

Avaliação da maturação nuclear *in vitro* de oócitos de gatas domésticas (*Felis catus*) pré-púberes e púberes *In vitro* evaluation of oocyte nuclear maturation in young and adult domestic cats (*Felis catus*)

Maria Denise LOPES¹;
Edilson UIECHI¹;
Luzia A. TRINCA²

1- Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu - SP
2- Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu - SP

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar a taxa de maturação nuclear *in vitro* de oócitos provenientes de gatas doméstica púberes e pré-púberes. Foram utilizadas 15 fêmeas felinas, 10 púberes e 5 pré-púberes; sendo os oócitos obtidos por aspiração quantificados e classificados. Os oócitos classificados como excelentes e regulares foram reunidos em grupos de 10, em meio de cultura, recobertos em óleo mineral em Placas de Petri siliconizadas e descartáveis. Após permanência em estufa, a 38°C e 5% de CO₂ por 48 horas, os oócitos foram submetidos a duas lavagens com solução de hialuronidase a 0,4%, fixados em metanol/ácido acético e corados com orceína acética. A avaliação da configuração cromossômica de oócitos maturados *in vitro* resultou em 44,68% das células em metáfase II no grupo das fêmeas púberes e 25,32% no grupo das doadoras pré-púberes, indicando que a puberdade influencia a capacidade dos oócitos se desenvolverem *in vitro*.

Palavras-chave:

Gata doméstica.
Folículos.
Maturação oocitária.

Correspondência para:

MARIA DENISE LOPES
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP
Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, s/n
18618-000 - Botucatu - SP
denise@fmvz.unesp.br

Recebido para publicação: 16/06/2003
Aprovado para publicação: 18/05/2004

Introdução

O gato doméstico é uma espécie com ovulação induzida, mecanismo este altamente conservador, desenvolvido para evitar a perda de oócitos. Após o início do estro e na expectativa da cobertura que estimula a ovulação, o oócito intrafolicular da gata deve ser capaz de permanecer biologicamente competente por um período imprevisível. Aparentemente, os oócitos são mantidos nos folículos em estado “pré-ovulatório”, por um período mais longo do que o observado nas espécies de ovulação espontânea.¹

A maturação de oócitos *in vitro* e subsequente fecundação tem sido realizada nos gatos domésticos e em algumas espécies de felinos não domésticos, utilizando-se de condições padronizadas de cultivo, suplementado com combinações de FSH,

LH, estradiol e BSA.^{2,3,4,5}

Nos gatos domésticos, a incidência mais alta de maturação oocitária ocorreu em meio acrescido de gonadotrofina, após cultivo de 40 a 48 horas^{2,6}, que é semelhante ao período compreendido entre a cobertura e a ovulação.

Nos estudos sobre maturação oocitária *in vitro* em gatas domésticas, 37% dos oócitos atingiram a metáfase II, na ausência de gonadotrofina no meio de cultivo²; a suplementação com FSH aumentou a incidência de maturação para 48% e a combinação de FSH e LH produziu a mais alta porcentagem de maturação, 54%².

A relação dos hormônios reprodutivos, particularmente os esteróides, na promoção da maturação de oócitos *in vitro* é de alguma forma ambígua. Nas gatas, a adição de estrógenos no meio de cultura

aumentou a taxa de maturação dos oócitos, provavelmente por influenciar as junções entre as células do *cumulus* e o oócito.⁷ A idade da doadora de oócito é um fator importante que influencia a capacidade de desenvolvimento dos oócitos e, em consequência, a eficiência da produção de embriões *in vitro*.⁸ Tem sido considerável o interesse do uso de animais pré-púberes como fonte de oócitos para produção de embriões, devido à vantagem que poderia advir do encurtamento do intervalo entre gerações, acelerando a taxa de ganho genético por meio da seleção natural ou pela introdução de novos gens pela transgênese^{8,9}.

Experimentos com maturação *in vitro* têm indicado que a competência meiótica é alcançada quando os oócitos são colhidos de fêmeas púberes.¹⁰ Entretanto, oócitos colhidos de animais pré-púberes podem ser maturados, fecundados *in vitro* e após cultura embrionária e transferência, podem dar origem a produtos viáveis.^{11,12} Observações têm demonstrado que os oócitos adquirem capacidade para atingir a fase de metáfase I quando assumem 80% de seu tamanho total, mas são incapazes de evoluir para metáfase II, até atingirem o crescimento final.¹³

Durante o crescimento e maturação oocitária, alguns produtos são sintetizados e armazenados. Esses produtos suportam o desenvolvimento após a fecundação até que os genomas embrionários tornem-se ativos e regulem a embriogênese. A maioria do RNA presente nos oócitos dos mamíferos é sintetizada e acumulada durante o período de crescimento oocitário.¹⁴

O objetivo desse experimento foi avaliar a taxa de maturação nuclear *in vitro* de oócitos de gatas domésticas púberes e pré-púberes.

Materiais e Métodos

Quinze (15) fêmeas foram utilizadas nesse experimento, cinco (5) pré-púberes com idade variando de cinco a sete meses e

dez (10) fêmeas púberes com idade entre sete meses e três anos.

Após a ovariectomia, os ovários foram isolados e puncionados com agulha 30x8mm acoplada a uma seringa descartável contendo meio TCM199 (Sigma M-3274). Os oócitos foram transferidos para placas de Petri siliconizadas e observados em lupa (LEICA MZ 12,5). Nesse momento, os oócitos foram quantificados e classificados de acordo com as características morfológicas em grau I, II e III.^{2,15,16} Os oócitos classificados como grau I ou excelentes apresentavam pigmentação homogênea e enegrecida do citoplasma, rodeados por células do *cumulus* e corona radiata compacta; os oócitos de grau II ou regulares apresentaram citoplasma ligeiramente pigmentado ou manchado com corona radiata e células do *cumulus* envolvendo apenas parcialmente a célula e os oócitos do grau III ou degenerados mostraram-se com formas anormais, pálidos e com ausência das células do *cumulus oophorus* e corona radiata.

Os oócitos classificados como excelentes e regulares foram lavados em meio de cultivo, sendo colocados dez oócitos em gotas de meio de cultivo, recobertos com óleo mineral, em placas de Petri siliconizadas e descartáveis.

Após permanência em estufa, a 38°C e 5% de CO₂ (Forma Scientific) por 48 horas, os oócitos foram submetidos a duas lavagens com solução de hialuronidase a 0,4% para remoção das células do *cumulus*. Os oócitos foram então fixados em metanol: ácido acético (3:1) por 48 horas e corados com orceína acética, para o exame da configuração cromossômica e determinação da maturação nuclear. Oócitos com núcleo vesicular contendo um nucléolo distinto rodeado por filamentos finos de cromatina foram caracterizados em estágio de vesícula germinativa (V.G.). Quando observou-se algum grau de condensação de cromatina e desaparecimento da vesícula germinativa, os oócitos foram classificados em quebra da vesícula germinativa (Q.V.G.). O estágio de

Metáfase II foi caracterizado por um grupo de cromossomos rigidamente unidos, considerado o primeiro corpúsculo polar e outro grupo mais expandido, permitindo a identificação dos cromossomos individualmente.

Meio de cultura: TCM-199 (Sigma), FSH - 5mg/ml (Folltropin-V, Vetrepharm), LH - mg/ml (Lutropin-V, Vetrepharm), BSA - 2% (Sigma), Piruvato - 0,2 mM (Sigma), Estrógeno - 1 ml/ml (b-Estradiol, Sigma), Gentamicina - 25 mg/ml (Garamicina, Schering-Plough).

A análise estatística utilizada neste experimento foi o Teste de qui-quadrado para comparação entre os dois grupos (púbere e pré-púbere), quanto às proporções de metáfase II.

Resultados

Maturação *in vitro*: Foram recuperados 306 oócitos das dez doadoras púberes utilizadas na avaliação da maturação oocitária *in vitro*. Nesse grupo, foi constatada uma variação muito grande do número de oócitos recuperados entre as fêmeas (de três a 72 oócitos).

Dos 306 oócitos, 150 foram maturados *in vitro* e resultaram na identificação de 24 (16%) em estágio de vesículas germinativas; 18 (12%) em estágio de quebra de vesícula germinativa, 65 (43,33%) em Metáfase II (Figuras 1 e 2) e 43 (28,66%) degenerados (Tabela 1).

Nesse grupo, 156 oócitos foram descartados, parte classificada como oócitos degenerados e parte perdida durante o manuseio da fixação e coloração.

No grupo de fêmeas pré-púberes, obteve-se 300 oócitos. Nesse grupo, a variação do número de oócitos entre as fêmeas foi de 22 a 80 oócitos. Dos 300 oócitos, 124 foram maturados *in vitro* e, destes, 85 foram avaliados para configuração cromossômica (Tabela 2).

Nesta fase, 176 oócitos foram inicialmente descartados, por serem classificados como degenerados e/ou

desnudos. Dos oócitos cultivados *in vitro*, 39 foram perdidos durante o processamento de fixação e coloração.

O resultado da análise estatística revelou diferença significativa entre os grupos de fêmeas púberes e pré-púberes; o valor do qui-quadrado foi de 34,619, com 1 grau de liberdade ($p < 0,0001$).

Discussão

A idéia de diminuir o intervalo entre gerações, explorando o potencial reprodutivo de fêmeas pré-púberes, não é nova, ao contrário, foi descrita há mais de 50 anos.¹⁷

A taxa de maturação dos oócitos provenientes de fêmeas púberes foi de 44,68%; taxa inferior à descrita pela maioria dos autores, que relataram uma porcentagem de maturação próxima de 60%¹⁸, 54%², com suplementação de FSH e LH no meio de

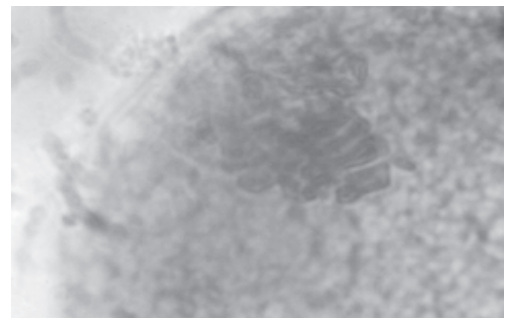


Figura 1
Detalhe da configuração cromossômica (metáfase II) em oócito de gata doméstica púbera, após maturação *in vitro* - 40X. Botucatu, São Paulo, 2003

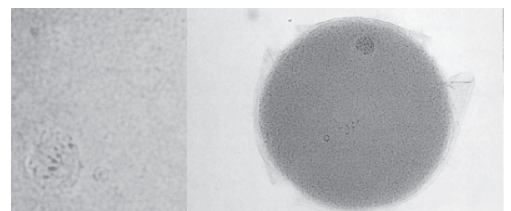


Figura 2
Detalhe da configuração cromossômica (metáfase II) em oócito de gata doméstica púbera, após maturação *in vitro* - 10X. Botucatu, São Paulo, 2003

Tabela 1

Número de oócitos avaliados quanto à configuração cromossômica maturados *in vitro*, provenientes de gatas domésticas púberes, Botucatu, São Paulo, 2003

Nº de oócitos	V.G.	Q.V.G.	Metáfase II	Degenerados
150	24 (16%)	18 (12%)	65 (43,33%)	43 (28,66%)

Tabela 2

Número de oócitos provenientes de gatas domésticas pré-púberes maturados *in vitro* e avaliados quanto à configuração cromossômica, Botucatu, São Paulo, 2003

Nº de oócitos	V.G.	Q.V.G.	Metáfase II	Degenerados
85	7 (8,23%)	10 (11,76%)	5 (5,88%)	63 (74,11%)

Tabela 3

Taxa de metáfase II de oócitos maturados *in vitro* de gatas domésticas (*Catus felis*) púberes e pré-púberes, Botucatu, São Paulo, 2003

	Nº	Metáfase II	Não Metáfase II
Púbere	150	65 (44,68%)	85 (105,32%)
Pré-púbere	85	5 (25,32%)	80 (59,68%)
Total	235	70	165

cultura e 48%⁶ em meio de cultura adicionado de FSH e BSA.

Aproximadamente 50 a 65% dos oócitos de gatos atingiram o estágio de metáfase II *in vitro*. Em contraste, são comuns taxas de 70 a 90% de maturação *in vitro* em animais de laboratório ou animais de produção, portanto, a maturação oocitária de gatas permanece inferior a outras espécies freqüentemente estudadas.

A taxa de maturação de oócitos de fêmeas pré-púberes foi de 25,32%. Considerando esse aspecto em ovelhas pré-púberes, quando oócitos foram examinados para determinação da capacidade de reiniciar a meiose, os resultados foram semelhantes aos de oócitos de fêmeas púberes e nenhuma diferença foi observada nas taxas de maturação, fecundação e clivagens. Entretanto, a proporção de blastocistos produzidos pelos oócitos de fêmeas pré-púberes foi a metade daquela de oócitos de

fêmeas púberes.¹²

As diferenças no desenvolvimento entre oócitos de fêmeas pré-púberes e de fêmeas púberes podem não ser demonstradas nos procedimentos de maturação *in vitro*, mas tornam-se mais evidentes 4 a 5 dias após a fecundação, quando embriões derivados de oócitos de fêmeas pré-púberes não atingem o estágio de mórula/blastocisto. Esse fato reforça a tese de que a competência oocitária está relacionada ao armazenamento de fatores importantes na forma de proteínas ou na forma de RNA estável.^{19,20}

Os oócitos de gatas são geralmente recuperados por retalhamento da região cortical ou punção dos ovários e são de tamanhos variados. Em várias outras espécies, a capacidade de reiniciar a meiose é afetada pelo tamanho dos folículos e tamanho dos oócitos, entretanto, há poucos relatos de maturação oocitária em gatos, usando

oócitos de diâmetros conhecidos.

Neste trabalho, as mesmas condições de cultivo foram utilizadas na maturação de oócitos de fêmeas pré-púberes e de fêmeas púberes e nenhum esquema de estimulação *in vivo* foi utilizado no grupo de fêmeas pré-púberes. Recentemente muitos protocolos de estimulação ovariana têm sido desenvolvidos para serem usados em fêmeas pré-púberes; esses tratamentos provavelmente aumentam a recuperação de folículos com diâmetros maiores e, portanto, com melhor capacidade de desenvolvimento.^{8,21,22}

Por outro lado, condições de cultivos diferentes para oócitos oriundos de fêmeas pré-púberes poderiam expressar resultados diferentes, pois o meio de cultivo tem efeito significativo na permissão dos oócitos de expressar seu potencial, mas os constituintes originais dos oócitos controlam sua habilidade para responder às condições de cultura.

A separação seletiva dos oócitos baseada na aparência do complexo *cumulus*/oócito resulta em maturação mais consistente e fornece indicador da maturação oocitária e capacidade de desenvolvimento.¹⁸ Ainda, a

maioria dos oócitos classificados como grau I se origina de folículos maiores do que 2mm de diâmetro e, portanto, com maior capacidade de se desenvolverem *in vitro*.

Em estudos iniciais, usando a progesterona como fonte de hormônio esteróide, mostraram taxas menores de maturação quando comparadas com o estradiol. Esses resultados confirmam a observação de que a progesterona age conjuntamente com AMPc, inibindo a quebra da vesícula germinativa. Há efeito equivocado da suplementação progestacional em gatos e nenhum benefício na maturação de oócitos *in vitro* foi observado.^{7,23}

A coleta de oócitos de animais pré-púberes representa um potencial importante para produção de embriões viáveis e poderia ter impacto na conservação de espécies ameaçadas. O melhor conhecimento dos sinais entre o compartimento folicular somático e o oócito poderia indicar a melhor maneira de assegurar um sistema próprio para o processo de maturação *in vitro* de oócitos de animais pré-púberes, com um potencial de desenvolvimento comparável ao de fêmeas púberes.

Abstract

This study assessed the *in vitro* oocyte nuclear maturation in adult and young domestic cats. Fifteen ovaries were used; 10 from adult females and 5 from young females. The oocytes collected by aspiration were quantified and classified. The oocytes classified as excellent and/or regular were grouped (10 oocyte / drop) in culture medium covered with mineral oil in disposable Petri dishes. The oocyte were incubated at 38°C and 5% de CO₂ for 48 hours and then washed with 0,4% hyaluronidase, fixed in methanol/acetic acid and stained with acetic orcein. Evaluation of chromosomal configuration of oocytes matured *in vitro* showed 44,68% of oocyte in metaphase II in the adult female group and 25,32% in the young donor group, showing that puberty influences oocyte capacity for *in vitro* development.

Key-words:

Domestic cat.
Follicles.
Nuclear maturation.

Referências

1. DONOGHUE, A. M. et al. Influence of gonadotrophin treatment interval on follicular maturation "in vitro" fertilization, circulating steroid concentrations and subsequent luteal function in the domestic cat. **Biology Reproduction**, v. 46, p. 972-980, 1992.
2. JOHNSTON, L. A.; O'BRIEN, S. J.; WILDT, D. E. "In vitro" maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. **Gamete Research**, v. 24, p. 343-356, 1989.
3. BYERS, A.P. et al. Oocyte nuclear maturation at the time of oocyte aspiration is independent of "in vitro" fertilization potential in the domestic cat. **Journal**

- Experimental Zoology**, v. 270, p. 399-404, 1994.
4. WOOD, T. C. et al. Influence of protein and hormone supplementation on "in vitro" maturation and fertilization of domestic cat eggs. **Journal Reproduction and Fertility** v. 104, p. 315-323, 1995.
 5. WOLFE, B. A.; WILDT, D. E. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized *in vitro* after prolonged cold storage. **Journal Reproduction and Fertility**, v.106, p.135-41, 1996.
 6. GOODROWE, K. L.; HAY, M.; KING, W. A. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes "in vitro". **Biology Reproduction**, v. 45, p. 466-470, 1991.
 7. YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G.; FAYER-HOSKEN, R. A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization "in vitro". **Gameta Research**, v. 23, p. 189-201, 1989.
 8. ARMSTRONG, D. T. Effects maternal age on oocyte development competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1303-1322, 2000.
 9. ARMSTRONG, D. T., IRVINE, B., EARL, C. R. *In vitro* fertilization of follicular oocytes from juvenile lambs and their development competence *in vitro* and *in vivo*. **Biology Reproduction**, v. 50, Suppl. 1, p. 189, 1994.
 10. BRACKETT, B. G. *In vitro* fertilization in farm animals. In: LAURIA, A., GANDOLFI, F. (Ed.). **Embryonic development and manipulation in animal production**. London: Portland Press, 1992. p. 59-76.
 11. ARMSTRONG, D. T. et al. Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. **Theriogenology**, v. 38, p. 667-678, 1992.
 12. LEDDA, S. et al. Meiotic progression and development competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 73-78, 1997.
 13. MOOR, R. M.; GANDOLFI, F. Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. **Journal Reproduction and Fertility**, n. 34, p. 55-69, 1987. Supplement.
 14. CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. **Humane Reproduction Update**, v. 4, p. 103-120, 1998.
 15. GOODROWE, J. L. et al. Development competence of cat follicular oocytes after fertilization "in vitro". **Biology Reproduction**, v. 39, p. 355-372, 1988.
 16. JOHNSTON, L. A. et al. Influence of temperature and gas atmosphere on "in vitro" fertilization and embryo development in the domestic cat. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 92, p. 377-82, 1991.
 17. CASIDA, L. E. et al. Effects of pituitary gonadotrophins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle. **American Journal Veterinarie Research**, v. 4, p. 76, 1943.
 18. WOOD, T. C.; WILDT, D. E. Effect of 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 Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 335-360, 1997.
 19. SIRARD, M. A., BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 417-426, 1996.
 20. GANDOLFI, F. et al. Comparative analysis of calf and cow oocytes during *in vitro* maturation. **Molecular. Reproduction Development**, v. 49, p. 168-175, 1998.
 21. PPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C.; O'BRIEN, M. Growth and development of mammalian oocytes *in vitro*. **Archives Pathological Laboratory Medicine**, v. 116, p. 379-382, 1992.
 22. GANDOLFI, F.; VASSENA, R.; LAURIA, A. The developmental competence of the oocyte before puberty: is something missing? **Reproduction Dom. Animal**, v. 35, p. 66-71, 2000.
 23. THIBAUT, C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? **Journal Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 1-15, 1977.