

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE FELINOS APLICÁVEIS À CAMPO**

***Field-Friendly in vitro maturation of feline oocytes***

**Larissa Schneider Brandão Souza**

Campo Grande - MS  
2024

**LARISSA SCHNEIDER BRANDÃO SOUZA**

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE FELINOS APLICÁVEIS À CAMPO**

***Field-Friendly in vitro maturation of feline oocytes***

**LARISSA SCHNEIDER BRANDÃO SOUZA**

**Orientador: Prof. Dr. Thyara de Deco Souza e Araujo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS  
2024



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**  
**MESTRADO**

Aos vinte e dois dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte e quatro, às doze horas, via *on line*, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Thyara de Deco Souza e Araujo (UFMS), Pedro Nacib Jorge Neto (USP) e Roberta Ferreira Leite (USP), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **LARISSA SCHNEIDER BRANDAO SOUZA**, CPF 12901404642, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS DE FELINOS APLICÁVEIS À CAMPO**" e orientação de Thyara de Deco Souza e Araujo. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresse conforme segue:

**EXAMINADOR**  
**AValiação**

Dra. Thyara de Deco Souza e  
Araujo (Presidente) \_\_\_\_\_ (APROVADO)

Dr. Pedro Nacib Jorge Neto  
(Externo) \_\_\_\_\_ (APROVADO)

Dra. Roberta Ferreira Leite  
(Externo) \_\_\_\_\_ (APROVADO)

**RESULTADO FINAL**

Aprovação ( ) Aprovação com revisão ( ) Reprovação

**Assinatura**

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Nacib Jorge Neto, Usuário Externo**, em 30/07/2024, às 16:37, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Schneider Brandao Souza, Usuário Externo**, em 31/07/2024, às 10:31, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Ferreira Leite, Usuário Externo**, em 02/08/2024, às 11:48, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Thyara de Deco Souza e Araujo, Coordenador(a) de Curso de Pós-graduação**, em 14/08/2024, às 09:20, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufms.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4993125** e o código CRC **B308FAED**.

#### COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha mãe Tânia Cristina e a minha irmã Gabriela Schneider pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a minha família e meus amigos, por sempre me estimularem a estudar, permitindo assim voar para longe. Agradeço também por sempre me receberem de braços abertos.

Agradeço a Prof. Dr. Thyara Deco e ao Prof. Dr Gediendson Ribeiro, pela admirável capacidade de fazer ciência. Pela disponibilidade e generosidade em compartilhar conhecimentos e oportunidades únicas. Agradeço também pelo constante esforço na busca da excelência em nosso trabalho. Vocês são fonte da minha inspiração profissional e pessoal.

Ao médico veterinário Dr. Pedro Nacib, por acreditar no meu trabalho antes mesmo de me conhecer e pelo enorme incentivo durante a minha jornada acadêmica.

As médicas veterinárias Sofia Pollizelle e Maitê Cardoso e a nossa equipe de laboratório Ian, Nayara, Liandra e Giullia pelo apoio durante a pós-graduação.

A médica veterinária Dr. Roberta Leite pela assistência rápida e eficaz nas estatísticas.

A Prof. Dra. Alexssandra (UFERSA) e a Dra. Camila (USP) pelas conversas, ideias e dicas que foram muito úteis na execução das técnicas de laboratório.

Ao Médico Veterinário Fábio (Clínica Veterinária São Francisco) que se tornou indispensável para a realização desta pesquisa.

Aos animais que permitiram a realização deste trabalho.

A Secretaria de Saúde de Campo Grande e ao Centro de Controle de Zoonoses.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da FAMEZ pelo acolhimento. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) que disponibilizou o financiamento deste trabalho.

Hoje me sinto mais forte. Mais feliz, quem sabe?  
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei.  
... Ou nada sei

## Sumário

RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1 O gato como modelo experimental na reprodução de outras espécies de felinos .....	2
2.2 Fisiologia reprodutiva da gata .....	3
2.3 Recuperação de oócitos em gatas .....	11
2.4 Maturação e fertilização <i>in vitro</i> de oócitos de gatas .....	12
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de embriões felinos .....	15
3. OBJETIVOS .....	17
Objetivo geral .....	17
Objetivo específico .....	17
4. METODOLOGIA .....	17
4.1 Delineamento Experimental .....	18
4.2 Experimento I: Avaliação da Taxa De Maturação Em Incubadora Portátil .....	18
4.2.1. Colheita e processamento dos oócitos .....	18
4.2.2. Maturação dos oócitos .....	19
4.3. Experimento II: Avaliação da Taxa de Fertilização de Oócitos Maturados em Incubadora Portátil .....	21
4.3.1 Colheita e processamento de sêmen .....	21
4.3.2 Fertilização <i>in vitro</i> .....	22
4.3.3 Cultivo <i>in vitro</i> .....	23
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	23
5. RESULTADOS .....	24
5.1 Experimento I .....	24
5.2 Experimento II .....	24
6. DISCUSSÃO .....	25
7. CONCLUSÃO .....	27
8. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO .....	27
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
10. ANEXOS .....	44
Anexo I. Composição dos meios utilizados .....	44
Anexo 2. Diluição e Preparo dos materiais Estoque e de Trabalho das Sondas Fluorescentes .....	47
11. PROJETO APROVADO .....	48



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Taxa de Metafase II, Metafase I e Quebra de Vesícula germinativa de oócitos de gatas após 24h de incubação em incubadora de bancada e portátil.

Tabela 2. Taxa de Clivagem e Mórula de embriões felinos, submetidos a FIV após a MIV em incubadora de bancada e portátil.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Foto ovário folicular (A); hemorrágico (B) e luteal (C) (Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

Figura 2. Visão geral esquemática da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação de oócitos. Evidencia da progressão da maturação nuclear do estágio imaturo da vesícula germinativa para o estágio maduro da metáfase II. (Fonte: Brandão-Souza et al., 2024 adaptado de Ferreira et al., 2009)

Figura 3. Oócito de gata em Metáfase II evidenciando extrusão do primeiro corpúsculo polar (A; seta), sob microscopia de luz e a cromatina sob microscopia de fluorescência com sonda fluorescente Hoechst 33342 (B). Aumento: 100x (Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

Figura 4. Microtubo WTA e Placa de Petri utilizados para a MIV. (Fonte: Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

Figura 5. Incubadoras WTA e Sanyo utilizadas na maturação *in vitro*. (Fonte: Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

Figura 6. Oócito em Metáfase II com extrusão do primeiro corpúsculo polar com cromatina evidenciada pela sonda fluorescente H33342 (B) (Fonte: Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

Figura 7. Zigoto (A), primeira clivagem (B), mórula (C) de embrião felino (Fonte: KIJ et al., 2020).

Figura 8. Oócitos pós maturação *in vitro* em incubadora portátil (A, B) e incubadora de bancada (C) (Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

## RESUMO

Brandão-Souza, L. S. Maturação *in vitro* de oócitos felinos aplicáveis à campo 2024. MESTRADO – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024. A saúde genética de uma população é a base da sustentação da biodiversidade, sendo este o foco dos programas de conservação animal. O desenvolvimento das Tecnologias de Reprodução Assistida (TRA) se mostra como ferramenta importante pois permite a translocação apenas do material genético entre as populações, evitando o estresse, custo e implicações que o transporte dos animais causaria, além de reduzir os riscos de transmissão de doenças infecciosas. Considerando que os felinos selvagens são de difícil acesso (pela raridade e distanciamento dos indivíduos nas diferentes instituições de manejo *ex situ*) o uso dos gatos domésticos como modelo experimental é fundamental para a padronização das diversas técnicas de TRA. Neste sentido, o uso de incubadoras portáteis para a maturação *in vitro* dos oócitos (MIV) ou mesmo para a fertilização *in vitro* de oócitos (FIV) durante o transporte até a chegada em laboratórios mais equipados é uma opção. Neste trabalho, a taxa de maturação foi avaliada em oócitos incubados em incubadora de bancada (N=114) e portátil (N=116) por 24 horas. Mais de 60% dos oócitos chegaram ao estágio de Metáfase II na incubadora de bancada (38,5°C, 5% CO<sub>2</sub> e 20% O<sub>2</sub>), enquanto cerca de 50% atingiram o mesmo estágio na incubadora portátil (38°C, 5%CO<sub>2</sub> e 5%O<sub>2</sub>), havendo diferença entre os tratamentos. Quando submetidas a fertilização *in vitro*, após a maturação *in vitro* em ambos os tratamentos, utilizando a mesma concentração de gases (38,5°C, 5%CO<sub>2</sub> e 20%O<sub>2</sub>), não houve diferença entre os tratamentos na taxa de clivagem (Ban:36% Port:36% p=0.9671), taxa de mórula (Ban:28%Port:23% p=0.5678) e na taxa de mórula por clivagem (Ban:73% Port:58% p=0.3443). Os resultados indicam, portanto, que a incubadora portátil é eficaz na maturação, resultando em posterior fertilização de oócitos de gatas domésticas.

Palavras-chave: Felinos; FIV; gato doméstico; reprodução assistida

## ABSTRACT

Brandão-Souza, L. S. Maturation *in vitro* of feline oocytes applicable to field 2024. MASTER'S – Graduate Program in Veterinary Sciences. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024. The genetic health of a population is the foundation for biodiversity conservation efforts. The development of Assisted Reproduction Technologies (ART) proves to be important tools as they enable the transfer of genetic material between populations, avoiding stress, cost and, implications of transporting animals, as well as reducing the risks of infectious disease transmission. Considering that wild felids are difficult to access (due to their rarity and the fact that individuals are often dispersed in various *ex situ* management institutions), the use of domestic cats as an experimental model is essential for standardizing various ART techniques. In this context, using portable incubators for *in vitro* maturation of oocytes (IVM) or even *in vitro* fertilization of oocytes (IVF) during transport to better-equipped laboratories is important. In this study, maturation rate was evaluated in oocytes incubated in a benchtop incubator (N=114) and a portable incubator (N=116) for 24 hours. Over 60% of oocytes reached the Metaphase II stage in the benchtop incubator (38,5°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 20% O<sub>2</sub>), whereas approximately 50% reached the same stage in the portable incubator (38,5°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 5% O<sub>2</sub>), with a difference between treatments ( $p<0.05$ ). When subjected to *in vitro* fertilization following IVM in both treatments using the same gas concentration (38,5°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 20% O<sub>2</sub>), there was no statistically significant difference between treatments in cleavage rate (Ban:36%Port:36%  $p=0.9671$ ), morula rate (Ben:28%Port:23%  $p=0.5678$ ), or morula per cleavage rate (Ban:73% Port:58%  $p=0.3443$ ). In conclusion, the portable incubator is effective for oocyte maturation, resulting in subsequent fertilization of domestic cat oocytes.

Keywords: assisted reproduction; IVM; IVF; domestic cat

## 1. INTRODUÇÃO

O avanço das Tecnologias de Reprodução Assistida (TRA) tem se mostrado crucial para a otimização da translocação de material genético entre indivíduos (COMIZZOLLI e HOLT, 2019), reduzindo o estresse, os custos e as implicações associadas ao transporte de animais, além de minimizar os riscos de transmissão de doenças infecciosas. Desde a década de 1970, o desenvolvimento das TRA tem apresentado avanços significativos no contexto dos gatos domésticos (BOWEN, 1977). Dado o desafio de acesso aos felinos selvagens, devido à sua raridade e à dispersão dos indivíduos em diferentes instituições de manejo *ex situ*, a utilização de gatos domésticos como modelo experimental torna-se fundamental para a padronização das diversas técnicas de TRA nessas espécies (AMSTISLAVSKY et al., 2016; SWANSON, 2003). Nesse contexto, as gônadas obtidas em programas de controle populacional, que de outra forma seriam descartadas, podem ser aproveitadas.

Dentre as TRA, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) destaca-se por possibilitar o máximo aproveitamento genético da fêmea e do macho, ao otimizar o uso de seus gametas na produção de embriões a serem transferidos para as receptoras. O processo de PIVE inicia com a obtenção de oócitos, sejam eles colhidos imaturos ou maturados *in vivo*. No primeiro caso, o processamento *in vitro* passa pela maturação (MIV), seguida pela fertilização (FIV) e cultivo (CIV) dos embriões, os quais podem ser transferidos ou criopreservados (FERRÉ et al., 2020). Dado que a MIV é uma fase crítica do processo, posto que, em gatos, aproximadamente 60% dos oócitos atingem a Metáfase 2 após a maturação (vide revisão em COLOMBO et al., 2021), a maioria dos estudos nessa espécie relata o uso de oócitos maturados *in vivo*. Nesses casos, são utilizados oócitos colhidos após ovariectomia ou por aspiração folicular (GOODROWE; HOWARD; WILDT, 1988; BOWEN, 1977). Após a FIV convencional, onde oócitos são co-incubados com espermatozoides, entre 31% e 80% dos oócitos incubados clivam, enquanto que após a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) esta taxa é de 54% a 70% (COLOMBO et al., 2021; HOWARD et al., 1993; JOHNSTON et al., 1991; POPE; GÓMEZ; DRESSER, 2006). Apesar de mais da metade dos embriões clivados se desenvolverem até o estágio de mórula utilizando oócitos de boa qualidade, há ainda uma perda de 50% desses até

o estágio de blastocisto (POPE; GÓMEZ; DRESSER, 2006; WOOD et al., 1995; WOOD; WILDT, 1997). No entanto, esses números estão intimamente ligados a uma série de fatores, como a saúde da doadora, o tempo de estocagem dos ovários e de incubação dos oócitos, bem como o meio de cultivo utilizado MIV, na FIV dos oócitos e no CIV de embriões (WOOD; WILDT, 1997).

Um dos principais desafios para a PIVE em felinos selvagens é a distância dos animais, mesmo daqueles mantidos sob cuidados humanos, em relação aos laboratórios especializados. Apesar de os oócitos maturados *in vivo* apresentarem melhores taxas de fertilização, o tempo de transporte entre a colheita e o processamento para FIV é mais curto (cerca de 6 horas) (MILLER et al., 1990; POPE, 2014). Por outro lado, ao colher os oócitos ainda imaturos, ganha-se tempo, pois são necessárias cerca de 24 horas de incubação para que ocorra a maturação, até que possam ser processados para realizar a FIV (WOLFE; WILDT, 1996; LUVONI e OLIVA, 1993). Nesse sentido, incubadoras portáteis podem ser usadas para a MIV ou mesmo para a FIV durante o transporte até os laboratórios. Estas incubadoras já são amplamente utilizadas para a maturação de oócitos bovinos e ovinos (BYRD et al., 1997; DONG et al., 2001). Em felinos selvagens, Swanson (2003) e Zahmel (2022) relatam o uso de uma incubadora portátil para a fertilização *in vitro* e maturação *in vitro*, respectivamente, porém não há descrição detalhada da metodologia usada. Dessa forma, faz-se necessário validar o uso de incubadoras portáteis em felinos para a MIV e a FIV, visando a disseminação dessa metodologia em outras espécies felinas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 O gato como modelo experimental na reprodução de outras espécies de felinos**

Considerando a dificuldade de acesso às espécies de felinos selvagens, tanto devido ao elevado grau de ameaça de extinção quanto à pequena população mantida sob cuidados humanos, o aprimoramento das técnicas em espécies domésticas de anatomia e fisiologia semelhantes é essencial. Devido às similaridades anatômicas e fisiológicas, o gato doméstico frequentemente é utilizado como modelo experimental para felinos selvagens. No entanto, particularidades fisiológicas específicas de cada

espécie demandam validação posterior na espécie-alvo (DONOGHUE et al., 1990; FARSTAD, 2000).

Em gatas, já na década de 1970, obteve-se sucesso na produção de embriões por meio de FIV com oócitos maturados *in vivo* (BOWEN, 1977). Dois anos depois, KRAEMER et al. (1979) relataram a primeira transferência de embrião em felinos domésticos. Esses embriões foram produzidos *in vivo* por monta natural, resultando em prenhez e no nascimento de filhotes saudáveis. Cerca de dez anos depois, foi relatada a primeira transferência de embrião utilizando embriões produzidos *in vivo* e posteriormente criopreservados. Cento e trinta e sete embriões foram transferidos, resultando no nascimento de quinze filhotes ao todo (taxa de 10%) (DRESSER et al., 1988). Por fim, no mesmo ano, foi relatado pela primeira vez o nascimento de filhotes após FIV de oócitos maturados *in vivo* (GOODROWE; HOWARD; WILDT, 1988).

Uma série de avanços foram alcançados em felinos selvagens a partir das evoluções tecnológicas em gatos domésticos. Após a primeira transferência de embrião (TE) interespécies, por exemplo, foi realizada após a maturação *in vivo* de oócitos de gato-selvagem-asiático (*Felis silvestris ornata*) submetidos a FIV, com os embriões transferidos para uma gata doméstica, resultando no nascimento de filhotes saudáveis (POPE; KELLER; DRESSER, 1993). Em 2012, a mesma tecnologia foi utilizada com sucesso no gato-bravo-de-patas-negras (*Felis nigripes*), com oócitos maturados *in vivo* e gatas domésticas como receptoras (POPE, C. et al., 2012).

Estudos com fertilização *in vitro* heteróloga, utilizando gatas domésticas como modelo experimental, evidenciam a importância desta espécie para o entendimento dos processos de fertilidade em espécies ameaçadas de extinção. SANTOS et al (2022) e MORO et al (2014) estudaram a capacidade de fertilização de sêmen congelado de onças-pintadas (*Panthera onca*), guepardos (*Acinonyx jubatus*) e leopardos (*Panthera pardus*), resultando em clivagem embrionária e formação de blastocistos, utilizando oócitos de felinos domésticos. Sendo assim, o refinamento de tecnologias reprodutivas em gatos domésticos consiste no primeiro passo para o desenvolvimento dos métodos nas demais espécies de felinos.

## **2.2 Fisiologia reprodutiva da gata**

### *2.2.1. Ciclo estral da Gata*

As gatas domésticas iniciam a puberdade quando atingem aproximadamente 80% do seu peso adulto final, o que pode ocorrer entre 4 e 8 meses de idade (CLINE

et al., 1980). Além da idade, outros fatores que interferem na puberdade incluem raça, época do ano, fotoperíodo, ambiente social, saúde e nutrição (FELDMAN, 1994). As gatas são classificadas como poliéstricas estacionais e fotoperiódicas positivas (GRIFFIN, 2001; POPE, C. E., 2000; VANSANDT, 2022). Nesta espécie, a melatonina é liberada durante os períodos de escuro e inibe a secreção de gonadotrofinas em dias em que a luminosidade mais curta, iniciando ou prolongando assim o período de anestro (GRAHAM et al., 2004; POPE, C. E., 2000). À medida que a quantidade de luz aumenta para 12 a 14 horas por dia, há o estímulo para o início do ciclo estral. Desta forma, em locais onde não há diferenças marcadas entre o fotoperíodo ao longo do ano, as gatas se comportam como uma espécie não sazonal (GRIFFIN, 2001; POPE, C.E. 2000).

O ciclo estral da gata é composto por cinco fases: proestro, estro, interestro, diestro (gestação ou pseudogestação) e anestro (Quadro 1). A duração média do ciclo é de 16 dias em ciclos não ovulatórios e 73 dias quando há ovulação (JOHNSON, 2018; POPE, C. E., 2000). No proestro, o hormônio folículo-estimulante (FSH) induz o desenvolvimento folicular, ocorrendo rápido crescimento dos folículos, o que resulta em um aumento da concentração sérica de estradiol, secretado pelas células da granulosa dos folículos ovarianos (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; GRIFFIN, 2001). Durante este período, a gata tende a vocalizar mais, esfregar-se nos objetos, ficar em decúbito lateral e rolar, apresentando ainda a postura de lordose. Nesta fase, elas atraem os machos, mas não estão receptivas à cópula. Este período é dificilmente observado na maioria das gatas e dura entre 12 e 48 horas (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006; JOHNSTON et al., 2001).

Quadro 1. Comportamento sexual da gata ao decorrer do ciclo estral.

	<i>Proestro</i>	<i>Estro</i>	<i>Interestro</i>	<i>Diestro</i>	<i>Anestro</i>
<b>Duração</b>	12 a 48 horas	4 a 7 dias (1 a 21 dias)	1 a 3 semanas	40 a 60 dias	A depender da luminosidade
<b>Comportamento</b>	Vocalização Esfregar nos objetos Rolar Lordose Não aceitam a monta	Vocalização Lordose Aceitam a monta	Nenhum	Nenhum, atividade reprodutiva cessa por 30 a 100 dias	Nenhum
<b>Atividade Hormonal</b>	Crescimento ovariano e folicular Síntese de Estradiol	Fase folicular Aumento abrupto da concentração de Estradiol	Níveis basais de Estradiol e Progesterona	Formação do corpo lúteo: Progesterona alta	Níveis basais de Estradiol e Progesterona
<b>Fase ovariana</b>	Fase folicular		Fase lútea		

Fonte: Brandão-Souza et al., 2024 adaptado de Griffin, 2001.

A próxima fase é chamada de estro. Nesta fase, as fêmeas vocalizam, ficam em posição de lordose e lateralizam a cauda, demonstrando receptividade à cópula. De fácil observação, o estro dura em média de 5 a 7 dias, podendo variar entre 1 e 21 dias (FELDMAN, 1994; GRIFFIN, 2001; POPE, C. E., 2000; VANSANDT, 2022). As concentrações séricas de estradiol fazem com que a vulva fique ligeiramente hiperêmica e edematosa, com discreta presença de secreção (GRIFFIN, 2001). Nesta fase, ocorre o pico da atividade folicular, com folículos medindo entre 2,3 e 3,5mm, e o pico de secreção de estradiol (MALANDAIN et al., 2011). A duração do estro é influenciada pelo número de cópulas, que induz a liberação do hormônio luteinizante (LH), resultando na ovulação (CONCANNON; HODGSON; LEIN, 1980). Desta forma, quanto mais cópulas, menor a duração do estro.

Em ciclos em que não ocorre a ovulação, ocorre o interestro. Esse é o período que sucede um estro e precede o próximo, com duração em média de 8 a 10 dias, podendo durar até 7 semanas (JOHNSTON et al., 2001; GRIFFIN, 2001). Nesta etapa, ocorre a regressão dos folículos pré-ovulatórios e o surgimento de uma nova onda folicular (GOODROWE et al., 1989; JOHNSTON et al., 2001). Durante este período, os níveis séricos de estradiol retornam aos níveis basais (GRIFFIN, 2001).

Quando há estímulos adequados, a ovulação ocorre entre 24 e 48 horas após a liberação do LH, com o corpo lúteo começando a secretar progesterona (FARSTAD, 2000). A ovulação pode ser induzida pela cópula, por estímulos visuais e olfativos com outros gatos ou pela administração hormonal (BINDER et al., 2019; KANDA et al., 1998). Segundo Concannon et al. (1980), quando ocorre apenas uma cópula, 50%

das fêmeas ovulam, sendo necessárias pelo menos quatro cópulas para que 100% das fêmeas ovulem. Após ovulação, segue a fase do diestro (fase luteal), com duração de aproximadamente 40 dias quando há ovulação sem fertilização e aproximadamente 60 dias na fêmea prenhe (GRIFFIN, 2001; JOHNSON, 2018).

O anestro é caracterizado pela inatividade ovariana, com folículos medindo 0,5mm ou menos. Nesse estágio, as concentrações séricas de estradiol e progesterona estão em níveis basais, e a duração varia de acordo com a luminosidade que a fêmea recebe (FELDMAN, 1994; JOHNSTON et al., 2001).

### *2.2.2. Efeito do ciclo reprodutivo na fisiologia dos folículos*

Em ovários de fêmeas adultas, são encontrados folículos em todos os estágios de desenvolvimento (quiescente, em crescimento ou atrésico). O início da foliculogênese requer a sinalização do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal para que o ovário produza fatores que controlam o crescimento e o desenvolvimento folicular. Apesar de sucessivos estudos, os fatores que interrompem a latência do desenvolvimento do folículo e induzem o seu crescimento em direção à ovulação ainda não são completamente conhecidos. Também é incerto como os sinais de maturação acontecem (BRISTOL-GOUD e WOODRUFF, 2006).

Carrijo-Jr (2010) contabilizou a população folicular ovariana da gata adulta, sendo de  $37.853 \pm 6.118$  folículos por ovário, dos quais 87% seriam primordiais, 10,4% primários, 2,3% folículos secundários e apenas cerca de 1% são folículos antrais. Os folículos primordiais são caracterizados por um único oócito de pequenas dimensões, rodeado por algumas células somáticas achatadas, frequentemente designadas por "células pré-granulosas" (GONDOS, 1969). Cada folículo primordial é circundado por sua própria membrana basal completa e as células adjacentes são planas e em monocamada (HIRSHFIEL, 1991). As células da granulosa passam de células escamosas a células cuboides à medida que proliferam, desenvolvendo-se em folículo primário (HIRSHFIELD, 1991). Já os folículos secundários possuem duas ou mais camadas de células da granulosa e são circundados por uma fina camada chamada de zona pelúcida, com distinção entre a membrana basal folicular e as camadas da teca (BRISTOL-GOUD e WOODRUFF, 2006). Seguindo o desenvolvimento, o folículo forma uma cavidade interna, passando para a fase de folículo antral ou folículo terciário. Neste estágio, é possível observar células da granulosa diferenciadas em células do cumulus e células murais, com muitas

camadas de células da teca, um antro cheio de líquido, contendo o oócito (BRISTOL-GOUD e WOODRUFF, 2006). É nesta fase que se encontram os oócitos que podem ser maturados *in vitro*, os quais têm a capacidade de gerar embriões após a fertilização (EVECEN et al., 2009; FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2019; KAŹSKA-KSIAŹKIEWICZ et al., 2003).

A fase do ciclo estral em que a gata se encontra pode ser observada por meio da morfologia externa ovariana e ao corte do ovário. Durante a fase folicular (proestro e estro), são observados na superfície do ovário folículos maduros proeminentes, medindo de 3 a 5 mm de diâmetro (FIGURA 1A). Os corpos hemorrágicos são observados no período pós-ovulatório, ou seja, já na fase luteínica (FIGURA 1B). Estes dão lugar ao corpo lúteo (CL) (FIGURA 1C), de diâmetro aproximado de 4,5mm entre 12 a 16 dias após a cópula (SPINDLER; WILDT, 1999; WILDT; SEAGER; CHAKRABORTY, 1980).



Figura 1. Foto do ovário folicular (A); hemorrágico (B) e luteal (C) (Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

No início do ciclo ovariano, os oócitos se encontram no estágio inicial de desenvolvimento, permanecendo na prófase meiótica I (vesícula germinativa - VG). A capacidade que um oócito tem de sair da fase de Vesícula Germinativa e retomar a meiose é denominada competência meiótica, quando as células aumentam de tamanho e passam a armazenar proteínas e nutrientes essenciais (FERREIRA et al., 2009). Geralmente, a competência meiótica ocorre *in vivo* pelo aumento das gonadotrofinas pré-ovulatórias ou pela atresia degenerativa do folículo, que age sobre o núcleo da célula. *In vitro*, quando o complexo *cumulus oophorus* (CCO) é retirado do folículo, ele perde contato com as células murais adjacentes, e o rompimento dessa barreira favorece a condensação da cromatina e a quebra da membrana do núcleo, induzindo a maturação nuclear. A retirada de um oócito do folículo antral resulta em quebra de vesícula germinativa (QVG) de forma espontânea, mas o

mesmo não ocorre em oócito retirado de um folículo pré-antral (ADASHI e LEUNG, 1993; EDWARDS, 1965).

Na retomada da meiose, o núcleo e o citoplasma sofrem alterações necessárias para a maturação meiótica, entre elas: a condensação da cromatina durante a quebra da vesícula germinativa, modificações e remodelação da cromatina, segregação de cromossomos, extrusão do corpúsculo polar, alterações no ambiente metabólico citoplasmático e sinalização com células somáticas adjacentes (CHAVEZ; LEE; COMIZZOLI, 2021). No estágio de QVG, em oócitos incompetentes, a cromatina é distribuída por todo o núcleo, enquanto em oócitos competentes, a cromatina forma um anel denso ao redor do núcleo. Além disso, a proteína M-phase aparece apenas em QVG competentes, indicando que o oócito entrou em Prófase (ADASHI e LEUNG, 1993).

Após o estágio de QVG, o oócito primário segue a maturação e atinge a metáfase I. Nessa fase, os pares de cromossomos homólogos estão duplicados e pareados, mais condensados, e se distribuem na placa equatorial da célula. Seguindo a maturação, os pares de cromossomos homólogos pareados migram para os pólos opostos da célula, devido ao encurtamento das fibras do fuso meiótico (ADASHI e LEUNG, 1993). Com a conclusão da primeira divisão meiótica, ocorre a formação de duas células haploides: uma contendo a maior parte do citoplasma e a outra menor, chamada de primeiro corpúsculo polar, caracterizando a telófase I. Nesse estágio, os cromossomos ainda estão duplicados, ou seja, cada cromossomo consiste em duas cromátides irmãs unidas pelo centrômero (ADASHI e LEUNG, 1993).

Seguindo o desenvolvimento, o oócito passa para a metáfase II. Esse estágio é caracterizado pelo processo de redução da ploidia celular pela metade, sendo fundamental para a estabilização do número de cromossomos. Nessa fase, ocorre a separação das cromátides irmãs dos cromossomos, resultando em células haploides contendo apenas um conjunto de cromossomos simples. Ao terminar a primeira divisão da meiose, ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar e a formação do oócito secundário, concluindo a segunda divisão meiótica (MOORE e PERSAUD, 2008). A ploidia celular é reconstituída no momento da fecundação ( ARAUJO, 2007; FERREIRA et al., 2009).

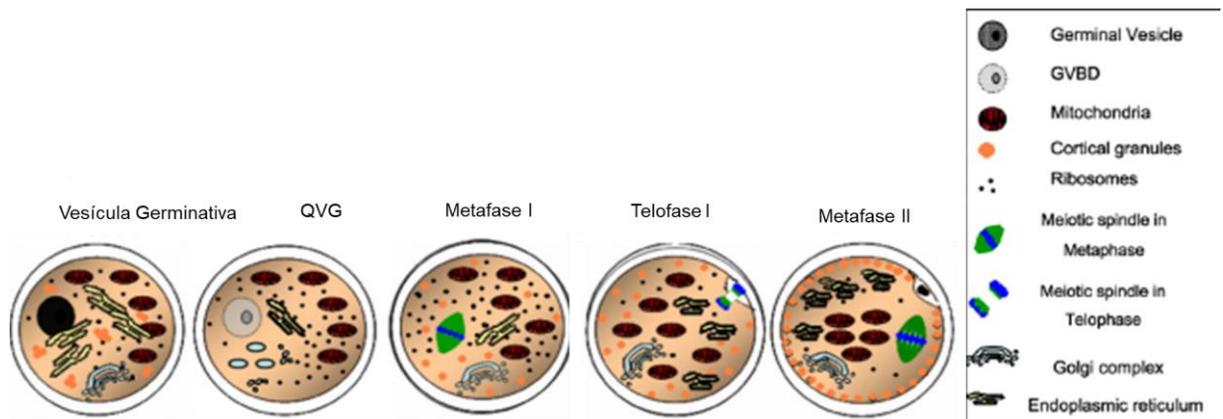


Figura 2: Visão geral esquemática da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação de oócitos, evidencia da progressão da maturação nuclear do estágio imaturo da vesícula germinativa para o estágio maduro da metáfase II. Fonte: Brandão-Souza et al., 2024 adaptado de Ferreira et al., 2009.

Nas gatas domésticas, as vesículas germinativas adquirem competência meiótica total durante a transição do estágio folicular pré-antral para o antral, e uma série de proteínas estão envolvidas neste processo (CHAVEZ; LEE; COMIZZOLI, 2021). Os oócitos são ovulados na metáfase II da divisão meiótica, quando estão prontos para a fertilização. Nessa etapa do desenvolvimento, os oócitos exibem uma zona pelúcida com bicamada, cuja camada interna desempenha papel fundamental como barreira parcial, regulando a entrada em número e tipo de espermatozoides que penetram no oócito. Após a fecundação pelo espermatozoide, o oócito retoma a meiose e libera o segundo corpúsculo polar, finalizando a oogênese com o desenvolvimento do zigoto (LUVONI, 2000; 2006).

Assim, os estágios da maturação nuclear oocitária são classificados segundo JOHNSTON; O'BRIEN; WILDT, (1989) como:

- Vesícula germinativa (VG): núcleo de formato redondo com nucléolo proeminente e filamentos finos de cromatina (Figura 3A);
- Quebra de vesícula germinativa (QVG): condensação da cromatina e dissolução da membrana nuclear, ruptura da vesícula germinativa (Figura 3B);
- Metafase I: aparecimento de dois grupos de cromossomos espalhados (Figura 3C);
- Metafase II: aparecimento de dois grupos de cromossomos, um espalhado e o outro agrupado, compreendendo o corpúsculo polar (Figura 4).

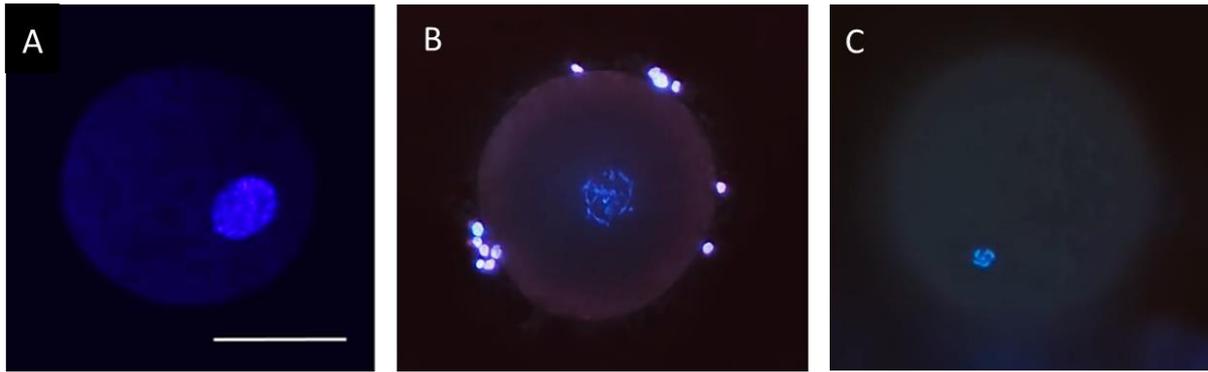


Figura 3. Oócitos de gata corados com sonda fluorescente Hoechst H33342 evidenciando o DNA, em fase de Vesícula Germinativa (A) (Fonte: SOWIŃSKA et al., 2017); Quebra da vesícula germinativa (B), Metáfase I (C) (Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

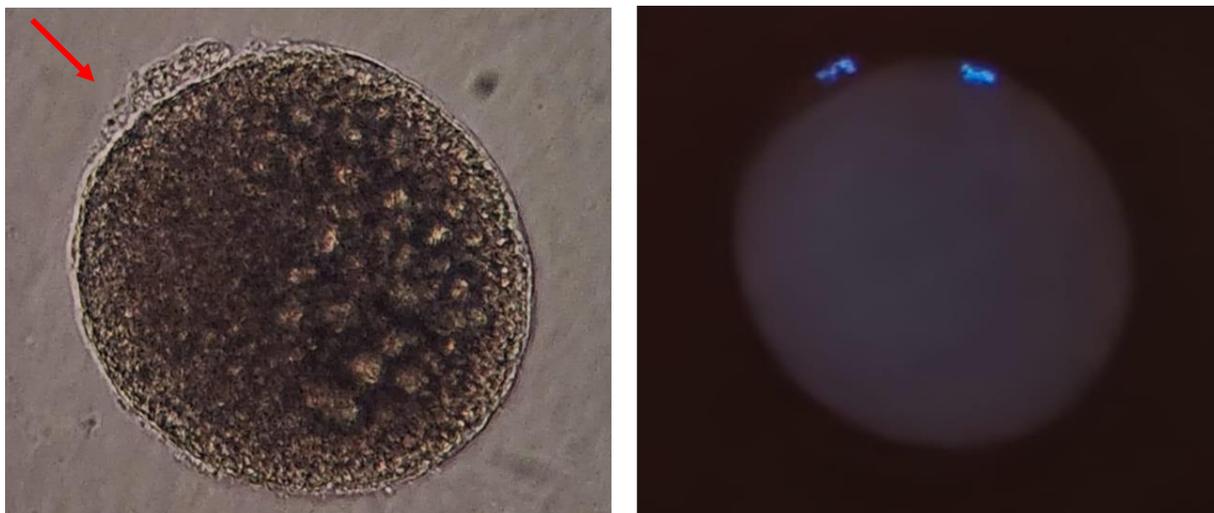


Figura 4. Oócito de gata em Metáfase II, evidenciando extrusão do primeiro corpúsculo polar (A; seta) sob microscopia de luz e a cromatina sob microscopia de fluorescência com sonda fluorescente Hoechst 33342 (B). Aumento  $\times 100$ . (Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

Os efeitos da atividade ovariana sobre os oócitos foram estudados em algumas espécies de felinos, em sua maioria com o objetivo de determinar a ciclicidade, mas pouco se sabe sobre a atuação do ciclo estral na qualidade dos oócitos obtidos. JOHNSTON et al., (1989) e SPINDLER e WILDT (1999) observaram que a porcentagem de oócitos grau I obtidos não difere entre as fases do ciclo estral. Entretanto, KARJA et al., (2002) afirmaram que, apesar do estágio reprodutivo da fêmea não afetar a eficiência da MIV e da FIV, a competência do desenvolvimento *in vitro* dos embriões (desenvolvimento até mórula e blastocisto) é influenciada pelo

estágio do ciclo da doadora, com melhor desempenho na fase inativa e lútea em relação à folicular.

### **2.3 Recuperação de oócitos em gatas**

A obtenção de oócitos competentes ao desenvolvimento, é essencial para as biotécnicas de reprodução assistida que envolvem a PIVE (JORGE-NETO et al., 2018; BALDASSARRE et al., 2002). A obtenção desses oócitos pode ser realizada de forma eficaz em felinos por meio da técnica de fatiamento (slicing) do ovário (após a castração ou pós-morte) ou pela aspiração folicular por laparoscopia (LOPU), quando se tem interesse em preservar o aparelho reprodutivo da fêmea (BALDASSARE et al., 2015; CUNHA et al., 2019; JORGE-NETO et al., 2023).

A técnica de fatiamento do ovário (slicing) é bastante difundida para obter oócitos de gatas domésticas, por ser eficiente na colheita de oócitos em ovários de tamanho reduzido (HERMANSSON; AXNÉR; HOLST, 2007; SOWIŃSKA et al., 2017). Esta consiste em isolar cada ovário do útero e colocá-lo em placas Petri contendo meio de manipulação o de oócitos, os quais podem variar na sua composição (ex: TCM 99 Hepes modificado; TALP + Albumina Sérica Bovina (BSA); Eagle's MEM com soro fetal bovino (FCS); TALP HEPES; Similar Oviductal Fluid (SOF) + BSA) (GÓMEZ et al., 2003; HERMANSSON; AXNÉR; HOLST, 2007; JOHNSTON; O'BRIEN; WILDT, 1989; MERLO et al., 2005; SNOECK et al., 2017; WLODARCZYK et al., 2009; WOOD et al., 1995; LUVONI; OLIVA, 1993). Para o fatiamento, segura-se o ovário com uma pinça e, do outro lado, incisões longitudinais são feitas em toda a superfície do mesmo utilizando lâmina de bisturi ou agulha de 22g (GARDNER et al., 1996). Segundo Cunha et al. (2019), a técnica de fatiamento pode recuperar um número superior de oócitos de gatas quando comparada à punção folicular e à punção folicular seguida do fatiamento, não afetando a qualidade estrutural das células recuperadas.

Goodrowe et al. (1988) demonstraram, pela primeira vez, que oócitos podem ser colhidos em gatas por meio da aspiração folicular por laparoscopia e que, após a FIV, estes teriam a capacidade de sustentar o desenvolvimento embrionário. Em grandes felinos, autores relataram que a mesma técnica permite a obtenção de oócitos de qualidade para produção *in vitro* de embriões (JORGE-NETO et al., 2018; 2020; 2023). A aspiração folicular aparece, portanto, como a metodologia de escolha em animais vivos em que há a intenção de manter o aparelho reprodutivo.

## 2.4 Maturação e fertilização *in vitro* de oócitos de gatas

Os oócitos usados para fertilização *in vitro* podem ser colhidos maduros ou serem maturados em incubadoras. Apesar de os oócitos maturados *in vivo* apresentarem melhores taxas de fertilização, o tempo de transporte entre a colheita e o processamento para FIV é mais curto (cerca de 6 horas) (POPE, 2014; MILLER et al., 1990). Por outro lado, oócitos ainda imaturos, permitem um tempo maior de transporte pois são necessárias cerca de 24 horas de incubação para que ocorra a realização da FIV (LUVONI; OLIVA, 1993; WOLFE; WILDT, 1996).

O tempo de maturação influencia diretamente na quantidade e qualidade de oócitos, assim como na taxa de fertilização. Após 40 a 48 horas de MIV pode-se obter um maior número de oócitos em metáfase II; no entanto, Luvoni e Oliva (1993) e Wolfe e Wildt (1996) mostraram que tempos prolongados de MIV resultam em baixa taxa de clivagem (e menos embriões se desenvolvendo em blastocistos). Por outro lado, após 24h de maturação, a maioria dos oócitos chega à Metáfase II.

O corante Hoechst 33342 (H342), juntamente com microscópios de fluorescência, tem sido utilizado para a visualização dos cromossomos dentro do núcleo dos oócitos para validar protocolos de maturação *in vitro* (SCHRAMM; BAVISTER, 1995; SMITH, 1993). Para a realização desta técnica, após o período de maturação *in vitro*, os COCs precisam ser desnudados para que a cromatina disposta no núcleo possa ser adequadamente corada. A desnudação pode ser feita através de sucessivas pipetagens com o uso de micropipetas ou com o auxílio do vórtex (CETICA et al., 2008). Após o desnudamento, para a coloração com o Hoechst, os oócitos são lavados e incubados com a sonda, aquecidos e mantidos longe de luminosidade. Protocolos utilizam o tempo de incubação entre 10 e 30 minutos, com concentrações variadas, 1, 5, 10 e 40 µg/mL (COLOMBO et al., 2020; MERLO et al., 2005; RAO et al., 2022; SNOECK et al., 2017). A exposição dos oócitos à radiação proveniente da fluorescência é deletéria à continuação do desenvolvimento dessas células, inviabilizando o seu posterior uso para fertilização *in vitro* (TSUNODA et al., 1988). Desta forma, esta técnica é viável para avaliar a maturação nuclear do oócito, porém não pode ser usada quando se pretende progredir com a FIV.

Oócitos que chegam à Metáfase II podem ser fertilizados *in vitro*. Bowen (1997) reportou a primeira em gatos e Hamner et al., (1970) reportaram o primeiro cultivo *in vitro* de embriões de gatos que se desenvolveram até blastocisto. Mesmo com

técnicas que viabilizam a PIVE nesta espécie, há falta de conhecimento básico em relação à fisiologia embrionária felina (HERRICK, et al., 2007), fazendo com que as taxas de blastocisto sejam reduzidas (PALMA; SINOWATZ, 2004; COLOMBO et al., 2021).

Estudos demonstram que a eficiência da MIV e da FIV de oócitos de gatos é geralmente inferior quando comparada a outras espécies de animais (COLOMBO et al., 2021; FARSTAD, 2000). A MIV é a fase mais crítica do processo pois o percentual de oócitos em Metafase II, que indica maturação nuclear, vai limitar o número de embriões obtidos. Em gatos, apenas cerca de 60% dos oócitos chegam a esta fase sendo que apenas próximo de 60% conseguem ser fertilizados. Mesmo em condições ótimas de cultivo, entre 10 e 30% dos oócitos fertilizados *in vitro* se desenvolvem em blastocisto (COLOMBO et al., 2021; FARSTAD, 2000; FREISTEDT et al., 2001; LUVONI; COLOMBO; MORSELLI, 2018; POPE, C. E.; GÓMEZ; DRESSER, 2006; WOOD et al., 1995; WOOD; WILDT, 1997) Além disso, embriões de gatos provenientes de MIV ou FIV são, aparentemente, menos competentes em termos de desenvolvimento do que os oócitos maturados e fertilizados *in vivo* (JOHNSTON; O'BRIEN; WILDT, 1989; SCHRAMM; BAVISTER, 1995; WOLFE; WILDT, 1996; WOOD; WILDT, 1996).

Para melhorar estes resultados *in vitro*, vários meios de cultivo com diferentes suplementações e sequências já foram avaliados em estudos (HERRICK, Jason R. et al., 2007; HUI et al., 2022; MERLO et al., 2005; POPE, C. E. et al., 2009). Tentativas de se obter um meio de cultivo que se assemelhe ao fluido folicular foram feitas em gatos, adicionando-se FSH e LH de diferentes origens e concentrações, demonstrando que os hormônios humanos ou de porcos na dosagem de 0,02-0,5 UI/mL apresentam os melhores resultados (COMIZZOLI; WILDT; PUKAZHENTHI, 2003; YILDIRIM et al., 2014; ZAHMEL et al., 2017). O fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) também foram avaliados na maturação *in vitro* de oócitos felinos (MERLO et al., 2005; SANTOS et al., 2022; YILDIRIM et al., 2014). O papel dos hormônios esteróides na maturação dos oócitos *in vitro* ainda não é bem estabelecido, mas sabe-se que as gonadotrofinas exógenas na presença de estrogênio estimulam a maturação meiótica de oócitos *in vitro* (WOOD et al., 1995). O FSH aparentemente promove a maturação ao regular as

concentrações de cAMP, associadas ao aumento da expansão das células do cumulus (SALUSTRI et al., 1985).

A albumina sérica bovina (BSA) se mostra superior na maturação *in vitro* de oócitos de gatas quando comparado ao uso de outros suplementos proteicos (JEWGENOW, 1998). Quando utilizada, o BSA apresenta melhores resultados nas taxas de maturação, fertilização e clivagem em relação ao meio com álcool polivinílico (PVA) e ao soro fetal bovino (FCS). Na análise macroscópica, oócitos apresentam expansão média de células do cumulus e mucificação, enquanto que o FCS promove expansão e mucificação mais proeminente (WOOD et al., 1995). Comparativamente com o soro fetal bovino e ao soro de gata em estro, estudos também apontam a superioridade do BSA (FARSTAD, 2000; WOOD et al., 1995; JOHNSTON et al., 1993; LUVONI; OLIVA, 1993).

A cisteína, apesar de nem sempre utilizada como suplemento no meio de cultivo da MIV, mitiga o estresse oxidativo causado pelo cultivo *in vitro*, aumentando a síntese intracelular de GSH, sendo capaz de melhorar a competência oocitária e as taxas de maturação, podendo alcançar até 70% de oócitos maturados (COMIZZOLI; WILDT; PUKAZHENTHI, 2003; HERRICK et al., 2007; LUVONI; COLOMBO; MORSELLI, 2018).

Outro ponto a ser levantado para obter sucesso na fertilização *in vitro* é a interação do oócito com o espermatozoide. Estudos realizados apresentam discrepâncias quanto ao tempo necessário para a capacitação espermática para que a fusão do espermatozoide (NIWA et al., 1985; BOWEN, 1997; GOODROWE e HAY (1993); HERMANSON et al., 2007). Entretanto, os protocolos de FIV em gatos estabelecem como 18 horas o tempo de incubação entre oócitos e espermatozoides (GÓMEZ et al., 2000; MERLO et al., 2005; POPE et al., 2009), indicando este tempo como o suficiente para fertilização, resultando em clivagem embrionária.

Basicamente, para a FIV em espécies felinas, o sêmen é diluído em concentração que varia entre  $1 \times 10^5$  e  $5 \times 10^6$  de espermatozoides/mL. A forma de colheita (ejaculado, sondagem uretral ou colhido do epidídimo após castração) e armazenamento (fresco, refrigerado ou criopreservado), são fatores que influenciam na qualidade seminal e, por isso, devem ser considerado (POPE et al., 1993; GOODROWE, K. L.; HAY, 1993; BOWEN, 1997; HERMANSSON; AXNÉR; HOLST, 2007; HERRICK, J.R. et al., 2010; SANTOS et al., 2022; THUWANUT et al., 2011).

## 2.5 Cultivo *in vitro* de embriões felinos

*In vivo*, a fertilização ocorre na ampola do oviduto. A união do oócito com o espermatozoide origina o zigoto, que passa a ser denominado embrião após o segundo dia de desenvolvimento e transita pela tuba uterina até se implantar no útero. Em humanos, sabe-se que as regiões do oviduto, tuba e ambiente uterino possuem concentrações diferentes de lactato, glicose e piruvato, que se apresentam como diferentes fontes de energia para os embriões (BAVISTER, 1999; CASSLÉN; NILSSON, 1984; GARDNER et al., 1996).

Diferentes meios de cultivo podem ser usados na produção de embriões felinos, permitindo o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (FREISTEDT; STOJKOVIC; WOLF, 2001; GÓMEZ et al., 2000; GOODROWE; HOWARD; WILDT, 1988; HERRICK et al., 2007; HERRICK et al., 2010; 2007; HUI et al., 2022; JOHNSON, 2018; KANDA et al., 1998; SPINDLER et al., 1999). Sabe-se que a concentração de íons, carboidratos e aminoácidos presentes no meio de cultivo é responsável por aumentar a viabilidade embrionária *in vitro*, sendo que as macromoléculas e os aminoácidos são essenciais para o desenvolvimento embrionário em estágios mais avançados (GARDNER, 1998; LANE; GARDNER, 2005; 2007).

As concentrações de carboidratos no trato reprodutivo da fêmea variam dependendo da localização, sugerindo que cada fase em que o embrião se encontra possui a concentração específica ideal para o seu desenvolvimento (GARDNER et al., 1996; HARRIS et al., 2005). Íons, aminoácidos essenciais e não essenciais também beneficiam o desenvolvimento embrionário em estágios específicos da sua formação *in vitro* (GARDNER et al., 1994; BIGGERS; MCGINNIS; RAFFIN, 2000; HERRICK et al., 2007; KHOSLA et al., 2001).

A atividade metabólica do embrião é impactada pela concentração de carboidratos, como a glicose, L-lactato e piruvato no meio de cultivo (GARDNER; POOL; LANE, 2000; LANE; GARDNER, 2000). No início do desenvolvimento embrionário o metabolismo é dependente da geração de ATP materna, apresentando menor consumo de glicose (GARDNER et al., 1996). A partir de oito células, quando há ativação do genoma embrionário, os embriões aumentam a atividade metabólica e o consumo de oxigênio, pois iniciam a prover metabólitos necessários para o seu desenvolvimento (LEESE et al., 1993).

O cultivo embrionário *in vitro* de felinos ocorre em temperatura ótima de 38,5 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. A forma de cultivo dos embriões de felinos pode ser em poços, contendo todos os embriões em 500µL de meio, em gotas individuais ou em gotas em grupo (PROCHOWSKA et al., 2017). Quando cultivados em grupos, os embriões tendem a ter um desenvolvimento melhor, o que pode ser explicado pelos fatores parácrinos liberados pelas células (SPINDLER; WILDT, 2002). Este efeito do cultivo embrionário *in vitro* em grupo pode ser benéfico mesmo quando o cultivo ocorre junto a embriões de outras espécies (SPINDLER et al., 2006).

Nos últimos anos, as biotécnicas de PIVE com gatos domésticos obtiveram consideráveis avanços, mas as taxas de maturação ainda permanecem inferiores quando comparadas a outras espécies de animais. Isso se deve ao fato de que os meios de cultivo ideais ainda estão em fase de aprimoramento (COLOMBO et al., 2021).

Atualmente, por ser um método não invasivo e não demorado, um parâmetro empregado para avaliar a qualidade embrionária é a análise morfológica dos embriões desde o estágio de zigoto até estágios mais avançados de desenvolvimento. O número, tamanho, forma e fragmentação dos blastômeros determinam a taxa de sucesso da implantação deste embrião (KIJ-MITKA et al., 2024). Outra forma de avaliar o sucesso da taxa de implantação é a posição e tamanho dos pró-núcleos de um zigoto (GUERIF et al., 2007). Entretanto, os gatos possuem maior quantidade de lipídio intracelular quando comparados a humanos e camundongos, escurecendo o citoplasma e dificultando a visualização de estruturas internas do zigoto. Portanto, nem todos os critérios de avaliação usados para zigotos com citoplasma claro podem ser aplicados a zigotos de gatos domésticos, que possuem citoplasma escuro. Nessa situação, a avaliação não invasiva de oócitos e zigotos concentra-se no tamanho e na forma, características do citoplasma e da zona pelúcida (KIJ-MITKA et al., 2024).

O tempo da primeira divisão é considerado uma ferramenta de seleção eficaz para embriões humanos e bovinos e, assim como em outras espécies, em gatos, a clivagem direta está relacionada à replicação incompleta do DNA, acarretando em anomalias cromossômicas (KIJ et al., 2020; KOCHAN et al., 2021). A clivagem embrionária de um a três blastômeros de uma vez é definida como clivagem direta,

característica usada para avaliar o sucesso do desenvolvimento de um embrião (KIJ et al., 2020).

Embriões com distúrbios morfológicos têm potencial para alcançar o estágio de blastocisto, mas podem não ter capacidade para se desenvolver mais devido à perda de material genético, podendo sofrer reabsorção precoce ou aborto espontâneo (KIJ et al, 2020).

### **3. OBJETIVOS**

Observar se o uso de incubadora portátil é eficiente para transporte e maturação de oócitos para a PIVE de embriões de felinos.

#### **Objetivo geral**

Validar a eficácia da incubadora portátil para a maturação *in vitro* de oócitos de felinos.

#### **Objetivo específico**

- Avaliar se a maturação oocitária na incubadora portátil influencia a taxa de maturação nuclear;
- Investigar se a maturação oocitária na incubadora portátil, seguida de fertilização *in vitro* em incubadora de bancada, impacta a taxa de desenvolvimento até o estágio de mórula.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os testículos e ovários foram obtidos no Centro de Controle de Zoonoses sob autorização da Secretaria de Saúde de Campo Grande. Por se tratar de material que seria descartado, não se faz necessário autorização da CEUA. A menos que informado, os reagentes foram adquiridos na Sigma. A composição completa dos meios de manipulação e cultivo estão descritas no Anexo 01.

## 4.1 Delineamento Experimental

O trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro consistiu na avaliação da taxa de maturação nuclear em incubadora portátil. No segundo, avaliamos a taxa de fertilização de oócitos após maturação em incubadora portátil.

## 4.2 Experimento I: Avaliação da Taxa De Maturação Em Incubadora Portátil

Foram processados 54 ovários de gatas submetidas à ovarioparingohisterectomia eletiva em campanhas de castração para controle populacional. Os ovários foram processados em nove replicatas, sendo selecionados 230 oócitos (COCs Grau I e II) de acordo com WOODT e WILDT (1997), divididos nos tratamentos: incubadora de bancada (modelo MCO-20AIC, Sanyo; a 38,5 °C, em atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub> em ar; n=114 oócitos) e portátil (LabMIX – WTA, a 38,5 °C com 5% CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>; n=116 oócitos).

### 4.2.1. Colheita e processamento dos oócitos

Logo após a remoção do aparelho reprodutivo, os ovários foram separados das demais estruturas e lavados em solução NaCl 0,9% por três vezes para remoção de sujidades. Posteriormente, foram acondicionados em tubos Falcon estéreis contendo 5mL de NaCl 0,9% e 0,5 mL de Gentamicina (50 mg/mL; Gentamicin, Sigma G1397) em seguida transportados ao laboratório em temperatura ambiente em caixa isotérmica. O tempo entre a colheita dos ovários e o início da maturação não ultrapassou duas horas.

No laboratório, os ovários foram transferidos para uma placa de Petri estéril contendo solução de 5 mL de NaCl 0,9% e 0,5mL de Gentamicina (50 mg/mL; Gentamicin, Sigma G1397) e mantidos em temperatura ambiente até iniciar o processamento. Posteriormente, cada ovário foi transferido para outra placa de Petri contendo 1 mL de meio de manipulação (Anexo 01 – Meio de colheita e seleção) (SANTOS et al., 2022), aquecido a 38,5°C. Com o auxílio de um bisturi, o ovário foi fatiado para a liberação dos complexos cumulus-oócitos (CCOs), que foram identificados e classificados visualmente em estereomicroscópio (aumento 4x, NIKON SMZ 745), sendo as estruturas viáveis (Grau I e II) selecionadas para a MIV conforme descrito por WOODT e WILDT (1997).

#### 4.2.2. *Maturação dos oócitos*

Os CCOs selecionados foram lavados 2x em meio de manipulação e 3x em meio de maturação - MMiv (Meio de manipulação suplementado com 20 µg/mL de FSH e LH (Pluset, Hertape Calier, Barcelona, Spain)).

Para a incubação em bancada (GC), gotas de 100 µL de MMiv cobertas por parafina líquida foram preparadas em placa de Petri de 30 x 15 mm estéril (Figura 4). Os oócitos (máximo de 20 oócitos por gota) foram incubados a 38,5°C em atmosfera úmida a 5% CO<sub>2</sub> em ar. Para a incubadora portátil, 200 µL de MMiv foram acondicionados no fundo de um microtubo WTA (fornecido pelo fabricante; Figura 4) cobertos por parafina líquida. Os oócitos (máximo de 20 oócitos por tubo) foram incubados a 38,5 °C em mistura trigás de baixa tensão (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>). Em todos os tratamentos o tempo de incubação foi de 24h.

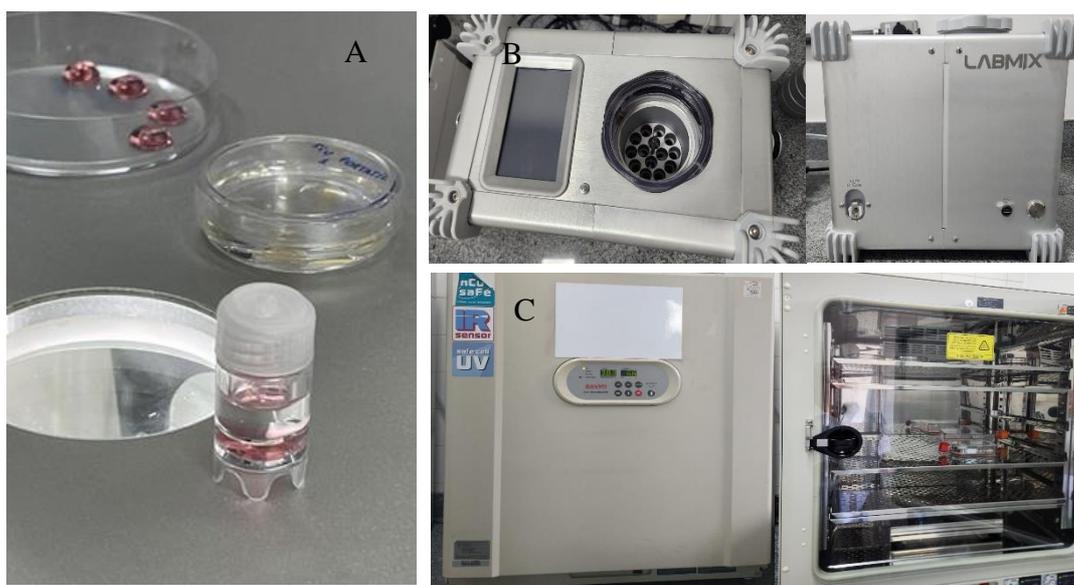


Figura 4. Microtubo WTA e Placa de Petri utilizados para a maturação *in vitro* (A). Incubadoras Labmix - WTA (B) e Sanyo (C) utilizadas na maturação *in vitro* (Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

A maturação nuclear dos oócitos foi avaliada por meio da sonda fluorescente Hoechst 33342 - H342 (Sigma H33342; bisbenzamide; Sigma Chemical Co.). Para isso, após o período de 24 horas de maturação, os oócitos foram lavados duas vezes em meio de manipulação e transferidos para gotas de 20  $\mu\text{L}$  de meio de manipulação contendo de 10 a 20 oócitos e 40  $\mu\text{L}$  de H33342 (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os oócitos foram então incubados por 1 hora a 38,5  $^{\circ}\text{C}$  em ambiente escuro. Posteriormente, foram lavados três vezes em gotas de 100  $\mu\text{L}$  contendo meio de manipulação para posterior avaliação individual em microscopia de fluorescência (NIKON Eclipse Ti2). Os oócitos foram classificados de acordo com Johnston, O'Brien e Wildt (1989) como:

- Vesícula Germinativa (VG) - núcleo de formato redondo com nucléolo proeminente e filamentos finos de cromatina;
- Quebra da vesícula Germinativa (QVG) - condensação da cromatina e dissolução da membrana nuclear, com ruptura da vesícula germinativa;
- Metáfase I (MI) - aparecimento de dois grupos de cromossomos espalhados;
- Metáfase II (MII) – aparecimento de dois grupos de cromossomos, um espalhado e o outro agrupado, compreendendo o corpúsculo polar (Figura 6).



Figura 6. Oócito em Metáfase II, com extrusão do primeiro corpúsculo polar com cromatina evidenciada pela sonda fluorescente H33342 (B). (Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

#### **4.3. Experimento II: Avaliação da Taxa de Fertilização de Oócitos Maturados em Incubadora Portátil**

Para este experimento, foram utilizados 180 ovários de gatas submetidas à ovariosalpingohisterectomia eletiva em campanhas de castração para controle populacional. Os ovários foram processados em seis replicatas, sendo selecionados 667 oócitos (COCs Grau I e II), divididos nos tratamentos: incubadora de bancada (n=333 oócitos) e incubadora portátil (n=334 oócitos). O processamento de seleção e maturação de oócitos foi realizado conforme descrito para o Experimento I, com a diferença que a proporção de oxigênio usada foi de 20% em ambas as incubadoras.

Após maturação, a incubadora de bancada foi utilizada para a fertilização e cultivo *in vitro* em ambos os tratamentos.

##### **4.3.1 Colheita e processamento de sêmen**

Os espermatozoides, obtidos de testículos oriundos de castração eletiva, foram recuperados a partir do conjunto cauda do epidídimo/ducto deferente (CE-DD). Para isso, logo após a orquiectomia, o conjunto testículo/ducto deferente foi acondicionado em tubo plástico e mantido em caixa isotérmica refrigerado até o transporte ao laboratório. Ao chegar no laboratório, o conjunto testículo/ducto

deferente foi acondicionado em placa de Petri e lavado com solução NaCl 0,9% e 0,5 mL de Gentamicina (50 mg/mL; Gentamicin, Sigma G1397) para retirada do excesso de sujidades. Em seguida, os vasos do plexo pampiniforme foram isolados por esmagamento com auxílio de pinça hemostática para redução da contaminação por células sanguíneas. Os testículos foram acondicionados na geladeira a 4 °C em solução contendo NaCl 0,9% e 0,5mL de gentamicina (50 mg/mL; Gentamicin, Sigma G1397) por 24 horas, até o processamento para a FIV.

No dia da FIV, as caudas dos epidídimos e os ductos deferentes foram transferidos para a placa de Petri e aquecidos aos poucos até chegar a temperatura de 38,5 °C. Sob estereomicroscopia, foi realizada a limpeza dos vasos sanguíneos e tecidos adjacentes ao ducto deferente e cauda do epidídimo de cada testículo para evitar a contaminação do sêmen com hemácias e células de descamação. Foi realizado o fatiamento (slicing) da cauda do epidídimo e do ducto deferente em gota contendo 800 µL de meio Talp Hepes (Anexo 01 – item 4) (Sowińska et al., 2017). Após o fatiamento, esperou-se 15 minutos com a placa de Petri aquecida a 38,5 °C para recuperação dos espermatozoides.

Em seguida, o meio contendo os espermatozoides foi transferido para um tubo de fundo cônico estéril, e uma alíquota foi retirada para avaliação do vigor (qualidade do movimento do espermatozoide, em uma escala de 0 a 5) e da motilidade espermática (percentual de células com movimento) em microscopia de luz sob aumento de 40×. Foram selecionados pools com pelo menos 50% de espermatozoides móveis e vigor 3, através da visualização subjetiva.

Para reduzir a contaminação com células de descamação e hemácias, a amostra foi centrifugada a 300g por 10 minutos e ressuspensa com 400 µL de Talp Hepes suplementado com 10 µg/mL de heparina (Talp Fiv) (SANTOS et al., 2022). O sobrenadante foi descartado e a parte superior do pellet foi retirada, evitando o conteúdo rico em hemácias. Posteriormente, a concentração do pool foi calculada em câmara de Neubauer e ajustada para  $2 \times 10^6$  spz/mL adicionando meio Talp Fiv (Anexo 01 – item 5).

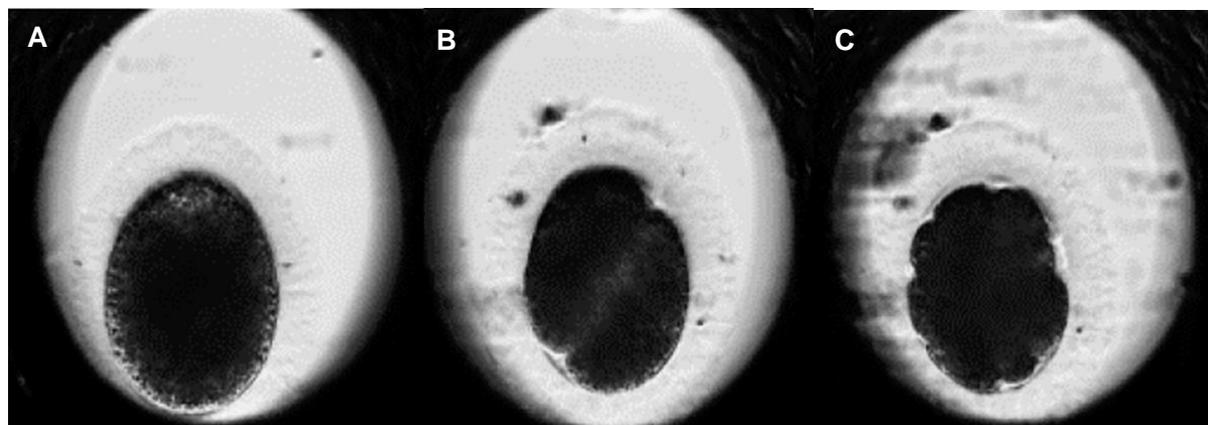
#### 4.3.2 Fertilização *in vitro*

Os óocitos maturados foram lavados em meio de manipulação e coincubados com espermatozoides (10µL;  $2 \times 10^6$ /mL) em gota de FIV contendo 90µL de meio Talp Fiv por 18 horas (5 a 10 CCOs/gota, 38,5°C; 5% de CO<sub>2</sub>).

### 4.3.3 Cultivo *in vitro*

Os presumíveis zigotos foram retirados da gota de FIV e lavados em meio de manipulação para remoção de espermatozoides aderidos à zona pelúcida. Em seguida, foram incubados (máximo de 20 zigotos presumíveis por gota, a 38,5°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> em ar) em Meio Fluido Sintético do Oviduto (Anexo 01 – item 6) (SANTOS et al., 2022). O dia da co-incubação foi considerado o dia 0 (D0) e o cultivo embrionário foi realizado até o dia 6 (D6). Os embriões foram avaliados periodicamente e, 48 horas após o início do cultivo (D2), as estruturas não clivadas foram removidas e a taxa de clivagem foi contabilizada dividindo o total de estruturas com dois blastômeros pelo número de oócitos co-incubados. A taxa de mórula foi avaliada 120 horas após o início do cultivo (D5), dividindo o número de embriões normais pelo número de oócitos co-incubados. A taxa de mórula por clivagem foi calculada dividindo o número de embriões normais pelo número de estruturas com dois blastômeros em D2.

Foi considerado como clivagem ou mórula apenas embriões que se desenvolverem morfológicamente saudáveis (blastômeros regulares, ausência de fragmentação e vacúolos no citoplasma) de acordo com Kij, 2020 (Figura 7).



Zigoto (A), primeira clivagem (B), mórula (C) de embrião felino (Fonte: KIJ et al., 2020).

## 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados no programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., NC, EUA.) e testados para normalidade de resíduos e homogeneidade das variâncias usando o aplicativo SAS Guided Data Analysis.

A comparação entre os grupos para variáveis paramétricas (Taxa de MII, Taxa de MI, Taxa de Clivagem, Taxa de Mórula e Taxa de Mórula por Clivagem) foi feita por teste T, enquanto uma única variável não-paramétrica (Taxa QVG) foi analisada pelo teste de Wilcoxon. O nível de significância usado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%.

Os resultados são apresentados em média mais ou menos erro padrão da média para dados paramétricos e mediana mais ou menos desvio padrão para variável não-paramétrica.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Experimento I

Ao comparar a taxa de maturação entre os grupos Bancada e Portátil, observamos que não houve diferença ( $p=0.4120$ ) na proporção de oócitos em metáfase I. No entanto, a proporção de oócitos em metáfase II foi maior para o grupo Bancada (62% e 53%, respectivamente;  $p=0.0327$ ) (Tabela 1). A taxa de QVG revela uma tendência a se diferenciar ( $p=0.0598$ ) entre os grupos Bancada e Portátil.

Tabela 1. Taxa de Metáfase II, Metáfase I e Quebra de Vesícula Germinativa de oócitos de gatas após 24h de incubação em incubadora de bancada (alta tensão de  $O_2$ ) e portátil (baixa tensão de  $O_2$ ).

	<b>Bancada (n = 114)</b>	<b>Portátil (n = 116)</b>	Valor de P
<b>TAXA M2</b>	0.62 ± 0.03 (69)	0.53 ± 0.02 (61)	0,0327
<b>TAXA M1</b>	0.29 ± 0.03 (34)	0.32 ± 0.02 (37)	0,412
<b>TAXA QVG*</b>	0.12± 0.07 (11)	0.14± 0.08 (18)	0,0598

Brandão-Souza et al., 2024. Dados apresentados em Média ± Erro Padrão da Média

\*Para Taxa QVG mediana mais ou menos desvio padrão (variável não-paramétrica).

### 5.2 Experimento II

Ao comparar a taxa de clivagem entre os tratamentos Bancada e Portátil, os resultados não indicaram diferenças ( $p=0,9671$ ), com a taxa média de 36% para ambos.

A taxa de mórula também não apresentou diferença ( $p=0,5678$ ) entre os tratamentos Bancada e Portátil, com médias de 27% e 22%, respectivamente.

Da mesma forma, não foi encontrada diferença ( $p=0,3443$ ) na taxa de mórulas por clivagem entre os tratamentos Bancada e Portátil, com médias de 72% para bancada e 58% para portátil (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de Clivagem e Mórula de embriões felinos, submetidos a FIV após a MIV em incubadora de bancada e portátil.

	Bancada (n=333)	Portátil (334)	Valor de P
<b>TAXA CLIVAGEM</b>	0.36 ± 0.04 (113)	0.36 ± 0.06 (113)	0.9671
<b>TAXA MORULA</b>	0.28± 0.06 (82)	0.23 ± 0.07 (67)	0.5678
<b>TAXA MORULA POR CLIVAGEM</b>	0.73± 0.10	0.58± 0.11	0.3443

Brandão-Souza et al., 2024. Dados apresentados em Média ± Erro Padrão da Média

Por meio de inspeção visual subjetiva, observou-se que há uma diferença na expansão das células do cúmulus entre os dois métodos de incubação (Figura 8). Quando maturados na incubadora portátil (Figura 8A e 8B), os oócitos nem sempre se mantinham agrupados e as células do cúmulus expandidas apresentaram coloração mais clara quando comparados aos oócitos maturados na incubadora de bancada (8C).

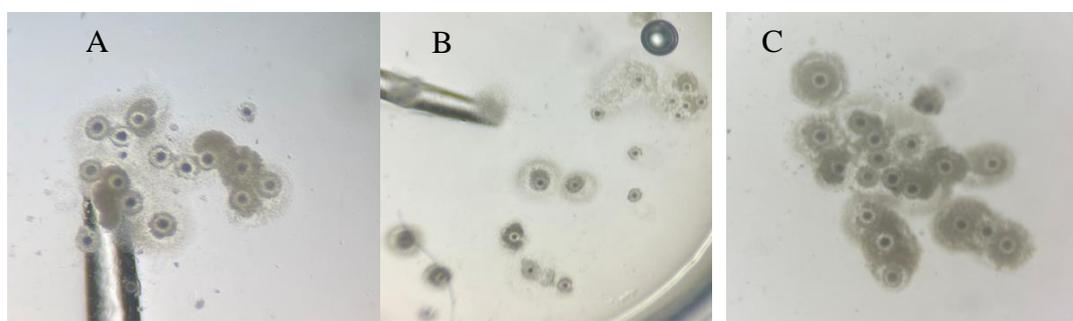


Figura 8. Oócitos pós maturação *in vitro* em incubadora portátil (A, B) e incubadora de bancada (C) (Fonte: Brandão-Souza et al., 2024).

## 6. DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, este trabalho representa um avanço nas tecnologias reprodutivas em felinos aplicáveis a campo (“*field friendly*”), demonstrando a aplicabilidade do uso de incubadora portátil para a maturação de oócitos e posterior FIV. Tecnologias de reprodução assistida que sejam “*field friendly*” são essenciais para favorecer o intercâmbio genético entre populações distantes, corroborando o conceito do One Conservation (PIZZUTTO; COLBACHINI; JORGE-NETO, 2021). A integração genética entre animais de vida livre e cativo é essencial

para a manutenção e revigoramento genético de ambas as populações, trazendo saúde genética tanto para populações *in situ* isoladas quanto para plantéis *ex situ* que geralmente se iniciam a partir de poucos indivíduos.

Zahmel et al., (2022) reportam o uso com sucesso de uma incubadora portátil (38,5–39°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar) para a maturação *in vitro* de oócitos de leões. Além de observarem uma boa taxa de maturação (50%) na incubadora portátil, concluíram que a maturação dos oócitos após 10h de transporte dos ovários até um laboratório capacitado obteve taxa de maturação inferior (38%). Incubadoras portáteis de alta tensão também foram utilizadas para a produção de embriões de sete espécies de grandes felinos (SWANSON, 2003). Entretanto, esses trabalhos não detalham a forma de uso e não compararam o desempenho da incubadora portátil em relação à incubadora de bancada.

Sabe-se que a concentração de O<sub>2</sub> no útero e oviduto é relativamente menor que no ar atmosférico, sendo 5% a 8% e 20%, respectivamente (FISCHER; BAVISTER, 1993). No entanto, protocolos envolvendo alta (20%) tensão de oxigênio são comumente utilizados para o cultivo *in vitro* de embriões bovinos apesar de aumentar a presença de estresse oxidativo (TRINDADE, 2016). Em espécies como suínos e bovinos, relata-se um efeito superior de baixa tensão de oxigênio (5%) durante a maturação *in vitro* de oócitos (HASHIMOTO et al., 2000; KANG et al., 2012).

Em gatos, Johnston et al. (1991b) não observaram diferenças na formação de embriões *in vitro* quando oócitos foram maturados em diferentes tensões de oxigênio. Entretanto, no experimento I do presente trabalho, oócitos maturados em baixa tensão de oxigênio apresentaram uma taxa inferior de Metafase II em comparação àqueles maturados em alta tensão de oxigênio. Essa divergência pode ser atribuída ao número mais expressivo de oócitos avaliados e a presença de aminoácidos que compõem o meio de cultivo no presente estudo em comparação aos dados apresentados por Johnston.

Para avaliar a eficácia da maturação citoplasmática e nuclear nos tratamentos utilizados no Experimento I os oócitos maturados foram submetidos à FIV. No Experimento II, quando ambos os tratamentos foram ajustados para uma concentração de oxigênio de 20%, não foram observadas diferenças ( $p > 0,05$ ) nas taxas de clivagem e formação de mórulas entre os grupos analisados. No entanto, uma observação relevante foi que oócitos maturados na incubadora portátil não apresentaram a mesma coesão e expansão visual das células do cúmulus em

comparação aos oócitos maturados na incubadora de bancada. Este fenômeno pode ser explicado pelo design do tubo WTA, onde os oócitos são alojados em uma superfície côncava. Possivelmente, há uma maior adesão ao fundo da placa plana, facilitando uma melhor interação das células do cúmulus com a superfície e com os oócitos entre si, porém os resultados indicam que esta diferença pode não afetar a taxa de embriões.

Para estabelecer um protocolo completo de produção *in vitro* de embriões a campo, o próximo passo envolve a realização da fertilização *in vitro* utilizando a incubadora portátil. Desta forma, podemos aspirar oócitos maturados *in vivo*, o que favorece a taxa de sucesso de embriões. Com isso, ainda podemos transportar oócitos co-incubados com os espermatozoides por até dezoito horas até o laboratório mais próximo, assegurando um ambiente estéril ideal para o cultivo embrionário *in vitro*. A escolha da melhor técnica depende da disponibilidade de amostras de sêmen para a FIV e da distância entre o local de colheita e o laboratório.

## **7. CONCLUSÃO**

Podemos concluir que a incubadora portátil pode ser utilizada para a maturação *in vitro* de oócitos de gatas.

## **8. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO**

O presente estudo representa um avanço significativo nas tecnologias reprodutivas aplicadas aos felinos, introduzindo métodos inovadores que viabilizam a produção *in vitro* de embriões em condições de campo. Essas inovações desempenham um papel crucial na conservação de espécies de felinos selvagens.

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADASHI, E.Y.; LEUNG, P. C. K **The Ovary: COMPREHENSIVE**

**ENDOCRINOLOGY (Revised series)**. Raven Press. 1993.

AMSTISLAVSKY, S. Ya. et al. Applying reproductive technologies and genome resource banking to laboratory animals. **Russian Journal of Genetics: Applied**

**Research**, v. 6, nº 4, p. 373–377, 2016. ISSN: 2079-0597, 2079-0600, DOI: [10.1134/S2079059716040031](https://doi.org/10.1134/S2079059716040031).

ARAUJO, C. H. M. D. Maturação in vitro de oócitos de mulheres com síndrome dos ovários policísticos: comparação entre dois meios de cultivo. Doutorado em Ginecologia e Obstetrícia - Universidade de São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17145/tde-27092013-152326/>.

Acesso em: 26/jun./24.

BALDASSARRE, H. et al. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies.

**Theriogenology**, v. 57, nº 1, p. 275–284, 2002. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/S0093-691X\(01\)00671-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00671-9).

BALDASSARE, H. et al. Efficient recovery of oocytes from “onça parda” (*Puma concolor*) by laparoscopic ovum pick-up of gonadotropin-stimulated females. **Animal Reproduction**, v. 12, nº 3, p. 717 Abstr., 2015.

BAVISTER, B. D. Glucose and culture of human embryos. **Fertility and Sterility**, v. 72, nº 2, p. 233–234, 1999. ISSN: 00150282, DOI: [10.1016/S0015-0282\(99\)00253-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00253-8).

BIGGERS, J. D.; MCGINNIS, L. K.; RAFFIN, M. Amino Acids and Preimplantation Development of the Mouse in Protein-Free Potassium Simplex Optimized Medium1. **Biology of Reproduction**, v. 63, nº 1, p. 281–293, 2000. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod63.1.281](https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.281).

BINDER, C. et al. Spontaneous ovulation in cats—Uterine findings and correlations with animal weight and age. **Animal Reproduction Science**, v. 209, p. 106167, 2019. ISSN: 03784320, DOI: [10.1016/j.anireprosci.2019.106167](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106167).

BOWEN, R., A. Fertilization in vitro of feline ova by spermatozoa from the ductus deferens. **Theriogenology**, v. 81, n° 1, p. 126–137, 2014. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2013.09.006](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.006).

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, n° 1, p. 5–13, 2006. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2006.03.019](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.019).

BYRD, S. R. et al. In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. **Theriogenology**, v. 47, n° 4, p. 857-864, 1997. ISSN: 0093-691X, DOI: [10.1016/S0093-691X\(97\)00041-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00041-1)

CASSELÉN, B.; NILSSON, B. Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 150, n° 7, p. 877–881, 1984. ISSN: 00029378, DOI: [10.1016/0002-9378\(84\)90466-6](https://doi.org/10.1016/0002-9378(84)90466-6).

CHAVEZ, D. R.; LEE, P.-C.; COMIZZOLI, P. Oocyte Meiotic Competence in the Domestic Cat Model: Novel Roles for Nuclear Proteins BRD2 and NPM1. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 670021, 2021. ISSN: 2296-634X, DOI: [10.3389/fcell.2021.670021](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.670021).

CLINE, E.M.; JENNINGS, L.L.; SOJKA, NJ. Breeding laboratory cats during artificially induced estrus. **Laboratory Animal Science**, v. 30, n.6, dez. 1980. ISSN: 0023-6764

COLOMBO, M. et al. Fighting Like Cats and Dogs: Challenges in Domestic Carnivore Oocyte Development and Promises of Innovative Culture Systems. **Animals**, v. 11, n° 7, p. 2135, 2021. ISSN: 2076-2615, DOI: [10.3390/ani11072135](https://doi.org/10.3390/ani11072135).

COMIZZOLI, P.; HOLT, W.V. Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species. **Biology of Reproduction**, v. 101, nº 3, p. 514-525, 2019. DOI: [doi:10.1093/biolre/ioz031](https://doi.org/10.1093/biolre/ioz031).

COMIZZOLI, P.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B. S. Overcoming poor in vitro nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season. **Reproduction and Fertility**, v. 126, nº 1, p. 809–816, 2003. ISSN: 1470-1626, DOI: [10.1530/rep.0.1260809](https://doi.org/10.1530/rep.0.1260809).

CONCANNON, P.; HODGSON, B.; LEIN, D. Reflex LH Release in Estrous Cats Following Single and Multiple Copulations. **Biology of Reproduction**, v. 23, nº 1, p. 111–117, 1980. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod23.1.111](https://doi.org/10.1095/biolreprod23.1.111).

CUNHA, R. O. et al. Efeito da técnica de coleta e do estágio do ciclo estral na recuperação de oócitos de boa qualidade em felinos e caninos domésticos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 26, nº 3, p. 104–109, 2019. ISSN: 1413-0130, 1984-7130, DOI: [10.4322/rbcv.2019.019](https://doi.org/10.4322/rbcv.2019.019).

DONG, Y. et al. Improvement of the Culture Conditions for *In Vitro* Production of Cattle Embryos in a Portable CO<sub>2</sub> Incubator. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, nº 6, p. 313–318, 2001a. ISSN: 0936-6768, 1439-0531, DOI: [10.1046/j.1439-0531.2001.00308.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00308.x).

DONOGHUE, A. M. et al. In Vitro Fertilization and Embryo Development in Vitro and in Vivo in the Tiger (*Panthera Tigris*)<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 43, nº 5, p. 733–744, 1990a. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod43.5.733](https://doi.org/10.1095/biolreprod43.5.733).

DRESSER, B. L. et al. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. **Journal of Experimental Zoology**, v. 246, nº 2, p. 180–186, 1988a. ISSN: 0022-104X, 1097-010X, DOI: [10.1002/jez.1402460210](https://doi.org/10.1002/jez.1402460210).

EVECEN, M. et al. Developmental competence of domestic cat oocytes from ovaries stored at various durations at 4°C temperature. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n° 1–2, p. 169–172, 2009. ISSN: 03784320, DOI: [10.1016/j.anireprosci.2009.01.006](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.01.006).

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 375–387, 2000a. ISSN: 03784320, DOI: [10.1016/S0378-4320\(00\)00106-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00106-8).

FELDMAN, H. N. Methods of scent marking in the domestic cat. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n° 6, p. 1093–1099, 1994. ISSN: 0008-4301, 1480-3283, DOI: [10.1139/z94-147](https://doi.org/10.1139/z94-147).

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

FERNANDEZ-GONZALEZ, L. et al. Felid-gamete-rescue within EAZA - efforts and results in biobanking felid oocytes and sperm. **Journal of Zoo and Aquarium research**, v.7, n°1, p. 15-24, 2019. ISSN:, DOI: [10.19227/jzar.v7i1.369](https://doi.org/10.19227/jzar.v7i1.369).

FERRÉ, L. B. et al. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14, n° 5, p. 991–1004, 2020a. ISSN: 17517311, DOI: [10.1017/S1751731119002775](https://doi.org/10.1017/S1751731119002775).

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n° 5, p. 836–848, 2009. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2008.10.023](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023).

FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Reproduction**, v. 99, n° 2, p. 673–679, 1993. ISSN: 1470-1626, 1741-7899, DOI: [10.1530/jrf.0.0990673](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990673).

FREISTEDT, P. et al. Energy Status of Nonmatured and In Vitro-Matured Domestic Cat Oocytes and of Different Stages of In Vitro-Produced Embryos: Enzymatic Removal of the Zona Pellucida Increases Adenosine Triphosphate Content and Total Cell Number of Blastocysts. **Biology of Reproduction**, [s.l.], v. 65, n° 3, p. 793–798, 2001. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod65.3.793](https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.793).

FREISTEDT, P.; STOJKOVIC, M.; WOLF, E. Efficient In Vitro Production of Cat Embryos in Modified Synthetic Oviduct Fluid Medium: Effects of Season and Ovarian Status. **Biology of Reproduction**, v. 65, n° 1, p. 9–13, 2001. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod65.1.9](https://doi.org/10.1095/biolreprod65.1.9).

GARDNER, D. K. et al. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. **Fertility and Sterility**, v. 65, n° 2, 1996, p. 349-353. ISSN: 01955616. DOI: [10.1016/S0015-0282\(16\)58097-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)58097-2)

GARDNER, D. K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. **Theriogenology**, v. 49, n° 1, p. 83–102, 1998. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/S0093-691X\(97\)00404-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00404-4).

GARDNER, D. K.; POOL, T. B.; LANE, M. Embryo Nutrition and Energy Metabolism and Its Relationship to Embryo Growth, Differentiation, and Viability. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 18, n° 02, p. 205–218, 2000. ISSN: 15268004, 15264564, DOI: [10.1055/s-2000-12559](https://doi.org/10.1055/s-2000-12559).

GÓMEZ, M. C. et al. Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, n° 8, p. 423, 2000. ISSN: 1031-3613, DOI: [10.1071/RD00126](https://doi.org/10.1071/RD00126).

GÓMEZ, M. C. et al. Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. **Theriogenology**, v. 60, n° 2, p. 239–251, 2003. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/S0093-691X\(03\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00004-9).

GONDOS, B. The ultrastructure of granulosa cells in the newborn rabbit ovary. **The Anatomical Record**, v. 165, n° 1, p. 67–77, 1969. ISSN: 0003-276X, 1097-0185, DOI: [10.1002/ar.1091650108](https://doi.org/10.1002/ar.1091650108).

GOODROWE, K. L. et al. Developmental Competence of Domestic Cat Follicular Oocytes after Fertilization in vitro. **Biology of reproduction**, v. 39, p. 355-372, 1988. DOI: [10.1095/biolreprod39.2.355](https://doi.org/10.1095/biolreprod39.2.355)

GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; SCHMIDT, P.M.; WILDT, D.E. Reproductive biology of domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.39, p.73-90, 1989.

GOODROWE, K. L.; HAY, M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, n° 5, p. 967–975, 1993. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/0093-691X\(93\)90365-C](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90365-C).

GOODROWE, K. L.; HOWARD, J. G.; WILDT, D. E. Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol-17b and progesterone profiles in domestic cats (*Felis catus*) at natural or induced oestrus. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 82, n° 2, p 553-561, 1988. DOI: [10.1530/jrf.0.0820553](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820553)

GRAHAM, L. H. et al. Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 61, n° 6, p. 1061–1076, 2004. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2003.05.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.05.004).

GRIFFIN, B. Prolific Cats: The Estrous Cycle. **Conpendium**, v.23, n° 12, p. 1049 – 1057, 2001.

GUERIF, F. et al. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: A prospective study based on 4042 embryos. **Human Reproduction**, v. 22, n° 7, p. 1973–1981, 2007. ISSN: 0268-1161, 1460-2350, DOI: [10.1093/humrep/dem100](https://doi.org/10.1093/humrep/dem100).

HARRIS, S. E. et al. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. **Theriogenology**, v. 64, n° 4, p. 992–1006, 2005. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2005.01.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.004).

HERMANSSON, U.; AXNÉR, E.; HOLST, B. S. Application of a zona pellucida binding assay (ZBA) in the domestic cat benefits from the use of in vitro matured oocytes. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 49, n° 1, p. 28, 2007. ISSN: 1751-0147, DOI: [10.1186/1751-0147-49-28](https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-28).

HERRICK, Jason R. et al. Toward a Feline-Optimized Culture Medium: Impact of Ions, Carbohydrates, Essential Amino Acids, Vitamins, and Serum on Development and Metabolism of In Vitro Fertilization-Derived Feline Embryos Relative to Embryos Grown In Vivo<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 76, n° 5, p. 858–870, 2007. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod.106.058065](https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058065).

HERRICK, J.R. et al. In Vitro Fertilization and Sperm Cryopreservation in the Black-Footed Cat (*Felis nigripes*) and Sand Cat (*Felis margarita*). **Biology of Reproduction**, v. 82, n° 3, p. 552–562, 2010. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod.109.081034](https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081034).

HOWARD, J. G. et al. Zona Pellucida Filtration of Structurally Abnormal Spermatozoa and Reduced Fertilization in Teratospermic Cats<sup>1</sup>. **Biology of**

**Reproduction**, v. 49, n° 1, p. 131–139, 1993a. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod49.1.131](https://doi.org/10.1095/biolreprod49.1.131).

HUI, L. et al. First deliveries of felines by transcervical transfer of in vitro-cultured embryos. **Theriogenology**, v. 193, p. 30–36, 2022. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2022.09.008](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.09.008).

JEWGENOW, K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. **Theriogenology**, v. 49, n° 8, p. 1567–1577, 1998. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/S0093-691X\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00102-2).

JOHNSON, A. K. Assisted Reproduction in the Female Cat. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 48, n° 4, p. 523–531, 2018. ISSN: 01955616, DOI: [10.1016/j.cvsm.2018.02.002](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.002).

JOHNSTON, L. A. et al. Culture medium and protein supplementation influence in vitro fertilization and embryo development in the domestic cat. **Journal of Experimental Zoology**, v. 257, n° 3, p. 350–359, 1991a. ISSN: 0022-104X, 1097-010X, DOI: [10.1002/jez.1402570308](https://doi.org/10.1002/jez.1402570308).

JOHNSTON, L. A. et al. Influence of temperature and gas atmosphere on in-vitro fertilization and embryo development in domestic cats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, n° 2, p. 377–382, 1991b. ISSN: 1741-7899, 1470-1626, DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0920377>.

JOHNSTON, L. A. et al. Influence of culture medium and protein supplementation on in vitro oocyte maturation and fertilization in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 40, n° 4, p. 829–839, 1993. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/0093-691X\(93\)90218-T](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90218-T).

JOHNSTON, L. A.; O'BRIEN, S. J.; WILDT, D. E. In Vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. **Gamete Research**, v. 24, n° 3, p. 343–356, 1989. ISSN: 0148-7280, 1554-3919, DOI: [10.1002/mrd.1120240310](https://doi.org/10.1002/mrd.1120240310).

JOHNSTON, S.D.; ROOT-KUSTRIZ, M.V.; OLSON, P.N. The feline estrous cycle. In: *Canine and Feline Theriogenology*. BW Saunders, Philadelphia, PA, pp. 396–405. 2001

JORGE-NETO, P. N. et al. Laparoscopic ovum pick-up (LOPU): From animal reproduction to conservation. **Asociacion Peruana de Reproducion Animal**, v. 8, n° 1, p. 61-67. DOI: [10.18548/aspe/0006.07](https://doi.org/10.18548/aspe/0006.07).

JORGE-NETO, P. N. et al. Can jaguar (*Panthera onca*) ovulate without copulation? **Theriogenology**, v. 147, p. 57–61, 2020. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2020.02.026](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.026).

JORGE-NETO, P. N. et al. Efficient recovery of in vivo mature and immature oocytes from jaguars (*Panthera onca*) and pumas (*Puma concolor*) by Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU). **Theriogenology Wild**, v. 3, p. 100042, 2023. ISSN: 2773093X, DOI: [10.1016/j.therwi.2023.100042](https://doi.org/10.1016/j.therwi.2023.100042).

KANDA, M. et al. Development of in vitro Fertilized Feline Embryos in a Modified Earle's Balanced Salt Solution: Influence of Protein Supplements and Culture Dishes on Fertilization Success and Blastocyst Formation. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n° 4, p. 423–431, 1998. ISSN: 0916-7250, 1347-7439, DOI: [10.1292/jvms.60.423](https://doi.org/10.1292/jvms.60.423).

KARJA, N. W. K. et al. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. **Theriogenology**, v. 57, n° 9, p. 2289–2298, 2002. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/S0093-691X\(02\)00905-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00905-6).

KĄTSKA-KSIAŹKIEWICZ, L. et al. Timing of nuclear maturation of nonstored and stored domestic cat oocytes. **Theriogenology**, v. 59, n° 7, p. 1567–1574, 2003.

ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/S0093-691X\(02\)01200-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01200-1).

KHOSLA, S. et al. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. **Human Reproduction Update**, v. 7, n° 4, p. 419–427, 2001. ISSN: 1460-2369, 1355-4786, DOI: [10.1093/humupd/7.4.419](https://doi.org/10.1093/humupd/7.4.419).

KIJ, B. et al. The frequency of collapse as a predictor of feline blastocyst quality. **Theriogenology**, v. 157, p. 372–377, 2020. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2020.08.008](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.08.008).

KIJ-MITKA, B. et al. Cat presumptive zygotes assessment in relation to their development. **Annals of Animal Science**, v. 24, n° 2, p. 445–452, 2024. ISSN: 2300-8733, DOI: [10.2478/aoas-2023-0096](https://doi.org/10.2478/aoas-2023-0096).

KOCHAN, J. et al. Analysis of Morphokinetic Parameters of Feline Embryos Using a Time-Lapse System. **Animals**, v. 11, n° 3, p. 748, 2021. ISSN: 2076-2615, DOI: [10.3390/ani11030748](https://doi.org/10.3390/ani11030748).

KRAEMER, D. C. et al. Embryo transfer in the nonhuman primate, feline and canine. **Theriogenology**, [s.l.], v. 11, n° 1, p. 51–62, 1979. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/S0093-691X\(79\)80018-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(79)80018-7).

LANE, M.; GARDNER, D. K. Lactate Regulates Pyruvate Uptake and Metabolism in the Preimplantation Mouse Embryo<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 62, n° 1, p. 16–22, 2000. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod62.1.16](https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.16).

LANE, M.; GARDNER, D. K. Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, n° 3, p. 371-378, 2005. ISSN: 1031-3613, DOI: [10.1071/RD04102](https://doi.org/10.1071/RD04102).

LANE, M.; GARDNER, D. K. Embryo culture medium: which is the best? **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 21, nº 1, p. 83–100, 2007. ISSN: 15216934, DOI: [10.1016/j.bpobgyn.2006.09.009](https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2006.09.009).

LEESE, H. J. et al. Early human embryo metabolism. **BioEssays**, v. 15, nº 4, p. 259–264, 1993. ISSN: 0265-9247, 1521-1878, DOI: [10.1002/bies.950150406](https://doi.org/10.1002/bies.950150406).

LUVONI, G. C. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. **Reproduction Nutrition Development**, v. 40, nº 5, p. 505–512, 2000. ISSN: 0926-5287, 1297-9708, DOI: [10.1051/rnd:2000114](https://doi.org/10.1051/rnd:2000114).

LUVONI, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, nº 1, p. 101–111, 2006. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2006.03.012](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.012).

LUVONI, G. C.; COLOMBO, M.; MORSELLI, M. G. The never-ending search of an ideal culture system for domestic cat oocytes and embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, nº S3, p. 110–116, 2018. ISSN: 0936-6768, 1439-0531, DOI: [10.1111/rda.13331](https://doi.org/10.1111/rda.13331).

MALANDAIN, E. et al. Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. **Theriogenology**, v. 76, nº 7, p. 1337–1346, 2011. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2011.06.002](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.002).

MERLO, B. et al. Effect of EGF on in vitro maturation of domestic cat oocytes. **Theriogenology**, v. 63, nº 7, p. 2032–2039, 2005. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2004.09.045](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.045).

MOORE, K.L; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 8a edição. Elsevier, 2008.

MORO, L.; SESTELO, A.; SALAMONE, D. Evaluation of Cheetah and Leopard Spermatozoa Developmental Capability after Interspecific ICSI with Domestic Cat

Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, [s.l.], v. 49, n° 4, p. 693–700, 2014.

ISSN: 0936-6768, 1439-0531, DOI: [10.1111/rda.12355](https://doi.org/10.1111/rda.12355).

NG, T. T.; FASCETTI, A. J.; LARSEN, J. A. Reproduction of Domestic Cats in Laboratories, Catteries, and Feral Colonies: A Review. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 55, p. 100780, 2023a. ISSN: 19389736, DOI:

[10.1016/j.tcam.2023.100780](https://doi.org/10.1016/j.tcam.2023.100780).

NIWA, K. et al. Early events of in-vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. **Reproduction**, v. 74, n° 2, p. 657–660, 1985. ISSN: 1470-1626, 1741-7899, DOI: [10.1530/jrf.0.0740657](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0740657).

PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and Female Effects on the *In Vitro* Production of Bovine Embryos. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 33, n° 5, p. 257–262, 2004. ISSN: 0340-2096, 1439-0264, DOI: [10.1111/j.1439-0264.2004.00543.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2004.00543.x).

PIZZUTTO, C. S.; COLBACHINI, H.; JORGE-NETO, P. N. One Conservation: the integrated view of biodiversity conservation. **Animal Reproduction**, v. 18, n° 2, p. e20210024, 2021. ISSN: 1984-3143, 1806-9614, DOI: [10.1590/1984-3143-ar2021-0024](https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2021-0024).

POPE, C. E. et al. Applying Embryo Cryopreservation Technologies to the Production of Domestic and Black-Footed Cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n° s6, p.

POPE, C. E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids.

**Theriogenology**, v. 53, n° 1, p. 163–174, 2000a. ISSN: 0093691X, DOI:

[10.1016/S0093-691X\(99\)00249-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00249-6).

POPE, C. E. et al. Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by in vitro fertilization of oocytes with flow-sorted sperm.

**Theriogenology**, v. 71, n° 5, p. 864–871, 2009. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2008.10.012](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.012).

POPE, C. E. Aspects of in vivo oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. **Theriogenology**, v. 81, n° 1, p. 126–137, 2014. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2013.09.006](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.006).

POPE, C. E.; GÓMEZ, M. C.; DRESSER, B. L. In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century. **Theriogenology**, v. 66, n° 1, p. 59–71, 2006a ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2006.03.014](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.014).

PROCHOWSKA, S. et al. The use of human and bovine commercial media for oocyte maturation and embryo development in the domestic cat ( *Felis catus* ).

**Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n° 4, p. 719–726, 2019. ISSN: 0936-6768, 1439-0531, DOI: [10.1111/rda.13418](https://doi.org/10.1111/rda.13418).

PROCHOWSKA, S. et al.. Selected methods of in vitro embryo production in felids – a review. **Animal Science Papers and Reports**, v. 35, n° 4, p. 361-377, 2017. ISSN: 0860-4037

SALUSTRI, A. et al. Effect of Follicle-stimulating Hormone on Cyclic Adenosine Monophosphate Level and on Meiotic Maturation in Mouse Cumulus Cell-enclosed Oocytes Cultured in Vitro<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 33, n° 4, p. 797–802, 1985. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod33.4.797](https://doi.org/10.1095/biolreprod33.4.797).

SANTOS, M. V. D. O. et al. Heterologous in vitro fertilization and embryo production for assessment of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) frozen-thawed semen in different extenders. **Animal Reproduction**, v. 19, n° 1, p. e20210093, 2022. ISSN: 1984-3143, 1806-9614, DOI: [10.1590/1984-3143-ar2021-0093](https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2021-0093).

SCHRAMM, R.; BAVISTER, B. Effects of gonadotrophins, growth hormone and prolactin on developmental competence of domestic cat oocytes matured in vitro.

**Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n° 5, p. 1061, 1995. ISSN: 1031-3613, DOI: [10.1071/RD9951061](https://doi.org/10.1071/RD9951061).

SMITH, L. C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. **Reproduction**, v. 99, n° 1, p. 39–44, 1993. ISSN: 1470-1626, 1741-7899, DOI: [10.1530/jrf.0.0990039](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990039).

SNOECK, F. et al. Age and anti-Müllerian hormone levels predict the success of in vitro maturation of cat oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n° S2, p. 98–102, 2017. ISSN: 0936-6768, 1439-0531, DOI: [10.1111/rda.12827](https://doi.org/10.1111/rda.12827).

SOWIŃSKA, N. et al. The effect of cumulus cells on domestic cat (*Felis catus*) oocytes during *in vitro* maturation and fertilization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n° S2, p. 108–113, 2017. ISSN: 0936-6768, 1439-0531, DOI: [10.1111/rda.12895](https://doi.org/10.1111/rda.12895).

SPINDLER, R. E. et al. Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions. **Theriogenology**, v. 66, n° 1, p. 82–92, 2006. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2006.03.021](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.021).

SPINDLER, R. E.; WILDT, D. E. Circannual Variations in Intraovarian Oocyte but Not Epididymal Sperm Quality in the Domestic Cat<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 61, n° 1, p. 188–194, 1999. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod61.1.188](https://doi.org/10.1095/biolreprod61.1.188).

SPINDLER, R. E.; WILDT, D. E. Quality and Age of Companion Felid Embryos Modulate Enhanced Development by Group Culture<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 66, n° 1, p. 167–173, 2002. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod66.1.167](https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.167).

SWANSON, W. F. Research in Nondomestic Species: Experiences in Reproductive Physiology Research for Conservation of Endangered Felids. **ILAR Journal**, v. 44, n° 4, p. 307–316, 2003. ISSN: 1084-2020, DOI: [10.1093/ilar.44.4.307](https://doi.org/10.1093/ilar.44.4.307).

THUWANUT, P. et al. The effects of antioxidants on semen traits and in vitro fertilizing ability of sperm from the flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*).

**Theriogenology**, v. 76, n° 1, p. 115–125, 2011. ISSN: 0093691X, DOI: [10.1016/j.theriogenology.2011.01.024](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.024).

VANSANDT, L. M. Feline Estrous Cycle. Em: JOHNSON, A.; KUTZLER, M. (Eds.). **Feline Reproduction**, p. 11–22, 2022. ISBN: 978-1-78924-709-1, DOI:

[10.1079/9781789247107.0002](https://doi.org/10.1079/9781789247107.0002)

WILDT, D. E. et al. Ovarian Activity, Circulating Hormones, and Sexual Behavior in the Cat. I. Relationships During the Coitus-Induced Luteal Phase and the Estrous Period Without Mating. **Biology of Reproduction**, v. 25, n° 1, p. 15–28, 1981. ISSN: 0006-3363, 1529-7268, DOI: [10.1095/biolreprod25.1.15](https://doi.org/10.1095/biolreprod25.1.15).

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, n° 4, p. 1212–1217, 1980. ISSN: 0013-7227, 1945-7170, DOI: [10.1210/endo-107-4-1212](https://doi.org/10.1210/endo-107-4-1212).

WLODARCZYK, R. et al. In vitro maturation and degeneration of domestic cat oocytes collected from ovaries stored at various temperatures. **Veterinárni medicína**, v. 54, n° 10, p. 491–497, 2009. ISSN: 03758427, 18059392, DOI: [10.17221/75/2009-VETMED](https://doi.org/10.17221/75/2009-VETMED).

WOLFE, B. A.; WILDT, D. E. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. **Reproduction**, v. 106, n° 1, p. 135–141, 1996. ISSN: 1470-1626, 1741-7899, DOI: [10.1530/jrf.0.1060135](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060135)

WOOD, T. C.; WILDT, D. E. Effect of the quality of the cumulus-oocyte-complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, n° 1, p. 1997.

ISSN: 1741-7899, 1470-1626, DOI: [10.1530/jrf.0.1100355](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1100355)

YILDIRIM, K. et al. The effects of EGF and IGF-1 on FSH-mediated in vitro maturation of domestic cat oocytes derived from follicular and luteal stages.

**Reproductive Biology**, v. 14, n° 2, p. 122–127, 2014. ISSN: 1642431X, DOI: [10.1016/j.repbio.2013.11.001](https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.11.001).

ZAHMEL, J et al. Analysis of gene expression in granulosa cells post-maturation to evaluate oocyte culture systems in the domestic cat. **Reproduction in Domestic**

**Animals**, v. 52, n° S2, p. 65–70, 2017. ISSN: 0936-6768, 1439-0531, DOI: [10.1111/rda.12927](https://doi.org/10.1111/rda.12927).

ZAHMEL, Jennifer et al. Current State of In Vitro Embryo Production in African Lion (Panthera leo). **Animals**, v. 12, n° 11, p. 1424, 2022. ISSN: 2076-2615, DOI:

[10.3390/ani12111424](https://doi.org/10.3390/ani12111424).

## 10. ANEXOS

### Anexo I. Composição dos meios utilizados

#### 1. MEIO DE COLHEITA E SELEÇÃO DE OÓCITOS

##### 1.1. Meio TCM HEPES (Estoque)

Reagente	Empresa (código)	P.M.	Conc. final	Quantidade
Meio 199 Earles	Gibco (11150059)	---	---	100,0 mL
HEPES	Sigma (H6147)	238,30	25 mM	0,595 g

- Ajustar o pII para 7,3–7,4.

##### 1.2. Meio de colheita e seleção oocitária

Reagente	Empresa (código)	P.M.	Conc. final	Quantidade
TCM HEPES (Estoque 1.1)	---	----	---	98,600 mL
ATB/ATM (100%)	Gibco (15240-062)	----	1%	1000 µL
Piruvato de Sódio	Sigma (P2256)	110,04	0,25mg/mL	0,025 g
BSA	Sigma (A9647)		3mg/mL	0,3 g
Lactato de sódio	Sigma (L7900)	5mM	0,6mg	300 µL
<b>Volume total</b>				<b>100,0 mL</b>

- Filtrar o meio. Validade: 1 mês (2–8°C).

##### 1.2. MCM para uso

Reagente	Empresa (código)	P.M.	Quantidade
TCM HEPES (Estoque 2.2)	---	---	50 mL
L-glutamina	Sigma (P2256)	110,04	0,0075 g
Cisteamina	Sigma (M9768)		0,005 g
<b>Volume total</b>			<b>50,0 mL</b>

- Filtrar o meio. Validade: 1 mês (2–8°C).

#### 4. MEIO TALP-HEPES

MEIO ESTOQUE				
Reagente	Empresa (código)	PM	Conc. final	Quantidade
NaCl	Sigma (S5886)	58,44	125 mM	0,7305 g
KCl	Sigma (P5405)	74,55	3,2 mM	0,0239 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma (S5011)	119,98	0,4 mM	200 µL
Lactato de sódio (60%)	Sigma (L7900)	112,06	10 mM	187 µL
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma (S5761)	84,01	2 mM	0,0168 g
Vermelho de fenol (0,5%)	Sigma (P0290)	--	10 µg/mL	200 µL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sigma (C7902)	147,01	2,0 mM	0,0294 g
MgCl <sub>2</sub>	Sigma (M8266)	95,21	0,5 mM	100 µL
Hepes	Sigma (H6147)	238,30	10 mM	0,2383 g
Água (q.s.p.)	Sigma (W1503)	18,02	--	100 mL
Osmolaridade (mOsm)				275-285
pH				7,3-7,4

MEIO PARA USO				
Reagente	Empresa (código)	PM	Conc. final	Quantidade
BSA fração V	Sigma (A9647)	--	6 mg/mL	0,30 g
Piruvato de sódio	Sigma (P4562)	110,04	0,2 mM	500 µL
Gentamicina	Sigma (G1272)	10 mg/mL	40 µg/mL	200 µL
[Penicilina/Strepto/Anf B]	[Sigma (A5955)]	[--]	[1%]	[500 µL]
Solução estoque	--	--	--	49,2 mL [49,0 mL]
Volume final				50 mL
Osmolaridade (mOsm)				275-285
pH				7,4-7,5

- Validade do meio estoque: 3 semanas.

- Validade do meio para uso: 1 semana.

#### 5. MEIO TALP-FIV

a) TALP-HEPES suplementado com 10 µg/mL de heparina.

Reagente	Empresa (código)	Concentração	Quantidade
TALP-HEPES	-	-	4,980 µL
Heparina	Calbiochem (375095)	10 µg/mL	20 µL
Volume final			5 mL

**6. SOF****ETAPA 1:**

Reagente	Empresa (código)	PM	Concentração inicial	Quantidade
<b>ESTOQUE (A): Solução de sais</b>				
NaCl	Sigma (S5886)	58,44	1,1 M	0,6290 g
KCl	Sigma (P5405)	74,55	72 mM	0,0542 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma (P5655)	136,1	12 mM	0,0162 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sigma (63138)	246,47	7,4 mM	0,0182 g
Lactato de sódio (60%)	Sigma (L7900)	112,10	10 mM	60 µL
<b>Água q.s.p.</b>	Sigma (W1503)	18,0	--	<b>9 940 mL</b>
<b>ESTOQUE (B): solução de NaHCO<sub>3</sub></b>				
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma (S5761)	84,01	250 mM	0,210 g
Vermelho de fenol (0,5%)	Sigma (P0290)	--	100 µg/mL	20 µL
<b>Água q.s.p.</b>	Sigma (W1503)	18,0	--	<b>10 mL</b>
<b>ESTOQUE (C): solução de piruvato de sódio</b>				
Piruvato de sódio	Sigma (P4562)	110,0	100 mM	0,022 g
<b>Água q.s.p.</b>	Sigma (W1503)	18,0	--	<b>2 mL</b>
<b>ESTOQUE (D): solução de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>				
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sigma (C7902)	147,0	1 M	0,147 g
<b>Água q.s.p.</b>	Sigma (W1503)	18,0	--	<b>1 mL</b>
<b>ESTOQUE (E): solução de L-glutamina</b>				
L-Glutamina	Sigma (G8540)	146,15	200 mM	0,0292 g
<b>Água q.s.p.</b>	Sigma (W1503)	18,0	--	<b>1 mL</b>

**ETAPA 2:**

Reagente	Empresa (código)	PM	Conc. final	Quantidade
<b>SOF ESTOQUE</b>				
Estoque A	--	--	--	1,0 mL
Estoque B	--	--	--	1,0 mL
Estoque D	--	--	--	17,82 µL
Estoque E	--	--	--	10 µL
BME essenciais (50X)	Sigma (B6766)	--	2%	200 µL
MEM não-essenciais (100X)	Sigma (M7145)	--	1%	100 µL
Gentamicina	Sigma (G1272)	10 mg/mL	40 µg/mL	40 µL

[Penicilina/Strepto/Anf B]	[Sigma (A5955)]	[--]	[1%]	[100 µL]
Mio-inositol	Sigma (I7508)	180,16	2,8 mM	0,005 g
Citrato de sódio	Sigma (S1804)	294,10	340 µM	0,001 g
Água	Sigma (W1503)	18,0	--	7,632 mL
				<b>[7,572 mL]</b>
<b>Volume final</b>				<b>10 mL</b>
<b>Osmolaridade (mOsm)</b>				<b>280-295</b>
<b>pH</b>				<b>7,2-7,4</b>

- Adicionar os componentes na ordem em que aparecem. Filtrar e armazenar em geladeira.

- Validade do meio para uso: 1 semana.

### ETAPA 3:

Reagente	Empresa (código)	PM	Concentração final	Quantidade
<b>SOF FINAL</b>				
<b>SOF estoque</b>	--	--	--	<b>4,865 µL</b>
Estoque C	--	--	0,2 mM	10 µL
SFB	Gibco (12657-029)	--	2,5%	125 µL
BSA fração V	(A9647)	--	5 mg/mL	0,025 g
<b>Volume final</b>				<b>5 mL</b>
<b>Osmolaridade (mOsm)</b>				<b>280-295</b>
<b>pH</b>				<b>7,2-7,4</b>

## Anexo 2. Diluição e Preparo dos materiais Estoque e de Trabalho das Sondas Fluorescentes

*Hoescht 33342*

Solução estoque:    Solução trabalho:

40 mg/mL H33342    10µL Solução estoque + 3990uLDMSO = 25µg/mL H33342

\*Armazenados a -20°C no escuro

# 1 11. PROJETO APROVADO

02/06/2023, 09:03

SEI/UFMS - 4110558 - Resolução



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 277-CPOS/CIV/FAMEZ/UFMS, DE 02 DE JUNHO DE 2023.

**A PRESIDENTE DO COLEGIADO DE CURSO DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, **ad referendum**:

Aprovar os projetos de mestrado, conforme constam na tabela abaixo:

Aluno (a)	Orientadora	Título do Projeto
Jonas Magalhães Moreira	Thyara de Deco Souza e Araujo	Avaliação da taxa de natalidade em diferentes métodos de reprodução na criação de <i>Monodelphis domestica</i> para experimentação
Larissa Schneider Brandão Souza	Thyara de Deco Souza e Araujo	Maturação in vitro e conservação de oócitos de felinos aplicáveis à campo

THYARA DE DECO SOUZA E ARAUJO



Documento assinado eletronicamente por **Thyara de Deco Souza e Araujo**, **Presidente de Colegiado**, em 02/06/2023, às 09:02, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Ativar o windows  
Acesse Configurações para ativ

2

### 3 11. AUTORIZAÇÕES LEGAIS

4



ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL  
PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO GRANDE  
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE PÚBLICA  
CENTRO DE CONTROLE DE ZOOSES

#### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que estamos disponibilizando ovários e testículos que foram extraídos de orquiectomia e ovariosalpingo-histerectomia eletiva de gatos que fazem parte do programa de controle populacional do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande – MS para Desenvolvimento de pesquisas coordenadas pela professora Thyara de Deco Souza e Araujo, lotada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Campo Grande, 24 abril de 2023

  
Cláudio G. Manoel Neto Ferriz  
Médico Veterinário CRMV/MS 3547  
Coordenador - CCZ  
SESAD-PMCG