

**UNIVERSIDADE BRASIL**

**ARIANE BELTRAME VICENTE**

**BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO APLICADAS A FELÍDEOS SELVAGENS  
PARA CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES**

**SÃO PAULO  
2017**

**ARIANE BELTRAME VICENTE**

**BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO APLICADAS A FELÍDEOS SELVAGENS  
PARA CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES**

Trabalho de conclusão do curso de Pós Graduação *Lato Sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens, apresentado à UNIBRASIL, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens.

**Orientação:** MSc. Luana Rodrigues Borboleta.

**SÃO PAULO  
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,  
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).**

V681b VICENTE, Ariane Beltrame.

Biotecnologias da reprodução aplicadas a felídeos selvagens para conservação das espécies / Ariane Beltrame Vicente – São Paulo: Universidade Brasil, 2017.

55 f. il. color.

Trabalho de conclusão do curso de Pós Graduação *Lato Sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens, apresentado à Universidade Brasil, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens.

Orientação: Me. Luana Rodrigues Borboleta.

1. Felinos. 2. Espécies ameaçadas. 3. Protocolos de produção *in vitro* (PIV). I. Borboleta, Luana Rodrigues. II. Título.

CDD 636.9

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** — Rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de Sertoli em onça parda adulta (*Puma concolor*).....12
- TABELA 2:** Médias ( $\pm$  desvio padrão) obtidas para as características espermáticas do sêmen de gato (fresco e descongelado) através do CASA (Computer-Assisted Sperm Analyzer, HTR-IVOS-10, Hamilton Thorne Research – Animal Version 12,0 L, Beverly, MA, EUA).....29
- TABELA 3:** Média e desvio padrão do número de Complexo *Cumulus Oophorus* (CCOs) de grau I antes e após expansão das células do cúmulus.....39

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Fotografia de coleta de sangue em onça-pintada (*Panthera onca*), proveniente da natureza, a campo para check-up e análises hormonais.....20
- FIGURA 2.** Fotografia de coleta de sêmen de onça pintada (*Panthera onca*) de vida livre.....22
- FIGURA 3.** Fotografia de criopreservação de sêmen em tambor de nitrogênio líquido.....27
- FIGURA 4.** Ilustração esquemática de etapas básicas na produção *in vitro* de embriões bovinos.....35
- FIGURA 5.** Fotografia de ovários de gatas domésticas (*Felis catus*) coletados durante a ovariosalpingohiesterctomia eletiva (OSH).....38
- FIGURA 6.** Fotografia de lâmina de microscopia óptica de CCOs gatas domésticas (*Felis catus*).....38
- FIGURA 7.** Fotografia de placa do tipo *four-well* com 400µL de meio MIV para maturação de oócitos de gata (*Felis catus*).....39

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

$\mu\text{L}$  = microlitro

$\mu\text{g}/\text{kg}$  = micrograma por quilo

$^{\circ}\text{C}$  = graus Célsius

$\text{Ca}^{2+}$  = cálcio

CASA = análise computadorizada do movimento espermático

CCO = Complexo Cumulus-Oophorus

CIV = Cultivo in vitro

CL = Corpo Lúteo

$\text{CO}_2$  = dióxido de carbono

DPBS = Dulbecco's phosphate buffered saline e

CG = gonadotropina coriônica equina

FIV = fertilização in vitro

FHS = Hormônio folículo-estimulante

hCG = gonadotropina coriônica humana

IA = inseminação artificial

ICSI = injeção intracitoplasmática de espermatozóide

LH = Hormônio luteinizante

mg = miligrama

$\text{Mg}^{2+}$  = magnésio

MI = metáfase I

MII = metáfase II

MIV = maturação in vitro

mL = mililitro

N<sub>2</sub> = nitrogênio

O<sub>2</sub> = oxigênio

OSH = ovariosalpingohisterectomia

PBS = Phosphate Buffered Saline

pH = potencial de hidrogênio

PIV = produção in vitro

PGF<sub>2</sub> $\alpha$  = prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$

Se = Selênio

SOF = Synthetic Oviductal Fluid

TE = transferência de embrião

V = volts

Zn = Zinco

## RESUMO

A ameaça de extinção pesa seriamente sobre os grandes felinos, inclusive em alguns dos maiores e mais importantes deles, a onça pintada (*Panthera onca*), que têm como hábitat diferentes regiões do Brasil. Atualmente ela se encontra na lista de animais ameaçados ou em perigo de extinção <https://www.iucnredlist.org/>. Nesse sentido, a aplicação de técnicas de reprodução assistida em espécies selvagens ameaçadas de extinção são cada vez mais importantes. Mas, para que se possa aplicar tais técnicas, informações sobre a fisiologia e endocrinologia reprodutiva devem ser obtidas, como as características normais do ejaculado, ciclo estral da fêmea, tipo de ovulação, sazonalidade e fatores estressantes. Essas informações da onça pintada e outros felinos podem ser obtidas através de estudos endócrinos a partir do desenvolvimento de técnicas não invasivas de monitoramento hormonal. A avaliação seminal, superovulação, inseminação artificial, produção *in vitro* de embriões (incluindo as etapas de capacitação espermática, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV), transferência de embriões e criopreservação de sêmen e embriões, surgem como métodos alternativos com o intuito de minimizar a diminuição da variabilidade genética das populações. A eletroejaculação é o método de eleição para obtenção de sêmen em felinos e, na avaliação seminal, elevados índices de anormalidade espermática são comuns na família Felidae, a qual a onça pintada se insere, geralmente associados a três grandes fatores: genéticos, nutricionais e ambientais. A inseminação artificial em onça-pintada obtém o melhor resultado quando realizada intra-uterina por laparoscopia trans-abdominal. A PIV (produção *in vitro*) é uma técnica bem difundida em felídeos selvagens e a criopreservação de embriões deles é existente, mas ainda não é uma técnica de uso rotineiro. Portanto, é necessário mais estudos no que diz respeito à fisiologia, endocrinologia e comportamento reprodutivo da espécie, aperfeiçoamento de técnicas de reprodução assistida, além de maior investimento do governo para tais pesquisas, aumentando a variabilidade genética e objetivando o sucesso em conservação de espécies de felídeos selvagens ameaçados de extinção.

**Palavras-chave:** Felinos. Espécies ameaçadas. Protocolos de produção *in vitro* (PIV).



## ABSTRACT

The threat of extinction weighs seriously upon the big felines, including one of the biggest and more important among them, the Jaguar (*Panthera onca*), which has as habitat different regions of Brazil. Nowadays it is found on the list of threatened animals or in risk of extinction. This means, the application of assisted reproduction in wild species threatened of extinction are more and more important. But in order of such technique to be applied, information regarding physiology and reproductive endocrinology must be obtained, just as characteristics of the ejaculated, estrous cycle, type of ovulation, seasonality and stress. These information about the Jaguar and other felines can be obtained through endocrine studies from invasive techniques of hormonal monitoring. The seminal evaluation, super ovulation, artificial insemination, in vitro production of embryos (including sperm capacitation steps, MIV, FIV, CIV) embryo transfer, semem and embryos cryopreservation, rises as an alternate method intended to minimize the lowering of genetic variability of populations. The electroejaculation, is the method used to obtain semen from felines, in the seminal evaluation, high marks of sperm abnormality are common in Felidae family and the Jaguar, usually associated to three big factors: Genetics, Nutritional and Environmental. Artificial insemination in Jaguars has the best result rate when done intrauterine through laparoscopia trans-abdominal. PIV is a well spread technique among Jaguars, the wild cats embryos cryopreservation exists, but it is still not a common procedure. All this Increasing the genetic variability and aiming at the successful conservation of endangered species of wild felines.

**Keywords:** Felids. Endangered species. In vitro production protocols (IVPs).

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS FELÍDEOS SELVAGENS.....	13
2.1	Morfologia reprodutiva e espermatogênese do macho felídeo.....	14
2.2	Ciclo reprodutivo da fêmea felídea.....	16
2.3	Influência da sazonalidade na reprodução.....	19
2.4	Influência do estresse na reprodução.....	21
3	BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO APLICADAS AOS FELÍDEOS SELVAGENS...22	
3.1	Monitoramento hormonal.....	22
3.2	Colheita e avaliação seminal em felídeos selvagens.....	24
3.3	Avaliação seminal.....	27
3.4	Criopreservação e refrigeração de sêmen.....	29
3.5	Indução da ovulação e superovulação.....	32
3.6	Inseminação artificial (IA).....	35
3.7.1	Capacitação dos espermatozóides.....	38
3.8	Transferência de Embriões.....	45
3.9	Criopreservação e refrigeração de embriões.....	46
4	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

## 1 INTRODUÇÃO

A diversidade biológica é a chave para a manutenção da vida que conhecemos. Entretanto, o rápido crescimento populacional humano exerce forte pressão nos ecossistemas, como destruição ambiental em larga escala, conversão de habitats, fragmentação de habitats e poluição.

Todos os biólogos conservacionistas concordam que a conservação *in situ* (manutenção da fauna e da flora em seu habitat natural) é o melhor caminho para conservar a biodiversidade, porém, esta pode se apresentar ineficiente em casos de populações reduzidas ou quando a maioria de indivíduos remanescentes está localizada em áreas desprotegidas (PRIMACK e RODRIGUES, 2002). Assim, a conservação *ex situ* (estratégias de conservação que são efetuadas fora dos ambientes naturais) (SANTOS, 2000), como os programas de reprodução em cativeiro, os bancos de recursos genéticos e as técnicas de reprodução assistida tem sido sugeridos como importantes ferramentas para a conservação, incluindo para os carnívoros neotropicais (FILHO, 2004).

Graves problemas surgem quando uma espécie atinge um tamanho de população muito pequena, como a perda de variabilidade genética; consanguinidade, onde populações que caem abaixo de 50 indivíduos são forçados a se reproduzir com parentes próximos, o que pode levar a problemas como fertilidade decrescente, alta mortalidade juvenil e defeitos ao nascimento; e reprodução seletiva, causada em animais com longo tempo de cativeiro (FILHO, 2004).

Muitos programas de reprodução em cativeiro têm planos de manejar pequenas populações cativas com o intuito de minimizar todos esses processos que possam levar a espécie à extinção. No entanto, a reprodução natural de animais silvestres em cativeiro encontra muitas dificuldades. Vários fatores interferem na reprodução natural desses animais em cativeiro, que dentre eles, destacam-se recintos inadequados, estresse, doenças infecciosas e/ou parasitárias, deficiências nutricionais, alterações genéticas e comportamentais (PAZ, 2004).

Algumas das biotecnologias reprodutivas vistas como soluções potenciais para a prevenção da perda de biodiversidade são: monitoramento hormonal; indução da ovulação e superovulação; inseminação artificial (IA); transferência de embriões; criopreservação de sêmen e embriões; produção *in vitro* (PIV) (PAULA, 2011).

O principal obstáculo para o sucesso da reprodução assistida em felídeos silvestres são os conhecimentos ainda limitados sobre o comportamento, a fisiologia e a endocrinologia reprodutiva dessas espécies. É imprescindível dispor, por exemplo, de informações confiáveis sobre sazonalidade reprodutiva, ciclo estral, sensibilidade ovariana, maturidade e tipo de ovulação. Para isso, estudos endócrinos têm sido realizados graças ao desenvolvimento de técnicas não invasivas de análise de metabólitos de esteróides fecais, que atualmente é o método de escolha para monitorar a função endócrina em espécies selvagens (BROWN, 2006).

Além da investigação do potencial reprodutivo destes animais, estas tecnologias têm como aplicação a translocação apenas do material genético entre populações de vida livre isoladas e entre populações de vida livre e animais em cativeiro. Essas manobras podem permitir o aumento no nascimento de filhotes de pais selecionados, de forma a aumentar a diversidade da população e reduzir o intervalo entre os partos (ANDRABI e MAXWELL, 2007).

Por serem topo de cadeia alimentar, os carnívoros, de modo geral, são utilizados como animais bandeira para conservação das demais espécies. Neste sentido, são necessários mais estudos em reprodução assistida em felinos que qualquer outro grupo silvestre (PAULA, 2011). Esta revisão relata a importância e o uso de programas reprodutivos em felídeos selvagens, as técnicas de reprodução assistida, suas limitações e aplicações para as espécies, com objetivo de informar e incentivar mais estudos e esforços na área de biotecnologias em reprodução para manutenção das espécies.

## 2 ASPECTOS REPRODUTIVOS DOS FELÍDEOS SELVAGENS

Na maior parte do século 20, uma das principais afirmações a respeito da reprodução de gatos (*Felis catus*) era de que a ovulação é induzida pelo coito; entretanto, na última década, evidência considerável indica que outros estímulos físicos, visuais ou olfativos são freqüentemente capazes de induzir a ovulação “espontânea” (MOREIRA, 2007).

No entanto, as populações de felídeos em cativeiro no Brasil não tem um bom desempenho reprodutivo para que seja possível garantir a manutenção de um banco genético viável. As espécies de grandes felídeos, quando comparada com os pequenos, estão entre as que apresentam maior número de representantes cativos, com maiores taxas de natalidade e menores de natimortalidade (CUBAS *et al.*, 2014).

Porém, quando se selecionam nos cativeiros brasileiros, as populações de onças (*Panthera onca*) e suçuaranas (*Puma concolor*) provenientes de vida livre (mesmo nascidas no cativeiro) com informações sobre sua procedência geográfica, estas se reduzem a quantidade preocupante de apenas 50 indivíduos de suçuarana e 30 de onças-pintadas (ADANIA *et al.*, 2005). Outro ponto de destaque seria o grande risco de se perder a linhagem dos poucos animais de procedência conhecida devido a falta de orientação quanto aos cruzamentos (CUBAS *et al.*, 2014)

Estudos endócrinos têm sido realizados graças ao desenvolvimento de técnicas não invasivas de monitoramento hormonal, ou seja, que empregam ensaios imunológicos para quantificar hormônios em fezes, urina e saliva (GRAHAM, 2004). Atualmente este é o método de escolha para monitorar a função endócrina reprodutiva em espécies selvagens, incluindo felídeos (BROWN, 2006). Felizmente, para a endocrinologia de felídeos, os metabólitos de esteróides são excretados quase que exclusivamente nas fezes, com pouco esteróide encontrado na urina, o que resulta em uma alta correlação entre os níveis fecais e sanguíneos (MOREIRA, 2007).

Muita informação básica a respeito da fisiologia reprodutiva de felinos pode ser obtida através da utilização de ovários de gatas domésticas (*Felis catus*) recuperados de clínicas veterinárias após a ovário-salpingohisterectomia (OSH) de rotina, sem as despesas de manter uma colônia de gatos. Estudos de fisiologia reprodutiva felina e avanços em tecnologia reprodutiva podem ser extrapolados para o uso em espécies ameaçadas de felídeos selvagens (MOREIRA, 2007).

## **2.1 Morfologia reprodutiva e espermatogênese do macho felídeo**

A morfologia do sistema genital está envolvida com a ação sexual, seleção dos caracteres e habilidade do macho em fertilizar a fêmea (CARNEIRO *et al.*, 2010).

Em um trabalho de Carneiro e colaboradores (2010), os autores descrevem a morfologia do sistema reprodutor masculino da jaguatirica (*Leopardus pardalis*), e que as principais partes funcionais de seu aparelho genital são: o pênis, prepúcio, escroto, testículos, epidídimos (cabeça, corpo e cauda), ductos deferentes e glândulas genitais acessórias, sendo elas a próstata e as glândulas bulbouretrais, não possuindo glândulas vesiculares. Estes componentes condizem com o que foi descrito por Dyce e pesquisadores (2004) para o gato doméstico (*Felis catus*).

A partir de trabalhos como este, pode-se estudar o sistema reprodutor masculino de outros felinos silvestres, formando-se assim uma visão geral sobre a morfologia reprodutiva desses animais, e a partir deste entendimento, é possível iniciar a elaboração de técnicas de auxílio à reprodução (CARNEIRO *et al.*, 2010).

A pesquisa básica tem mostrado que muitas espécies de felídeos apresentam altas porcentagens de espermatozoides morfologicamente anormais e baixo número de espermatozoides por ejaculado. A teratospermia afeta adversamente múltiplos aspectos da função espermática e a obtenção de pequenos ejaculados limita a disponibilidade de sêmen para o congelamento e para o uso em procedimentos de reprodução assistida (CUBAS *et al.*, 2014).

A eficiência do processo espermatogênico pode ser avaliada através dos índices celulares obtidos a partir das coletas celulares nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero. Esta prática permite a comparação entre diferentes espécies, uma vez que revela numericamente a produção nas diferentes fases do processo espermatogênico (PAULA e GUIÃO-LEITE, 2003).

Estes índices celulares constituem o rendimento intrínseco da espermatogênese e referem-se: ao coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, que é a quantificação das perdas ou degenerações ocorridas durante a fase espermatogonial; o rendimento meiótico, que revela a eficiência das divisões meióticas durante o processo espermatogênico; e o rendimento geral da espermatogênese, que avalia a eficiência do processo como um todo (PAULA, 1999). Além desse método de avaliação do processo espermatogênico, há também a determinação da produção espermática diária por grama de testículo, que constitui num dos parâmetros mais efetivos e de fácil comparação entre as espécies, pois elimina a disparidade exercida pelo peso testicular e a duração da espermatogênese (PAULA e GUIÃO-LEITE, 2003).

O número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e no tamanho do testículo (FRANÇA *et al.*, 1995). Isso se deve ao fato de que as células de Sertoli têm uma capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa para cada espécie e que a população deste tipo celular não aumenta após a puberdade (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Desta forma, o número de células germinativas suportado por uma única célula de Sertoli (índice de células de Sertoli) é o melhor indicativo da eficiência funcional destas células (RUSSELL e PETERSON, 1984).

Em um estudo com onças-pardas (*Puma concolor*) foram analisados esses parâmetros sobre a morfologia testicular e o processo espermatogênico, que mostraram valores próximos aos de gata doméstica (*Felis catus*) (PAULA e GUIÃO-LEITE, 2003), representados na tabela 1.

**Tabela 1** – Rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de Sertoli em onça parda adulta (*Puma concolor*).

PARÂMETRO	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO
Coeficiente de mitoses espermatogoniais	7,7 ± 1,6
Rendimento meiótico	3,0 ± 1,3
Rendimento geral da espermatogênese	22,7 ± 3,1
Total de cél. Germinativas por cél. de Sertoli	12,5 ± 1,2
Espermátides arredondadas por cél. de Sertoli	7,3 ± 0,7
Produção espermática diária por grama de testículo	26,8x10 <sup>6</sup> ± 5,3x10 <sup>6</sup>

**Fonte:** PAULA e GUIÃO-LEITE, 2003

Conforme a literatura, é permitido agrupar a produção espermática diária por grama de testículo em três patamares: espécies com alta eficiência espermatogênica e que produzem cerca de 20 à 30 milhões de espermatozoides, como os suínos, equinos, ovinos e coelhos (FRANÇA e RUSSELL, 1998); espécies com eficiência espermatogênica média, produzindo de 10 à 20 milhões de espermatozoides, incluindo-se os bovinos e búfalos (FRANÇA e RUSSELL, 1998), o gato doméstico (*Felis catus*) (GODINHO, 1998) e a capivara (PAULA, 1999); e por ultimo, espécies com baixa eficiência espermatogênica, que produzem abaixo dos 10 milhões de espermatozoides, como o homem e o gambá (*Didelphis albiventris*).

## 2.2 Ciclo reprodutivo da fêmea felídea

Os estágios do ciclo reprodutivo da fêmea felina incluem proestro, estro, interestro, diestro e anestro. As fêmeas passam consecutivamente por proestro, estro e interestro quando mantidas em adequado fotoperíodo sem ovulação, com ou sem acasalamento (SILVA *et al.*, 2006).



A primeira fase do ciclo estral é conhecida como proestro. Muitas fêmeas felina irão esfregar a cabeça e o pescoço em locais convenientes e apresentar comportamento afetivo, porém sem permitir a monta por um macho. Esta fase pode durar aproximadamente um a dois dias (na gata doméstica), e normalmente é tão sutil que freqüentemente não é detectada. Durante esse período, o hormônio folículo-estimulante (FSH) da hipófise induz o desenvolvimento folicular ovariano. O recrutamento folicular coincide com o início do proestro, enquanto os folículos estão dilatando e há um aumento nas concentrações séricas de estradiol secretado pelas células da granulosa do ovário. O estradiol estimula a cornificação vaginal e causa o estro comportamental. Assim que o estro aproxima-se, alguns folículos tornam-se dominantes, enquanto outros folículos que estavam em desenvolvimento sofrem atresia (MOREIRA, 2007).

O estro é caracterizado pela receptividade comportamental ao acasalamento. O comportamento associado com o estro pode incluir um aumento na frequência dos seguintes sinais: agachamento, pisar característico dos membros pélvicos, vocalização, rolamento, lordose, deflexão da cauda, aumento da secreção vaginal, esfregar-se contra superfícies, afeição ou receptividade. Há uma correlação positiva entre o pico da atividade folicular, o pico da secreção de estradiol e número de células cornificadas na citologia vaginal durante o estro. Se a fêmea não ovular durante o estro, caso não tenha sido acasalada ou não tenha ovulado após a cópula, ela não entrará no metaestro (período do desenvolvimento do corpo lúteo) e sim no interestro. Esse período dura até que a fêmea retorne ao proestro, seguido então novamente pelo estro (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Diestro é a fase luteal seguinte ao estro na fêmea que recebeu estímulo adequado para ovular. Durante este período, há corpos lúteos funcionais (CL) acompanhados por uma alta concentração de progesterona no soro e de metabólitos de progestágenos nas fezes. Caso a fêmea tenha ovulado e a fertilização não tenha ocorrido, ocorrerá uma pseudogestação que dura, na gata, quase 70% do período normal de gestação. Por fim, o anestro é caracterizado por uma ausência de atividade ou ciclicidade ovariana. A progesterona e o estradiol

estão em níveis basais durante esta fase e a fêmea apresenta-se sexualmente inativa (MOREIRA, 2007).

A ocorrência da ovulação durante o estro depende de um adequado nível de liberação de hormônio luteinizante (LH) que, por sua vez, é dependente do número de cópulas (geralmente várias são requeridas) e do período do estro (CONCANNON *et al.*, 1980; WILDT *et al.*, 1980).

Entretanto, há registros de altas concentrações de progesterona sérica ou progestágenos fecais e presença de CL (corpo lúteo) em fêmeas de felídeos que não tiveram contato físico com um macho. Esses resultados mostram que fêmeas de determinadas espécies podem algumas vezes ovular espontaneamente, ovular em resposta a um estímulo diferente do coito, ou que os folículos podem sofrer luteinização, ao invés de atresia, após um ciclo não ovulatório (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Há um alto grau de variabilidade no tipo de ovulação (espontânea versus induzida) das diversas espécies de felídeos. Mesmo dentro de uma espécie, alguns indivíduos apresentam ovulação que é apenas induzida, enquanto outros também ovulam espontaneamente (BROWN, 2006).

Os padrões do ciclo ovariano de produção de esteróides foram publicados para quase a metade das espécies de felídeos selvagens (MOREIRA *et al.*, 2001), com análise de esteróides fecais utilizada em acima de 75% dos estudos. Elevações de estrógenos fecais distinguem o estro de períodos de interestro ou de anestro, e em geral as fêmeas ciclam em intervalos de duas a quatro semanas com o estro durando de três a dez dias. Em algumas espécies como a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), lince (*Lynx sp.*), onça-pintada (*Panthera onca*), as progestinas fecais apresentam-se aumentadas durante os picos de estrógenos. Isto não é observado em todas as espécies, e a significância funcional desta correlação positiva é desconhecida. As progestinas são provavelmente de origem folicular, porque as concentrações representam apenas uma fração daquelas observadas após a ovulação (BROWN, 2006).

Em um estudo de Furtado (2003) foi avaliada a atividade ovariana de fêmeas

de onça-pintada (*Panthera onca*) adultas n=2 e pré-púberes n=3) mantidas em cativeiro, pela extração e quantificação de estrógenos e progestinas fecais. Foram colhidas amostras fecais de duas a sete vezes por semana durante 16-18 meses e realizada a validação dos radioimunoensaios em fase sólida, progesterona e 17 $\beta$ -estradiol, para uso em extratos fecais em onça-pintada.

A duração média do ciclo ovariano definido por 2 picos consecutivos de estrógenos fecais foi de 38, 28 dias (variando de 25 a 44 dias). A fase de estro teve duração média de 10,42 dias (variando de 7 a 15 dias). E a fase de inter-estrou durou em média 28 dias (variando de 28 a 31 dias). O nível basal médio de estrógenos fecais no período de inter-estrou foram de 31,26 ng/g de fezes secas. Já no período de estro, os valores médios encontrados foram de 115,91ng/g de fezes secas (FURTADO, 2003).

A gata doméstica (*Felis catus*) foi caracterizada como ovuladora induzida ou reflexa, entretanto, ovulações espontâneas podem acontecer dependendo das condições de alojamento, da proximidade de um macho e, possivelmente, da genética. De forma semelhante, ovulações espontâneas foram documentadas em leopardo-das neves (*Panthera uncia*), leão (*Panthera leo*), leopardo (*Panthera pardus*), gato-de-Pallas (*Otocolobus manul*), gato-pescador (*Prionailurus viverrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*). Geralmente, os aumentos nas concentrações de progestinas, não induzidos por cópula, são mais freqüentes em fêmeas alojadas juntas, próximas a um macho ou em respostas individuais específicas a estímulos ainda não identificados de natureza física e/ou psico-social (MOREIRA, 2007).

### **2.3 Influência da sazonalidade na reprodução**

Para o sucesso dos trabalhos de reprodução assistida, é necessário identificar se há o efeito da sazonalidade na reprodução das espécies e, se sim, é preciso conhecê-lo. O gato doméstico (*Felis catus*) no hemisfério norte, por exemplo, produz espermatozoides o ano todo, apesar de a reprodução ocorrer normalmente na primavera e no verão (BLOTTNER e JEWGENOW, 2007). Nessa região, nota-se uma redução significativa na produção de espermatozoides nos

meses de dezembro e janeiro (inverno) e um aumento na concentração espermática no mês de março (primavera) (BLOTTNER e JEWGENOW, 2007).

Esse fato está possivelmente ligado aos efeitos da sazonalidade reprodutiva na fêmea, que, em regiões temperadas, é poliéstrica sazonal (BROWN, 2006), apresentando ciclos estrais apenas na primavera e no verão. Em condições tropicais, ocorre a poliestria anual tanto em gatas domésticas (*Felis catus*) quanto em fêmeas de jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) (MOREIRA, *et al.*, 2001).

Em felídeos de vida livre, a sazonalidade reprodutiva é dependente principalmente do fotoperíodo, não esquecendo também da influência das flutuações na disponibilidade alimentar que podem ocorrer na natureza. A reprodução é até certo grau sazonal em alguns felídeos selvagens como o tigre (*Panthera tigris*), leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*), gato-de-Pallas (*Otocolobus manul*) e leopardo-das-neves (*Uncia uncia*). Por outro lado, a atividade folicular de fêmeas em cativeiro das seguintes espécies não foi influenciada pela estação: leão (*Panthera leo*), leopardo (*Panthera pardus*), suçuarana (*Puma concolor*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) e gato-pescador (*Prionailurus viverrinus*) (MOREIRA, 2007).

A sazonalidade pode, ainda, comprometer a obtenção de espermatozoides viáveis para a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e influenciar a taxa de clivagem de embriões *in vitro* (MICHELETTI *et al.*, 2011). Embriões de gata doméstica gerados de oócitos extraídos fora do período reprodutivo, podem ter a viabilidade comprometida, pois não se desenvolvem da mesma maneira que embriões gerados a partir de oócitos coletados em períodos reprodutivos (SPINDLER e WILDT, 1999). É necessário, portanto, desenvolver pesquisas visando aperfeiçoar as técnicas de maturação de oócitos e de aumentar a viabilidade espermática do sêmen colhido em períodos de baixa produção espermática. (MICHELETTI *et al.*, 2011).

Quando a coleta de oócitos em espécies sazonais não pode ser realizada

durante a época reprodutiva, é possível utilizar-se da técnica de maturação de oócitos *in vitro* (MIV) em meios de cultivo contendo antioxidantes (cisteína ou ácido ascórbico) e FSH (hormônio folículo-estimulante). Essa técnica foi comprovadamente eficaz na melhoria do desenvolvimento *in vitro* de embriões de gato doméstico (*Felis catus*) (COMIZZOLI *et al.*, 2003) e, portanto, apresenta potencial para ser utilizada com espécies selvagens.

## **2.4 Influência do estresse na reprodução**

Em vista da interferência do estresse do animal em cativeiro, seu comportamento sofrerá distorção de acordo com seu grau de perturbação. Já com o animal livre na natureza, em seu habitat natural, seu comportamento é original, influenciado apenas pelos seus instintos e condições do habitat. (ARCHER, 1979).

Em felídeos, o estresse decorrente do cativeiro pode ser devido a recintos inadequados e/ou falhas de manejo. Conseguiu-se comprovar o efeito benéfico da ambientação de recintos através da conseqüente redução das concentrações de cortisol do animal. Em um estudo de Moreira e pesquisadores (2002) com fêmeas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), estas foram submetidas a três condições de recintos durante três períodos sucessivos: fase I, com recintos grandes e ambientados por três meses; fase II, recintos pequenos e completamente vazios, por seis meses; fase III, os mesmos pequenos recintos enriquecidos com troncos, plantas e caixa para abrigo, por mais seis meses.

As fêmeas de ambas as espécies exibiram elevações evidentes nas concentrações de corticóides após a transferência dos recintos grandes e ambientados para os pequenos recintos sem ambientação, elevações essas que foram simultâneas ao comportamento agitado, caracterizado pela alta frequência de andar estereotipado, especialmente durante os três primeiros dias após a transferência. As concentrações de corticóides fecais apresentaram-se então reduzidas após o enriquecimento dos recintos em gato-do-mato-pequeno, mas não no gato-maracajá, indicando uma diferença

espécie-específica na resposta a técnicas de enriquecimento (MOREIRA *et al.*, 2002).

### **3 BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO APLICADAS AOS FELÍDEOS SELVAGENS**

A aplicação de técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro*, criopreservação de gametas e transferência de embriões surgem como métodos alternativos com o intuito de minimizar a diminuição da variabilidade genética de populações ameaçadas (LOPES, 2002) e garantindo especialmente a sobrevivência fetal e neonatal (MICHELETTI *et al.*, 2011).

O sucesso desses procedimentos em felídeos silvestres, determinado pelo nascimento e sobrevivência dos filhotes, ainda é baixo atualmente, chegando a 20%. A extrapolação de protocolos de animais domésticos para espécies silvestres é um método ainda muito utilizado, porém não ideal (BROWN, 2006). Particularidades de cada espécie tornam, muitas vezes, a extrapolação de protocolos ineficiente. Acredita-se que os baixos índices de sucesso na reprodução assistida de felídeos silvestres são decorrentes do desconhecimento da fisiologia reprodutiva e da ausência de técnicas laboratoriais mais refinadas para espécies selvagens. Portanto, essas particularidades fisiológicas podem ser, em parte, responsáveis pelas baixas taxas reprodutivas em felídeos neotropicais cativos, quando empregadas técnicas de reprodução assistida (MOREIRA *et al.*, 2001).

#### **3.1 Monitoramento hormonal**

O monitoramento hormonal é indispensável nas pesquisas em reprodução, pois fornece informações sobre a fisiologia reprodutiva das espécies e a condição fisiológica do animal estudado. Ter conhecimento sobre o nível de atividade ovariana de uma fêmea, se esta apresenta ou não ciclos hormonais regulares, em que fase do ciclo estral esta se encontra, os níveis de concentrações hormonais circulantes, além de informações sobre as concentrações de andrógenos em machos, é essencial para o sucesso da reprodução assistida (figura 1) (GRAHAM,

2004).

**Figura 1** — Fotografia de coleta de sangue em onça-pintada (*Panthera onca*), proveniente da natureza, a campo para check-up e análises hormonais.



**Fonte:** Jaguar.org

Disponível em: <http://www.jaguar.org.br/iop/pt/projetos/epidemiologic/index.html>.  
Acesso em: 10 mar 2017.

Normalmente, os estudos endócrinos requerem inúmeras colheitas seriadas de sangue para obtenção dos níveis hormonais circulantes. Para espécies silvestres, essas colheitas geram um alto nível de estresse no animal, o que por si só já contra-indicaria essa opção pelo risco de se perder o exemplar, além de essas amostras apresentarem alterações relevantes nos perfis hormonais (GONÇALVES, 2008). Sendo assim, o tipo de monitoramento hormonal para o estudo da fisiologia e endocrinologia reprodutiva e comportamental em animais silvestres preferencialmente utilizado no momento é baseado em técnicas não invasivas, como extração e dosagem de hormônios e metabólitos hormonais de esteróides sexuais das fezes ou da urina (GRAHAM, 2004).

Essas técnicas podem ser utilizadas em diferentes espécies, tanto em condições de cativeiro como em vida livre. Para tanto, deve ser determinado quais hormônios ou metabólitos hormonais serão pesquisados e em qual matriz (fezes ou urina) (GRAHAM, 2004). Felizmente, para a endocrinologia de felídeos, os metabólitos de esteróides são excretados quase que exclusivamente nas fezes, com pouco esteróide encontrado na urina, o que resulta em uma alta correlação entre os níveis fecais e sanguíneos (MOREIRA, 2007).

A extração de metabólitos de esteróides das fezes geralmente envolve fervura e agitação (através de *Vortex*® ou outro mecanismo) das amostras em combinações de solventes orgânicos, como o etanol e metanol, e solventes aquosos. Os métodos devem obter uma recuperação da extração superior a 80%. Como alguns metabólitos são conjugados, a inclusão de 10% de água pode aumentar a eficiência da extração significativamente em relação aos solventes orgânicos puros. A variabilidade no interior das amostras pode ser reduzida pela secagem das fezes e mistura do pó resultante antes da extração (BROWN *et al.*, 1994), entretanto, resultados acurados têm sido obtidos através de amostras úmidas bem misturadas (MOREIRA *et al.*, 2001). O metabolismo de esteróides parece ser conservado dentro do táxon, porém as taxas de produção absoluta e/ou excreção são mais espécie-específicas (MOREIRA, 2007).

Até meados da década de 90, utilizava-se o radioimunoensaio para quantificar a concentração hormonal em excrementos e secreções. Atualmente, privilegia-se o teste do enzimoimunoensaio, mediado por reações enzimáticas e que não requer o uso de substâncias radioativas que podem ser prejudiciais à saúde humana. As limitações são os custos relativamente altos das análises e, para o Brasil, o fato de poucos laboratórios realizarem estes testes com materiais procedentes de animais silvestres (MICHELETTI *et al.*, 2011).

### **3.2 Colheita e avaliação seminal em felídeos selvagens**

Para que possamos aplicar técnicas artificiais de reprodução em espécies de interesse, informações básicas de fisiologia reprodutiva devem ser obtidas, como as



características normais do ejaculado. Para tanto, métodos seguros de colheita de amostras devem ser desenvolvidos de forma a garantir o bem-estar do animal, assim como tranqüilidade para a equipe que o assiste. (MORATO, *et al.*, 1998).

A primeira etapa para a criopreservação espermática é colheita de sêmen, ilustrada na figura 2. Em felinos, pode ser utilizada a eletroejaculação, a vagina artificial, a cateterização uretral, lavagem da vagina pós-coito e ainda a recuperação espermática da cauda de epidídimo, após a orquiectomia ou a morte do reprodutor (MARTINS e JUSTINO, 2015). Porém, a eletroejaculação é o método de eleição para obtenção de sêmen em felinos, já que para a aplicação da manipulação manual/digital e da eletrovibração, os animais não podem estar anestesiados, sendo necessário que sejam treinados para aceitar esses procedimentos, o que precisa de um longo período de condicionamento (MORATO *et al.*, 1998).

**Figura 2** — Fotografia de coleta de sêmen de onça pintada (*Panthera onca*) de vida livre.



**Fonte:** YouTube.

Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=ioT\\_CL3KnSk](https://www.youtube.com/watch?v=ioT_CL3KnSk)

Acesso em: 10 mar 2017.

A eficiência do método de eletroejaculação varia dramaticamente entre indivíduos e entre colheitas de um mesmo animal, sendo os protocolos propostos na literatura apenas o ponto de partida para o procedimento. A maior parte dos protocolos existentes recomenda que esse procedimento seja realizado com o animal sob contenção química e plano cirúrgico de anestesia (GONÇALVES, 2008).

Dentre os protocolos anestésicos mais utilizados para a eletroejaculação em gatos domésticos e felídeos silvestres encontram-se o uso de cloridrato de cetamina (PLATZ & SEAGER, 1978) e as associações de cloridrato de cetamina e xilazina (MORAIS et al, 2002) e tiletamina e zolazepam (MORAIS et al., 2002; MORATO et al., 2002; TEBET et al., 2006).

Outros fármacos utilizados isoladamente ou em associações também já foram utilizados com esse propósito para gatos domésticos (*Felis catus*), tais como: tiletamina, zolazepam e morfina; tiletamina, zolazepam, butorfanol e acepromazina (TEBET et al., 2006). Leite e pesquisadores (2006) citam a indução anestésica com propofol e anestesia epidural com lidocaína, já Silva e colaboradores (2008) relatam o uso de anestesia inalatória com indução anestésica à base de cetamina ediazepame e manutenção anestésica com isoflurano.

Em um estudo realizado por Silva e pesquisadores (2011) onde fez-se o comparativo entre quatro protocolos anestésicos com 14 gatos domésticos (*Felis catus*) em cada grupo, entre eles: cloridrato de cetamina e xilazina (protocolo A); cloridrato de tiletamina e zolazepam (protocolo B); cloridrato de tiletamina e zolazepam tramadol (protocolo C); ou indução da anestesia com cloridarato de cetamina e diazepam e manutenção com isoflurano (protocolo D), este último foi o que melhor promoveu analgesia, segurança ao procedimento anestésico e à equipe e rápida recuperação, para eletroejaculação em gatos domésticos, podendo ser extrapolado para felídeos silvestres.

Certas drogas como diazepam, acepromazina, halotano e isoflurano podem promover acentuado relaxamento da musculatura ao redor da vesícula urinária, produzindo contaminação do ejaculado por urina. Mas, a incidência desse tipo de contaminação relatada na literatura, possivelmente está relacionada de forma majoritária à intensidade excessiva dos eletrochoques, ou ao posicionamento do

eletrodo (mais cranial), ou até mesmo às doses das drogas utilizadas (HOWARD, 1993).

O protocolo de estímulos elétricos mais utilizado consiste em três séries de estímulos (30, 30 e 20) de dois a seis volts, com descanso entre as séries de cinco minutos, o equipamento utilizado deve ser adaptado para espécie, com voltagem máxima de 12 volts e probes retais que variam de acordo com o porte do animal (HOWARD *et al.*, 1990). Para a utilização da vagina artificial na colheita de sêmen de gatos, é necessário um período de treinamento de duas a três semanas, o qual normalmente 60 a 70% dos animais respondem (ZAMBELLI *et al.*, 2008).

Geralmente são utilizadas fêmeas em estro, mas pode ser feito o treinamento do macho com uma fêmea castrada ou não, que aceite a monta ou um manequim de pelúcia. É um método de coleta que apresenta grande aplicabilidade em colônias de pesquisa, quando colheitas seriadas são necessárias. A cateterização uretral é uma técnica de colheita dos espermatozoides felinos, que consiste na introdução de uma sonda uretral fina após a sedação do animal com 130 a 140 µg/kg medetomidina (agonista de receptor  $\alpha_2$ ), via intramuscular, que permite a eliminação uretral de espermatozoides sem que haja ejaculação completa. As desvantagens desse método são a necessidade de sedação do macho e o volume obtido de aproximadamente 20 µL (ZAMBELLI *et al.*, 2008).

### **3.3 Avaliação seminal**

Uma vez obtido o ejaculado, a análise imediata é efetuada segundo metodologia padronizada para espécies domésticas, abrangendo características físicas, volume (em mililitros), motilidade (percentual de células móveis), vigor (movimento progressivo do espermatozoide em classificação de 0 a 5) e percentual de células vivas (coloração eosina-nigrosina) (NÚNEZ- MARTINEZ *et al.*, 2006).

O movimento espermático pode ser avaliado por método computadorizado (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis), o qual avalia a motilidade total e progressiva, velocidade espermática, amplitude de deslocamento lateral de cabeça, frequência de batimentos, retilinearidade, linearidade do movimento, coeficiente de

oscilação e espermatozoides rápidos. Baseados nos parâmetros avaliados são calculados o índice de movimento e o índice de velocidade espermática (NÚÑEZ-MARTINEZ, *et al.*, 2006).

É interessante destacar característica comum à maioria das espécies de felídeos silvestres, em que o percentual de células espermáticas anormais é superior a 40%. (GONÇALVES, 2008). As anormalidades espermáticas mais frequentes em amostras seminais de gatos domésticos (*Felis catus*) são: macrocefalia, microcefalia, formas duplas, cauda fortemente enrolada ou dobrada, peça intermediária dobrada, gota citoplasmática proximal ou distal e cabeça isolada (JOHNSTON *et al.*, 2001). Alguns estudos têm sido realizados com a avaliação do plasma seminal de felinos e a influência dos microelementos na qualidade espermática; acredita-se que as concentrações de Se e Zn possam predizer a qualidade espermática nessa espécie (VILLAVARDE *et al.*, 2014).

A literatura apresenta poucos trabalhos avaliando sêmen de onça-pintada (*Panthera onca*) tornando difícil a interpretação das causas do elevado índice de espermatozoides morfologicamente anormais da espécie estudada (MORATO *et al.*, 1998). Porém, os resultados obtidos em alguns estudos mostram um número de espermatozoides anormais encontrados em onça-pintada (*Panthera onca*), que variou de 33,7%<sup>14</sup> a 41,8%<sup>10</sup>. Em um estudo realizado em zoológicos brasileiros, a morfologia espermática mostrou elevado índice de espermatozoides anormais (53,3%), sendo que esses resultados podem indicar comprometimento da fertilidade (PAZ *et al.*, 2000).

Segundo Howard (1993), elevados índices de anormalidade espermática são comuns na família Felidae. Geralmente as alterações de qualidade espermática estão diretamente relacionadas a três grandes fatores: genéticos, nutricionais e ambientais.

Considerando-se o fator genético, elevado índice de espermatozoides anormais (75%) tem sido associada a baixa variabilidade genética em guepardos (*Acinonyx jubatus*). Em pantera da Flórida (*Felis concolor coryi*), subespécie de puma que apresenta elevado grau de consanguinidade e concomitante perda de variabilidade genética, a incidência de espermatozoides anormais está em torno de

95%. Sendo os animais estudados de origem desconhecida, o estudo de paternidade pode contribuir substancialmente para a elucidação da causa do elevado índice de espermatozoides morfologicamente anormais (MORATO *et al.*, 1998).

Quanto ao aspecto nutricional, deve-se considerar que as dietas fornecidas pelos zoológicos sul-americanos são baseadas em carne (eqüina ou bovina) ou frango e pescoço de frango sem suplementação mineral e vitamínica, diminuindo a concentração espermática e aumentando a porcentagem de espermatozoides morfologicamente anormais, quando comparadas às dietas suplementadas (MORATO *et al.*, 1998). Este elevado índice de anormalidades espermáticas em onças-pintadas (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro pode estar relacionado também à deficiências de vitamina A e E. Alterações e redução na espermatogênese foram associadas à deficiência dessas vitaminas (PAZ *et al.*, 2000).

Condições ambientais desfavoráveis podem conduzir ao estresse, afetando o ciclo espermatogênico (MORATO *et al.*, 1998). O tipo de recinto, o número de animais por recinto e a interação tratador-animal são determinantes para o sucesso reprodutivo de felinos em cativeiro (MELLEN, 1991). No entanto, é difícil avaliar o impacto da condição de cativeiro, uma vez que não há informações suficientes quanto às características do sêmen de onça-pintada (*Panthera onca*) em vida livre que permita a comparação (MORATO *et al.*, 1998).

Mais estudos devem ser conduzidos com a finalidade de avaliar a fertilidade destes animais e até que ponto a variabilidade da espécie pode estar comprometida. Assim como são necessárias avaliações complementares, realizadas principalmente experimentalmente, que incluem integridade da membrana espermática e acrossomal, fragmentação de DNA, capacitação espermática, peroxidação lipídica, índice de apoptose, teste de ligação/penetração espermática em oócitos e fertilização *in vitro* (MARTINS e JUSTINO, 2015).

### **3.4 Criopreservação e refrigeração de sêmen**

A criopreservação de sêmen (figura 3) tem potencial significativo na conservação de felídeos selvagens, permitindo o cruzamento de indivíduos com dificuldade de acasalar, além de facilitar o intercâmbio genético e permitir a formação de um banco de reserva genômica (ABRAVAS, 2008).

**Figura 3** - Fotografia de criopreservação de sêmen em tambor de nitrogênio líquido.



**Fonte:** Medicina Reprodutiva. Disponível em: <http://medicinareprodutiva.com.br/2010/07/congelamento-de-semen/>. Acesso em: 10 mar 2017.

São dois os métodos de criopreservação de sêmen: a refrigeração e a congelação. A refrigeração consiste na manutenção do sêmen a 4 ou 5°C, após a diluição em meio extensor (HARRIS *et al.*; 2002). É o método indicado para utilização em biotécnicas reprodutivas, quando o transporte do sêmen pode ser em questão de horas ou até poucos dias. A congelação espermática em nitrogênio líquido é o segundo método, é a forma de armazenamento de eleição para integrar o Banco de Recursos Genéticos. O sêmen congelado tem um grande potencial para conservação, já que pode ser armazenado por tempo indeterminado e transportado a qualquer distância para utilização em biotécnicas reprodutivas (MARTINS e JUSTINO, 2015).

A técnica de inseminação artificial (IA) com sêmen criopreservado oferece vantagens que devem ser consideradas. Apesar de a inseminação com sêmen fresco resultar em melhores resultados do que com sêmen criopreservado (SWANSON, 2006), nem sempre é possível realizá-la devido às dificuldades

logísticas inerentes à colheita de sêmen e imediata inseminação. Já a inseminação com sêmen criopreservado pode ser mais facilmente planejada, uma vez que elimina a etapa de coleta prévia à realização da IA. Outra vantagem da inseminação com sêmen criopreservado é a facilidade de intercâmbio de material genético entre instituições, o que é essencial para a conservação *ex situ*. A possibilidade de intercâmbio de sêmen criopreservado é extremamente vantajosa atualmente devido às crescentes dificuldades de intercâmbio de animais entre instituições em razão de barreiras sanitárias e leis ambientais (WILDT e ROTH, 1997; SWANSON e BROWN, 2004; SWANSON, 2006; ANDRABI e MAXWELL, 2007).

Para minimizar os efeitos indesejáveis das baixas temperaturas sobre os espermatozoides, alguns trabalhos recomendaram adaptar os protocolos de espécies domésticas para espécies silvestres. Para que se consiga manter a integridade espermática após a descongelação. É necessário investimento em pesquisa, especialmente na área de criobiologia, que envolve composição e permeabilidade de membrana, transição de fases dos componentes líquidos da estrutura interna dos espermatozoides, crioprotetores, resposta espermática ao estresse hipo e hiperosmótico e monitoramento microscópico da formação de cristais de gelo intra e extracelular (MICHELETTI *et al.*, 2011).

Magalhães (2013) utilizou três alíquotas de cada uma das amostras de sêmen fresco utilizadas para o seu estudo de liofilização de sêmen provindas de cada um dos gatos. Foram testadas através do CASA para verificar a qualidade do sêmen antes do processo e após descongelação de forma a verificar a qualidade do sêmen após criopreservação convencional. Não houve diferença estatística entre o sêmen fresco e descongelado (tabela 2).

**Tabela 2:** Médias ( $\pm$  desvio padrão) obtidas para as características espermáticas do sêmen de gato doméstico (fresco e descongelado) através do CASA (Computer-Assisted Sperm Analyzer, HTR-IVOS-10, Hamilton Thorne Research — Animal Version 12,0 L, Beverly, MA, EUA).

Variável	Sêmen fresco	Sêmen descongelado
	MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO	MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO
MT	88,1 $\pm$ 1,5	85,4 $\pm$ 1,2
MP	68,2 $\pm$ 2,5	66,1 $\pm$ 1,1
VAP	140,5 $\pm$ 3,0	131,5 $\pm$ 2,5
VSL	122,3 $\pm$ 3,1	109,3 $\pm$ 2,1
RAP	84,1 $\pm$ 2,5	78,2 $\pm$ 2,8

\* MT (motilidade total); MP (motilidade progressiva); VAP (velocidade espermática ao longo de uma trajetória média); VSL (velocidade ao longo de uma linha reta); RAP (rápidos).

**Fonte:** MAGALHÃES, (2013).

É importante investir no aprimoramento de protocolos de criopreservação que deram certo em animais domésticos e que possam ser utilizados em animais silvestres. Algumas propostas de trabalho incluem pesquisas para o aperfeiçoamento de crioprotetores, da curva de congelação e meios de cultivo, e a melhoria das técnicas de sexagem de espermatozoides. Nas últimas duas décadas, foram publicados diversos trabalhos sobre criopreservação e descongelação de espermatozoides em felídeos silvestres, buscando manter a viabilidade celular. Porém, nenhum protocolo utilizado conseguiu manter as taxas de viabilidade do ejaculado pós-descongelação tão elevadas quanto as geralmente obtidas em animais domésticos (SWANSON e BROWN, 2004; SWANSON *et al.*, 2006). Isso ocorre provavelmente por características próprias dos espermatozoides dos felídeos (ex.: alto índice de teratospermia) e pela utilização de protocolos ainda não adequados.

### 3.5 Indução da ovulação e superovulação

Para que qualquer procedimento de IA e/ou outros programas de reprodução



assistida sejam bem-sucedidos, é necessário que a fêmea esteja prestes a ovular ou tenha recém-ovulado. Isso garante que haja condições hormonais e de ambiente uterino adequadas para a implantação e o desenvolvimento do embrião (BROWN, 2011). Rotineiramente, em cativeiro, são utilizadas gonadotrofinas exógenas que simulam hormônios endógenos com intuito de estimular o estro nas fêmeas fora do seu período comum. Durante esse período, ocorre o crescimento de folículos e, posteriormente, a ovulação. Com esse procedimento e com o acompanhamento contínuo dos hormônios esteroides reprodutivos, é possível quantificar a atividade ovariana, o tipo de ovulação apresentada, a duração do estro e o momento da ovulação (MICHELETTI *et al.*, 2011).

Porém a resposta ovariana a elas varia não só entre espécies, mas também entre indivíduos de uma mesma espécie (POPE *et al.*, 2006). Trabalhos como o de Moreira e pesquisadores (2001), que identificaram ovulações espontâneas e com maior frequência em gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) do que em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*), sugerem ocorrer ovulações espontâneas e a consequente presença de CL (corpo lúteo) em fêmeas mantidas isoladas de machos.

A presença de CL pode comprometer a resposta ovariana às gonadotrofinas exógenas, já que uma fêmea que apresenta CL mantém a produção contínua de progesterona, onde esta reduz a atividade ovariana por meio de retroalimentação negativa no eixo hipotalâmico-hipofisário, alterando a resposta fisiológica do organismo à administração de análogos do FSH e LH (MICHELETTI *et al.*, 2011). Em espécies que têm ovulação induzida, a simples presença de CL pode interferir reduzindo a resposta às gonadotrofinas exógenas (PELICAN *et al.*, 2008).

Além desse fato, diferentemente de outras espécies (bovinos), a prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) não surte efeito quando aplicada com o intuito de regredir o CL em gatas domésticas no início da fase luteal. Em determinados exemplares, essa prostaglandina pode ter um efeito luteotrófico, apesar de não ter sido explorado a razão pela qual isso ocorre. De qualquer maneira, o fato de a PGF2 $\alpha$  não apresentar efeito luteolítico em gatas domésticas leva os pesquisadores da área a uma busca por protocolos alternativos (MICHELETTI *et al.*, 2011). Assim, diferentes protocolos hormonais foram desenvolvidos para

diferentes espécies de felídeos (SWANSON e BROWN, 2004).

A resposta ovariana às gonadotrofinas também pode variar com o intervalo entre as aplicações dos hormônios. Macromoléculas exógenas como a gonadotropina coriônica equina (eCG), aplicadas sucessivamente em intervalos curtos, podem sensibilizar o sistema imunológico da fêmea, induzindo a formação de imunocomplexos que interferem na resposta ovariana, na eficácia da inseminação artificial e na recuperação de oócitos (PELICAN *et al.*, 2006).

Estudos sobre superovulação em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) indicaram que o intervalo de quatro meses entre aplicações alternadas de eCG/hCG (gonadotropina coriônica equina/gonadotropina coriônica humana) e FSH/LH purificados (hormônio folículo estimulante purificado/hormônio luteinizante purificado) não reduz a resposta ovariana (PAZ *et al.*, 2005).

Mesmo que algum progresso tenha sido feito, fatores limitantes, como a grande variabilidade na resposta à utilização de produtos altamente heterólogos como o eCG e o hCG, têm dificultado a obtenção de melhores resultados na indução da atividade ovariana. Já foi comprovada também em fêmeas felídeas com idades avançadas, a diminuição da eficiência reprodutiva, causa provavelmente relacionada com a diminuição da qualidade oocitária, alteração do ambiente uterino e alterações endócrinas. As diferenças espécie-específicas são significantes; e é fácil causar hiperestimulação ovariana e perfis endócrinos alterados que, por sua vez, podem comprometer a reprodução. Estudos com a utilização de progestágenos no pré-tratamento que objetivam melhorar a resposta ovariana têm fornecido resultados promissores em várias espécies de felídeos (PELICAN *et al.*, 2006).

Pesquisas futuras precisam indicar protocolos que suprimam a atividade ovariana de forma reversível e controlável, como dose e intervalo de aplicação de gonadotrofinas, para cada espécie. Entretanto, estas pesquisas precisam de mais bases fisiológicas. É necessário que novos estudos foquem em protocolos específicos para indução à superovulação (PELICAN *et al.*, 2006). O desenvolvimento desses protocolos, associados à criopreservação de sêmen e

embriões e ao desenvolvimento de gonadotrofinas específicas para felídeos, aumentará a utilidade das técnicas de reprodução assistida para a conservação dessas espécies (MOREIRA, 2007).

### **3.6 Inseminação artificial (IA)**

Inseminação artificial é a introdução de sêmen através de uma pipeta no trato reprodutivo de uma fêmea no estágio correto do seu ciclo (FILHO, 2004).

A técnica de IA vem sendo aplicada a inúmeras espécies silvestres, algumas com êxito outras não, sendo considerada uma importante ferramenta para conservação de espécies ameaçadas (GUIMARÃES, 2008). Esta técnica pode ser benéfica para três fatores principais: indivíduos que falham em acasalar-se por incompatibilidade comportamental ou clínica; aumentar a diversidade genética dentro de uma população e expandir o grupo de genes através do acasalamento de indivíduos selecionados; e distribuir o sêmen com segurança entre diferentes localizações geográficas sem o risco e o custo de transportar animais vivos (HOWARD *et al.*, 1992).

É essencial que os métodos de reprodução assistida utilizados sejam isentos de qualquer risco de contaminação ou transmissão de doenças. Para isso, algumas medidas devem ser tomadas para não se comprometer os procedimentos utilizados. A centrifugação do sêmen e retirada do líquido seminal são importantes para procedimentos de inseminação artificial com sêmen fresco ou congelado (HOWARD, 1993).

Métodos de processamento de sêmen sem centrifugação e retirada do plasma seminal levaram ao desenvolvimento de piometra em 40% de gatas domésticas inseminadas, mesmo com o fato de o sêmen estar diluído em meio de cultura contendo antibióticos, penicilina e estreptomicina (HOWARD, 1993).

Acredita-se que o sêmen de doadores possa conter bactérias da flora normal como *Escherichia coli*, que seriam causadoras de infecção nas fêmeas. Casos de brucelose, que tem grande implicação reprodutiva, já foram relatados em tigresas (*Panthera tigris*) e fêmeas de onças-pintadas (*Panthera onca*) (ABRAVAS, 2008).

Conforme Ruiz (1999), o conteúdo do prepúcio (invaginação de pele que cobre a parte livre do pênis no estado não erétil), mistura-se com o sêmen durante a ejaculação, sendo essa uma das principais fontes de contaminação.

Em felinos silvestres, após muitos testes comparativos entre inseminação vaginal, transcervical e intra-uterina, chegou-se a conclusão que esta última, realizada por laparoscopia trans-abdominal, obtinha o melhor resultado (GUIMARÃES, 2008), tornando esta técnica o melhor método de IA, podendo justificar o alto índice de contaminação das fêmeas, o que não acontece durante a cópula natural pelo fato do depósito do sêmen ser vaginal. Neste contexto, cuidados como centrifugação do sêmen e retirada do líquido seminal já citados, além de outros como avaliação reprodutiva e exame clínico completo dos animais, devem ser realizados antes da utilização dos mesmos na IA e em outros programas de reprodução assistida (ABRAVAS, 2008).

Uma das vantagens da IA é o fato de ser um procedimento relativamente simples, mas ainda dependente do aperfeiçoamento de protocolos de indução do desenvolvimento folicular e da ovulação. Outra vantagem é a possibilidade de utilização tanto de sêmen resfriado quanto criopreservado. (MICHELETTI *et al.*, 2011).

A inseminação usando sêmen congelado tem sido amplamente reportada, mas em geral, as taxas de fertilização são mais baixas do que as conseguidas com sêmen fresco. Até os dias de hoje, a inseminação artificial com sêmen fresco ou descongelado tem sido utilizado com sucesso, porém com dificuldades para produzir filhotes em espécies de felídeos (FILHO, 2004).

Segundo Swanson e Brown (2004), há especulações que estas dificuldades existentes da IA estejam relacionadas à variabilidade na resposta ovariana, à necessidade de um procedimento cirúrgico para a deposição intrauterina do sêmen em felídeos, ao uso de anestésicos, ao estresse de captura e, nos casos de IA cirúrgica, ao estresse pós-operatório.

Lacerda-Neto e pesquisadores (2004) relataram que gatas domésticas (*Felis catus*) submetidas a cirurgias para inseminação apresentaram concentrações de cortisol aumentadas após os procedimentos cirúrgicos, retornando aos níveis

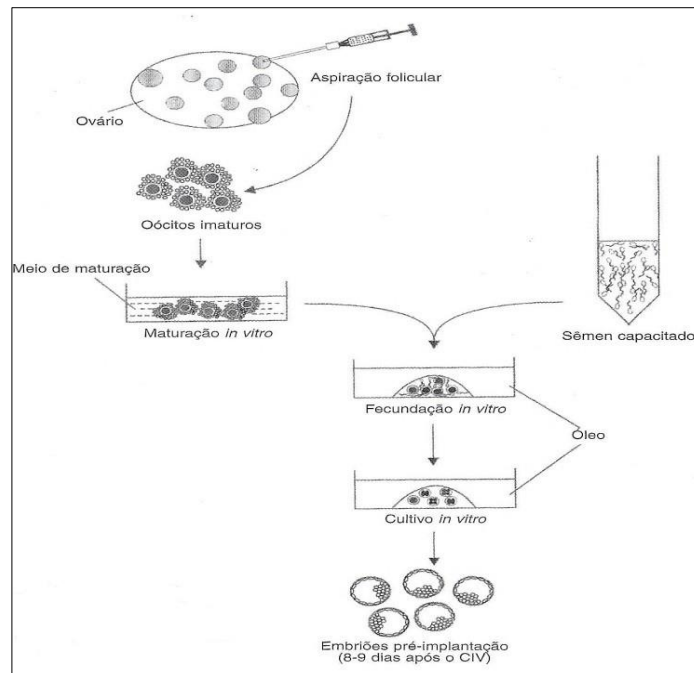
basais após aproximadamente 72 horas, o que indica que procedimentos cirúrgicos podem ser fatores de estresse prolongado. É necessário também saber se as cirurgias em si afetam as taxas de fecundação e a viabilidade dos embriões. Pode haver a interferência do cortisol na liberação do hormônio reprodutivo LH logo após os procedimentos cirúrgicos, apesar de as concentrações de LH não terem sido significativamente diferentes nos períodos analisados de 24, 48 e 72 horas após o procedimento (MICHELETTI *et al.*, 2011).

Para aumentar as taxas reprodutivas em felídeos mantidos em cativeiro, seria necessário desenvolver técnicas não cirúrgicas (i.e., transvaginal) de IA para a deposição de sêmen no corno uterino, o que eliminaria o efeito da elevação pós-cirúrgica do cortisol. Porém, mesmo eliminando o efeito da elevação do cortisol pela cirurgia, é possível que ainda ocorra uma elevação dele devido à contenção física e química dos animais estudados. A inseminação via laparoscopia tem apresentado bons resultados em diversas espécies de felídeos, mas ainda precisa ser aprimorada (SWANSON *et al.*, 2002).

### 3.7 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é um procedimento que envolve várias técnicas de reprodução assistida, entre elas a capacitação espermática; a coleta de oócitos dos folículos ovarianos, incluindo nesta, três etapas biológicas (figura 4): maturação *in vitro* dos oócitos (MIV); fecundação *in vitro* (FIV); e cultivo *in vitro* de embriões (CIV). Estes, junto com as técnicas de transferência de embriões (TE), completam o procedimento (HAFEZ, 2004).

**Figura 4** - Ilustração esquemática de etapas básicas na produção *in vitro* de embriões bovinos. Os oócitos são aspirados dos folículos ovarianos e maturados (MIV), fecundados com sêmen capacitado (FIV) e os zigotos são cultivados (CIV) por 8 a 9 dias para obter blastocistos para transferir para o útero.



Fonte: HAFEZ e HAFEZ, 2004.

A PIV é uma técnica relativamente difundida em animais silvestres, tendo sido testada em diversas espécies de felídeos neotropicais, como em gatos-domato-pequenos (*Leopardus tigrinus*) e jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) (SWANSON *et al.*, 2002) e em onças-pintadas (*Panthera onca*) (MORATO *et al.*, 2000). Apesar de ser uma técnica relativamente simples, a partir do momento em que se possui o oócito maturado e o sêmen capacitado, a produção *in vitro* de embriões (PIV) apresenta baixa taxa de sucesso para certas espécies de felídeos, mesmo quando os oócitos recuperados para o procedimento são de boa qualidade (MORATO *et al.*, 2000).

Entretanto, pesquisas utilizando as biotecnologias da reprodução em felinos selvagens vêm crescendo cada vez mais devido à sua importância como ferramenta na conservação de espécies ameaçadas (SILVA *et al.*, 2004).

### 3.7.1 Capacitação dos espermatozoides

Os espermatozoides não conseguem atingir sua total capacidade de fecundação antes de serem transportados através do trato reprodutivo feminino. Eles devem sofrer modificações fisiológicas adicionais (capacitação) antes de

conseguirem penetrar na zona pelúcida e fundir-se com o vitelo do oócito. A capacitação permite ao espermatozóide sofrer uma reação acrossômica normal antes da fecundação (HAFEZ, 2004).

O sêmen pode ser capacitado em meio de alta força iônica, ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , cafeína, incubação prolongada (28 a 24 horas), pH elevado e lavagem em um gradiente de Percoll, mas os resultados não tem repetibilidade (HAFEZ, 2004).

O primeiro passo para a capacitação espermática é a obtenção de uma amostra do sêmen ejaculado com alta porcentagem de espermatozoides mostrando motilidade progressiva. Se for utilizado sêmen congelado, a motilidade espermática pode ser intensificada (hipermotilidade) por métodos físicos (técnica do nado ascendente swim-up, gradiente de densidade de Percoll) ou por agentes químicos (cafeína, teofilina) (HAFEZ, 2004).

### **3.7.2 Maturação *in vitro* de oócitos**

Ao contrário do espermatozóide, após a liberação da gônada, o oócito não requer exposição ao trato reprodutivo para ser fértil. Eles podem ser coletados através da dissecação, fatiamento ou aspiração, sendo a última a técnica mais eficiente para se obter oócitos (HAFEZ, 2004), usando uma agulha guiada por fibra ótica ou ultra-som (GONÇALVES *et al.*, 2008).

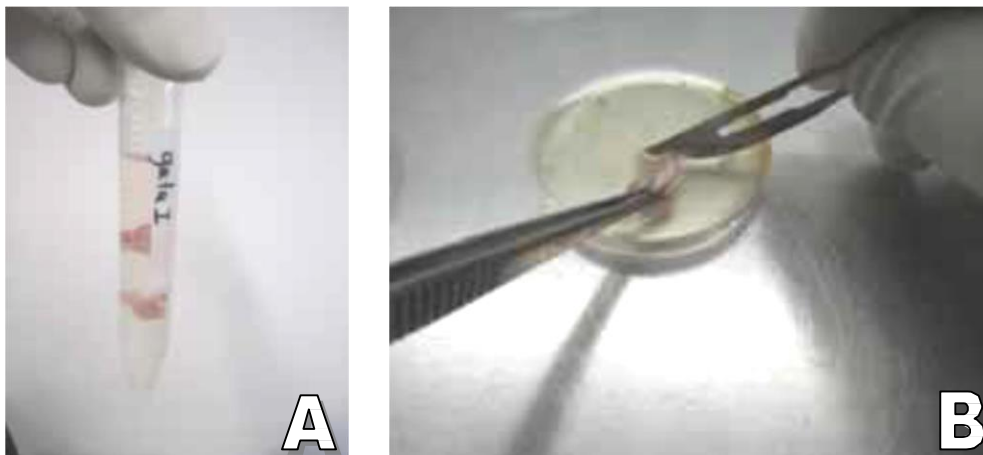
A técnica de aspiração folicular por via laparoscópica deve ser precedida por tratamentos hormonais para indução da atividade ovariana. A combinação de FSH e LH tem sido utilizada com sucesso em tigres (*Panthera tigris*) e onças pintadas (*Panthera onca*) (MORATO *et al.*, 2000).

Magalhães (2013) demonstra a recuperação e seleção de oócitos de ovários de gata doméstica (*Felis catus*) (figura 5) através da técnica de *slicing* (fatiamento), em placas de Petri de plástico, contendo 8mL de DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) suplementado com 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina, aquecidos a 38° C.

Nessa mesma placa, sob lupa estereomicroscópica, procedeu-se a classificação dos CCOs (figura 6). Foram utilizados apenas CCOs que

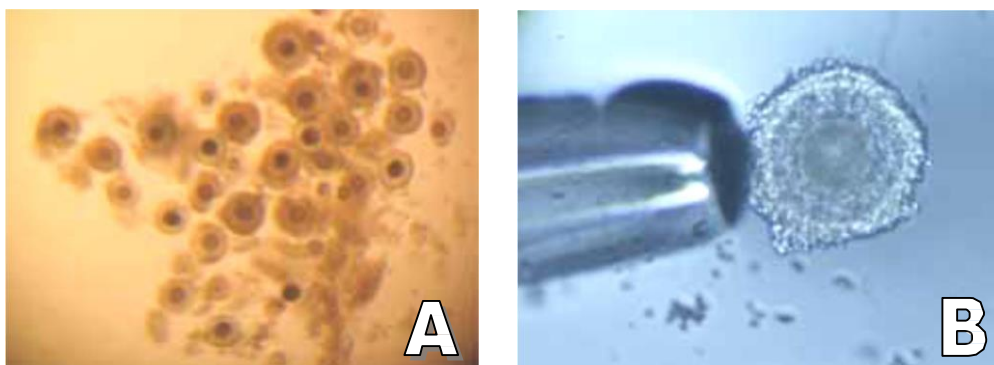
apresentavam citoplasma uniforme e fortemente pigmentado, envoltos por duas ou mais camadas de células da granulosa firmemente aderidas (CCOs de grau I) (MURAKAMI *et al.*, 2002).

**Figura 5** – Fotografia de ovários de gatas domésticas (*Felis catus*) coletados durante a ovariosalpingohiesterctomia eletiva (OSH). **A** — ovários íntegris preservados em solução. **B** — ovários sendo submetidos à técnica de *Slicing*.



Fonte: MAGALHÃES, 2013.

**Figura 6** – Fotografia de lâmina de microscopia óptica de CCOs gatas domésticas (*Felis catus*). **A** - Graus variados de CCOs de gata (*Felis catus*). **B** - CCO de grau I de gata (*Felis catus*). (Microscópio de luz, aumento 400x).



Fonte: MAGALHÃES, 2013.

Após a recuperação e seleção dos oócitos, eles são transferidos para uma



placa contendo um meio de maturação. Após romper os folículos para a liberação do complexo *cumulus-oócito* (CCO), quatro a cinco ou um grupo de CCO são colocados em microgotas do mesmo meio sob óleo de parafina em placas de Petri e incubados à 39°C em 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar com alta umidade por 24 horas (HAFEZ, 2004). Diversos outros meios para maturação de oócitos são propostos, mas a eficiência deles é avaliada pela competência em produzir embriões e a avaliação morfológica dos embriões produzidos. Alguns dos métodos utilizados para a avaliação dos meios são: proporção de oócitos maduros após MIV, embriões produzidos após FIV, tempo de clivagem, porcentagem de blastocistos e número de blastômeros (HRIBAL *et al.*, 2013).

Magalhães (2013) realizou a maturação oocitária *in vitro* em placas do tipo *four-well*. Em cada poço foram colocados 400µL de meio SOF e 20 CCOs de grau I e o período de maturação foi de 30 horas em atmosfera úmida de 5%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> (figura 7). A taxa de expansão de células do *cumulus* foi da ordem de 94,3% provando que o meio de maturação foi eficiente e adequado. Somente os CCOs que apresentaram expansão das células do *cumulus* foram utilizados para a fertilização. Não houve diferença estatística entre o número de CCOs I selecionados e o número de CCOs I resgatados com expansão das células do *cumulus*, conforme informado na tabela 3.

**Figura 7** - Fotografia de placa do tipo *four-well* com 400µL de meio MIV para maturação de oócitos de gata (*Felis catus*).



Fonte: MAGALHÃES, 2013.

**Tabela 3:** Média e desvio padrão do número de Complexo *Cumulus Oophorus*

(CCOs) de grau I antes e após expansão das células do cúmulus, em placa do tipo *four-well* com 400µL de meio MIV (SOF).

Número de gatas	CCO I/animal	CCO I (cúmulus expandido)
11	19,2±4,0a	18,2±4,0a

\* Médias seguidas de letras diferentes numa mesma linha diferem entre si (P≤0,05).

### 3.7.3 Fertilização *in vitro*

Durante a co-incubação de um oócito MIV com sêmen capacitado, um espermatozóide penetra o oócito, desencadeando uma série de eventos que levam à fecundação (HAFEZ, 2004).

A taxa de FIV (clivagem) de oócitos nas gatas (*Felis catus*) varia entre 40% e 50% em oócitos maturados *in vitro* e 60–80% para maturados *in vivo* (POPE *et al.*, 1999). A FIV em gato doméstico vem apresentando sucesso na produção tanto de embriões, como de filhotes. Em alguns felídeos selvagens como o guepardo (*Acinonyx jubatus*) e o gato do deserto índico (*Felis margarita*) a técnica de FIV mostrou ser capaz de produzir embriões (SWANSON, 2012), e no caso do tigre (*Panthera tigris*) foi capaz de produzir filhotes (DONOGHUE *et al.*, 1990).

Uma grande porcentagem de embriões felinos produzidos *in vitro* apresenta um bloqueio de desenvolvimento no estágio entre mórula e blastocisto, período mais tardio do que o bloqueio ocorrido em outros mamíferos (HOFFERT *et al.*, 1997).

Pope e pesquisadores (1999) observaram que tanto a suplementação de cisteína ao meio de maturação como a redução da atmosfera de oxigênio melhoraram significativamente o desenvolvimento de embriões *in vitro* até o estágio de blastocisto. Portanto, assim como na FIV de bovinos, os oócitos de gata maturados *in vitro* não se desenvolvem até blastocistos tão rapidamente como os oócitos maturados *in vivo*, mas a diferença é mínima devido aos avanços ocorridos nas condições de cultivo (SWANSON, 2006).

O procedimento de FIV para animais domésticos envolve o preparo de microgotas de 25mL de suspensão de sêmen e 25mL de meio contendo 10mg/mL de heparina. A seguir, de quatro a cinco CCO (*cumulus-oócito*) são colocados em uma microgota de meio de fecundação (volume final de 50mL sob óleo de parafinas e incubados em 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar com alta umidade à 39°C, por 24 horas (HAFEZ, 2004).

Em oócitos envelhecidos, a incidência de poliespermia é alta; caso o oócito seja muito envelhecido, o desenvolvimento primário é anormal ou a fecundação não pode ocorrer (HAFEZ, 2004). Porém, estudos demonstraram que os ovários de guepardos (*Acinonyx jubatus*) de idade avançada são responsivos ao tratamento com gonadotrofina sérica de éguas grávidas (PMSG, também conhecido por eCG) e que óvulos maduros podem ser coletados eficientemente de cada uma das espécies usando técnica laparoscópica. A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) tem uma baixa sensibilidade intrínseca ao eCG/hCG e requer proporcionalmente ao seu peso de três a dez vezes a dose rotineira administrada a guepardos (*Acinonyx jubatus*), pumas (*Puma concolor*) e panteras nebulosas (*Neofelis nebulosa*) (SWANSON *et al.*, 1996).

A taxa de fecundação pode ser avaliada com o exame microscópico para clivagem, mas para uma análise mais precisa, alguns oócitos devem ser fixados, corados e examinados sob microscopia de contraste de fase 18 a 22 horas após a inseminação. Altas taxas de fecundação na FIV dependem de um número ótimo de espermatozoides fecundantes com motilidade vigorosa e de um oócito fecundável com o primeiro corpúsculo polar (HAFEZ, 2004).

Alguns critérios são usados como evidência de fecundação, que incluem a penetração do espermatozóide no ooplasma; inchaço da cabeça do espermatozóide e formação de pró-núcleo; clivagem morfológicamente normal e formação de blastocisto; rompimento dos grânulos corticais; e evidencia de cauda de espermatozoide no ooplasma (HAFEZ, 2004).

O protocolo para superovulação e posterior fecundação *in vitro*, preconizado para tigres (*Panthera tigris*), foi capaz de produzir embriões em onças-pintadas (*Panthera onca*), porém há a necessidade de adequação deste protocolo devido à

baixa taxa de clivagem. Entre 0,5 a 3 horas pós- inseminação, cerca de 90% dos oócitos já estão penetrados. Entre os felídeos, filhotes nascidos através da fertilização *in vitro* foram produzidos no gato do deserto Indiano (*Felis margarita*) (POPE *et al.*, 1989) e no tigre (*Panthera tigris*) (DONOUGHUE *et al.*, 1990).

#### **3.7.4 Cultivo *in vitro***

Após a FIV, os zigotos devem ser cultivados para posterior desenvolvimento antes de serem transferidos para o útero ou criopreservados (HAFEZ, 2004).

Após a FIV ou a ICSI, é necessário o cultivo dos embriões *in vitro* (CIV) para que eles se desenvolvam até o estágio de blastocisto expandido, de quatro a seis dias (POPE *et al.*, 2006), quando estarão prontos para serem transferidos para uma fêmea receptora (MICHELETTI *et al.*, 2011).

Diversos trabalhos com gatas domésticas demonstraram que quanto mais desenvolvido o oócito na coleta, maior a viabilidade para fecundação após atingir a metáfase II (última fase de desenvolvimento antes de fecundar) (POPE *et al.*, 2006). Em felídeos domésticos, o cultivo de embriões é feito em grupo (cultivo de vários embriões na mesma gota ou poço), o que proporciona melhores índices de crescimento e desenvolvimento embrionário em comparação ao cultivo de células isoladas (SPINDLER *et al.*, 2006). Como a produção em laboratório de embriões de felídeos ameaçados de extinção é escassa, dificilmente são utilizadas técnicas como o cultivo em grupo intraespecífico. Porém, foi comprovada a eficácia da utilização de embriões de outras espécies (de roedores e de bovinos) para o cultivo conjunto com embriões de gatas domésticas como estímulo para o desenvolvimento deles (SPINDLER *et al.*, 2006).

Para o sucesso das técnicas de cultivo de embriões, é fundamental a utilização de meios de cultivo adequados para que ocorra a clivagem deles. Alguns estudos em gato doméstico demonstraram que os embriões apresentam respostas específicas a diferentes carboidratos no meio, conforme o estágio de desenvolvimento em que se encontram. Foi também comprovada certa sensibilidade dos embriões a aminoácidos essenciais presentes no meio de cultivo

(HERRICK *et al.*, 2007).

O CIV é uma técnica recente e encontra-se em desenvolvimento. Pesquisas sobre estimulação ovariana e coleta e cultivo de oócitos são importantes para melhor aplicação das técnicas de FIV e ICSI e, conseqüentemente, melhor desenvolvimento embrionário. Entretanto, o desenvolvimento de meios adequados de cultivo de oócitos e embriões é essencial para o sucesso dos protocolos de produção *in vitro* de embriões (PIV) (MICHELETTI *et al.*, 2011).

### **3.8 Transferência de Embriões**

Os requisitos básicos para um programa de transferência de embriões (TE) são: uma fonte de embriões, um método confiável para transferir os embriões; e receptoras adequadamente sincronizadas (HAFEZ, 2004).

Na transferência de embriões, óvulos fertilizados ou embriões precoces (geralmente no estágio de cerca de oito células) são removidos do trato reprodutivo da fêmea doadora e transferidos para o trato de uma mãe adotiva, que carrega os embriões ao termo e produzem filhotes vivos. A produção de embriões *in vitro* é a geração artificial de um embrião em cultura usando gametas (óvulos e espermatozoides) que foram coletados em um estado maduro ou imaturo. Os procedimentos de transferência de embriões em espécies não-domésticas são freqüentemente realizados em conjunto com protocolos de estimulação ovariana para permitir a coleta de grande quantidade de embriões seja para uso imediato seja para congelar (FILHO, 2004).

Há um número de pré-requisitos essenciais para a coleta de embriões de qualquer espécie que inclui um grande conhecimento da biologia da reprodução da espécie; boas técnicas de manejo animal e a disponibilidade de locais para restrição do animal; recursos laboratoriais e pessoal treinado na coleta e manejo de embriões e o uso de animais que são comprovados reprodutores. A coleta de embriões é geralmente aplicada no estágio de blastocisto expandido, que é durante a primeira semana de desenvolvimento e pode ser feita por técnicas cirúrgicas e não-cirúrgicas (FILHO, 2004).

A transferência de embriões aumenta o número de ninhadas por fêmea; previne a transmissão de doenças entre populações; os filhotes adquirem imunidade passiva da mãe adotiva via sangue da placenta ou leite; os animais podem ser transferidos de um local para outro como embriões em tubos de ensaio e os embriões podem ser congelados antes de transferidos para fêmeas receptoras (FILHO, 2004).

### **3.9 Criopreservação e refrigeração de embriões**

A eficiência da transferência de embriões depende da manutenção da viabilidade dos embriões do momento da coleta até o momento da transferência. A sobrevivência embrionária pós-descongelamento depende da qualidade inicial do embrião, do estágio de desenvolvimento, da espécie, do tempo entre a coleta e congelamento, do tipo de crioprotetor e do protocolo de resfriamento (HAFEZ, 2004).

Os embriões são criopreservados por congelamento lento ou por vitrificação. O desenvolvimento embrionário ocorre em várias condições de cultivo, meios e suplementos e atmosferas gasosas. Para animais domésticos, culturas em tubos fechados produzem resultados iguais àqueles notados em microgotas de meio sob óleo de parafina. Uma atmosfera de oxigênio reduzido, de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> é no mínimo igual e em algumas espécies superior à 5% de CO<sub>2</sub> no ar para promover o desenvolvimento embrionário (HAFEZ, 2004).

Óvulos não fertilizados são mais sensíveis a criopreservação do que os embriões. Os embriões formados *in vitro* são mais sensíveis a criopreservação do que os embriões fertilizados *in vivo* (FILHO, 2004).

Swanson e pesquisadores (2002) realizaram a reprodução através transferência de embriões após criopreservação, de gato-silvestre-africano (*Felis silvestris*) e o caracal (*Caracal caracal*), e a jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Apesar de essas técnicas não apresentarem muita dificuldade em termos de procedimentos, dificilmente se obtêm filhotes. Isso se dá principalmente em razão das falhas na sincronização hormonal das receptoras e da dificuldade em se estabelecer um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento dos embriões

(SWANSON e BROWN, 2004; PELICAN *et al.*, 2008).

A criopreservação de embriões de felídeos silvestres é existente, mas ainda não é uma técnica de uso rotineiro. Isso certamente ocorrerá quando as técnicas de cultivo e congelação de embriões *in vitro* estiverem mais avançadas. Poucos trabalhos realizados com felídeos silvestres conseguiram desenvolvimento de embriões viáveis ou aptos à transferência ou inovulação para as receptoras a partir de embriões criopreservados (GÓMEZ *et al.*, 2003).

## 4 CONCLUSÃO

Para melhorar as taxas de reprodução de espécies ameaçadas de extinção é preciso ampliar a pesquisa básica em fisiologia reprodutiva e aprimorar as técnicas de reprodução assistida.

A biotecnologia aplicada à reprodução pode contribuir para minimizar o risco de extinção de inúmeras espécies consideradas vulneráveis ou ameaçadas e garantir um futuro para elas, importantes para a manutenção do equilíbrio natural do planeta. Para isto torna-se necessário identificar o efeito da sazonalidade na reprodução das diversas espécies dos felídeos selvagens, corrigir o fator estresse com enriquecimento ambiental, aperfeiçoar as técnicas de reprodução assistida desde os protocolos anestésicos para colheita de sêmen do macho e os protocolos hormonais para a indução de desenvolvimento folicular e ovulação da fêmea até os protocolos de inseminação artificial (IA), maturação *in vitro* (MIV) fertilização *in vitro* (FIV), criopreservação de gametas e transferência de embriões (TE).

A partir da correta aplicação das biotecnologias de reprodução com o intuito de se conseguir um bom desempenho reprodutivo, sendo possível garantir a manutenção de um banco genético viável e conseqüentemente aumentar a variabilidade genética destas espécies, se conseguirá alcançar com sucesso a conservação das mesmas.

Apesar dos avanços que vêm ocorrendo na área de reprodução assistida de animais selvagens desde a década de 90, ainda há muito a ser desenvolvido nessa área. As pesquisas demandam alto investimento em profissionais experientes, equipamentos e suprimentos, mas se justificam pelos resultados significativos que trazem à conservação de espécies ameaçadas de extinção. É necessário que haja também maior esforço de governos, órgãos financiadores, instituições de ensino e pesquisa e da comunidade científica para incentivar a pesquisa e o avanço tecnológico nessa área de conhecimento.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANIA, C. H.; SILVA, J. C. R.; HASHIMOTO, C. Y. et al. **Studbook dos grandes felinos brasileiros**: Registro genealógico da onça-pintada (*Panthera onca*) e suçuarana (*Puma concolor*) em cativeiro. Jundiaí: Conceito, 2005. 80 p.

ARCHER, J. **Animals Under Stress**. Southampton: Camelot press, 1979.

Anais do XI Congresso e XVII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens — ABRAVAS, 2008, Santos. **Exame andrológico e criopreservação de sêmen de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*)**. Santos, 2008. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/54275240/anais2008-abravas#download>. Acesso em: 10 jan 2017.

ANDRABI, S.M.H; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**. v.99, p.223-243, 2007.

BLOTTNER, S.; JEWGENOW, K. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. **Reprod Domest Anim**, v.42, p.536-540, 2007.

BLOOMSMITH, M.A; BRENT, L.Y; SCHAPIRO, S.J. Guidelines for Developing and Managing an Environmental Enrichment Program for Nonhuman-primates. In: **Laboratory Animal Science**, 1991.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODDRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.5- 13, 2006.

BROWN, J.L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**. v.66, p.25-33, 2006.

BROWN, J.L. Female reproductive cycles of wild female felids. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.155-162, 2011.

CARNEIRO, R.M.; BRANCO, E.; PINHEIRO, L.L. et al. Descrição morfológica do sistema reprodutor masculino de jaguatirica (*Leopardus pardalis*). **Biotemas**, 23(4): 83-89, dez 2010. Disponível em: [www.periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/17408](http://www.periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/17408). Acesso em: 10 jan 2017.

CONCANNON, P.; HODGSON, B.; LEIN, D. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. **Biology of Reproduction**, v.23, p.111–117, 1980. Disponível em: <http://www.biolreprod.org/content/23/1/111.full.pdf>. Acesso em: 10 jan 2017.

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**, v.126, p.809-816, 2003

DYCEE, K. M; SACK, W. O; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

DONOGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; SEAL, U. S., et al. In vitro fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*). **Biology of Reproduction**. v. 43, p. 33-44, 1990.

FILHO, E.S. **Bioteχνologias de reprodução na conservação de espécies animais selvagens: São realmente importantes?**. Disponível em: [www.kasa.org.br/projetoelias.doc](http://www.kasa.org.br/projetoelias.doc). Acesso em: 10 jan 2017.

FRANÇA, L. R.; YE, S. J.; YING, L., et al. Morphometry of rat germs cells during spermatogenesis. **The Anatomic Record**. v.241, p. 181-204, 1995.

FRANÇA, L.R; RUSSEL, L.D. the testis of domestic animals. In: REGADERA, J; MARTINEZ-GARCIA. **Male reproduction: A multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Livingstone, p. 197-219. 1998.

FURTADO, P.V. **Estudo da função ovariana em fêmeas de onça-intada (panthera onca, LINNAEUS, 1758) mantidas em cativeiro, por meio da extração e quantificação de esteróides fecais**. 2003. Dissertação (Pós- graduação em reprodução animal) — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GODINHO, C.L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros**. 1999. 124f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) — Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de ciências biológicas, Belo Horizonte, 1999.

GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

GRAHAM, L.H. Non-invasive monitoring of Reproduction in zoo and wildlife species. **Annual Review of Biomedicine Science**, v.6, p.91-98, 2004.

HAFEZ, B; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004.

HERRICK, J.R.; BOND, J. B.; MAGAREY, G. M., 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. **Biology of Reproduction**, v.76, p.858-870, 2007.

HOWARD, J.G.; BARONE, M. A.; DONOGHUE, A. M., et al. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. **Journal Reproduction Fertility**, v.96, p.175-86, 1992.

HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M.E. **Zoo and Wildlife Medicine**. 3.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1993.

HRIBAL, R.; JEWGENOW, K.; BRAUN, B.C.; COMIZZOLI, P. Influence of culture medium composition on relative mRNA abundances in domestic cat embryos. **Reprod. Dom. Anim.** v.48, p. 245-251, 2013.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OSLON, P.N.S. Semen collection, evaluation and preservation. In: **Johnston SD, Kustritz MVR, Oslon PNS. Canine and feline theriogenology**. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 2001. p.287-306.

LACERDA NETO, J.C.; BARBOSA, J. C.; LUNARDI, L. O., et al. Effects of surgical stress on the secretion of luteinizing hormone, testosterone and cortisol in the domestic cat (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.5, p.211-214, 2004.

LOPES, M.D. **Análise histológica, ultra-estrutural e avaliação da maturação nuclear de oócitos de gatas domésticas (*Felis catus*)**. 2002. 138f. Tese (Livre Docência em Reprodução animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo, 2002.

MAGALHÃES, Luis Carlos Oña. Uso de sêmen liofilizado de gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) para produção in vitro de embriões através da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). 2013. 109 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/115795>. Acesso em: 07 mar 2017

MARTINS, M.I.M.; JUSTINO, R.C. Criopreservação espermática em felinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.136-140, jan/mar. 2015. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/rbra/article/view/26690/27791>. Acesso em: 07 mar 2017.

MELLEN, J.D. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis* spp.): A multiple regression analysis. **Zoo Biology**, v.10, n.2, p.95- 110, 1991.

MICHELETTI T.; CUBAS, Z. S.; MORAES, W., et al. Reprodução assistida em felídeos selvagens – uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.408-417, out./dez. 2011. Disponível em: [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br). Acesso em: 10 jan 2017.

MORAIS, R.N.; MUCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L.H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J.L. Seasonal

analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, p. 2027-2041, 2002.

MORATO, R.G.; CRICHTON, E. G.; PAZ, R. C. R., et al. Ovarian stimulation and successful in vitro fertilization in the jaguar (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v.53, p.339, 2000.

MORATO, R.G.; GUIMARAES, M. A. B. V.; NUNES, A. L. V., et al. Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). **Brazilian Journal Veterinary Research animal Science**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 178-181, 1998.

MORATO, R.G.; MOURA, C.A.; CRAWSHAW JR., P.G. Inmobilización química de jaguares libres con una combinación de tiletamina y zolazepam. *In*: MEDELLIN, R. A.; CHETKIEWICZ, C.; RABINOWITZ, A.; REDFORD, K. H.; ROBINSON, J. G.; SANDERSON, E.; TABER, A. **El Jaguar en el nuevo milenio: una evaluación de su estado, detección de prioridades y recomendaciones para la conservación de los jaguares em America**. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México/Wildlife Conservation Society, 2002, p.63. Disponível em: [http://www.procarnivoros.org.br/pdfs/05.\\_Morato\\_et\\_alp.pdf](http://www.procarnivoros.org.br/pdfs/05._Morato_et_alp.pdf). Acesso em: 07 mar 2017.

MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAES, W. D., et al. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v.20, p.103-116, 2001.

MOREIRA, N.; BROWN, J. L.; MORAES, W., et al. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, v.26(6), p.441-460. 2007.

MURAKAMI, M.; OTOI, T.; KARJA, N.W.K.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 37, p. 352-356, 2002.

MOREIRA, N. Reprodução e estresse em felídeos silvestres. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.3, n.3, p.333-338, jul./set. 2007. Disponível em: [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br). Acesso em: 10 jan 2017.

PAULA, T.A.R. **Avaliação istológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**. 1999. 84f. Tese (Doutorado em morfologia) — Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de ciências biológicas, Belo Horizonte, 1999.

PAULA, T.A.R.; GUIÃO-LEITE, F.L. Rendimento intrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a produção espermática diária da onça parda (*Puma concolor*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. n.1, vol. 27, p.21-26, jan/mar 2003.

PAULA, T.A.R. Reprodução de carnívoros silvestres. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.130-132, abr./jun. 2011. Disponível em: [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br). Acesso em: 10 mar 2017.

PALATA, F.T. **Avaliação das condições dos recintos para onças pintadas (*Phantera onca*) e suas interferências no comportamento**. 2006. Disponível em: [www.spzoo.org.br/anais2007/4.pdf](http://www.spzoo.org.br/anais2007/4.pdf). Acesso em: 20 jan 2017.

PAZ, R.C.R.; ZUGUE R. M.; BARNABÉ, V. H., et. al. Avaliação da capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos. **Brazilian Journal of Veterinary Research And Animal Science**. São Paulo, v.37, n.6, dez. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php>. Acesso em: 9 jan 2017.

PAZ, R.C.R. **Bioteecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus***. 2004. 150f. Dissertação (Doutorado em medicina veterinária) — Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/>. Acesso em: 18 jan 2017.

PAZ, R.C.R.; SWANSON, W. F., DIAS, E. A., et al. Ovarian and immunological responses to alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Zoo Biology**, v.24, p.247-260, 2005.

PELICAN, K.M.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHY, B., et al. Ovarian control for assisted reproduction in the domesticcat and wild felids. **Theriogenology**, v.66, p.37-48, 2006.

PELICAN, K.M.; WILDT, D. E.; OTTINGER, M. A., et al. Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. **Domestic Animal Endocrinology**, v.34, p.160-175, 2008.

POPE, C.E.; GELWICKS, E. J.; WACHS, K. B., et al. Successful interspecies transfer of embryos from the indian desert cat (*Felis silvestris*) to the domestic cat (*Felis catus*) following *in vitro* fertilization. **Biology of Reproduction**. v.40, p.6, 1989.

POPE, C.E.; SCHMID, R.; DRESSER, D.L. In vitro development of cat embryos produced by in vitro fertilization is enhanced by addition of cysteine to the

maturation medium and a reduced O<sub>2</sub> atmosphere. **Theriogenology**. v.51, p.291(Abstr.), 1999.

POPE, C.E; GÓMEZ, M.C; DRESSER, B.L. In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century. **Theriogenology**, v.66, p.59-71, 2006.

PLATZ., C. C.; SEAGER, S. W. J. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 173, p. 1353-1355, 1978. Disponível em <http://189.126.110.61/cab/article/view/7965> . Acesso em: 07 mar 2017.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Planta, 2001.

RUIZ, R.L. Microbiologia e Reprodução. In: **Microbiologia Zootécnica**. 1 ed. São Paulo: Roca,1992.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, ed. especial, p. 70-84, 2000.

SILVA, A.S; MORATO, R.G; SILVA, L.D.M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.159-175, 2004.

SILVA, T.F.P. Sexual characteristics of domestic queens kept in a natural equatorial photoperiod. **Theriogenology**. v.66, p.1476-1481, 2006.

SILVA, T.F.P.; DIAS, C.G.A.; ACKERMANN, C.L. *et al.* Avaliação de segurança e analgesia de protocolos anestésicos para eletroejaculação em gatos domésticos (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n. 3. Disponível em: <http://189.126.110.61/cab/article/view/7965>. Acesso em 07 mar 2017.

SPINDLER, R.E, WILDT, D.E. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v.61, p.188-194, 1999.

SPINDLER, R.E.; CRICHTON, E. G.; AGCA, Y., *et al.* Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions. **Theriogenology**, v.66, p.82-92, 2006.

SWANSON, W.F.; HOWARD, J. G.; ROTH, T. L., *et al.* Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). **Journal of Reproduction Fertility**, 106 (1): 87- 94. 1996.

SWANSON, W.F.; PAZ, R. C. R.; MORAIS, R. N., *et al.* Influence of species and

diet on efficiency of in vitro fertilization in two endangered Brazilian felids - the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.593, 2002.

SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.21-34, 2004.

SWANSON, W.F. Application of assisted Reprod for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. **Theriogenology**, v.66, p.49-58, 2006.

SWANSON, W.F.; MAGGS, D. J.; CLARK, H. E., et al. Assessment of viral presence in semen and reproductive function of frozen-thawed spermatozoa from Palla's cat (*Otocolobus manul*) infected with feline herpesvirus. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37, p.336-346, 2006.

SWANSON, W.F. Laparoscopic Oviductal Embryo Transfer and Artificial Insemination in Felids — Challenges, Strategies and Successes. **Reprod. Dom. Anim.** v.47 (Suppl.6), p.136-140, 2012.

TEBET, J.M.; MARTINS, M. I. M.; CHIRINEA, V. H.; SOUZA, F. F.; CAMPAGNOL, D.; LOPES, M. D. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa, **Theriogenology**, v. 66, p. 1629-1632, 2006.

**The IUCN Red List of Threatened Species.** 2016. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/> . Acesso em: 12 mar 2017.

VILLAVERDE, A.I.S.B.; FIORATTI, E. G.; Ramos, R. S., et al. Blood and seminal plasma concentrations of selenium, zinc and testosterone and their relationship to sperm quality and testicular biometry in domestic cats. **Animal Reprod Sci**, v.150, p.50-55, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432014002449>. Acesso em: 07 mar 2017.

WILDT, D. E. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. **Zoo Biology**, 1: 17-20, 1989. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/>. Acesso em: 18 jan 2017.

WILDT, D.E.; ROTH, T.L. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. **Int Zoo Yrbk**, v.35, p.164-172, 1997.417.

ZAMBELLI, D.; PRATI, F.; CUNTO, M., et al. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. **Theriogenology**, v.69, p.485-490, 2008.