artificial insemination in the cat (*Felis catus*) **Laboratory Animal Care**, v.20, p.198-204,1970.
- SWANSON, W.; ROTH, T.L.; WILDT, D.E. In vivo embryogenesis, embryo migration and embryonic mortality in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v.51, p. 452-464,1994.
- SWANSON, W.F.; HOROHOV, D.W.; GODKE, R.A. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.105, p.35-41,1995.
- SWANSON, W.F.; HOWARD, J.G.; ROTH, T.L.; BROWN, J.L.; ALVARADO, T.; BURTON, M.; STARNES, D. WILDT, D.E. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p.87-94, 1996.
- TONIOLLO, G.H.; CURY, S.R.; VICENTE, W.R.R.; CAMACHO, A.A.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.32, nº2, p.125-129,1995.
- TSUTSUI, T.; STABENFELDT, G.T. Biology ovarian cycle, pregnancy and pseudopreganancy in the domestic cat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.29-35,1993.
- VAJTA, G. Vittrification of bovine oocytes and embryos. **Embryo Transfer Newsletter**, v.15, p.12-18,1997.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vittrification of early stage bovine in vitro produced embryos with open pulled straw (OPS) methods. **Cryo-latters**, v.18, p.191-195,1997.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vittrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction Development**, v.51, p.53-58, 1998.

- VERHAGE, H.G.; BEAMER, N.B.; BRENNER, R.M. Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. **Biology of Reproduction**, v.14, p. 579-585,1976.
- WEELER, A. G.; LEAN, J.; WALKER, M. Peripheral progesterone concentrations in the phase luteal ewe: effects of a beta. **Journal of Endocrinology**, v.116, n°1, p.137-147, 1994.
- WHITTINGHAM, D.G; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse by frozen to 196°C, and 296°C. **Science**, Washington. v.178, p. 411-414,1972.
- WHITTINGHAM, D.G. Principles of embryo preservation. In: **ASHWOOD-SMITH M.J., FARRANT J. (Eds)**, Low temperature in medicine and biology, Tumbridge Wells: Pitman Medical, p.65-83,1980.
- WILDT, D.E.; LEVINSON, C.J.; SEAGER, S.W.J. Laparoscopic exposure and sequential observation of the ovary of the cycling bitch. **Anatomical Record**, v.189, p.443-450, 1977.
- WILDT, D.E.; SEAGER, S.W.J. Ovarian response in the estral cat receiving varying doses of HCG. **Hormone Research**, v.9, p.144, 1978.
- WILDT, D.E.; PANKO, W.B.; SEAGER, S.W. Effect of prostaglandin F2 alpha on endocrine- ovarian function in the domestic cat. **Prostaglandins**, v.18, n°6, p. 883-892, 1979.
- WILDT, D.E.; SEAGER, S.W.J.; CHAKRABORTY, P.K. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. **Endocrinology**, v.107, p.212, 1980.
- WILDT, D.E; CHAN, S.Y.; SEAGER, S.W.; CHAKRABORTY, P.K. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behaviour in the cat. Relationships during the coitus- induced luteal phase and during the oestrous period without mating. **Biology of Reproduction**, v.25, n°1, p.15-18,1981.
- WILDT, D.E.; MONFORT, S.L.; DONOGHUE, A.M.; JONSTON L.A; HOWARD, J.G. Embryogenesis in conservation biology-or how to make an endangered species embryo. **Theriogenology**, v.37, p.161-184,1992.
- WILLADSEN, S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. **Cryobiology**, San Diego California, v.11, p.560,1974.

WILMUT, I. the effect of cooling rate, cryopreservative agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Science**, Elmsford, v.1, p.1071-1070, 1972.

YOUNG, E.; KENNY, A.; PUIGDOMENECH, E.; VAN THILLO, G.; TIVERON, G.; PIAZZA, A. Human oocyte cryopreservation and pregnancy. **Fertility and Sterility**, Suppl., v.70, p.S16, 1998.

### **3.0 DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE GATAS DOMÉSTICAS, EM MEIO TCM 199 MODIFICADO, FRESCOS E PREVIAMENTE CONGELADOS COM GLICEROL, ASSOCIADO À SACAROSE. USO POTENCIAL DA TÉCNICA EM FELINOS SILVESTRES.**

#### **3.1 RESUMO**

Foram utilizados um total de 48 embriões nos estágios de mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto, nos graus I e II, obtidos de 14 gatas domésticas adultas. Dois animais apresentaram manifestação natural do cio e 12 animais foram induzidos artificialmente à atividade ovariana e ovulação. Para tal receberam uma única aplicação de 150 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e 84h após, uma única aplicação de 100 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG). Todos os animais foram acasalados naturalmente e seis dias após a primeira cópula, todas as gatas foram submetidas a laparotomia, e por meio da técnica de lavagem transcornual adaptada, foram coletados os embriões, os quais foram classificados de acordo com IETS (1998). Vinte e sete foram cultivados em meio TCM 199 modificado, em estufa de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, sendo então avaliados quanto ao seu estágio de desenvolvimento, qualidade e número de blastômeros, observando-se uma taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto expandido grau I de 77,7%, com um número médio de 161±15,8 blastômeros. Em 21 embriões foi testada a congelabilidade em meio comercial a base de 10% glicerol associado a 0,1molL<sup>-1</sup> de sacarose. Após o descongelamento, em banho maria a 37°C, nas mesmas condições de cultivo, observou-se uma taxa de desenvolvimento, até o estágio de blastocisto expandido grau I, de 38,1% com um número médio de 139,1 ±11,8 blastômeros. Desta forma, embora o protocolo de congelamento e descongelamento tenha reduzido em 51% a taxa de desenvolvimento de embriões felinos, com uma queda (P< 0,01) do número de blastômeros, mostrou-se viável, com promissor uso *in vivo* em felinos domésticos e silvestres.

**Palavras-chave:** Gonadotrofinas coriônicas, congelamento, embrião, gata Doméstica.

### **3.2 DEVELOPMENT *IN VITRO* OF EMBRYOS OF DOMESTIC CATS, IN MEDIUM TCM 199 MODIFIED, FRESH AND PREVIOUSLY FROZEN WITH GLYCEROL, ASSOCIATE WITH SUCROSE. POTENTIAL USE OF THE TECHNIQUE IN WILD FELINES.**

### **3.3 ABSTRACT**

In this study a total of 48 embryos were used in the compacts morulae, initial blastocysts and blastocysts stages in the degrees I and II, obtained from 14 adult domestic cats. Two animals presented natural manifestation of the oestrus and 12 animals were artificially induced to ovarian activity and ovulation. They received one only application of 150 IU of gonadotropins equine corionic (eCG) and 84h after, one application of 100 IU of gonadotropins human corionic (hCG), and all the animals were coupled naturally. Six days after the first mating, all cats were submitted to laparotomy, and through an adapted transcornual technique the embryos were collected and classified in agreement with IETS (1998). 27 of these were cultivated in a TCM 199 modified with a controlled CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 hours. The embryos were classified by development stage, quality and blastomeres number, observing a development index until expanded blastocysts in degree I of 77.7% with an average of 161±15,8 blastomeres was reached. In 21 embryos the freezing technique was tested in a commercial medium with 10% of glycerol associated with 0,1molL<sup>-1</sup> of sucrose. After the unfreezing, in 37°C water with the same cultivation conditions, a developmental index of 38.1%, was observed until the stage of expanded blastocysts in degree I, with average number of 139.1±11,8 blastomeres. Although the freezing and unfreezing protocols, had reduced the developmental index of feline embryos by 51% and reduce the blastomeres number (P<0.01), it was considerate a viable technique in domestic and wild felines.

Word-key: gonadotropins Corionic, freezing, embryo, domestic cat.

### 3.4 INTRODUÇÃO

Os gatos e cães domésticos vêm há muito sendo criados como animais de companhia e sua reprodução não tem sido sujeita a planejamento em larga escala, como em animais de produção (FARSTAD, 2000). A maioria das criações limitam-se a pequenos criatórios e só recentemente tecnologias de reprodução assistida vêm crescendo, principalmente no cão, no âmbito comercial. Já para o gato as iniciativas econômicas de procedimentos em biotecnologias reprodutivas são escassas (FARSTAD, 2000). Porém, as tecnologias *in vitro* desenvolvidas em felinos apresentam-se muito mais avançadas do que aquelas voltadas para caninos, dado o interesse de instituições de pesquisa no uso do gato doméstico como modelo experimental para espécies ameaçadas (LONG et al., 2003).

A crescente degradação ambiental, provocada pela ação humana, tem como principal consequência a redução e fragmentação de inúmeros ecossistemas, levando grande diversidade de espécies a um rápido declínio populacional (GUIMARÃES, 2002). Segundo os critérios de TEWES & EVERETT (1986), TEWES & SCHMIDLY (1987) MACE & LANDE (1991) e IUCN (1995) todas as espécies de felídeos silvestres brasileiras apresentam-se na condição de ameaçadas de extinção. Neste contexto, técnicas de reprodução assistida, vêm se firmando como importantes ferramentas de otimização do desempenho reprodutivo de espécies silvestres, visando a manutenção da variabilidade genética nas populações em cativeiro e em vida livre (GUIMARÃES, 2002).

O gato doméstico tem sido usado intensamente como modelo experimental para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida incluindo: indução artificial da atividade ovariana e ovulação (GREULICH, 1934; WILDT & SEAGER 1978; ROTH et al., 1997; TSUTSUI et al., 1989), cultura de embriões (JEWGENOW & GÖRITZ, 1995; POPE et al., 1998; MURAKAMI et al., 2002; GÓMEZ et al., 2003), transferência de embriões (PLATZ et al., 1978;

GOODROWE et al., 1988; WOOD et al., 1995; POPE, 2000; TSUTSUI et al., 2000; KITIYANANT et al., 2003; SANTANA, 2005) e criopreservação de embriões (BALLOU, 1992; LEIBO & SONGSASEN, 2002).

A criopreservação de embriões vem sendo apontada como uma alternativa para o estoque de material genético e a diversificação entre populações cativas e mesmo de vida livre, iniciando um conceito do “zoológico congelado” (DRESSER et al., 1988). A produção de filhotes de espécies ameaçadas, através do uso de embriões criopreservados, deverá ser limitada a menos que a viabilidade depois da criopreservação possa ser demonstrada (GÓMEZ et al., 2003). Neste sentido o uso do gato doméstico como modelo experimental no presente trabalho objetivou a avaliação *in vitro* da competência desenvolvimental de embriões dessa espécie, em meio TCM 199 modificado, obtidos por indução artificial da atividade ovariana e ovulação, a fresco e após o congelamento com o glicerol associado à sacarose como crioprotetores.

### 3.5 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados no presente experimento três gatos da raça siamesa adultos e 14 gatas domésticas adultas sem raça definida. Todos os animais foram provenientes do gatil experimental do setor de Morfologia DVT-UFV. As fêmeas foram mantidas em colônia em uma área de 24 m<sup>2</sup>, sendo 12 m<sup>2</sup> de solário. Os machos foram mantidos em recintos individuais com aproximadamente 3 m<sup>2</sup>, sendo 1 m<sup>2</sup> de solário. A todos os animais foram oferecidas ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram monitorados através de registros das manifestações comportamentais do ciclo estral.

Para coleta dos embriões, 12 gatas foram artificialmente induzidas à atividade ovariana e à ovulação. Para tal, no período de pós-estro, as fêmeas doadoras receberam a aplicação de 150 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) Novormon<sup>®</sup> Syntex, por via intramuscular, em dose única, sendo esta denominada hora 0 do dia 1. No dia 4, 84h após a aplicação de eCG para indução da atividade ovariana, foram aplicadas 100 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) Vetecor<sup>®</sup> Calier, para induzir estes animais à ovulação. Todos os animais

estimulados apresentaram sinais comportamentais do estro, semelhante àqueles observados no estro natural. Imediatamente após a aplicação de hCG as doadoras foram acasaladas alternadamente, com pelo menos dois machos, por um período mínimo de duas horas, para garantir um maior número de cópulas. Outras duas fêmeas, que apresentavam histórico de estimulação prévia pelo eCG e hCG, demonstrarem manifestação natural do cio e foram também acasaladas e utilizadas.

Para lavagem uterina e manutenção, congelamento e descongelamento embrionários utilizou-se meio base tamponado (pH 7,2 a 7,4), de formulação comercial (Embriocare<sup>®</sup>), conforme mostrado tabela 1.

No dia 10, ou seja, seis dias após a primeira cópula, todas as gatas foram submetidas a uma intervenção cirúrgica, sob anestesia geral com o uso da associação cloridrato de ketamina (10mg/kg) (Dopalen<sup>®</sup> Vetbrands) e cloridrato de xilazina (1mg/kg) (Calmiun<sup>®</sup> Agener União), e através da técnica de lavagem uterina transcornual adaptada, foi efetuada a coleta dos embriões. Para isto, após a laparotomia, os cornos uterinos foram expostos e estabilizados por meio de pinça hemostática no ligamento próprio do ovário. Uma pinça cirúrgica atraumática, revestida em sua extremidade por uma gaze estéril, foi posicionada na extremidade caudal do corpo do útero, cranial à cérvix. Um cateter venoso (18G) foi introduzido na extremidade tubária de cada corno uterino e um fluxo com meio de lavagem comercial tamponado pH 7,2 a 7,4 (Embriocare<sup>®</sup>) (Tabela 1), previamente aquecido, foi estabelecido entre seringas de 5 mL acopladas aos cateteres, sendo realizada média três lavagens, utilizando 15 mL em média de solução de lavagem por gata. O lavado obtido de cada animal foi transferido para placas de petri estéreis e observado ao microscópio estereoscópico para contagem e qualificação dos embriões obtidos.

Durante o procedimento cirúrgico foram também anotados os corpos hemorrágicos e folículos anovulatórios em cada ovário. A taxa de recuperação embrionária foi calculada através da proporção entre corpos lúteos encontrados e o número de embriões recuperados.

Uma vez coletados, os embriões foram transferidos para placas individuais contendo meio comercial de manutenção (Embriocare<sup>®</sup>) (Tabela 1) e avaliados morfológicamente, segundo a classificação do IETS (1998).

Tabela 1- Substâncias contidas no meio base comercial Embriocare<sup>®</sup> para lavagem uterina e manutenção, congelamento e descongelamento embrionário.

| MEIOS<br>SUBSTÂNCIAS | MANUTENÇÃO | LAVAGEM | CONGELAMENTO | DESCONGELAMENTO |
|----------------------|------------|---------|--------------|-----------------|
| GENTAMICINA          | 0,02mg     | 0,02mg  | 0,02mg       | 0,02mg          |
| ANFOTERICINA         | 0,25mg     | 0,25mg  | 0,25mg       | 0,25mg          |
| BSA                  | 4mg        | -       | 4mg          | 4mg             |
| SACAROSE             | -          | -       | 114mg        | 342 mg          |
| GLICEROL             | -          | -       | 10%          | 6,0; 3,0 e 0%   |

FONTE: EMBRIOCARE<sup>®</sup>

Foram utilizados no presente experimento um total de 48 embriões, obtidos nos estágios de mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto, nos graus I e II. De cada doadora os embriões recuperados eram divididos para cultivo a fresco e cultivo após congelamento e descongelamento. Em 27 destes embriões foi testada a viabilidade de cultivo a fresco. Para isto, imediatamente após a coleta, estes embriões foram levados para cultivo em estufa de atmosfera controlada com 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade e temperatura de 39°C, pelo período de 24 horas, em meio de cultivo celular TCM 199 modificado (COSTA, 1997), suplementado com SVC (soro de vaca no cio) (Tabela 2).

Em 21 embriões foi testada a viabilidade de desenvolvimento em cultivo após congelamento com meio comercial a base de 10% glicerol associado a 0,1mol L<sup>-1</sup> sacarose (Tabela 1), utilizando-se curva de resfriamento e congelação padrão para bovinos (Figura 1) (WILLADSEN et al., 1978). Para isto, imediatamente após a coleta e classificação, cada embrião foi lavado em solução comercial de manutenção, imerso em solução contendo 50% de meio comercial de manutenção e 50% de meio comercial para congelamento (10% glicerol) por seis minutos e transferidos para o meio comercial de congelamento (10% glicerol)

por 15 minutos. Posteriormente cada embrião foi envasado separadamente em paleta francesa (0,25 mL), intercalado com ar e meio de congelamento.

Tabela 2- Meio de cultivo usado para embriões felinos.

| Item | Produto                     | Quantidade |
|------|-----------------------------|------------|
| 1    | TCM 199 (com sais de Earle) | 0,1589g    |
| 2    | Lactato de cálcio           | 0,0120g    |
| 3    | Penicilina G sódica         | 0,0005g    |
| 4    | Estreptomicina              | 0,0010g    |
| 5    | Piruvato                    | 0,0050g    |
| 6    | NAHCO <sub>3</sub>          | 0,0585g    |
| 7    | Hepes                       | 0,0270g    |
| 8    | Água tridestilada (qsp)     | 20 ml      |
| 9    | Soro de vaca no cio         | 2,2 ml     |

Fonte: COSTA (1997).

Foi utilizado um aparelho congelador biológico modelo FTS Systems- BC (Biocool<sup>®</sup>). O embrião envasado foi submetido a uma curva de resfriamento inicial, a +25°C com queda de temperatura de -2,0 ° C por minuto, até atingir a temperatura de -7° C, na qual foi induzido à cristalização (seeding). Após 10 minutos de estabilização, uma curva final de congelamento foi aplicada, com taxa de resfriamento de -0,3° C por minuto até -32° C que após estabilizada, as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido.

O descongelamento destes embriões foi feito em banho maria à 37°C. Após passagem em bateria de três soluções comerciais (Embriocare<sup>®</sup>) de descongelamento, permanecendo de cinco a seis minutos em cada solução (Tabela 1), os embriões foram lavados em meio comercial de manutenção e cultivados nas mesmas condições descritas para os embriões cultivados a fresco.

Após 24 horas de cultivo, todos os embriões foram avaliados quanto ao seu estágio de desenvolvimento e qualidade. O número de blastômeros foi

quantificado em microscópio óptico, após montagem e coloração segundo a técnica de USHIJIMA et al., (1988). Para tal os embriões foram imersos em solução de 0,9% de citrato de sódio por 20 minutos, fixados em solução de água destilada, ácido acético e álcool absoluto em partes iguais, a 4°C por 1 minuto, montados em lâminas e corados por Giemsa por 15 minutos.

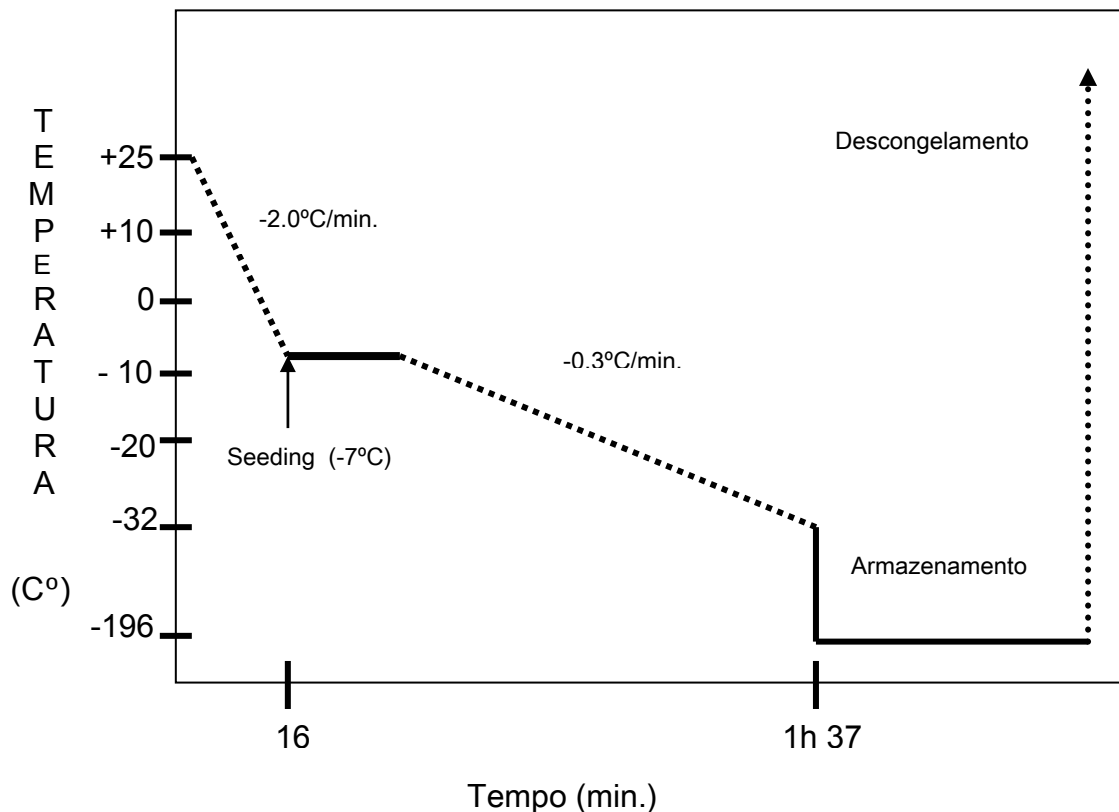


Figura 1- Representação esquemática da curva de congelamento padrão (WILLADSEN et al., 1978).

As taxas de desenvolvimento embrionário após o cultivo *in vitro* foram comparadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (SAMPAIO, 2002). A variável quantitativa número de células por embrião foi submetida ao teste de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran). Como as premissas de normalidade e homocedasticidade foram atendidas, foi realizada a análise de variância (SAEG, 1999).

### 3.6 RESULTADOS

Para o presente experimento foram realizadas 14 intervenções cirúrgicas para coleta dos embriões, em diferentes gatas SRD sexualmente maduras. Destes animais dois apresentaram cio natural e já haviam sido estimuladas hormonalmente há pelo menos seis meses, em experimentos prévios para a indução da atividade ovariana e ovulação. Destes animais foram coletados oito embriões (Tabela 3), com taxa de recuperação embrionária total de 61,5%.

Tabela 3-Classificação e quantificação dos embriões coletados de gatas com manifestação natural do cio.

| DOADORA | DATA     | CL.* | FOL.* | Nº EMBRIÕES<br>COLETADOS | OVÓCITOS | CLASSIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA |        |       |       |       |
|---------|----------|------|-------|--------------------------|----------|---------------------------|--------|-------|-------|-------|
|         |          |      |       |                          |          | MC I*                     | MC II* | Bi I* | BL I* | DEG.* |
| 01      | 03/06/05 | 7    | 0     | 4                        | 0        | 1                         | -      | 2     | -     | 1     |
| 02      | 03/06/05 | 6    | 1     | 4                        | 0        | -                         | 2      | -     | -     | 2     |

Mc I\* : Mórula compacta de grau I

Mc II\* : Mórula compacta de grau I

BL I\* : Blastocisto de grau I

Bi I\* : Blastocisto inicial de grau I

CL.\* : Corpos lúteos

FOL.\* :Folículos ovarianos

DEG.\* : Degenerados

Dos 12 animais que receberam estimulação hormonal para atividade ovariana e ovulação, apenas dois (16,7%) não responderam satisfatoriamente ao tratamento produzindo embriões e outros dois animais produziram apenas embriões degenerados (Tabela 4). Neste grupo foi observada uma média geral de 10,9 embriões por gata e a taxa geral de recuperação de embriões nestes animais foi de 56,2% (Tabela 4) sendo que, apenas oito em doze animais produziram em média 5,4 embriões em grau I e II de qualidade, indicados para o congelamento.

Tabela 4 - Classificação e quantificação dos embriões coletados de gatas por indução da atividade ovariana e da ovulação. Número de corpos lúteos e folículos ovarianos.

| CLASSIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA |          |                   |                 |                          |          |       |       |       |       |       |
|---------------------------|----------|-------------------|-----------------|--------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DOADORA                   | DATA     | CL.*              | FOL.*           | Nº EMBRIÕES<br>COLETADOS | OVÓCITOS | MC I* | MCII* | Bi I* | BL I* | DEG.* |
| 01                        | 15/09/04 | 16                | 7               | 9                        | 0        | 8     | -     | -     | 1     | -     |
| 02                        | 18/05/05 | 17                | 3               | 5                        | 0        | -     | 2     | -     | -     | 3     |
| 03                        | 08/06/05 | 17                | 0               | 10                       | 0        | 5     | -     | -     | 3     | 2     |
| 04                        | 08/06/05 | 13                | 2               | 8                        | 0        | 2     | -     | -     | -     | 6     |
| 05                        | 15/06/05 | 47                | 0               | 37                       | 0        | -     | -     | -     | -     | 37    |
| 06                        | 15/06/05 | 30                | 1               | 23                       | 0        | -     | -     | -     | -     | 23    |
| 07                        | 29/06/05 | 16                | 7               | 7                        | 0        | 1     | -     | -     | -     | 2     |
| 08                        | 29/06/05 | 18                | 6               | 11                       | 0        | -     | 2     | -     | -     | 9     |
| 09                        | 12/07/05 | 10                | 2               | 7                        | 0        | 1     | 4     | 4     | -     | 2     |
| 10                        | 12/07/05 | 21                | 1               | 0                        | 0        | -     | -     | -     | -     | -     |
| 11                        | 01/08/05 | 11                | 3               | 0                        | 0        | -     | -     | -     | -     | -     |
| 12                        | 01/08/05 | 17                | 2               | 14                       | 0        | 10    | -     | -     | -     | 4     |
| Médias                    |          | 19,41<br>(±10,08) | 2,83<br>(±2,51) | 10,9<br>(±10,23)         | 0        | 2,25  | 0,66  | 0,33  | 0,33  | 7,33  |

Mc I\* : Mórula compacta de grau I

Mc II\* : Mórula compacta de grau I

BL I\* : Blastocisto de grau I

Bi I\* : Blastocisto inicial de grau I

CL.\* :Corpos lúteos

FOL.\* : Folículos ovarianos

DEG.\* : Degenerados

Foram cultivados 48 embriões (Figuras 2 e 3), provenientes de 10 animais, sendo 27 cultivados a fresco e 21 cultivados após congelamento com glicerol. Os embriões cultivados a fresco foram: 17 mórulas compactas de grau I, seis mórulas compactas de grau II e quatro blastocistos iniciais de grau I (Tabela 5). Já no tratamento com congelamento prévio utilizaram-se 11 mórulas compactas de grau I, quatro mórulas compactas de grau II, dois blastocistos iniciais de grau I e quatro blastocistos de grau I (Tabela 6).

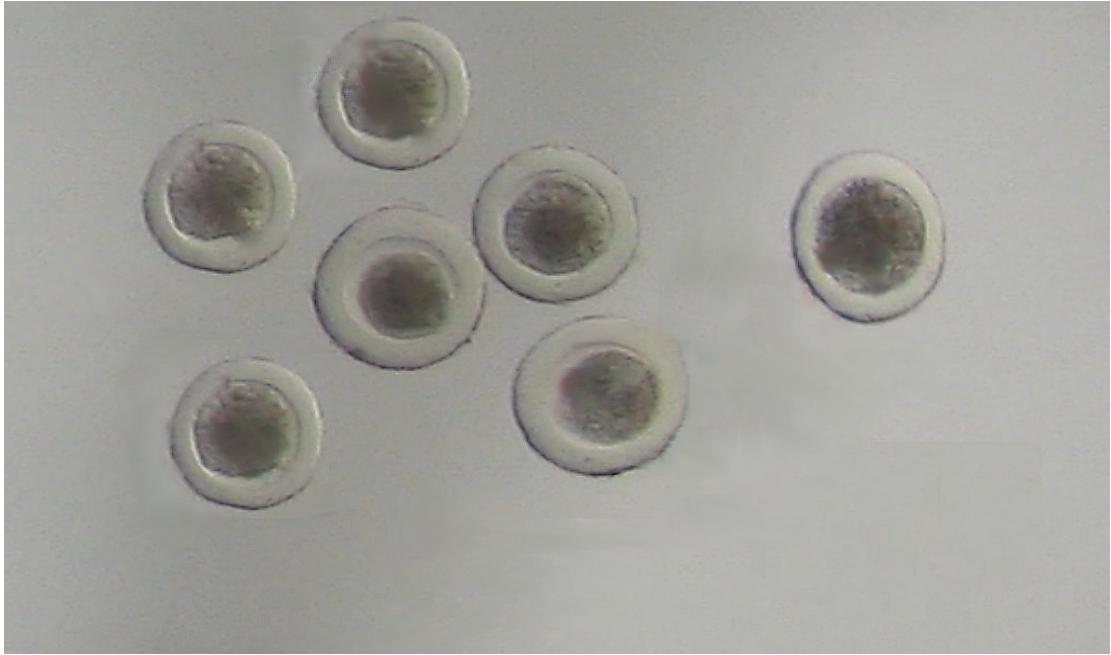


Figura 2- Embriões de felino, a fresco no estágio de mórula.

Após 24 horas de cultivo, independente do estágio embrionário inicial ou do tratamento, os embriões que desenvolveram o fizeram até o estágio de blastocisto expandido, apresentando qualidade excelente ou boa, segundo classificação do IETS (1998). Dos 27 embriões cultivados à fresco seis não desenvolveram, apresentando desta forma uma taxa geral de desenvolvimento de 77,7%. Em relação à classe inicial, cerca de 82,3 % das mórulas compactas de grau I e 50 % das mórulas compactas de grau II desenvolveram, ao passo que todos os blastocistos de grau I desenvolveram (Tabela 5).

Tabela 5-Estágio embrionário e grau de qualidade no pré-cultivo, número de blastocistos expandidos, taxa de desenvolvimento e número médio de blastômeros após 24h de cultivo de embriões de gato doméstico.

|                                                               | Mc I*           | Mc II*       | Bi I* | BL I*           | Total | Média                       |
|---------------------------------------------------------------|-----------------|--------------|-------|-----------------|-------|-----------------------------|
| <b>Estágio e grau qualitativo embrionário no pré cultivo</b>  | 17              | 6            | 0     | 4               | 27    | -                           |
| <b>Número de blastocistos expandidos após 24 h de cultivo</b> | 14              | 3            | 0     | 4               | 21    | -                           |
| <b>Taxa de desenvolvimento após 24 h de cultivo</b>           | 82,35%          | 50%          | 0     | 100%            |       | 77,7%                       |
| <b>Nº médio de blastômeros pós cultivo</b>                    | 159,83<br>(n=6) | 149<br>(n=2) | 0     | 171,33<br>(n=3) |       | 161± 15,8<br>(n=11) (cv=10) |

Mc I\* : Mórula compacta de grau I

Mc II\* : Mórula compacta de grau I

Bi I\* : Blastocisto inicial de grau I

BL I\* : Blastocisto de grau I

Nas mesmas condições, apenas oito dos 21 embriões previamente congelados desenvolveram até o estágio de blastocisto expandido, ou seja, a taxa geral de desenvolvimento foi de 38,1%, sendo que 45,4 % das mórulas compactas de grau I e 25% dos blastocistos iniciais de grau I desenvolveram e, da mesma forma observada para os embriões cultivados a fresco, todos os blastocistos de grau I desenvolveram (Tabela 6).

Em média de 161±15,8 blastômeros foram observados nos blastocistos expandidos, oriundos do cultivo a fresco (Tabela 5), enquanto daqueles resultantes do cultivo de embriões previamente congelados e descongelados, apenas 139,1±11,8 blastômeros em média foram registrados (Tabela 6). Assim, o congelamento com glicerol promoveu redução ( $P<0.01$ ) de aproximadamente 14 % no número de blastômeros após 24 horas de cultivo.

Tabela 6-Estágio embrionário e grau de qualidade no pré-congelamento, número de blastocistos expandidos, taxa de desenvolvimento e número médio de blastômeros após 24h de cultivo de embriões descongelados, de gato doméstico.

|                                                                   | Mc I*          | Mc II* | Bi I*        | BL I*        | Total | Média                       |
|-------------------------------------------------------------------|----------------|--------|--------------|--------------|-------|-----------------------------|
| <b>Estágio e grau qualitativo embrionário no pré-congelamento</b> | 11             | 4      | 4            | 2            | 21    | -                           |
| <b>Número de blastocistos expandidos após 24 h de cultivo</b>     | 5              | 0      | 1            | 2            | 8     | -                           |
| <b>Taxa de desenvolvimento</b>                                    | 45,45%         | 0      | 25%          | 100%         |       | 38,1%                       |
| <b>Nº médio de blastômeros pós cultivo</b>                        | 139,5<br>(n=4) | 0      | 138<br>(n=1) | 139<br>(n=2) |       | 139,1± 11,8<br>(n=7) (cv=9) |

Mc I\*:Mórula compacta de grau I

Mc II\* : Mórula compacta de grau I

Bi I\* : Blastocisto inicial de grau I

BL I\* : Blastocisto de grau I

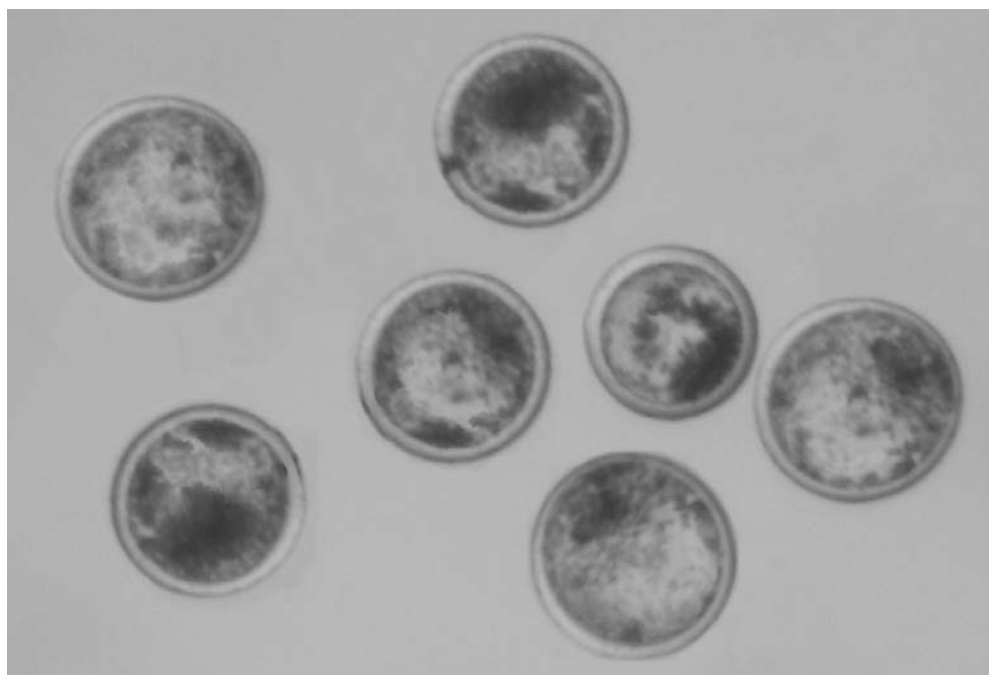


Figura 3-Embriões de felino, congelados e descongelados, no estágio de blastocisto expandido de grau I pós-cultivo em estufa de CO<sub>2</sub>.

### 3.7 DISCUSSÃO

Dos diferentes protocolos de indução da atividade ovariana e da ovulação propostos para felinos, o uso respectivo de 150 UI de eCG (gonadotrofina coriônica eqüina) e 100 UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana), vem sendo amplamente preconizado para gatas domésticas, apresentando resultados bastante satisfatórios (GOODROWE et al., 1988; DONOGHUE et al., 1992; POPE et al., 1998; TSUTSUI et al., 2000; SANTANA, 2005). No presente experimento o uso deste protocolo, associado à monta natural e coleta transcornual adaptada, possibilitou a recuperação média de 10,9 embriões quando utilizaram-se 12 doadoras sem histórico de estimulação hormonal prévia, com taxa de recuperação de aproximadamente 56% (baseado no número de corpos lúteos). Já SANTANA (2005), com o uso de metodologia semelhante, embora tenha apresentado uma taxa de recuperação superior (66%), obteve um número médio de embriões por doadora menor (7,25 embriões em oito doadoras). No presente experimento dois animais não responderam à estimulação hormonal e duas doadoras apresentaram alta taxa de produção embrionária, porém todos degenerados (Tabela 4). Assim, se computarmos somente os embriões não degenerados coletados de doadoras responsáveis exogenamente à atividade ovariana e ovulação, a média por animal seria 5,4 embriões, próximo ao observado, de 5,25, por SANTANA (2005).

Embora tenha sido reportado em outras espécies, que o uso de gonadotrofinas exógenas pode levar à luteinização folicular com ausência de ovulação (DIELEMAN & BEVERS, 1987; WESTFAHL, 1993) e reduzir significativamente o trânsito de embriões através do oviduto (GRAHAM et al., 2000), a taxa de recuperação após 148 horas da primeira cópula, nas gatas estimuladas hormonalmente, foi semelhante ao observado para os dois animais que apresentaram cio natural e ao relatado por SWANSON et al., (1994) de 56,4% utilizando seis gatas, também apresentando cio e monta natural.

A técnica de lavagem uterina transcornual, descrita por SANTANA (2005), foi adaptada para o presente experimento, com o uso adicional de uma pinça atraumática revestida na sua extremidade por uma gaze estéril, posicionada na extremidade caudal do corpo do útero cranial a cervix, devido à possibilidade de extravasamento transcervical do meio de lavagem. Esta técnica mostrou ser tão

eficiente ou mais que técnicas convencionais, uma vez que SWANSON et al., (1994), utilizando lavagem tubo-uterina após salpingo-histerectomia, também após 148 horas da primeira cópula, obtiveram os mesmos valores de recuperação embrionária relatados no presente experimento.

No presente experimento, embora utilizando apenas dois animais com manifestação natural do cio, a produção média de corpos lúteos (6,5) foi à mesma observada por SWANSON et al., (1994) avaliando seis gatas nas mesmas condições. Desta forma observa-se que o protocolo utilizado para indução hormonal da atividade ovariana, aumentou em cerca de 198% a produção de corpos lúteos, quando comparado a animais com manifestação natural do cio. No presente trabalho, 148 horas após a primeira cópula, a maioria dos embriões recuperados encontravam-se no estágio de mórula compacta no útero, semelhante ao observado por SANTANA, (2005) também em animais induzidos artificialmente, e não diferindo do relatado por SWANSON et al., (1994), para animais com manifestação natural do cio. Porém, o uso de gonadotrofinas exógenas parece alterar a qualidade embrionária, uma vez que apenas 32,7% dos embriões recuperados apresentavam-se em graus I e II, enquanto nas duas gatas com manifestação natural do cio, estes embriões chegaram a 62% contra 81% descrito por SWANSON et al., (1994). Ou seja, o número de embriões produzidos parece ser inversamente proporcional à qualidade visto que fêmeas com alta produção embrionária apresentaram todos os embriões degenerados (Tabela 4).

O cultivo *in vitro* é um protocolo de manutenção e desenvolvimento de embriões, com objetivos de adequação a estágios desenvolvimentais para futuras transferências e avaliação de metodologias de manipulação. Para tal é necessário condições controladas de atmosfera e meios de cultura. No sentido de se estabelecer um protocolo padronizado e viável para o controle de experimentações em manipulações de embriões felinos, o presente experimento, testou a viabilidade de cultivo, por 24 horas em meio TCM 199 enriquecido com sais de Earle e suplementado com soro de vaca no cio (COSTA, 1997), em atmosfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade a 39°C. Os embriões testados apresentaram uma taxa de sobrevivência, com desenvolvimento até o estágio de blastocisto expandido, de 77,7% sendo que as melhores taxas foram observadas partindo-se de embriões em grau I de qualidade, principalmente

blastocistos. Neste sentido, REICHENBACH et al., (2002) descrevem que embriões de qualidade grau I e II apresentam maior resistência podendo ser mantidos em meio de cultivo, em temperatura ambiente por curtos períodos de até 12 horas, ou mantidos em geladeira em temperatura de 2°C a 8°C até 12 horas, sem que haja perdas significativas da vitalidade embrionária. Embriões de qualidade inferior (grau III) são bem mais sensíveis quando submetidos às mesmas condições.

SWANSON et al., (1994) descrevem uma taxa de 93% de sobrevivência de embriões felinos cultivados a fresco, em protocolo controle, usando meio M2 enriquecido com 0,4% de albumina sérica bovina. Já KANDA et al., (1995), descrevem uma taxa de sobrevivência de 64,7%, de embriões felinos atingindo blastocisto após cultivo iniciado no estágio de mórula, em meio TCM 199 com sais de Earle suplementados com 20% de soro fetal bovino. Desta forma o protocolo proposto no presente experimento apresenta resultados compatíveis com os descritos acima.

O uso de felinos domésticos como modelo experimental é notório e justificado em inúmeras publicações, em reprodução assistida, visto a semelhança fisiológica com a maioria dos felinos silvestres que, em sua grande maioria encontram-se ameaçados, vulneráveis ou mesmo em processo de extinção (FARSTAD, 2000). A gata doméstica não é somente um modelo valioso para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas, mas também tem uso potencial como receptoras de embriões de muitas espécies de pequenos felinos silvestres (POPE, 2000). Não obstante a grande contribuição ao avanço biotecnológico para a preservação destas espécies, a produção assistida de embriões e sua transferência a fresco (SANTANA, 2005) pode ser ainda maximizada com o uso da criobiologia, visto o efeito complementar entre elas. Assim, o objetivo dos muitos projetos em felinos baseia-se na busca de avanços tecnológicos do congelamento de embriões. O conceito de “zoológico congelado” lançado por DRESSER et al., (1988), fundamenta-se principalmente no melhor aproveitamento de material genético em populações cativas e de vida livre.

A criopreservação de embriões de gatos domésticos tem sido realizada com resultados promissores através de modificações nas metodologias de congelamento normalmente empregadas para embriões bovinos e de roedores. Os crioprotetores mais comumente utilizados são o glicerol, o etilenoglicol e o

propilenoglicol (DRESSER et al., 1988; POPE et al., 1994; SWANSON et al., 1999; GÓMEZ et al., 2003). O princípio fundamental da criopreservação reside na prevenção à desidratação excessiva das células e à formação de cristais de gelo que lesariam severamente estruturas intracelulares (SEIDEL Jr., 1986). Associação glicerol e sacarose no meio permitem em uma taxa de resfriamento específica, a substituição controlada da água intracelular pelo glicerol, impedindo assim a deformação celular e a formação de cristais de gelo durante o congelamento (ALLER et al., 1995). Embora seja um crioprotetor eficiente o glicerol apresenta alguns efeitos tóxicos às células, sendo necessário sua remoção do meio no processo de descongelamento (ALLER et al., 1995). A sacarose por sua vez apresenta efeito crioprotetor também durante a fase de reidratação, após o congelamento, não sendo necessário sua remoção posterior (FRIEDLER et al., 1988).

A viabilidade da criopreservação de embriões pode ser avaliada após o descongelamento por transferência para receptoras ou por cultivo controlado *in vitro*. DRESSER et al., (1988) descrevem o primeiro sucesso de nascimento de filhotes oriundos de embriões congelados em um meio contendo PBS + 15% de soro fetal bovino e 10% de glicerol, sem o uso de sacarose, obtendo 17 filhotes de 11 receptoras. Já POPE et al., (1994) descrevem para embriões congelados em meio contendo  $1.4 \text{ molL}^{-1}$  de propilenoglicol +  $0.125 \text{ molL}^{-1}$  de sacarose, uma taxa de 73 % (n=22) de desenvolvimento *in vitro* após o descongelamento, atingindo os estádios de mórula e blastocisto, em meio de cultivo tyrodes suplementado com soro fetal bovino. Posteriormente embriões foram transferidos para quatro receptoras, obtendo-se uma taxa de 50% de gestação. Segundo SWANSON et al., (1999), as melhores taxas de desenvolvimento *in vitro*, de embriões pré-congelados foram obtidos por cultivo em meio M2 com 0,4% de albumina sérica bovina e com o uso do etilenoglicol como crioprotetor (80% n=30). O uso de propilenoglicol e glicerol apresentaram taxas significativamente menores com respectivamente, 50 (n=30) e 40% (n=30) de desenvolvimento *in vitro*.

No presente experimento, cerca de 38,1% dos embriões submetidos ao congelamento, com meio contendo glicerol associado à sacarose, desenvolveram após descongelamento. Ou seja, observou-se redução de aproximadamente 51% na taxa de desenvolvimento geral nos embriões submetidos ao processo de

congelamento com glicerol, em relação aos embriões cultivados a fresco. Segundo GÓMEZ et al., (2003), a habilidade de embriões felinos em sobreviverem a criopreservação é dependente de suas características morfológicas e desenvolvimentais. Neste sentido, os melhores resultados observados no presente experimento partiram de embriões descongelados, iniciando cultivo classificados como grau I, principalmente blastocistos, da mesma forma que no cultivo a fresco. Após 24 horas de cultivo, independente do estágio inicial e do tratamento, todos os embriões que desenvolveram atingiram estágio de blastocisto expandido. Embora seja descrito que todos os protocolos de congelamento tenham o potencial de reduzir a qualidade inicial do embrião após 24 horas de cultivo, os embriões felinos que desenvolveram no presente experimento, independente da qualidade inicial e do tratamento, apresentaram qualidade grau I.

O grau de desenvolvimento *in vitro* pode ainda ser avaliado por meio da contagem do número de células viáveis por embrião, estimando assim, os possíveis danos sofridos pelos mesmos, quando submetidos ao processo de congelamento (GÓMEZ et al., 2003). Estes autores, quantificando o número de células de embriões de gatos, a fresco e congelados com propilenoglicol observaram que aos 8 dias, em estágio de blastocisto eclodindo, os embriões apresentam em média de 225 e 220 células, respectivamente, não observando efeito deletério significativo do protocolo de congelamento/descongelamento utilizado. POPE et al., (1994) descrevem que embriões derivados de fertilização *in vitro*, aos quatro dias, apresentam em média 50 células. Estes embriões apresentaram melhor desenvolvimento (avaliado pelo número de células), quando submetidos a um protocolo de congelamento de exposição única (1-step) em relação à exposição em duas etapas (2-steps) com propanadiol e sacarose.

No presente experimento, foram contabilizados em média  $161 \pm 15,8$  blastômeros em embriões coletados ao sexto dia após a monta natural e cultivados por mais 24 horas. Não obstante as metodologias empregadas, o número médio de blastômeros observado é compatível com esperado para embriões de 7 dias de acordo com os dados da literatura para embriões felinos domésticos. Já os embriões com a mesma idade, porém submetidos ao congelamento, apresentaram redução ( $P < 0,01$ ) no número médio de blastômeros ( $139,1 \pm 11,8$ ), o que, embora não inviabilizando o desenvolvimento *in vitro*,

caracteriza um efeito deletério do protocolo de congelamento contendo a associação glicerol/sacarose.

Segundo ALLER et al., (1995), embriões que foram submetidos aos processos de congelamento e descongelamento terão menos blastômeros viáveis devido às injúrias provocadas em todo o processo.

### **3.8 CONCLUSÕES**

1- O protocolo de indução da atividade ovariana e da ovulação utilizado foi efetivo na produção de embriões felinos, de qualidade adequada para congelamento, sendo que a qualidade foi inversamente proporcional ao número produzido.

2- A técnica de lavagem transcornual adaptada foi efetiva para a recuperação de embriões felinos.

3- Todos os embriões avaliados que desenvolveram, atingiram o estágio de blastocisto expandido, após 24 horas de cultivo em meio TCM 199 modificado, independente do estágio desenvolvimental inicial, qualidade e protocolo utilizado previamente.

4- O congelamento de embriões felinos, utilizando o glicerol associado à sacarose como crioprotetores, embora viável, reduziu em 51% a taxa de desenvolvimento e reduziu significativamente o número de blastômeros após 24 horas de cultivo em meio TCM 199 modificado.

### 3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLER, J.F.; ALBERIO, R.H.; IOVANNITTI, B.; CABOCEVILA, J. Criopreservación de embriones mamíferos. 1ª Parte. Características generales de la congelación. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.76 nº2, p.132-136, 1995.
- BALLOU, J.D. Potential contribution of cryopreserved germplasma to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. **Cryobiology**, v.29, p.19-25, 1992.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; FERREIRA, A.M.; COSTA A.H.A.; GUIMARÃES, J.D. Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas. I. efeito da maturação nuclear. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 49, nº 5, p.551-560, 1997.
- DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the pre ovulatory follicles. **Animal Reproduction Science**, v.15, p.37-52, 1987.
- DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; MUNSON, L.; BROWN, J.L.; WILDT, D.E. Influence of gonadotrophin treatment interval on follicular maturation, *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v.46, p.972-980, 1992.
- DRESSER, B. L.; GELWICKS, E. J.; WACH, K. B.; KEELER, G. L. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. **The Journal Experimental Zoology**. v.246, nº2, p.180-186, 1988.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.375-387, 2000.
- FRIEDLER S.; GIUDICE L.C.; LAMB E.J. Cryopreservation of embryos and ova. **Fertility and Sterility**. v.49, p.743-64, 1988.
- GÓMEZ, M.C.; POPE, E.C.; 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.
- GOODROWE, K.L.; WALL, R.J.; O'BRIEN, S.J.; SCHMIDT, P.M.S.; WILDT, D.E. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.39, p.355-372, 1988.

- GRAHAM L.H.; SWANSON, W.F.; BROWN J.L. Chorionic gonadotropin, administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. **Theriogenology**, v.54, p.1117-1131, 2000.
- GREULICH, W.W. Artificially induced ovulation in the cat (*Felis domestica*). **The Anatomical Record**, p.58, nº3, p.217-224, 1934.
- GUIMARÃES, M. A. B. V. Biotecnologia aplicada aos animais silvestres: aspectos éticos e conservacionistas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.26, nº2, p.58-60, 2002.
- IETS. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões** Stringfellow, DA. Seidel, S.M., p.109-140, 1998.
- IUCN. **International Union for Conservation of Nature and Natural Resources**, Felid Conservation Assessment and Management Plan Global Captive Action Recommendations, 230p Compiled by the IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN, 1995.
- JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of pre antral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. **Animal Reproduction Science**, v.39, p.285-297, 1995.
- KANDA, M.; OIKAWA, H.; NAKAO, H.; TSUTSUI, T. Early embryonic development in vitro and embryo transfer in the cat. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.57, p.641-646, 1995.
- KITIYANANT, Y.; SAIKHUN, J.; PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. **Theriogenology**, v.59, p.1775-1786, 2003.
- LEIBO, S.P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v. 57, p.303-326, 2002.
- LONG, C.R.; WALKER, S.C.; TANG, R.T.; WESTHUSIN, M.E. New commercial opportunities for advances reproductive technologies in horses, wildlife, and companion animals. **Theriogenology**, v.59, p.139-149, 2003.
- MACE, G. M.; LANDE, R. Assessing extinction threats: toward a revaluation of IUCN threatened species categories. **Conservation Biology**, v.5, p.148-157, 1991.
- MURAKAMI, M.; OTOI, T.; KARJA, N.W.K.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization. **Reproductive Domestic Animal**.

- v.37, p.352-356, 2002.
- PLATZ, C.C.; WILDT, D.E.; SEAGER, S.W.J. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.52, p.519-527, 1978.
- POPE, C.E.; McRAE, M.C.; PLAIR, B.L.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. Successful in vitro and in vivo development of in vitro fertilized two to four-cell cat domestic following cryopreservation, culture and transfer **Theriogenology**, v.42, p.513-525, 1994.
- POPE, C. E.; JOHNSON, C.A.; MCRAE, M.A.; KELLER, G. L.; DRESSER B. L. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.53, p.221-236, 1998.
- POPE C.E. Embryo Technology in Conservation Efforts for Endangered Felids **Theriogenology**, v.53, nº1, p.163-174, 2000.
- REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. et al., Transferência dos embriões bovinos. In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. (Ed.) **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, p.127-178, 2002.
- 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. **Biology of Reproduction**, v.57, p.165-171, 1997.
- SAEG. **SISTEMA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA E GENÉTICA**, UFV, Central de Processamento de Dados, Viçosa-MG, 1999.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2 ed. Belo Horizonte, FEPMVZ, p.265, 2002.
- SANTANA, M.L.; Colpocitologia indução da atividade ovariana e da ovulação e transferência de embriões em gatos domésticos. Viçosa: UFV, 2005 p. 8-10, **Tese de Mestrado**, Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- SEIDEL Jr. G.E., Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: Techniques for freezing mammalian embryos: Short course proceedings, 6, 1986, Fort Collins. **Proceedings...** Fort Collins: USA, p.123, 1986.

- SWANSON, W.F.; ROTH, T.L.; WILDT, D.E. In vivo embryogenesis, embryo migration and embryonic mortality in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v.51, p.452-464, 1994.
- SWANSON, W.F.; McRAE, M.A.; WILDT, D.E.; RALL, W.F. Cryoprotectant toxicity and cryopreservation success in IVF derived domestic cat embryos after embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, p.174, 1999, (abst).
- TEWES, M.E.; EVERETT, D.D. Status and distribution of the endangered ocelot and jaguarondi in Texas. In Cats of the World: **Conservation and Management**, Eds S.D. Miler and D.D. Everett. National Wildlife Federation, Washington D.C., p.147-158,1986.
- TEWES, M.E.; SCHMIDLY, D.J. The neotropical felids: jaguar, ocelot, margay, and jaguarondi, In: **Wild Furbearer Management and Conservation in North America**, Eds. M. Novak, J.A. baker, M.E. Obbard and B. Malloch. Ontario Ministry of Natural Resources, Toronto. p.1697-1711,1987.
- TSUTSUI, T.; SAKAI, 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. **Japanese Journal Veterinary Science**, v.51,nº4, p.677-683,1989.
- TSUTSUI, T.; YAMANE, I.; HATTORI, I.; KUROSSAWA, N.; MATSUNAGA, H.; MURAO, I.; KANDA, M., HORI, T., Feline embryo transfer during the non-breeding season. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.62, p.1169-1175, 2000.
- USHIJIMA, M.; OKUDA, T.; NAKAYAMA, A.; MOJI, K.; ISHIDA, K.; MURATA, H.; IGUCHI, A. & ETOH, T. Relationships between the cell number and quality of 8-day bovine blastocysts. Proc. 3<sup>rd</sup> East, **Japanese Society Animal Embryo Transfer**. nº9, p.37-38,1988.
- WESTFAHL, P.K., Comparison of luteinized unruptured follicles and corpora lutea: steroid hormone production and response to luteolytic and luteotropic agents. **Biology of Reproduction**. v.48, p.807-814,1993.
- WILDT, D.E.; SEAGER, S.W.J. Ovarian response in the estral cat receiving varying doses of HCG. **Hormone Research**. v.9, p.144,1978.
- WILLADSEN, S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. the viability of deep frozen cow embryos. **Journal Reproduction Fertility**. Cambridge, v.52, p.91-393,1978.

WOOD, T.C.; 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, p. 315-323,1995.