



Efeito da indução da atividade ovariana e da ovulação, com gonadotropinas exógenas (eCG, hCG), na recuperação, viabilidade e congelabilidade de embriões de gatos domésticos

Effect of induction of ovarian activity and ovulation, with exogenous gonadotropins (eCG, hCG), on the recovery, viability and freezing of domestic cat embryos

Adolfo Lima Neto, Tarcízio A.R. Paula¹, Marcelo L. Santana, Lina R. Carazo, Antônio C. Csermak Junior, Eduardo P. Costa, José D. Guimarães

Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 36570-000, Brazil.

¹Correspondência: tarcizio@ufv.br

Resumo

Objetivou-se a avaliação da efetividade do protocolo de aplicação, em dose única, de gonadotrofinas exógenas (150 UI eCG associado a 100 UI hCG), na indução da atividade ovariana e da ovulação em gatas domésticas, bem como a competência desenvolvimental *in vitro* e *in vivo* de embriões felinos produzidos por monta natural, e ainda o efeito da congelação padronizada no desempenho pós-descongelamento de embriões felinos congelados em diferentes fases de desenvolvimento, como modelo experimental para potencial uso em espécies felíneas não domésticas. Foram utilizados três machos e 22 gatas para indução reprodutiva e duas gatas com manifestação natural do cio. Em todas as gatas foram computadas, na superfície ovariana, a presença de corpos lúteos e folículos anovulatórios. Dos animais induzidos e inseminados naturalmente, foram coletados 189 embriões, dos quais: em 27 foi testada a viabilidade de cultivo a fresco; 24 foram transferidos a quatro gatas receptoras, sincronizadas com o mesmo método; e em 21 embriões foi testada a viabilidade de desenvolvimento *in vitro*, após congelamento com meio (10% glicerol, 0,1mol L⁻¹ sacarose). Conclui-se que o protocolo foi efetivo na produção de embriões felinos, embora haja indícios sugerindo a diminuição da dose de eCG e aumento da dose de hCG. Os embriões produzidos foram viáveis para uso em transferência interespecífica, sendo que 75% (3/4) das fêmeas receptoras ficaram gestantes e 50% levaram a gestação a termo. O protocolo de congelamento reduziu em 51% a taxa de desenvolvimento (8/21), *in vitro* de embriões felinos e reduziu significativamente (P = 0,01) o número de blastômeros (139,1/161) após 24 horas de cultivo em meio TCM 199 modificado.

Palavras-chave: criopreservação, reprodução assistida, transferência de embriões felinos.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the single-dose protocol of exogenous gonadotropins (150 IU eCG associated with 100 IU hCG), to induce ovarian activity and ovulation in domestic cats, as well as developmental competence in vitro and in vivo of feline embryos produced by natural mating. The effect of standardized freezing on the post-thawing performance of frozen feline embryos at different stages of development also was evaluated as an experimental model for potential use in non-domestic felid species. For reproductive induction, 3 males and 22 females were used and 2 females with natural estrus. In all females, the presence of luteal bodies and anovulatory follicles were counted on the ovarian surface. Of induced and naturally inseminated animals, 189 embryos were collected, of which: the viability of fresh culture was tested in 27; 24 were transferred to four receiving cats, synchronized with the same method; and in 21 embryos the viability of in vitro development was tested after freezing with medium (10% glycerol, 0.1 mol L⁻¹ sucrose). It was concluded that the protocol was effective in the production of feline embryos, although there are suggestions to decrease the eCG dose and increase the hCG dose. The embryos produced were viable for use in interspecific transfers, with 75% (3/4) of the recipient females becoming pregnant and 50% leading to full term pregnancy. The freezing protocol reduced the rate of in vitro development (8/21), of feline embryos by 51% and significantly reduced the number of blastomeres (P = 0.01), after 24 hours of culture in modified TCM 199 medium (139,1/161).

Keywords: assisted reproduction, cryopreservation, feline embryo transfer.

Introdução

Dados divulgados no Plano Nacional de Saúde pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicam uma população atual estimada de 52,2 milhões de cães e 22,1 milhões de gatos de estimação (IBGE-PNS, 2015). Os dados mostram que, no Brasil, existem mais animais de estimação do que crianças, uma



vez que a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (IBGE-PNAD, 2015), indica que, na mesma data, havia 44,9 milhões de crianças até 14 anos de idade. Esses números impressionantes revelam a importância econômica e social, que os animais de estimação vêm crescentemente ocupando, movimentando um grande comércio de produtos e serviços, assim como o mercado de animais de raça. Neste sentido, uma crescente demanda por serviços e tecnologias em reprodução assistida vem se avolumando (Farstad, 2000; Cui et al., 2005). Uma outra vertente, ainda justificadora da busca pelo conhecimento tecnológico em reprodução assistida nestes animais, é o potencial uso destes como modelos experimentais para espécies de carnívoros silvestres ameaçados (Murakami et al., 2011; Pope et al., 2012; Comizzoli et al., 2012). Embora para o gato doméstico as demandas econômicas de procedimentos em biotecnologias reprodutivas (inseminações artificiais, congelamento de gametas, etc) sejam mais escassas em relação àquelas voltadas ao cão doméstico (Farstad, 2000), já como modelo experimental, as tecnologias *in vitro* desenvolvidas em felinos apresentam-se muito mais avançadas do que aquelas voltadas para caninos (Ochota et al., 2017), uma vez que os esforços em pesquisas com finalidade conservacionista em felídeos são maiores, visto que a maioria das espécies da família felídea encontra-se em algum grau de ameaça. De fato 36 das 37 espécies felinas não domésticas conhecidas, estão em risco de extinção (Long et al., 2003; Yin et al., 2006).

A indução da atividade ovariana e ovulação com o uso de gonadotropinas exógenas vem sendo há muito utilizada, em diferentes protocolos e em diferentes espécies de felídeos para: a reprodução fora da estação reprodutiva, sincronização e inseminação artificial, fertilização *in vitro*, transferência e criopreservação de embriões, etc. (Greulich, 1934; Wildt e Seager 1978; Tsutsui et al., 1989; Roth et al., 1997; Farstad, 2000; Santana et al., 2012; Pope et al., 2014), entretanto a gestação e a taxa de sobrevivência de filhotes resultantes têm sido baixas e as falhas têm sido frequentes (Crichton et al., 2003; Pope et al., 2012). A criopreservação de embriões vem sendo unanimemente apontada como uma excelente alternativa para o estoque de material genético e a potencial diversificação entre populações cativas e mesmo de vida livre de espécies ameaçadas (Micheletti et al., 2011; Pope et al., 2014), consolidando o conceito do “zoológico congelado” sugerido por Dresser et al. (1988). Diferentes técnicas de congelamento são aplicáveis a embriões felinos, embora os melhores resultados são descritos em procedimentos com protocolos de resfriamento lento em relação à vitrificação (Pederson et al., 2009; Tomii et al., 2011).

A padronização de um protocolo multiuso para a produção e criopreservação de embriões felinos, embora altamente desejável, ainda não pode ser efetivado com as ainda limitadas informações, em especial ao desenvolvimento do blastocisto no final do período pré-implantação (dias 8 a 12 após o coito ou aproximadamente 7 a 11 dias após a ovulação) (Pope, 2014). Dentre estas limitações, os conhecimentos sobre a criotolerância frente a diferentes crioprotetores (Murakami et al., 2002) e o grau de desenvolvimento embrionário a apresentar maior resiliência e consequente viabilidade após o descongelamento (Gómez et al., 2003; Pope et al., 2012) merecem destacada atenção, pois podem subsidiar os melhores procedimentos. Neste sentido o presente trabalho objetivou a avaliação da efetividade do protocolo de aplicação em doses únicas de gonadotropinas exógenas (150 UI eCG associada a 100 UI hCG), na indução da atividade ovariana e da ovulação em gatas domésticas. Bem como a competência desenvolvimental *in vitro* e *in vivo* de embriões felinos produzidos por inseminação natural e ainda o efeito da congelação padronizada, no desempenho pós-descongelamento de embriões felinos congelados em diferentes fases de desenvolvimento, como modelo experimental para potencial uso em espécies de felídeos não domésticas.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados no presente experimento três machos adultos com características da raça Siamesa e histórico de fertilidade, e 24 gatas domésticas adultas sem raça definida. Todos os animais foram provenientes do gatil experimental do setor de Morfologia DVT-UFV, e seguiram os procedimentos de conduta ética estabelecidos pela Comissão de Ética para o Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV). As fêmeas foram mantidas, em distintas cronologias, em colônia em uma área de 24 m², sendo 12 m² de solário. Os machos foram mantidos em recintos individuais com aproximadamente 3 m², sendo 1 m² de solário. A todos os animais foram oferecidas ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram monitorados através de registro das manifestações comportamentais do ciclo estral. Todas as fêmeas foram monitoradas através de colpocitologia vaginal com o intuito de se detectar o período de pós-estro, no qual foi iniciado o protocolo de indução da atividade ovariana em 18 gatas doadoras de embriões e 4 gatas receptoras. Ainda foram utilizadas outras duas gatas doadoras, com manifestação natural do cio, para comparação da taxa de recuperação embrionária.



Indução da atividade ovariana e ovulação

Para a indução da atividade ovariana, 20 fêmeas receberam, em cronologia distinta, a aplicação de 150 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novohormon® Syntex), por via intramuscular, em dose única, sendo esta denominada hora 0 do dia 1. Todos os animais apresentaram então sinais comportamentais do estro, semelhante àqueles observados no estro natural. No dia 4, mais precisamente 84h após a aplicação de eCG, foram aplicadas 100 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG, Vetecor®, Calier), para induzir a ovulação. Imediatamente após a aplicação de hCG, 18 gatas doadoras foram acasaladas alternadamente, com dois machos intercalados a cada 24 horas, por um período total de 72 horas. Outras duas fêmeas, demonstrando manifestação natural do cio foram também acasaladas, da mesma forma, e utilizadas como doadoras. As 4 gatas receptoras não foram acasaladas, porém receberam estímulo artificial de cópula através da manipulação de um *swab* vaginal, em movimentos circulares, a cada 12 horas por 72 horas.

Coleta dos embriões, quantificação da atividade ovariana e cálculo das taxas de recuperação e ovulação

Para lavagem uterina, manutenção, congelamento e descongelamento embrionários utilizou-se meio base tamponado (pH 7,2 a 7,4), de formulação comercial (Embriocare®), acrescido de substâncias específicas conforme Tabela 1.

Tabela 1- Substâncias acrescidas ao meio base comercial (Embriocare®) para lavagem uterina e manutenção, congelamento e descongelamento embrionário.

Meios Substâncias	Manutenção	Lavagem	Congelamento	Descongelamento
Gentamicina	0,02 mg	0,02 mg	0,02 mg	0,02 mg
Anfotericina	0,25 mg	0,25 mg	0,25 mg	0,25 mg
BSA	4 mg	-	4 mg	4 mg
Sacarose	-	-	114 mg	342 mg
Glicerol	-	-	10%	6,0; 3,0 e 0%

Fonte: Embriocare®.

No dia 10, ou seja, seis dias após a primeira cópula, todas as gatas doadoras foram submetidas a uma intervenção cirúrgica, sob anestesia geral com o uso da associação cloridrato de cetamina (10mg/kg, Dopalen®, Vetbrands) e cloridrato de xilazina (1mg/kg, Calmiun®, Agener União), e através da técnica de lavagem uterina transcornual adaptada, foi efetuada a coleta dos embriões. Para isto, após 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 cervix. Um cateter venoso (18G) foi introduzido na extremidade tubária de cada corno uterino e um fluxo com meio lavagem tamponado pH 7,2 a 7,4, previamente aquecido, foi estabelecido entre seringas acopladas aos cateteres. O lavado obtido de cada animal foi transferido para placas de Petri estéreis e observado ao microscópio estereoscópico para contagem e avaliação do grau de desenvolvimento (estágios de mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto) e qualificação morfológica (graus I a IV, respectivamente: excelente a degenerado), segundo a classificação da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 1998). No presente estudo, utilizou-se apenas embriões graus I e II (excelentes e bons) nos procedimentos de transferência, criopreservação e cultivo.

Durante o procedimento cirúrgico foram quantificados os corpos lúteos iniciais e folículos anovulatórios na superfície de ambos os ovários em cada animal. A taxa de recuperação embrionária foi calculada através da proporção entre corpos lúteos encontrados e o número de embriões recuperados. A resposta à indução da atividade ovariana foi avaliada quanto ao número de corpos lúteos iniciais somados ao número de folículos anovulatórios contabilizados na superfície ovariana, e a avaliação da indução da ovulação foi observada pela porcentagem de folículos remanescentes não ovulados em relação aos ovulados (corpos lúteos). Os dois animais que apresentaram manifestação natural do cio foram utilizados apenas para avaliação comparativa da atividade ovariana, da taxa de recuperação embrionária e taxa de ovulação.

Após classificação e avaliação, os embriões foram então subdivididos em três grupos experimentais: 1- cultivo a fresco; 2- transferência a fresco; 3- congelamento e cultivo pós-descongelamento.

Avaliação in vivo e in vitro da viabilidade de embriões frescos produzidos por indução exógena

Em um total de 27 embriões foi testada a viabilidade do cultivo a fresco. Para isto, imediatamente após a coleta e classificação estes embriões foram levados para cultivo, agrupados nos diferentes estágios, em estufa



de atmosfera controlada com 5% de CO₂, 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).

Tabela 2- Meio de cultivo TCM 199, modificado para embriões felinos.

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

Fonte: Costa (1997).

Um total de 24 embriões foi transferido a quatro gatas receptoras, sincronizadas com a mesma metodologia de indução exógena da atividade ovariana e ovulação. As gatas receptoras foram anestesiadas em procedimento paralelo ao de coleta de embriões nas gatas doadoras, com o mesmo procedimento anestésico e cirúrgico. Assim como nas doadoras nestes animais foram computados, na superfície ovariana, a presença de corpos lúteos e folículos anovulatórios. Em média seis embriões foram transplantados em cada receptora, para isso os embriões foram posicionados entre colunas de ar no interior de uma sonda rígida do tipo “tom cat” número 7, e inovulados na extremidade cranial do corno uterino com maior número de corpos lúteos. O monitoramento da gestação foi feito por exames ultrassonográficos a cada 15 dias.

Criopreservação e avaliação in vitro da viabilidade de embriões produzidos por indução exógena

Em 21 embriões foi testada a viabilidade de desenvolvimento *in vitro*, nas mesmas condições de cultivo a fresco, após congelamento com meio comercial a base de 10% glicerol associado a 0,1mol L⁻¹ sacarose (Tabela 1), utilizando-se curva de resfriamento e congelamento padrão para bovinos (Willadsen et al., 1978). Para isto, imediatamente após a coleta e classificação, cada embrião foi lavado em solução de manutenção (Tabela 1), imerso em solução contendo 50% de meio de manutenção e 50% de meio para congelamento por seis minutos e transferidos para o meio de congelamento por 15 minutos. Posteriormente cada embrião foi envasado separadamente em palheta francesa (0,25 ml), intercalado com ar e meio de congelamento. Foi utilizado um aparelho congelador biológico (modelo FTS Systems- BC, Biocool®). 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 induzida a 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 a 37°C. Após passagem em bateria de soluções comerciais de descongelamento (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 morfológica e 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.

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 foram atendidas, foi realizada a análise de variância (SAEG, 1999).



Resultados

Apenas a título comparativo, dois animais que apresentaram cio natural foram submetidos à coleta embrionária, para a contabilização de corpos lúteos e folículos anovulatórios na superfície ovariana e qualificação embrional. Destes animais foram coletados oito embriões e computados 13 corpos lúteos, perfazendo uma taxa de recuperação embrionária de 61,5%. Não foram observados ovócitos e apenas um folículo anovulatório foi computado (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação e quantificação dos embriões coletados, corpos lúteos, folículos anovulatórios de gatas com manifestação natural do cio.

Animal	CL	FOL	Nº Embriões coletados	Ovócitos	MC I	MCII	Bi I	BL I	DEG
01	7	0	4	0	1	-	2	-	1
02	6	1	4	0	-	2	-	-	2

CL: Corpos lúteos; FOL: Folículos ovarianos anovulatórios; DEG: ruins e degenerados; Mc I: Mórula compacta de grau I; Mc II: Mórula compacta de grau II; Bi I: Blastocisto inicial de grau I; BL I: Blastocisto de grau I.

Daquelas fêmeas que receberam estimulação hormonal para indução da atividade ovariana e ovulação, foram coletados um total de 189 embriões a partir de 309 corpos lúteos, perfazendo assim uma taxa de recuperação de 61,2%, sendo ainda observados 85 folículos anovulatórios e 13 ovócitos não fertilizados (Tabela 4). Dois animais (números: 07 e 08) apresentaram hiperestimulação ovariana, com produção de grande número de embriões, porém todos degenerados (Tabela 4). Em uma doadora (número 16) observou-se falha completa na inseminação, sendo coletados apenas ovócitos.

Tabela 4. Classificação e quantificação dos embriões coletados, corpos lúteos, folículos anovulatórios de gatas com indução exógena da atividade ovariana e da ovulação.

Animal	CL	FOL	Nº Embriões coletados	Ovócitos	Mc I	Mc II	Bi I	BL I	DEG
03	16	7	9	0	8	0	0	1	0
04	17	3	5	0	0	2	0	0	3
05	17	0	10	0	5	0	0	3	2
06	13	2	8	0	2	0	0	0	6
07	47	0	37	0	0	0	0	0	37
08	30	1	23	0	0	0	0	0	23
09	16	7	7	0	1	0	0	0	2
10	18	6	11	0	0	2	0	0	9
11	10	2	7	0	1	4	4	0	2
12	17	2	14	0	10	0	0	0	4
13	17	01	02	0	0	0	0	0	02
14	19	16	16	0	8	3	3	2	0
15	17	1	6	0	3	2	0	0	1
16	19	6	0	12	0	0	0	0	0
17	9	6	13	0	12	1	0	0	0
18	12	9	15	0	3	0	0	0	12
19	6	7	4	0	3	0	1	0	0
20	9	9	2	1	0	0	1	0	1
Totais	309	85	189	13	56	14	9	6	104
Médias	17,2	4,7	10,5	0,7	3	0,7	0,5	0,3	6,1

CL: Corpos lúteos; FOL: Folículos ovarianos anovulatórios; DEG: ruins e degenerados; Mc I: Mórula compacta de grau I; Mc II: Mórula compacta de grau II; Bi I: Blastocisto inicial de grau I; BL I: Blastocisto de grau I.

Foram cultivados 48 embriões, sendo 27 cultivados a fresco e 21 cultivados após congelamento. 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 utilizou-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).

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 (I) ou boa (II), segundo classificação da IETS (1998). Dos 27 embriões cultivados a 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 morfológica no pré-cultivo; número de blastocistos expandidos, taxa de desenvolvimento e número médio de blastômeros após 24h de cultivo de embriões frescos de gato doméstico.

	Mc I	Mc II	Bi I	BL I	Total	Média
Estágio e grau qualitativo embrionário no pré cultivo	17	6	0	4	27	-
Número de blastocistos expandidos após 24 h de cultivo	14	3	0	4	21	-
Taxa de desenvolvimento após 24 h de cultivo	82,3%	50,0%	0	100%		77,7%
Nº médio de blastômeros pós cultivo	159,8	149,0	0	171,3		161,0 ± 15,8

Mc I: Mórula compacta de grau I; Mc II: Mórula compacta de grau II; 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 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 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
Estágio e grau qualitativo embrionário no pré cultivo	11	4	4	2	21	-
Número de blastocistos expandidos após 24 h de cultivo	5	0	1	2	8	-
Taxa de desenvolvimento	45,45%	0	25%	100%		38,1%
Nº médio de blastômeros pós cultivo	139,5	0	138,0	139,0		139,1 ± 11,8

Mc I: Mórula compacta de grau I; Mc II: Mórula compacta de grau II; Bi I: Blastocisto inicial de grau I; BL I: Blastocisto de grau I.

Como observado na Tabela 7, seis embriões em média, foram inovulados em cada receptora, a maioria mórula compacta do tipo I. A receptora número 21 recebeu oito embriões, sendo três mórulas compactas tipo I, três mórulas compactas tipo II e dois blastocistos iniciais tipo I, apresentou gestação de 66 dias, com parto normal de dois filhotes saudáveis. A receptora número 22, recebeu cinco embriões, sendo três mórulas compactas tipo I e duas mórulas compactas tipo II, apresentando gestação de 63 dias, com parto normal de quatro filhotes sendo um natimorto com má formação cefálica, e três filhotes saudáveis. A receptora número 23, recebeu seis embriões, sendo todos mórulas compactas do tipo I porém não apresentou qualquer sinal de gestação. A receptora 24 recebeu cinco embriões sendo três mórulas compactas do tipo I, uma mórula compacta do tipo II e um blastocisto inicial do tipo I, apresentou vesículas embrionárias nos primeiros exames ultrassonográficos, porém estas não foram detectadas a partir dos 45 dias da gestação.

Todos os filhotes nascidos apresentaram características da raça siamesa, acompanhando o padrão fenotípico apresentado pelos pais biológicos. Apresentaram desenvolvimento normal, sendo desmamados aos 60 dias de idade.



Tabela 7. Quantificação do número de corpos lúteos e folículos anovulatórios observados na superfície ovariana das gatas receptoras e classificação e quantificação dos embriões transferidos.

Animal	Corpos Lúteos	Folículos anovulatórios	Número de Embriões Transferidos	MCI	MCI I	Bi I	Filhotes nascidos viáveis
21	17	01	08	03	03	02	02
22	16	06	05	03	02	-	03
23	20	08	06	06	-	-	-
24	24	15	05	03	01	01	-

MC II e I: Mórula compacta tipo I e II; Bi I : Blastocisto Inicial tipo I.

Discussão

Todas as tentativas de estímulo da atividade ovariana em felinos não domésticos partiram de protocolos previamente testados em gatos domésticos (Goodrowe e Wildt 1987; Roth et al., 1997; Pope, 2014), graças a estes esforços espécies raras e ameaçadas apresentam uma oportunidade prática de conservação (Donoghue et al., 1992; Howard et al., 1997; Pope et al., 2012).

Embora o uso exógeno de gonadotropinas presente, via de regra, resultados previstos no desencadeamento dos eventos do ciclo reprodutivo, alguns aspectos morfofisiológicos espécie-específicos podem influenciar as respostas com diferentes intensidades e qualidades, assim, são demandados ajustes, também espécie-específicos, no protocolo. Segundo Crichton et al. (2003), ovócitos obtidos em tigresas por meio de tratamentos com gonadotropinas exógenas apresentam anormalidades morfológicas que podem comprometer a sobrevivência de embriões produzidos por fertilização *in vitro*, bem como a criopreservação dos mesmos. Em outras espécies, o uso de gonadotropinas exógenas pode levar à luteinização folicular com ausência de ovulação (Dieleman e Bevers, 1987; Westfahl, 1993) e reduzir significativamente o trânsito de embriões através do oviduto (Graham et al., 2000).

Muitos estudos focaram especificamente na administração combinada de eCG, (gonadotrofina coriônica equina) para indução da atividade ovariana, e hCG (gonadotrofina coriônica humana) para indução da ovulação (Goodrowe et al., 1988; Donoghue et al., 1992). Sendo que as doses de 150 UI de eCG e 100 UI de hCG são as mais utilizadas em gatas domésticas (Howard et al., 1992; Pope et al., 1998; Tsutsui et al., 2000; Santana et al., 2012).

Ao se avaliar separadamente a eficiência da indução da atividade ovariana com o uso de 150 UI de eCG (representada pelo número de corpos lúteos iniciais somados ao número de folículos anovulatórios computados na superfície ovariana), observa-se que o protocolo utilizado no presente experimento aumentou em três vezes a atividade ovariana quando comparado a animais com manifestação natural do cio. Porém, a alta atividade ovariana parece influenciar negativamente a qualidade dos embriões produzidos, haja visto que fêmeas com as mais altas produções embrionárias (animais 7 e 8), apresentaram todos os embriões ruins ou degenerados. Ainda neste sentido, com o protocolo utilizado, houve recuperação total de 189 embriões, média de 10,5 embriões por fêmea doadora, com taxa de recuperação de aproximadamente 61,2 % (baseado no número de corpos lúteos), porém, apenas 45% destes apresentaram-se degenerados ou ruins. Ou seja, se computarmos somente os embriões excelentes ou bons (85 classificados como tipo I e II) coletados, a média por animal cairia para 4,7 embriões, e uma taxa de recuperação de apenas 27,5%, enquanto nas duas gatas com manifestação natural do cio, estes embriões chegaram a 72% próximos aos 81% descrito por Swanson et al. (1994), também em seis gatas apresentando cios naturais. Neste sentido é passível a sugestão de estudos na avaliação da diminuição da dose de eCG como indutor da atividade ovariana em estudos futuros.

As gatas domésticas são ovuladoras reflexas, 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 ao aumento sérico do hormônio luteinizante (LH), culminando com a ovulação (Goodrowe e Wildt, 1987). 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 altas proporções (Goodrowe e Wildt, 1987). Outros estímulos que não a cópula natural, incluindo estimulação direta da vagina e a administração de hormônios como a gonadotrofina coriônica humana (hCG) mostraram ser eficientes em induzir a liberação de ovócitos maduros (Howard et al., 1992; Pope et al., 1994; Pope, 2000), porém, no presente trabalho, naqueles animais que foram submetidos à aplicação de 100 UI de hCG previamente à cópula, observou-se que cerca de 21,5% dos folículos induzidos ao desenvolvimento pela aplicação de 150 UI de eCG permaneceram anovulatórios no momento da coleta dos embriões, enquanto apenas 7,1% dos folículos não ovularam em animais com a manifestação natural do cio e cópula. Desta feita, mesmo com o protocolo de acasalamento natural utilizado, aparentemente há uma influência do uso de hCG previamente à cópula na eficiência da ovulação, assim, também se sugere estudos para avaliação do aumento da dose de hCG como indutor da ovulação em estudos futuros.



No presente trabalho, 148 horas após a primeira cópula, a maioria dos embriões recuperados (82,4%) encontravam-se no estágio de mórula compacta no útero, semelhante ao observado por Santana et al. (2012), também em animais induzidos artificialmente, e não diferindo do relatado por Swanson et al. (1994), para animais com manifestação natural do cio.

O cultivo *in vitro* é um protocolo de manutenção e desenvolvimento de embriões, que permite a adequação a estágios desenvolvimentais para futuras transferências e, principalmente, permite a avaliação de métodos de obtenção e manipulação. No presente experimento, testou-se 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), observando uma taxa de sobrevivência, com desenvolvimento até o estágio de blastocisto expandido, de 77,7% dos embriões, sendo que as melhores taxas foram observadas partindo-se de embriões em grau I de qualidade, principalmente blastocistos. Neste sentido, Reichenbach et al. (2002) descreveram 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 temperatura de 2°C a 8°C por até 12 horas, sem que haja perda significativa da vitalidade embrionária. Embriões de qualidade inferior (grau III) são bem mais sensíveis quando submetidos às mesmas condições. Swanson et al. (1994) descreveram 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), descreveram 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 na literatura.

Embora a cultura permita uma excelente estimativa da viabilidade de embriões obtidos por indução exógena, a avaliação *in vivo* por meio de transferência interespecífica é o protocolo avaliador definitivo. No presente experimento foram transferidos 24 embriões, sendo que cinco (20,8%) produziram filhotes saudáveis. Não obstante a viabilidade *per si* do embrião, há de se considerar ainda a habilidade materna na manutenção da gestação, assim mesmo com o melhor cenário possível (transferência de embriões em mórula compacta do tipo I, Swanson et al., 1994; Tsutsui et al., 2000), a receptora número 23 não apresentou sinais de gestação. Neste sentido, 75% das fêmeas ficaram gestantes e 50% levaram a gestação a termo. Observando apenas as fêmeas com nascimento de filhotes, cerca de 38,5% dos embriões transferidos produziram filhotes saudáveis. A técnica descrita para lavagem uterina, para recuperação dos embriões, mostrou-se eficiente visto que nenhuma das gatas doadoras apresentou gestação, mesmo não recebendo qualquer tratamento abortivo.

A gata doméstica não é somente um modelo valioso para o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas, mas também tem uso potencial como receptora de embriões de muitas espécies de pequenos felídeos silvestres (Pope, 2014). Não obstante a grande contribuição ao avanço biotecnológico para a preservação destas espécies, a produção assistida de embriões e sua transferência a fresco (Santana et al., 2012) pode ser ainda maximizada com o uso da criobiologia, visto o efeito complementar entre estas.

Protocolos de congelamento de embriões com o uso de técnicas de resfriamento controlado (lento, com aplicação de tempo de equilíbrio), e técnicas de vitrificação (ultra rápida, sem tempo de equilíbrio) vêm sendo testados para felinos, com resultado positivos em experimentações *in vitro* (Pederson et al., 2009; Ochota et al., 2017) e *in vivo* (Pope et al., 2012). Porém, a taxa de desenvolvimento *in vitro* de embriões submetidos previamente à vitrificação é menos efetiva do que aquela observada por congelamento em taxa controlada de resfriamento (Tsujioka et al. 2008; Pederson et al., 2009). De fato, embora o nascimento de filhotes saudáveis tenha sido observado em ambas as técnicas (Dresser et al., 1988; Pope et al., 1994; Pope et al., 2012), Tharasanit et al. (2011) sugeriram que falhas na produção a termo de filhotes, a partir de transferência de embriões vitrificados, podem ser devidas às alterações na expressão gênica padrão requerida para o desenvolvimento embrionário, provocadas pelo congelamento ultra rápido.

Pope et al. (1994) descreveram para embriões felinos congelados por técnica de resfriamento controlado, em meio contendo 1.4 mol L⁻¹ de propilenoglicol + 0.125 mol L⁻¹ de sacarose, uma taxa de 73% de desenvolvimento *in vitro* após o descongelamento. Segundo Swanson et al. (1999), as melhores taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões felinos pré-congelados, em técnica controlada de resfriamento, foram obtidas com o uso do etilenoglicol como crioprotetor (80%), sendo que o uso de propilenoglicol e glicerol apresentaram taxas significativamente menores com, respectivamente, 50 e 40% 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 previamente congelados em relação aos embriões cultivados a fresco. Os melhores resultados observados no presente experimento partiram de embriões previamente congelados classificados como grau I, principalmente blastocistos. Segundo Gómez et al. (2003), a habilidade de embriões felinos em sobreviverem a criopreservação é diretamente dependente de suas características morfológicas iniciais no pré-congelamento. Apesar disso, todos os embriões felinos cultivados no presente protocolo, que desenvolveram após 24 horas de cultivo, independente do estágio inicial ou da presença de criotratamento, atingiram estágio de blastocisto expandido 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 (Murakami et al., 2011). Pope et al. (1994) descreveram 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. Já Gómez et al. (2003), quantificando o número de células de embriões de gatos, a fresco e congelados com propilenoglicol, observaram o desenvolvimento até blastocisto eclodindo aos 8 dias em ambos os protocolos, sendo que os embriões apresentavam em média de 225 e 220 células respectivamente, não observando efeito deletério significativo do protocolo de congelamento/descongelamento utilizado.

No presente protocolo de indução da atividade ovariana e ovulação, foram contabilizados em média 161 blastômeros em embriões frescos coletados ao sexto dia após a monta natural e cultivados por mais 24 horas. Não obstante os métodos empregados, o número médio de blastômeros observado é compatível com o esperado para embriões de 7 dias (Murakami et al., 2011). Já os embriões com a mesma idade, previamente submetidos ao congelamento, apresentaram redução ($P = 0,01$) no número médio de blastômeros (139,1). Embora esta redução numérica de blastocistos pós-descongelamento seja responsabilizada a injúrias decorrentes do processo de criopreservação (Aller et al., 1995), no presente experimento todos os embriões previamente congelados, que desenvolveram em cultivo, o fizeram até blastocisto com qualidade morfológica grau I, ou seja, apresentaram bom potencial de produção de filhotes em procedimentos *in vivo*.

Conclusões

1- O protocolo de indução da atividade ovariana e da ovulação utilizado foi efetivo na produção de embriões felinos, embora haja indícios sugerindo a diminuição da dose de eCG e aumento da dose de hCG.

2- Os embriões produzidos no presente protocolo de indução da reprodução e com uso de inseminação natural são viáveis para uso em transferências interespecíficas a fêmeas sincronizadas, sendo que 75% das fêmeas ficaram gestantes e 50% levaram a gestação a termo.

3- Todos os embriões avaliados *in vivo*, 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.

Referências

- Aller JF, Alberio RH, Iovannitti B, Cabocevila J. Criopreservación de embriones mamíferos. 1ª Parte. Características generales de la congelación. Rev Med Vet, v.76, n.2, p.132-136, 1995.
- Comizzoli P, Songsasen N, Hagedorn M, Wildt DE. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. Theriogenology, v.78, p.1666-1681, 2012.
- Costa EP, Vale Filho VR, Nogueira JC, Ferreira AM, Costa AHA, Guimarães JD. Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas. I. efeito da maturação nuclear. Arq Bras Med Vet Zoot, v.49, n.5, p.551-560, 1997.
- Crichton EG, Bedows E, Miller-Lindholm AK, Baldwin DM, Armstrong DL, Graham LH, Ford JJ, Gjorret JO, Hyttel P, Pope CE, Vajta G, Loskutoff NM. Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and *in vitro* embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). Biol Reprod, v.68, p.105-113, 2003.
- Cui XS, Jin YX, Shen XH, Lee JY, Lee HS, Yin XJ, Kong IK, Kim NH. Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. Theriogenology, v.66, p.267-274, 2005.
- Dieleman SJ, Bevers MM. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the pre ovulatory follicles. Anim Reprod Scie, v.15, p.37-52, 1987.
- Donoghue AM, Johnston LA, Munson L, Brown JL, Wildt DE. Influence of gonadotrophin treatment interval on follicular maturation, *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. Biol Reprod, v.46, p.972-980, 1992.
- Dresser BL, Gelwicks EJ, Wach KB, Keeler GL. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. J Experim Zool, v.246, n.2, p.180-186, 1988.
- Farstad W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. Anim Reprod Sci, v.60, n.61, p.375-387, 2000.
- Gómez MC, Pope EC, Harris R, Mikota S, Dresser BL. Development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. Theriogenology, v.60, p.239-251, 2003.



- Goodrowe KL, Wildt DE.** Ovarian response to human chorionic gonadotropin or gonadotropin releasing hormone in cats in natural or induced estrus. *Theriogenology*, v.27, p.811-817, 1987.
- Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien SJ, Schmidt PMS, Wildt DE.** Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biol Reprod*, v.39, p.355-372, 1988.
- Graham LH, Swanson WF, Brown JL.** Chorionic gonadotropin, administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. *Theriogenology*, v.54, p.1117-1131, 2000.
- Greulich WW.** Artificially induced ovulation in the cat (*Felis domestica*). *The Anatomical Record*, v.58, n.3, p.217-224, 1934.
- Hilliard JG, Hayward JN, Sawyer CH.** Post coital patterns of secretion of pituitary gonadotropin and ovarian progesterin in the rabbit. *Endocrinology*, v.75, p.957-961, 1964.
- Howard JG, Donoghue AM, Barone MA, Goodrowe KL, Blumer ES, Snodgrass K, Starnes D, Tucker M, Bush M, Wildt D.** Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J Zoo Wildl Med*, v.23, p.288-300, 1992.
- Howard JG, Roth TL, Byers AP, Swanson WF, Wildt DE.** Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Biol Reprod*, v.56, p.1059-1068, 1997.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).** Pesquisa Nacional de Saúde (PNS). Acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação/IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. 100p.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).** Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD): síntese de indicadores/IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. 102p.
- Kanda M, Oikawa H, Nakao H, Tsutsui T.** Early embryonic development in vitro and embryo transfer in the cat. *J Vet Med Sci*, v.57, p.641-646, 1995.
- Long CR, Walker SC, Tang RT, Westhusin ME.** New commercial opportunities for advances reproductive technologies in horses, wildlife, and companion animals. *Theriogenology*, v.59, p.139-149, 2003.
- Micheletti T, Cubas ZS, Moraes W, Oliveira MJ, Kozicki LE, Weiss RR, Moreira N.** Reprodução assistida em felídeos selvagens - uma revisão. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, n.4, p.408-417, 2011.
- Murakami M, Otoi T, Karja NWK, Ooka A, Suzuki T.** Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization. *Reprod Dom Anim*, v.37, p.352-356, 2002.
- Murakami M, Dong YJ, Suzuki T, Taniguchi M, Kaedei Y, Sato Y, Tanihara F, Otoi T.** Development and subsequent of domestic cat embryo cultured in serum-containing media. *Cryobiology*, v.63, p.170-174, 2011.
- Ochota M, Wojtassik B, Nizanski W.** Survival rate after vitrification of various stages of cat embryos and blastocyst with artificially collapsed blastocoel cavity. *Reprod Dom Anim*, v.52 suppl. 2, p.288-292, 2017.
- Pederson MJ, Watson CA, Blevins BA, Loskutoff NM.** Domestic cat (*Felis catus*) embryo cryopreservation: slow cooling versus vitrification. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.180-181, 2009. (Abstract).
- Pope CE, Mcrae MC, Plair BL, Keller GL, Dresser BL.** 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 CE, Johnson CA, McRae MA, Keller GL, Dresser BL.** Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.53, p.221-236, 1998.
- Pope CE.** Embryo Technology in conservation efforts for endangered felids *Theriogenology*, v.53, n.1, p.163-174, 2000.
- Pope CE, Gómez MC, Galiguis J, Dresser BL.** Applying embryo cryopreservation technologies to the production of domestic and black-footed cats. *Reprod Dom Anim*, v.47, p.125-129, 2012.
- Pope CE.** Aspects of *in vivo* oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. *Theriogenology*, v.81, p.127-137, 2014.
- Reichenbach HD, Oliveira MAL, Lima PF.** Transferência dos embriões bovinos. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF (Ed.) *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo. Varela, p.127-178, 2002.
- Roth TL, Wolfe BA, Long JA, Howard JG, Wildt DE.** Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. *Biol Reprod*, v.57, p.165-171, 1997.
- Sampaio IBM.** Estatística aplicada à experimentação animal. 2 ed. Belo Horizonte, FEPMVZ, 265p., 2002.
- Santana ML, Paula TAR, Costa EP, Costa DS.** Exogenous induction of ovarian activity and ovulation and transfer of fresh embryos of domestic cat (*Felis catus*). *Revista Ceres*, v.59, n.4, p.499-505, 2012.
- Sistema de análise estatística e genética (SAEG).** Universidade Federal de Viçosa (UFV), Central de Processamento de Dados, Viçosa-MG, 1999.



- Sociedade Internacional de Transferência de embriões (IETS).** Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. In: Stringfellow, DA. Seidel, S.M., 109-140, 1998.
- Swanson WF, Roth TL, Wildt DE.** *In vivo* embryogenesis, embryo migration and embryonic mortality in the domestic cat. *Biol Reprod*, v.51, p.452-464, 1994.
- Swanson WF, Mcrae MA, Wildt DE, Rall WF.** Cryoprotectant toxicity and cryopreservation success in IVF derived domestic cat embryos after embryo transfer. *Theriogenology*, v.5, p.174, 1999. (Abstract).
- Tharasanit T, Manee-In S, Buarpung S, Chatdarong K, Lohachit C, Techakumphu M.** Successful pregnancy following transfer of feline embryos derived from vitrified immature cat oocytes using 'stepwise' cryoprotectant exposure technique. *Theriogenology*, v.76, p.1442-1449, 2011.
- Tomii R, Ogawa B, Naoko I, Handa Y, Sasaiama N, Shirasu A, Nagashima H.** *In Vitro* development and postvitrification survival of cloned feline embryos derived from preadipocytes. *J Reprod Develop*, v.57, n.2, p.273-279, 2011.
- Tsujioka T, Otzdorff C, Braun J, Hochi S.** Effect of post-IVF developmental kinetics on in vitro survival of vitrified warmed domestic cat oocytes. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.323-327, 2008.
- Tsutsui T, Sakai Y, Matsui Y, Sato M, Yamane I, Murao I, Stabenfeldt GH.** Induced ovulation in cats using porcine pituitary gland preparation during the non-breeding season. *Jap J Vet Sci*, v.51, n.4, 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. *J Vet Med Sci*, 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. 3rd East Japanese Society Animal Embryo Transfer*, v.9, p.37-38, 1988.
- Westfahl PK.** Comparison of luteinized unruptured follicles and corpora lutea: steroid hormone production and response to luteolytic and luteotropic agents. *Biol Reprod*, v.48, p.807-814, 1993.
- Wildt DE, Seager SWJ.** Ovarian response in the estral cat receiving varying doses of HCG. *Hormone Research*. v.9, p.144, 1978. (Abstract).
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA.** The viability of deep frozen cow embryos. *J Reprod Fertil*, v.52, p.91-393, 1978.
- Yin X, Lee Y, Lee H, Kim N, Kim L, Shin H, Kong I.** *In vitro* production and initiation of pregnancies in inter-genus nuclear transfer embryos derived from leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) nuclei fused with domestic cat (*Felis silvestris catus*) enucleated oocytes. *Theriogenology*, v.66, p.275-282, 2006.
-