

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA INDUÇÃO DE INATIVIDADE  
OVARIANA EM GATAS DOMÉSTICAS**

**DÉBORA TRAMUJAS BALLAROTTI**

**CURITIBA**

**2005**

**DÉBORA TRAMUJAS BALLAROTTI**

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA INDUÇÃO DE INATIVIDADE OVARIANA EM  
GATAS DOMÉSTICAS**

**Dissertação apresentada como requisito à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias, pelo Curso de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias da Universidade  
Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Nei Moreira**

**CURITIBA**

**2005**

DÉBORA TRAMUJAS BALLAROTTI

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA INDUÇÃO DE INATIVIDADE OVARIANA EM  
GATAS DOMÉSTICAS

Dissertação aprovada no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da  
Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências Veterinárias, pela comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Nei Moreira  
Universidade Federal do Paraná  
Campus Palotina

Examinador: Prof.

Examinador: Prof.

Curitiba, 08 de agosto de 2005

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Nei Moreira pelos ensinamentos, dedicação e orientação.

Às gatas domésticas que tornaram possível o desenvolvimento deste estudo, e merecem todo respeito.

Aos felídeos selvagens, que são a razão do desenvolvimento deste estudo, e o incentivo para protegê-los nos leva ao desenvolvimento de mais pesquisas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio científico e financeiro.

Ao colega Médico Veterinário Wanderlei de Moraes pela dedicação, disponibilidade e ensinamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

À Itaipu Binacional pelo apoio e empréstimo do laparoscópio.

À Érika Cristiane Gutierrez Felipe, enquanto técnica do Laboratório de Dosagens Hormonais da USP, pela grande ajuda na realização das dosagens hormonais e pela dedicação e disponibilidade em receber-me.

Ao Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, por permitir a realização das dosagens hormonais no Laboratório de Dosagens Hormonais da USP.

Ao Prof. Dr. Roberto Rochadelli pelos ensinamentos e atenção.

À colega Elisângela pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao aluno Anderson Luiz de Carvalho, do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina, pelo apoio.

Ao colega Médico Veterinário Julio Cezar Juvenal pelo apoio.

À amiga e Médica Veterinária Laura pelo auxílio.

Ao colega e Médico Veterinário Renato H. Erdmann pelo auxílio e apoio.

Aos meus padrinhos Maria Luiza e Romualdo pela atenção, amor e apoio.

À querida Thalita pelo grande apoio.

Ao meu avô Alceo pelo amor e apoio, sempre.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram para a concretização desta meta.

Aos funcionários da Tolevet, Dna. Nair e Edvaldo, pela ajuda com a coleta das fezes das gatas.

Aos secretários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, Francisco Gerber e Maria José.

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe Adelaide, ao meu pai José, e ao meu irmão Gustavo, pelo amor, apoio e dedicação. Vocês são os principais responsáveis pela minha formação acadêmica e por hoje eu estar realizando mais um sonho!

Ao meu marido e querido amigo, além de tudo, colega Médico Veterinário Rodrigo. Somente o seu apoio, companheirismo, amor e dedicação tornaram possível a concretização deste trabalho.

Principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA OVARIANA ATRAVÉS DE LAPAROSCOPIA.....	7
2.2 CITOLOGIA VAGINAL .....	8
2.3 CONTROLE DO CICLO ESTRAL E INIBIÇÃO OVARIANA PRÉVIA À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	9
2.4 PROGESTÁGENOS.....	11
2.5 INDUÇÃO ARTIFICIAL DA OVULAÇÃO .....	15
2.6 MONITORAÇÃO HORMONAL NÃO-INVASIVA.....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	18
3.1 ANIMAIS.....	18
3.2 TRATAMENTO HORMONAL .....	19
3.3 ANESTESIA .....	21
3.4 INSERÇÃO E REMOÇÃO DO IMPLANTE .....	21
3.5 ACESSO LAPAROSCÓPICO PARA VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE OVARIANA .....	22
3.6 ANÁLISE HORMONAL FECAL .....	24
3.7 CITOLOGIA VAGINAL .....	26
3.8 ANÁLISE HORMONAL SÉRICA .....	28
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
<b>4 RESULTADOS</b> .....	29
4.1 INIBIÇÃO OVARIANA .....	29
4.2 PERÍODO DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM GONADOTROPINAS E PERÍODO APÓS A ESTIMULAÇÃO .....	29

4.3 PERÍODO APÓS A ESTIMULAÇÃO COM AS GONADOTROPINAS EXÓGENAS .....	30
4.4 COMPARAÇÃO DENTRO DOS GRUPOS.....	30
4.4.1 Grupo Controle .....	30
4.4.2 Grupo Levonorgestrel.....	31
4.4.3 Grupo Etonogestrel .....	31
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES HORMONAIS DURANTE O CICLO ESTRAL DAS FÊMEAS .....	32
4.6 RESULTADO DO EXAME LAPAROSCÓPICO .....	39
4.7 RESULTADO DA ANÁLISE HORMONAL SÉRICA .....	39
4.8 RESULTADO DA CITOLOGIA VAGINAL .....	39
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - GATO-MARACAJÁ – <i>Leopardus wiedii</i> .....	3
FIGURA 2 - GATO-DO-MATO-PEQUENO - <i>Leopardus tigrinus</i> .....	3
FIGURA 3 - JAGUATIRICA - <i>Leopardus pardalis</i> .....	3
FIGURA 4 - IMAGENS CAPTADAS POR SATÉLITE QUE MOSTRAM AS MUDANÇAS QUE A TERRA PASSOU DEVIDO À AÇÃO HUMANA – 1973 .....	4
FIGURA 5 - IMAGENS CAPTADAS POR SATÉLITE QUE MOSTRAM AS MUDANÇAS QUE A TERRA PASSOU DEVIDO À AÇÃO HUMANA – 2003 .....	5
FIGURA 6 - GATAS DOMÉSTICAS NOS GATIS INDIVIDUAIS NAS DEPENDÊNCIAS TOLEVET (ANO 2004).....	19
FIGURA 7 - LEVONORGESTREL ORAL (Pilem <sup>®</sup> ) .....	20
FIGURA 8 - IMPLANTE ETONOGESTREL (Implanon <sup>®</sup> ) .....	20
FIGURA 9 - INSERÇÃO DO IMPLANTE ETONOGESTREL EM GATA DOMÉSTICA .....	21
FIGURA 10 - GATA DOMÉSTICA APÓS A INSERÇÃO DO IMPLANTE .....	22
FIGURA 11 - VISUALIZAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS ATRAVÉS DE EXAME LAPAROSCÓPICO .....	23
FIGURA 12 - GATA DOMÉSTICA POSICIONADA PARA O EXAME LAPAROSCÓPICO .....	23
FIGURA 13 - INSERÇÃO DA AGULHA DE VERRES .....	23
FIGURA 14 - EXAME LAPAROSCÓPICO PARA VISUALIZAÇÃO DE ÚTERO E OVÁRIOS EM GATA DOMÉSTICA ( <i>Felis catus</i> ) .....	23
FIGURA 15 - PESAGEM DAS AMOSTRAS FECALIS .....	25
FIGURA 16 - PRIMEIRA ETAPA DE CENTRIFUGAÇÃO .....	25
FIGURA 17 - AMOSTRA FECAL APÓS FERVURA .....	25
FIGURA 18 - SEGUNDA ETAPA DE CENTRIFUGAÇÃO.....	25

FIGURA 19 - CENTRÍFUGA .....	25
FIGURA 20 - EXTRATO EM SOLUÇÃO NO ETANOL.....	25
FIGURA 21 - FLUXO DE SECAGEM COM BANHO-MARIA.....	25
FIGURA 22 - COLETA DE SANGUE EM GATA DOMÉSTICA .....	26
FIGURA 23 - COLORAÇÃO COM PANÓTICO DAS LÂMINAS DO ESFREGAÇO VAGINAL .....	27
FIGURA 24 - CÉLULA EPITELIAL VAGINAL PARABASAL (400 X – COLORAÇÃO PANÓTICO).....	27
FIGURA 25 – CÉLULAS EPITELIAIS VAGINAIS SUPERFICIAIS ANUCLEADAS (CORNIFICADAS) (400 X - COLORAÇÃO PANÓTICO).....	27
FIGURA 26 – CÉLULA EPITELIAL VAGINAL SUPERFICIAL NUCLEADA (400 X - COLORAÇÃO PANÓTICO) .....	27
FIGURA 27 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DA GATA DOMÉSTICA 1 DO GRUPO CONTROLE .....	32
FIGURA 28 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DA GATA DOMÉSTICA 2 DO GRUPO CONTROLE .....	33
FIGURA 29 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DA GATA DOMÉSTICA 3 DO GRUPO CONTROLE .....	33
FIGURA 30 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DA GATA DOMÉSTICA 4 DO GRUPO LEVONORGESTREL .....	34
FIGURA 31 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DA GATA DOMÉSTICA 5 DO GRUPO LEVONORGESTREL .....	34
FIGURA 32 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DA GATA DOMÉSTICA 6 DO GRUPO LEVONORGESTREL .....	35
FIGURA 33 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DA GATA DOMÉSTICA 7 DO GRUPO ETONOGESTREL.....	35
FIGURA 34 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DA GATA DOMÉSTICA 8 DO GRUPO ETONOGESTREL.....	36

FIGURA 35 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DA GATA DOMÉSTICA 9 DO GRUPO ETONOGESTREL.....	36
FIGURA 36 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DAS GATAS DOMÉSTICAS DO GRUPO C DURANTE O PERÍODO DE INIBIÇÃO OVARIANA DOS GRUPOS L, E .....	37
FIGURA 37 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DAS GATAS DOMÉSTICAS DO GRUPO L DURANTE O PERÍODO DE INIBIÇÃO OVARIANA COM O LEVONORGESTREL ORAL.....	37
FIGURA 38 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DAS GATAS DOMÉSTICAS DO GRUPO E DURANTE O PERÍODO DE INIBIÇÃO OVARIANA COM O IMPLANTE ETONOGESTREL.....	37
FIGURA 39 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DAS GATAS DOMÉSTICADO GRUPO C APÓS A AMINISTRAÇÃO DAS GONADOTROPINAS .....	38
FIGURA 40 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DAS GATAS DOMÉSTICADO GRUPO L APÓS A AMINISTRAÇÃO DAS GONADOTROPINAS .....	38
FIGURA 41 - PERFIL DA EXCREÇÃO FECAL DE ESTRÓGENOS DAS GATAS DOMÉSTICADO GRUPO E APÓS A AMINISTRAÇÃO DAS GONADOTROPINAS .....	38
FIGURA 42 - RESULTADOS DA CITOLOGIA VAGINAL REALIZADA NO MOMENTO DO EXAME LAPAROSCÓPICO DAS GATAS DOMÉSTICAS DOS GRUPOS C, L, E .....	40

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO DAS GATAS DOMÉSTICAS DO EXPERIMENTO NAS DEPENDÊNCIAS DA TOLEVET (ANO 2004) .....	18
TABELA 2 - VALORES REFERENTES ÀS CONCENTRAÇÕES BASAIS DE ESTRÓGENOS FECAIS DAS GATAS DOMÉSTICAS DURANTE O ESTUDO .....	32
TABELA 3 - RESULTADOS DO EXAME LAPAROSCÓPICO DAS GATAS DOS GRUPOS ETONOGESTREL, LEVONORGESTREL E CONTROLE (3 GATAS DOMÉSTICAS / TRATAMENTO) .....	39

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - RESULTADO DA DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA DURANTE O PERÍODO DE INIBIÇÃO OVARIANA DOS GRUPOS C, L, E .....	29
QUADRO 2 - RESULTADO DA DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA DURANTE O PERÍODO DE ESTIMULAÇÃO COM GONADOTROPINAS E APÓS DOS GRUPOS C, L, E .....	29
QUADRO 3 - RESULTADO DA DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA DURANTE O PERÍODO APÓS A ESTIMULAÇÃO COM GONADOTROPINAS DOS GRUPOS C, L, E .....	30
QUADRO 4 - RESULTADO DA DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA DURANTE O PERÍODO DE INIBIÇÃO OVARIANA, ESTIMULAÇÃO COM GONADOTROPINAS E APÓS A ESTIMULAÇÃO DAS GATAS DOMÉSTICAS DO GRUPO CONTROLE .....	30
QUADRO 5 - RESULTADO DA DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA DURANTE O PERÍODO DE INIBIÇÃO OVARIANA, ESTIMULAÇÃO COM GONADOTROPINAS E APÓS A ESTIMULAÇÃO DAS GATAS DOMÉSTICAS DO GRUPO LEVONORGESTREL .....	31
QUADRO 6 - RESULTADO DA DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA DURANTE O PERÍODO DE INIBIÇÃO OVARIANA, ESTIMULAÇÃO COM GONADOTROPINAS E APÓS A ESTIMULAÇÃO DAS GATAS DOMÉSTICAS DO GRUPO ETONOGESTREL .....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
CASIB	- Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional
CL	- Corpo lúteo ( <i>corpus luteum</i> )
CLs	- Corpos lúteos
CV	- Coeficiente de variação
DMS	- Diferença mínima significativa
DP	- Desvio padrão
E <sub>2</sub>	- Estrógeno
eCG	- Gonadotropina coriônica eqüina
EPM	- Erro padrão da média
GL	- Grau de liberdade
FIV	- Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	- Hormônio folículo-estimulante
GnRH	- Hormônio liberador de gonadotropinas
h	- Horas
hCG	- Gonadotropina coriônica humana
IA	- Inseminação artificial
Kg	- Quilogramas
LH	- Hormônio luteinizante
ng	- Nanogramas
P <sub>4</sub>	- Progestágeno
RIA	- Radioimunoensaio
SQ	- Soma dos quadrados
LDH	- Laboratório de Análises Hormonais
USP	- Universidade de São Paulo

## RESUMO

BALLAROTTI, D. T. **Avaliação de protocolos para indução de inatividade ovariana em gatas domésticas.** Curitiba, 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná.

Os pequenos felídeos neotropicais apresentam baixo desempenho reprodutivo em cativeiro e estão ameaçados de extinção. Como consequência do variável ambiente endócrino após a estimulação com gonadotropinas, os índices de prenhez após a inseminação artificial em felídeos selvagens não são satisfatórios. Atualmente, o controle do ciclo estral tem melhorado significativamente os índices de nascimento após a inseminação artificial em várias espécies. Devido ao gato doméstico ser utilizado extensivamente como animal modelo, apresentar similaridade na biologia reprodutiva, disponibilidade e por ser dócil, este estudo foi conduzido com esta espécie. O objetivo deste estudo consistiu em avaliar protocolos para aumentar a taxa de sucesso em programas de inseminação artificial em gatas domésticas, além de testar novos princípios ativos para indução da inatividade ovariana, como o levonorgestrel e etonogestrel prévia ao protocolo para inseminação artificial (eCG/hCG) em gatas domésticas. As fêmeas (n=9) foram divididas em três grupos, cada um com três animais, sendo: 1) controle (C), somente administração de eCG/hCG; 2) levonorgestrel oral (L) (0,075 mg) durante 37 dias + eCG/hCG; 3) etonogestrel (E), implante subdérmico durante 37 dias + eCG/hCG. As fêmeas foram submetidas ao exame laparoscópico 29-39 horas após a administração de hCG para verificação da resposta ovariana. No momento da laparoscopia foi realizado esfregaço vaginal para monitoração da fase do ciclo estral. Foram coletadas amostras de fezes 60 dias antes e 60 dias após a laparoscopia para dosagem hormonal de estrógenos. Os resultados foram avaliados através de análise estatística (comparação de médias). Para isto foi realizado Teste ANOVA, analisando-se os níveis de significância, os quais mostraram que o Grupo E (implante) apresentou inibição ovariana durante a sua utilização. Em contraste com o Grupo C e o Grupo L oral, o Grupo E apresentou inibição satisfatória das concentrações de estrógenos durante a sua utilização. O grupo L não apresentou inibição ovariana durante o tratamento, apresentando picos de estrógenos, e não apresentou diferença significativa em relação ao Grupo C. Todas as fêmeas do experimento apresentaram células epiteliais superficiais anucleadas e nucleadas características de estro no momento do exame laparoscópico. Ao exame laparoscópico foi observado que todas as fêmeas apresentaram folículos e 77% das gatas apresentaram corpo lúteo. No grupo etonogestrel as fêmeas apresentaram  $7,6 \pm 3,4$  folículos / gata e  $2,0 \pm 0,6$  corpos lúteos / gata, no grupo levonorgestrel foram observados  $4,0 \pm 0,6$  folículos / gata e  $5,0 \pm 1,5$  corpos lúteos, e no grupo controle  $6,3 \pm 1,4$  folículos / gata e  $1,5 \pm 0,5$  corpo lúteo. Concluiu-se que a utilização de implantes de etonogestrel em gatas domésticas mostrou-se eficaz, possibilitando a sua utilização prévia aos programas de inseminação artificial, aspiração folicular, bem como para a contracepção.

Palavras-chave: Inseminação artificial; ovário; felídeos selvagens; contracepção;

## **ABSTRACT**

BALLAROTTI, D. T. ***Protocols evaluation for ovarian inactivity induction in domestic cats.*** Curitiba, 2005, p. 65. Dissertation (Master's degree in Veterinary Sciences) - Federal University of Parana.

Reproductive success in endangered captive neotropical small felids species is very low. Due to great variability in endocrine environment post gonadotropin treatment, pregnancy rates are very low. Nowadays, ovarian activity control improves the AI success in many species. The domestic cat is a common model in programs of assisted reproductive technology for wild felids. In this study, new protocols were compared to improve the fertilization rates in artificial insemination programs in domestic cat. To induce ovarian inhibition, levonorgestrel and etonogestrel were used previous to gonadotropin treatment (eCG/hCG). Female domestic cats were divided in three treatments: 1) control (eCG/hCG); 2) levonorgestrel (0.075 mg) orally during 37 days + eCG/hCG; 3) etonogestrel subdermal implant during 37 days + eCG/hCG: laparoscopies were done 29-39 hours post hCG treatment to verify ovarian activity. Vaginal swabs were collected at laparoscopic procedures. Fecal samples were collected 60 days before and 60 days after the gonadotropin treatment for estradiol assay. Means comparisons were done by ANOVA test. Results demonstrated that etonogestrel (implant) and not oral levonorgestrel successfully suppressed ovarian activity. The levonorgestrel group did not show ovarian inactivity during the administration, presenting oestradiol peaks and without significant difference comparing to control group. All females presented anuclear and nuclear superficial vaginal epithelial cells at laparoscopies. At the laparoscopies etonogestrel females group showed  $7.6 \pm 3.4$  ovarian follicles/cat,  $2.0 \pm 0.6$  corpora lutea/ cat, levonorgestrel group  $4.0 \pm 0.6$  ovarian follicles/cat,  $5.0 \pm 1.5$  corpora lutea, and control group  $6.3 \pm 1.4$  ovarian follicles/cat,  $1.5 \pm 0.5$  corpora lutea. In conclusion, the etonogestrel implant used in the domestic cat it was efficient and can be used previous to gonadotropin protocol in artificial insemination programs, follicular aspiration and contraception .

Key-words: Artificial insemination; ovary; wild felids; contraception

## 1 INTRODUÇÃO

A família Felidae é um dos grupos de carnívoros com maior diversidade de espécies fenotipicamente díspares que vivem em diversas regiões geográficas. Há 37 espécies de felídeos selvagens no mundo, sendo que 23 destas (e suas subespécies) estão ameaçadas em pelo menos alguma porção de seu ambiente natural (OLIVEIRA, 1994).

Existem dez espécies de felídeos neotropicais, das quais oito ocorrem no Brasil: *Leopardus pardalis*, jaguatirica; *Leopardus tigrinus*, gato-do-mato-pequeno; *Leopardus wiedii*, gato-maracajá; *Oncifelis geoffroyi*, gato-do-mato-grande; *Herpailurus yagouaroundi*, gato-mourisco; *Oncifelis colocolo*, gato-palheiro; *Panthera onca* (onça-pintada) e *Puma concolor* (onça-parda), sendo que as duas últimas pertencem ao grupo dos grandes felídeos (OLIVEIRA, 1994). Em muitas espécies ameaçadas, determinadas populações devem ser mantidas em cativeiro, para permanecerem seguras do perigo da extinção, com a possibilidade de reintrodução futura. Para outras espécies, populações selvagens são mantidas em vida livre, mas muitas vezes o hábitat está fragmentado, limitando o intercâmbio genético (SWANSON e WILDT, 1997). As espécies de pequenos felídeos sul americanos apresentam baixo desempenho reprodutivo em cativeiro e estão sob alto risco de extinção na natureza. Segundo a Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira situam-se na categoria ameaçada (BRASIL, 2005).

As taxas de reprodução de pequenos felídeos nas populações de zoológicos brasileiros mostram que há baixos índices de nascimento, associados com alta mortalidade de filhotes nos primeiros trinta dias de vida. Considerando o alto valor genético da população de pequenos felídeos em cativeiro na América do Sul, e em razão de muitos indivíduos provenientes de vida livre serem de origem conhecida, aumenta obrigatoriamente, a necessidade de um programa de conservação destas espécies (SWANSON e WILDT, 1997).

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) tem reproduzido melhor em cativeiro do que as outras espécies de pequenos felídeos neotropicais, como o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) (SIMON et al., 1997). No entanto, as instituições que mantêm esses animais dispõem de poucos recintos, o que caracteriza a urgente necessidade da utilização de biotécnicas de reprodução para manutenção da variabilidade genética da população cativa.

As técnicas de reprodução assistida utilizada em felídeos consistem em coleta de sêmen pelo método de eletro-ejaculação, avaliação da função espermática, inseminação artificial (IA), coleta e maturação de oócitos, fertilização e cultivo, transferência de embriões, formação de bancos de genoma e monitoração de hormônios através de técnicas não invasivas (SWANSON e WILDT, 1997).

Embora as técnicas de reprodução assistida venham sendo aplicadas em diversos zoológicos do mundo, poucos trabalhos em felinos selvagens foram desenvolvidos até o momento no Brasil (MORATO e BARNABE, 1998).

O desenvolvimento efetivo de técnicas reprodutivas requer o conhecimento da fisiologia reprodutiva da espécie. A fisiologia reprodutiva de pequenos felídeos neotropicais não tem sido estudada extensivamente. A maioria dos estudos biológicos de felídeos tem focalizado o gato doméstico, que tornou-se modelo intensivamente utilizado (SWANSON e WILDT, 1997).

Em razão do gato doméstico ser utilizado extensivamente como um animal modelo, graças à similaridade na biologia reprodutiva, disponibilidade e por ser mais dócil que os felídeos selvagens (GOODROWE e WILDT, 1987), este estudo foi conduzido com essa espécie.

A meta deste estudo foi propiciar um melhor desempenho de gatas domésticas em programas de inseminação artificial com o controle sobre o ciclo reprodutivo. Tratamentos hormonais inéditos foram testados para a inativação ovariana temporária antes do protocolo para desenvolvimento folicular e indução da ovulação para a inseminação artificial. Sabe-se que a supressão do ciclo estral é indispensável para melhorar as taxas de fertilização em programas de inseminação artificial, em razão dos hormônios (secretados pelo ovário), interferirem com a terapia hormonal estabelecida. Portanto, neste estudo os esforços foram para desenvolver uma resposta hormonal mais uniforme, proporcionando um ambiente uterino mais adequado para a sobrevivência embrionária.

Este estudo integra um trabalho conjunto com o Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), o qual possibilita a futura aplicação dessas biotécnicas, desenvolvidas em gato doméstico, nas espécies ameaçadas de felídeos selvagens.

O CASIB destaca-se nos cenários nacional e mundial na manutenção e reprodução de pequenos felídeos neotropicais, especialmente a jaguatirica (Figura 1), gato-do-mato-pequeno (Figura 2) e gato-maracajá (Figura 3).

Através de contínuos avanços em reprodução assistida com espécies de felídeos selvagens ameaçados de extinção, cada vez mais, procedimentos têm sido efetuados para a propagação e manejo destas espécies (SWANSON, 2003).

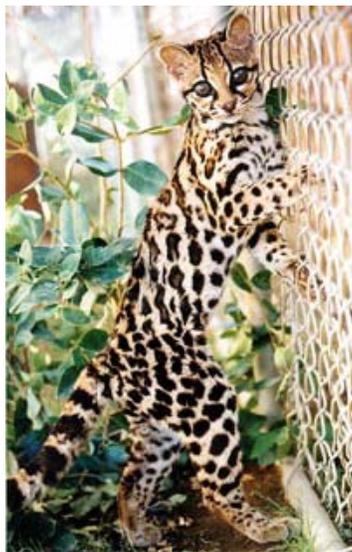


Fig. 1 - Gato maracajá - *Leopardus wiedii*.



Fig. 2 - Gato-do-mato-pequeno – *Leopardus tigrinus* .



Fig. 3 - Jaguatirica - *Leopardus pardalis*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As 10 espécies de felídeos selvagens que ocorrem na América Latina estão em extinção devido à perda de hábitat, caça e condições de cativeiro inapropriadas. Nos últimos 10 anos, a conservação desses felídeos tem sido o foco primário de pesquisas em reprodução e programas de treinamento no Brasil, México e Estados Unidos (SWANSON e BROWN, 2004).

Na tríplice fronteira, as pressões agrícola e urbana extinguiram o verde na porção paraguaia e ameaçam o Parque Nacional do Iguaçu, no Brasil (Figuras 4 e 5) (AMORIM, 2005).



FONTE: Phuma, USGS, Nasa, apud AMORIM (2005)

Fig. 4 - Imagens captadas por satélite que mostram as mudanças que a terra passou devido à ação humana – 1973



FONTE: Pnuma, USGS, Nasa, apud AMORIM (2005)

Fig. 5 - Imagens captadas por satélite que mostram as mudanças que a terra passou devido à ação humana – 2003

As técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial, consistem em uma ferramenta auxiliar para o manejo de espécies ameaçadas de extinção ( e indivíduos com dificuldade de acasalamento devido à incompatibilidade comportamental ou impedimento físico/médico). Essa técnica pode aumentar a diversidade genética de uma população e expandir o “pool” genético através de cruzamentos de indivíduos selecionados, além de possibilitar o intercâmbio seguro entre diferentes localizações geográficas, sem o risco e o custo do transporte de animais vivos (GOODROWE e WILDT, 1987).

Devido à inseminação artificial vaginal ou transcervical em gatos domésticos raramente resultar em prenhez, a maioria dos procedimentos de inseminação artificial é realizado através de laparoscopia. A inseminação artificial laparoscópica permite a visualização dos ovários, a certificação da ocorrência da ovulação e a deposição espermática dentro do corno uterino adjacente ao ovário com corpo(s) lúteo(s). O procedimento básico de inseminação artificial por laparoscopia é similar entre as

espécies, utilizando o mesmo equipamento e gonadotropinas exógenas. A gonadotropina coriônica eqüina (eCG) pode ser utilizada para induzir o desenvolvimento folicular e a gonadotropina coriônica humana (hCG) para induzir a ovulação. As dosagens dessas gonadotropinas e o tempo de inseminação devem ser determinados para cada espécie (SWANSON e WILDT, 1997).

A inseminação artificial foi amplamente utilizada para produzir filhotes viáveis em várias espécies de felídeos. Como consequência da variável resposta ovariana após a estimulação com gonadotropinas, os índices de prenhez ainda não são satisfatórios. Atualmente, o controle do ciclo estral tem melhorado significativamente os índices de fertilidade na IA (PELICAN et al., 2002).

Apesar de pesquisas com o gato doméstico serem válidas para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida, variações espécie-específicas determinam a necessidade de pesquisa básica para cada espécie de felídeo selvagem.

A IA tem alcançado maior sucesso em guepardos do que nas outras espécies de felídeos selvagens, pois, durante os últimos quinze anos, esta espécie tem sido o foco de intensivo estudo multi-disciplinar e cooperativo que inclui análises genéticas, estudos reprodutivos, endócrinos e sobrevivência individual em alta escala, tanto em cativeiro, quanto em vida livre (WILDT e ROTH, 1997).

Uma das razões para as fêmeas de guepardo terem apresentado maior índice de sucesso em programas de inseminação artificial, é o fato de que os ovários desta espécie estão freqüentemente quiescentes (WILDT e ROTH, 1997). Esta inatividade faz com que o ovário responda de forma mais consistente à administração de gonadotropinas exógenas (eCG/hCG), talvez devido à presença de alguns folículos ativos e nenhum tecido lúteo produzindo esteróides endógenos, os quais potencialmente interferem na ação das gonadotropinas exógenas (BROWN et al., 1995).

No presente estudo foram utilizados o levonorgestrel e o etonogestrel, progestágenos que atuam em receptores intracelulares no cérebro, inibindo indiretamente a função pituitária e com efeitos na função ovariana. A verificação dos efeitos destes hormônios sobre a atividade ovariana de gatas domésticas foi realizada através da análise de estrógenos fecais, laparoscopia e citologia vaginal.

## 2.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA OVARIANA ATRAVÉS DE LAPAROSCOPIA

Atualmente, procedimentos minimamente invasivos são rotineiramente utilizados em Medicina com o objetivo de diminuir alguns inconvenientes relacionados à cirurgia convencional. Entre estes procedimentos, encontra-se a cirurgia laparoscópica. Estudos demonstram sua superioridade em relação à aparência estética, aos custos hospitalares, à dor pós-operatória, às complicações trans e pós-operatórias, à recuperação pós-operatória e ao período de hospitalização. Em Medicina Veterinária, poucos estudos descrevem o emprego da cirurgia laparoscópica em casos clínicos, porém bons resultados têm sido observados (BRUN & BECK, 1999).

A laparoscopia tem sido adaptada para espécies de diversos tamanhos, desde ratos até gorilas. A primeira utilização da laparoscopia na maioria das espécies, incluindo o cão e o gato, foi para o estudo das funções reprodutivas. Uma ampla variedade de instrumentos está disponível para a laparoscopia de caninos e felinos. Para exames de rotina, são necessários a ótica, cânula, trocáter, agulha de Verres, fonte de luz e cabo flexível de fibra ótica (WILDT, 1980).

Para a inseminação artificial laparoscópica, o animal deve ser anestesiado, posicionado na mesa cirúrgica e ajustado num ângulo de 30 graus, com a região posterior elevada. Por meio deste posicionamento, os órgãos abdominais movem-se cranialmente, dessa forma há uma melhor visualização dos órgãos reprodutivos. A agulha de Verres é inserida através do lado abdominal direito para o interior da cavidade e um insuflador é adaptado à agulha de Verres para insuflar CO<sub>2</sub> ou ar ambiente para dentro da cavidade abdominal. Um pneumoperitônio é estabelecido antes da inserção do trocáter. Após a insuflação do abdômen é realizada uma incisão mediana, cranialmente à cicatriz umbilical para a inserção do trocáter em um ângulo de 30 graus, no plano longitudinal do animal. O insuflador é removido da agulha de Verres e inserido na cânula. Desta forma, a agulha pode ser utilizada para a manipulação dos órgãos (WILDT, 1980).

O procedimento laparoscópico permite um rápido e simples acesso à atividade ovariana em gatas domésticas e tem facilitado estudos relacionando a morfologia ovariana a fatores da reprodução.

Inicialmente, a laparoscopia era utilizada para observar as seqüências de mudanças dos folículos ovarianos e corpos lúteos (CLs) através do ciclo reprodutivo. Atualmente, as informações obtidas são utilizadas para o estudo dos efeitos das

gonadotropinas exógenas na atividade ovariana, a relação entre a morfologia ovariana e o comportamento sexual, e mudanças endócrinas durante o estro, fase lútea e prenhez. Os exames através de laparoscopia em gatas não produziram nenhum efeito no ciclo estral ou funções endócrinas. Em programas de inseminação artificial, a laparoscopia é extremamente útil, pois possibilita a deposição espermática diretamente no útero (WILDT, 1980).

## 2.2 CITOLOGIA VAGINAL

A citologia vaginal é uma técnica simples que pode ser utilizada para monitorar a progressão do ciclo estral em cadelas e gatas (THRALL & OLSON, 1999).

Em razão da necessidade de métodos não invasivos tratando-se de felídeos selvagens, a citologia vaginal é muito utilizada em pesquisas. O epitélio vaginal é responsivo às mudanças do estrógeno circulante e as mudanças na citologia vaginal podem ser interpretadas como uma mensuração indireta das concentrações de estrógeno circulante. A partir do aumento da concentração de estrógeno circulante, as células aumentam e o núcleo diminui, podendo algumas vezes desaparecer (PARAKKAL e GREGORIE, 1972).

As avaliações diárias ou em dias alternados da mucosa vaginal são muito importantes para o manejo de fêmeas, pois possibilitam a definição do momento apropriado para o acasalamento e manejo reprodutivo. As mudanças das células esfoliativas da vagina são observadas em esfregaços simples e rápidos que permitem estimar a progressão do desenvolvimento folicular e secreção de estrógenos durante o proestro e estimar dessa forma o início e o final do período fértil (BURKE, 1986).

Em razão de ser alvo dos hormônios ovarianos, o epitélio vaginal modifica-se de duas a quatro camadas de espessura a multicamadas de epitélio durante o estro, resultando numa esfoliação de um grande número de células do epitélio superficial. As células são obtidas através da passagem de um *swab* na região caudal da vagina. O *swab* deve ser direcionado crânio dorsalmente quando estiver na vagina. Uma vez cranial ao orifício uretral, o *swab* é friccionado contra a parede vaginal. O vestíbulo e a fossa clitoral devem ser evitados, pois as células superficiais destas áreas podem alterar a interpretação citológica. As células devem então ser transferidas para uma lâmina de vidro através de rolamento gentil do *swab* (THRALL & OLSON, 1999).

O esfregão pode ser fixado imediatamente (1 a 2 segundos) através da imersão da lâmina em um líquido fixador ou com a utilização de *spray* fixador de uso comercial (BURKE, 1986).

Após secas, as lâminas podem ser coradas com a técnica de Schorr (1940) ou Wright's-Giemsa (Diff-Quik). São contadas 100 células epiteliais por lâmina, incluindo células superficiais nucleadas e anucleadas, células intermediárias e células parabasais, segundo a classificação de HERRON (1977).

As características da citologia vaginal em gatas domésticas são similares às de cadelas, no entanto, hemácias não são visualizadas na fase de proestro e os neutrófilos são raramente encontrados na fase de diestro. No período de estro as células superficiais anucleadas são predominantes e as células parabasais e intermediárias são presentes em pequeno número. As células epiteliais vaginais tornam-se progressivamente cornificadas quando as concentrações de estradiol aumentam. A proporção de células anucleadas superficiais aumenta 10% no primeiro dia do estro, e em torno de 40% no quarto dia, atingindo 60% do total de células durante este período. As células intermediárias diminuem em torno de 10% durante os quatro primeiros dias do estro. No início da fase de prenhez ou pseudoprenhez, as células parabasais reaparecem. Na fase final do estro ou no início da pseudoprenhez, pouca quantidade de neutrófilos pode ser verificada (THRALL e OLSON, 1999).

### 2.3 CONTROLE DO CICLO ESTRAL E INIBIÇÃO OVARIANA PRÉVIA À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Atualmente, em programas de IA com felídeos selvagens observa-se alta variabilidade de resposta ovariana às gonadotropinas exógenas, utilizadas para estimular o crescimento folicular e a ovulação (ROTH et al., 1997).

As gonadotropinas exógenas interferem no ambiente endócrino, interrompendo a maturação de oócitos, o desenvolvimento e a implantação embrionária. Estudos em várias espécies têm mostrado que perfis endócrinos anormais podem resultar em um ambiente folicular anormal, causando qualidade inferior de oócitos, redução da implantação embrionária e, conseqüentemente, insucesso nos resultados de prenhez (SMITZ et al., 2001). Os parâmetros associados com a diminuição da fertilidade em algumas espécies incluem hiperestimulação ovariana, causando elevadas

concentrações de estradiol, produção prematura e excessiva de progesterona e luteólise prematura (FOSSUM et al., 1989).

Para o maior sucesso em programas de reprodução assistida deve-se buscar o controle do ciclo ovariano. A ovulação pode ser induzida por vários métodos em gatas, controlando assim a fertilidade (COLBY, 1970).

A estimulação com gonadotropinas em felídeos é comumente associada ao desenvolvimento de CLs e folículos acessórios, resultando em prolongadas e elevadas concentrações de estradiol (ROTH et al., 1997) e excessiva produção de progesterona. As pesquisas realizadas com gatos domésticos indicaram que elevações prolongadas nas concentrações de estradiol inibem o transporte de embriões no oviduto (GRAHAM et al., 2000).

Apesar da gata doméstica ser classificada como uma ovuladora induzida e ovular aproximadamente 24 horas após o coito, recentes pesquisas demonstraram que várias espécies de felídeos podem apresentar ovulações espontâneas (GUDERMUTH et al., 1997). Em casos de ovulação espontânea, há formação do CL, o qual bloqueia a resposta ovariana à subsequente estimulação com gonadotropinas (BROWN et al., 1995).

Em humanos, efetuando-se a inibição do ciclo antes da indução da ovulação obtém-se um efeito mais uniforme e efetivo em programas de fertilização *in vitro* (FIV), resultando em altas taxas de recuperação de oócitos, melhorando a embriogênese e sucesso da gestação (BARBIERI e HORNSTEIN, 1999).

A inibição folicular é a maneira mais lógica para a regulação da função ovariana em felídeos. A habilidade em suprimir a atividade cíclica, prévia à estimulação ovariana via terapia hormonal, tem aumentado o sucesso da reprodução assistida em ruminantes domésticos e não-domésticos (MORROW et al., 2000), eqüinos (LOFSTEDT e PATEL, 1989), suínos (WOOD et al., 1992), primatas (KENIGSBERG et al., 1984) e humanos (DAMARIO et al., 1997).

Algumas pesquisas demonstraram que a resposta do gato doméstico às gonadotropinas exógenas pode ser otimizada quando as fêmeas são pré-tratadas para induzir a inatividade ovariana, prévia ao estímulo com gonadotropinas exógenas (DONOGHUE et al., 1992). Há também evidência de que o guepardo, uma espécie que cicla intermitentemente, e que apresenta-se em anestro durante a maior parte do ano, possui alto sucesso de fertilização em programas de IA, com a utilização de gonadotropinas exógenas (HOWARD et al., 1997; 1992). Portanto, o controle do ciclo

estral associado com a resposta do ovário ao estímulo às gonadotropinas em felídeos, poderia ser testado em gata doméstica, buscando uma resposta similar ao que ocorre naturalmente no guepardo (PELICAN et al., 2002).

Em resumo, a inativação ovariana é utilizada para a obtenção de resposta mais homogênea ao estímulo das gonadotropinas exógenas. Na ausência da manutenção de gonadotropinas, o ovário que sofreu a reação de *feedback* negativo contém folículos primários, assim como os folículos que continuam desenvolvendo-se, independente da ação de gonadotropinas. O resultado é uma população de folículos antrais recentes altamente suscetíveis à estimulação por gonadotropinas (ZELEZNIK, 2001).

## 2.4 PROGESTÁGENOS

Os agentes mais comuns utilizados para o controle do ciclo estral em outras espécies são os implantes contendo progestágenos na forma de dispositivos intravaginais ou subcutâneos em ruminantes (MORROW et al., 2000), progestágenos orais em eqüinos e suínos (RHODES, 1991), e análogos do GnRH, provocando o *feedback* negativo na pituitária antes da estimulação ovariana em mulheres (SAUER et al., 1997).

Os progestágenos têm sido muito utilizados em programas de reprodução para controlar e sincronizar o estro. Em bovinos e outros ungulados, a progesterona, o acetato de melengestrol ou o acetato de medroxiprogesterona têm sido utilizados em combinação com prostaglandinas e estrógenos para suprimir a ovulação e sincronizar o estro em programas de IA ou transferência de embriões (CHAGAS et al., 2002).

O acetato de meggestrol tem sido prescrito para diversas situações terapêuticas em gatas domésticas, incluindo a supressão do estro, como contraceptivo. Os implantes de acetato de meggestrol foram utilizados como contraceptivos em 23 espécies de felídeos, incluindo o gato doméstico, leão, tigre e guepardo (TURNER & KIRKPATRICK, 1991).

As altas doses de progesterona causam *feedback* negativo no eixo hipotalâmico – hipofisário, alterando a produção de GnRH e a síntese e liberação de FSH e LH. Há também a diminuição da população de receptores de GnRH e a afinidade do GnRH aos seus receptores (TURZILLO e NETT, 1999).

Em ovuladores induzidos, a inibição do *feedback* requer concentrações basais de estrógeno para sintetizar receptores de progesterona em tecidos-alvos. De acordo

com o aumento das doses de progesterona (mimetizando aumento endógeno de atividade luteal), diminui a frequência dos pulsos de GnRH e da gonadotropina subsequente, com posterior diminuição da amplitude do pulso (WOLFE et al., 1989). Os progestágenos também agem nos tecidos periféricos diminuindo o número de receptores de estrógeno, alterando a fisiologia renal, adrenal e gastrointestinal, influenciando o comportamento reprodutivo e induzindo a consistentes alterações como a hipertrofia uterina, aumento das secreções uterinas e supressão do crescimento folicular. Também agem diretamente no ovário causando moderada esteroidogênese (GRAHAM e CLARKE, 1997).

Há também evidências dos efeitos deletérios ao organismo associados à terapia com progestágenos. Em felídeos, a longa exposição (> 5 anos) tem sido associada à piometra, hiperplasia endometrial e neoplasia uterina. O uso durante curto período de acetato de megestrol causa disfunção endócrina, incluindo supressão adrenocortical, ganho de peso, desenvolvimento mamário, perda de pêlo e diabetes *melitus* (MUNSON e MANSON, 1991).

Em felídeos, a presença de folículos pode prevenir uma resposta uniforme ao protocolo de indução da ovulação em programas de reprodução assistida (GOODROWE et al., 1989).

Para suprimir a atividade ovariana, o protocolo hormonal deve inibir qualquer atividade cíclica dos ovários durante a sua utilização e então retornar à atividade normal após a supressão de sua utilização. Em razão dos protocolos hormonais serem testados em animais, devem ser seguros e de fácil administração. Os progestágenos seguem estes critérios, os quais inibem a atividade reprodutiva via *feedback* negativo do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (PELICAN et al., 2002).

Os progestágenos sintéticos têm sido desenvolvidos para minimizar estes efeitos colaterais, como por exemplo, o levonorgestrel, o qual é mais seguro comparado aos antigos progestágenos, como o acetato de megestrol (SIVIN, 1994).

Os implantes de levonorgestrel têm sido utilizados extensivamente para a contracepção em humanos, mostrando grande eficácia e segurança. Após a colocação do implante, a contracepção é rapidamente atingida, com níveis de levonorgestrel no sangue algumas horas após a sua inserção, atingindo concentrações de contracepção em três dias. Os níveis de liberação são altos (60-85 microgramas/dia) durante o primeiro mês, diminuindo durante o primeiro ano a aproximadamente 30 microgramas/dia (devido à encapsulação e fibrose de tecido em torno do implante)

(FOTHERBY, 1995). Em mulheres, após a remoção do implante, o levonorgestrel é rapidamente eliminado da circulação e o término do tratamento é atingido dentro de 96 horas e a ovulação pode ocorrer em torno de 4 dias.

Estudos utilizando implantes de levonorgestrel em gatas domésticas indicaram que o mesmo inibe picos de estradiol e ovulação espontânea, apresentando resultados satisfatórios ao melhorar a resposta ovariana ao estímulo com gonadotropinas em programas de reprodução assistida. Em gatas domésticas, a supressão do ciclo estral através da utilização do hormônio levonorgestrel, prévia ao protocolo de inseminação artificial, melhora a resposta ovariana ao eCG e hCG (PELICAN et al., 2002).

Verificou-se em um experimento com quatro gatas domésticas, as quais foram tratadas com levonorgestrel e agrupadas com a presença de um macho, que o estro foi suprimido e não houve nenhuma prenhez. Outros estudos realizados com gatas domésticas revelaram que os implantes de levonorgestrel inibiram o comportamento de estro e a ovulação durante um ano, com poucas alterações uterinas e nenhum distúrbio endócrino, como os que ocorrem com a utilização do acetato de megestrol. Uma injeção de levonorgestrel de longa ação previne a gestação por 36 semanas em gatas, e diminui as concentrações de estradiol circulante. Apesar do levonorgestrel na forma de implante (Norplant<sup>®</sup>) estar associado com o crescimento folicular e até mesmo a ovulação em algumas mulheres, há evidências de que altas doses causam maior inibição ovariana. Enquanto que baixas doses de progesterona podem estimular a pituitária e aumentar o número de pulsos de LH, o aumento da dose de progesterona provoca um progressivo aumento dos intervalos e amplitude dos pulsos de GnRH e LH (BALDWIN et al., 1994).

Inicialmente, os implantes subdérmicos impediam a ovulação somente durante o primeiro ano. Após este período, a proteção contraceptiva era fornecida principalmente pelo aumento da viscosidade do muco cervical. O implante de bastonete único com etonorgestrel foi desenvolvido com o intuito de realizar a completa inibição da ovulação. Com o desenvolvimento dos polímeros sintéticos, foi possível desenvolver sistemas de liberação com longa duração de ação, os quais liberam continuamente quantidades baixas de hormônios. O desenvolvimento desse tipo de sistema, sob a forma de um implante subdérmico (Implanon<sup>®</sup>, Organon do Brasil), baseado no progestágeno etonogestrel, ilustra a contínua pesquisa de métodos contraceptivos inovadores. As vantagens desse método contraceptivo incluem eficácia não superada, independência da aderência da usuária e imediato retorno à fertilidade após a remoção (CROXATTO e MAKARAINEN, 1998).

Em mulheres, a fim de manter uma taxa de liberação requerida de 30 microgramas do etonogestrel ao dia, para uma duração projetada de uso de três anos, determinou-se que era necessária uma taxa de liberação inicial de aproximadamente 60 microgramas ao dia. O perfil da taxa de liberação “*in vitro*” deste implante é de aproximadamente 60-70 microgramas ao dia de etonogestrel durante a semana 5-6, diminuindo para aproximadamente 35-45 microgramas ao dia no final do primeiro ano, 30 a 40 microgramas ao dia no final do segundo ano e 25-30 microgramas ao dia no final do terceiro ano. As concentrações séricas de etonogestrel aumentam rapidamente nos primeiros quatro dias após a inserção, atingindo no primeiro dia níveis suficientes para a inibição da ovulação. (HUBER, 1998).

Os contraceptivos a base de progestinas obtêm sua eficácia através do efeito inibidor da ovulação sobre o hipotálamo e a glândula pituitária. A supressão da secreção de gonadotropinas (LH e FSH) evita a ovulação. Conseqüentemente, o corpo lúteo está ausente e as concentrações de progesterona natural estão baixas. A inibição da ovulação pode ser determinada pela ausência de um pico de LH, supressão do desenvolvimento folicular e da produção de estradiol (MCCANN e POTTER, 1994).

Embora a ovulação seja efetivamente inibida por etonogestrel (Implanon<sup>®</sup>, Organon do Brasil), pode ainda estar presente uma substancial atividade ovariana. Em mulheres, a atividade ovariana pode ser avaliada pelas concentrações de gonadotropina (FSH, LH), E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>, pela monitoração do desenvolvimento folicular por ultra-sonografia. Nos estudos farmacodinâmicos de Implanon<sup>®</sup>, foi constatado que as concentrações séricas de FSH eram comparáveis às observadas na fase folicular normal. Além disso, as concentrações séricas de E<sub>2</sub> diminuiriam acentuadamente durante as primeiras quatro semanas após a inserção do implante, mas começaram gradualmente a se elevar seis meses após a inserção. A presença de folículos pré-ovulatórios que secretam quantidades normais de E<sub>2</sub> sugere bioatividade normal de FSH durante o uso do etonogestrel (Implanon<sup>®</sup>, Organon do Brasil), e que a atividade ovariana está presente. A ausência de ovulação e a alta eficácia contraceptiva assegurada por Implanon<sup>®</sup> (Organon do Brasil) sugerem que o etonogestrel previne adequados picos de LH. Isso resulta em uma situação na qual a ovulação é inibida e o E<sub>2</sub> endógeno é normalmente sintetizado. Portanto, durante o uso de Implanon<sup>®</sup> (Organon do Brasil) não foram observados em mulheres sintomas e efeitos de deficiência estrogênica sobre a densidade mineral óssea (DAVIES et al., 1993).

## 2.5 INDUÇÃO ARTIFICIAL DA OVULAÇÃO

O interesse pelo ciclo estral e indução da ovulação em gatas domésticas está principalmente relacionado ao comportamento sazonal e atividade sexual. Normalmente gatas domésticas exibem estros irregulares, períodos interrompidos, ou nenhum comportamento sexual. Os métodos para induzir o estro e a ovulação podem ser particularmente importantes para a reprodução de fêmeas que apresentam prolongados períodos de inatividade sexual ou falhas durante a ovulação (WILDT et al., 1978).

O objetivo da administração de hormônios é estimular a função reprodutiva, incluindo estro e ovulação. A administração de estrógenos ou compostos relacionados podem produzir intensa influência no estro, os quais podem também estimular a função ovariana, incluindo a ovulação. O processo de ovulação em todas as espécies de mamíferos inclui dois componentes distintos: o desenvolvimento e maturação de folículos ovarianos e subsequente ovulação e formação de corpo lúteo (CL). A formação e o desenvolvimento de folículos ovarianos são ocasionados primeiramente através de estímulos da secreção de FSH pela glândula pituitária. A pituitária também regula o processo ovulatório pela secreção de LH durante o estágio avançado do período pré-ovulatório do ciclo estral. O comportamento de estro e a receptividade sexual são conseqüências diretas do aumento de estrógenos foliculares na gata doméstica. Muitas preparações hormonais podem mimetizar as atividades endógenas de FSH e LH e têm sido utilizadas extensivamente para este propósito em várias espécies de mamíferos. Estes compostos hormonais incluem FSH suíno, gonadotropina coriônica eqüina (eCG), gonadotropina coriônica humana (hCG) e hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH). O hCG isolado da urina de mulheres grávidas tem sido utilizado rotineiramente para induzir a ovulação, freqüentemente em combinação com o eCG. Foi observado que a combinação da administração de eCG e hCG induz estro em fêmeas em anestro. Em um estudo com 25 gatas domésticas, a administração de injeções intramusculares de 250 a 500 UI de eCG/dia (20 UI de eCG/Kg/dia) durante dez dias combinada com 500 UI de hCG no décimo dia induziu o estro e a ovulação em 14 das 25 fêmeas de gatas domésticas (SEAGER et al., 1980).

A administração de gonadotropinas exógenas para induzir a ovulação, visando otimizar as taxas de fertilização em programas de inseminação artificial, resultaram em prenhez em gato-do-mato-pequeno e jaguatirica, representando a primeira inseminação

artificial com sucesso na América Latina e o primeiro nascimento de filhote de gato-domato-pequeno por IA. Os índices de prenhez, taxas de fertilização e filhotes viáveis ainda são baixas em felídeos tratados com gonadotropinas exógenas (eCG/hCG). As dosagens são espécie-específicas e requerem o ajuste de acordo com a espécie. As doses baixas são ineficazes, enquanto superdosagens podem causar o risco de superovulação e desequilíbrio hormonal (MORAES et al., 1997).

Pesquisas realizadas com objetivo de obter bons resultados em programas de IA para felídeos identificaram dois aspectos cruciais para melhorar os índices de prenhez: a realização da inseminação artificial após o início da ovulação e o uso de mínimas doses de eCG e hCG para ocorrer a ovulação, desta forma prevenindo a hiperestimulação ovariana, a qual impede a ovulação (HOWARD et al., 1996).

## 2.6 MONITORAÇÃO HORMONAL NÃO-INVASIVA

As técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial, estão aumentando sua importância para o manejo de espécies selvagens em cativeiro, portanto, a monitoração de metabólitos esteróides tem sido especialmente útil para verificar a eficiência das terapias com associações hormonais. A habilidade em atingir a atividade gonadal é essencial para o entendimento dos fundamentos da reprodução. A monitoração dos metabólitos esteróides através das fezes foi estabelecida como ferramenta para a avaliação dos processos reprodutivos em diversas espécies de mamíferos, incluindo os felídeos. Foram utilizados gatos domésticos como modelo para análises fecais (radioimunoensaio) de metabólitos de estradiol, progesterona, testosterona e cortisol, revelando que mais de 85% dos metabólitos foram excretados através das fezes. Uma das principais vantagens da monitoração dos metabólitos hormonais através das fezes é de ser um método não-invasivo, possibilitando a coleta da amostra sem que o animal seja submetido à anestesia ou sedação. Além disso, os cientistas não se deparam com limitações com relação ao número de amostras a serem obtidas, as quais podem ser coletadas rotineiramente, possibilitando o acesso à atividade reprodutiva de um indivíduo ou de uma população. O entendimento da endocrinologia básica dos felídeos ameaçados pode ser utilizado para melhorar estratégias de manejo. A técnica não invasiva de monitoração de hormônios fecais é uma das mais importantes ferramentas disponíveis em centros de pesquisas em zoológicos nos dias de hoje (BROWN et al., 2001).

O radioimunoensaio (RIA) é um método desenvolvido para medir a concentração de um hormônio particular ou proteína (ex.: esteróides, receptores, etc.) em uma determinada amostra (urina, extrato fecal, soro, etc.). O método utiliza a especificidade dos anticorpos para ligarem-se a certas estruturas denominadas antígenos (CHARD, 1989).

Segundo a descrição de BROWN et al. (1995), os esteróides são extraídos do material fecal úmido ou através da liofilização, pulverização da amostra colhida e a padronização do peso do material fecal a ser utilizado. As amostras são liofilizadas durante 24 h com auxílio do aparelho evaporador giratório. Em seguida, uma alíquota de 0,2 g de fezes secas é fervida em 5 mL de etanol 90% (90% etanol: 10% água destilada) por 25 minutos. Durante este tempo, o etanol evaporado é gradativamente repostado para que nenhuma amostra fique seca, de forma que ao final desta etapa o volume inicial seja mantido. Após centrifugação por 15 minutos a 500G, o sobrenadante é recuperado e o *pellet* resultante é ressuspendido em 5 ml de etanol (90%) e homogeneizado em aparelho vortex e recentrifugado. Os dois sobrenadantes são combinados e secos completamente sob ar comprimido, e então redissolvidos em 1 ml de metanol. Os extratos são homogeneizados durante 1 min e levados para o banho ultrasônico por 15 min. Uma alíquota de 100 µl do extrato reconstituído em metanol é transferida para tubos contendo 2 ml de líquido de cintilação e levados para contagem em contador de cintilação durante 10 min. A taxa de recuperação obtida a partir desta contagem será utilizada como fator de correção para as concentrações de estradiol e progesterona de cada amostra fornecida pelo radioimunoensaio (RIE). As amostras são diluídas em tampão gelatina pH 7,0 [NaPO<sub>4</sub> (13,8 g), NaCl (0,9 g), azida sódica (1,0 g), gelatina (1,0 g) e água destilada (1000 ml)] antes das análises para validação do RIE. Este método é utilizado para ilustrar a diversidade das características do ciclo estral, resposta gonadal ao fotoperíodo e sensibilidade ovulatória da família Felidae. As análises demonstram que o estradiol fecal aumenta com a manifestação de estro e que a duração do ciclo estral varia de acordo com a espécie (BROWN e WILDT, 1997).

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 ANIMAIS

Foram estudadas nove fêmeas de gato doméstico, com idade entre 2 a 3,5 anos, consideradas sadias ao exame clínico, laboratorial (hemograma) e com histórico reprodutivo conhecido (Tabela 1). Foram mantidas em gatis individuais nas dependências da Clínica Tolevet em Toledo – PR e divididas em três grupos, cada um com três animais (Figura 6). Durante o estudo receberam ração comercial para gato doméstico (Garfield<sup>®</sup>, Nutron, Toledo - PR) e água *ad libitum*.

**TABELA 1 - Identificação das gatas domésticas do experimento nas dependências da Tolevet (Ano 2004)**

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL	IDADE (ANOS)	PESO CORPORAL (Kg)	GESTAÇÕES ANTERIORES
Gata 1	3,0	3,4	2
Gata 2	2,5	2,5	1
Gata 3	3,5	2,9	2
Gata 4	3,0	2,4	2
Gata 5	2,0	2,5	1
Gata 6	2,5	2,9	1
Gata 7	3,0	2,8	2
Gata 8	2,5	3,3	1
Gata 9	3,5	2,4	2



Fig. 6 - Gatas domésticas nos gatis individuais nas dependências da Tolevet (ano 2004)

### 3.2 TRATAMENTO HORMONAL

No grupo C (controle), as fêmeas foram tratadas com uma única dose intramuscular (IM) de 200 UI de eCG (gonadotropina coriônica eqüina, (Novormon 5000<sup>®</sup>)<sup>1</sup> para estimular o desenvolvimento folicular ovariano. Oitenta horas após, cada fêmea recebeu uma única injeção de 100 UI IM (intramuscular) de hCG (gonadotropina coriônica humana, Vetecor 5000 UI<sup>®</sup>)<sup>2</sup>, para induzir a ovulação. Essas dosagens foram baseadas em experiências prévias, utilizando essas gonadotropinas em várias espécies felinas, incluindo o gato doméstico, sendo essas dosagens suficientes para induzir a foliculogênese e a ovulação (HOWARD et al., 1992).

Os tratamentos de inibição ovariana foram estabelecidos para atingir a supressão ovariana por 37 dias, como o tempo médio equivalente à fase lútea de pseudoprenhez na gata doméstica (WILDT et al., 1998).

No grupo L, as fêmeas receberam levonorgestrel (progestágeno, Pilem<sup>®</sup>)<sup>3</sup> via oral, o qual foi administrado na dose de 0,075 mg/gata, uma vez ao dia durante 37 dias,

<sup>1</sup> Syntex S.A / Tecnopec, Av. João Pedro Cardoso 76, Parque Jabaquara, São Paulo-SP.

<sup>2</sup> Laboratório Calier do Brasil LTDA, Rua Manoel Pedro Pimentel, 15, Portão 1, Osasco-SP.

<sup>3</sup> União Química, Rua Cel. Luiz Tenório de Brito, 90, Embu-Guaçu-SP.

com o objetivo da indução da inatividade ovariana (Figura 7). Dois dias após o término da administração essas fêmeas receberam as mesmas doses anteriormente mencionadas de eCG e hCG.



Fig. 7 - Levonorgestrel oral (Pilem®).

No grupo E, as fêmeas receberam um implante contendo 68 mg de etonogestrel (Implanon®)<sup>4</sup>, o qual permaneceu durante 37 dias, com o objetivo da indução da inatividade ovariana (Figura 8). Dois dias após a retirada do implante foram administrados eCG e hCG conforme protocolo anteriormente descrito.



Fig.8 - Implante etonogestrel (Implanon®).

<sup>4</sup> Orgnanon do Brasil Indústria e Comércio, São Paulo - SP.

### 3.3 ANESTESIA

As fêmeas foram anestesiadas entre 29-39 h após a administração de hCG para o exame laparoscópico. Antes da administração da medicação pré-anestésica, foi realizado jejum hídrico e alimentar de 12 h. Para a laparoscopia das fêmeas, um plano cirúrgico de anestesia foi induzido com xilazina (Calmium<sup>®</sup>, Agener União, 0,5 mg/Kg IM)<sup>5</sup> e hidrocloridrato de cetamina (Ketamina<sup>®</sup>, Agener União, 15 mg/Kg IM)<sup>6</sup> e mantido com anestesia inalatória com halotano (Fluothane<sup>®</sup>)<sup>7</sup>.

Para a inserção e remoção dos implantes de etonogestrel, as fêmeas foram induzidas ao plano anestésico administrando-se 3-10 mg/Kg de hidrocloridrato de cetamina combinado com 0,5-1,5 mg/Kg de xilazina IM.

### 3.4 INSERÇÃO E REMOÇÃO DO IMPLANTE

Após instituído plano anestésico, as fêmeas foram posicionadas em decúbito esternal. Uma incisão de 1,5 cm foi realizada na região cervical dorsal, cranial à escápula, para a inserção do implante (Figuras 9 e10). Os implantes foram removidos 37 dias após a sua inserção.



Fig. 9 - Inserção do implante etonogestrel em gata doméstica.

<sup>5</sup> União Química, Rua Cel. Luiz Tenório de Brito, 90, Embu-Guaçu - SP.

<sup>6</sup> União Química, Rua Cel. Luiz Tenório de Brito, 90, Embu-Guaçu - SP.

<sup>7</sup> Astra Zeneca do Brasil, Rod. Raposo Tavares Km 26,9, Cotia - SP.

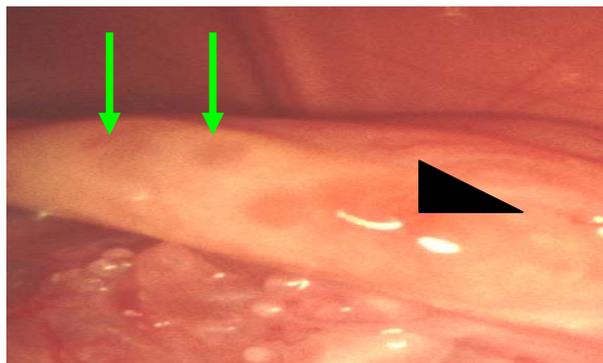


Fig. 10 - Gata doméstica após a inserção do implante.

### 3.5 ACESSO LAPAROSCÓPICO PARA VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE OVARIANA

As gatas domésticas foram submetidas à laparoscopia para verificação da eficiência dos protocolos e resposta ovariana (presença de corpo lúteo, número e tamanho dos folículos e ovulação) (Figura 11). Todos os aspectos ovarianos e uterinos foram avaliados. A agulha de Verres (diâmetro de 2 mm) foi utilizada para a manipulação das estruturas internas e mensuração precisa das estruturas anatômicas (ovariana e uterina). As gatas domésticas foram anestesiadas e posicionadas na mesa cirúrgica, a qual foi ajustada num ângulo de 30 graus (Figura 12). Por meio deste posicionamento, os órgãos abdominais movem-se cranialmente, desta maneira há uma melhor visualização dos órgãos reprodutivos. Os ovários foram visualizados diretamente através de um endoscópio rígido com 7 mm de diâmetro, inserido na cavidade peritoneal através de uma cânula de 10 mm colocada médio-ventralmente (Figura 13). Uma agulha de Verres inserida através da parede abdominal (Figura 14) foi utilizada para manipular o ovário, dessa forma permitindo o exame de todos os aspectos e a determinação do número de folículos e corpos lúteos (CLs). Devido ao diâmetro da agulha de Verres ser conhecido, foi possível mensurar o diâmetro dos folículos, CLs e cornos uterinos. Após a laparoscopia, as fêmeas receberam uma injeção profilática subcutânea de amoxicilina trihidrato 30 mg/Kg (Agemoxi®)<sup>8</sup> (Figura 15).

<sup>8</sup> União Química Farmacêutica Nacional, S.<sup>a</sup>, Rua Cel. Luiz Tenório Brito, 190, Embu-Guaçu - SP.



FORNE: PELICAN (2004)

Fig. 11 - Visualização de folículos ovarianos através de exame laparoscópico.



Fig. 12 - Gata doméstica posicionada para o exame laparoscópico.



Fig. 13 – Inserção da agulha de Verres.



Fig. 14 - Exame laparoscópico para visualização de útero e ovários em gata doméstica (*Felis catus*).

### 3.6 ANÁLISE HORMONAL FECAL

Foram coletadas amostras fecais para dosagens de estrógenos, 60 dias antes e 60 dias após a instituição dos protocolos hormonais. As amostras foram mantidas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização da análise. O processamento da amostra (extração e análise por RIA) foi realizado no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) da Universidade de São Paulo (USP), seguindo o padrão já descrito por BROWN et al. (1995). Primeiramente as fezes foram pesadas (0,3 g) e fervidas em 5 ml de etanol 90% (90% de etanol: água destilada) por 20 minutos. Durante este tempo, o etanol evaporado foi gradativamente repostado para que nenhuma amostra ficasse seca, de forma que ao final desta etapa o volume inicial fosse mantido. Após centrifugação por 15 minutos a 500G, o sobrenadante foi recuperado e o *pellet* resultante foi ressuspensionado em 5 ml de etanol (90%) e homogeneizado em aparelho Vortex (Phoenix, modelo At 56) e recentrifugado. Os dois sobrenadantes foram combinados e secos completamente sob ar comprimido, e então redissolvidos em 1 ml de metanol. Os extratos foram homogeneizados por 1 minuto, e levados para o banho ultrassônico (Ultra Sonic Cleaner, USC – 1450 – Unique) por 15 minutos. Uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  do extrato reconstituído em metanol foi transferida para tubos contendo 2 ml de líquido de cintilação e levados para contagem em contador de cintilação por 10 minutos. A taxa de recuperação obtida a partir desta contagem foi utilizada como fator de correção para as concentrações de estradiol de cada amostra fornecida pelo radioimunoensaio. As amostras foram diluídas em tampão gelatina pH 7,0 [ $\text{NaPO}_4$  (13,8 g), NaCl (9,0 g), azida sódica (1,0 g), gelatina (1,0 g) e água destilada (1000 ml)] antes das análises para validação do RIE. As amostras preparadas foram dosadas por meio de *kits* comerciais de radioimunoensaio em fase sólida, desenvolvidos para avaliação quantitativa de estradiol no soro humano, previamente validado para extratos de fezes de felinos (BROWN et al., 1995). As Figuras 15 a 21 ilustram as etapas de extração. Devido à problemas ocorridos durante a metodologia do estudo, somente nas gatas do grupo E foram coletadas amostras de sangue para dosagem de estrógeno sérico (RIA-LDH /USP) (Figura 22).



Fig. 15 - Pesagem das amostras fecais.



Fig. 16 - Primeira etapa de centrifugação.



Fig. 17 - Amostra fecal após fervura.



Fig. 18 - Segunda etapa de centrifugação.



Fig. 19 - Centrífuga (Quimis®).



Fig. 20 - Extrato em solução no etanol.



Fig. 21 - Fluxo de secagem com banho-maria.



Fig. 22 - Coleta de sangue em gata doméstica.

### 3.7 CITOLOGIA VAGINAL

No momento da laparoscopia foram realizados esfregaços vaginais utilizando-se *swabs* estéreis, previamente imersos em solução salina estéril. Para a realização do esfregaço, o *swab* foi direcionado crânio dorsalmente na vagina. Uma vez cranial ao orifício uretral, o *swab* foi friccionado contra a parede vaginal. O vestíbulo e a fossa clitoral devem ser evitados, pois as células superficiais destas áreas podem alterar a interpretação citológica. As células foram então transferidas para uma lâmina de vidro através de rolamento gentil do *swab* (THRALL & OLSON, 1999). Os esfregaços foram fixados com spray fixador para cabelos e, após secas, as lâminas foram coradas com a técnica de Wright's-Giemsa (Diff-Quik, Panótico) (Figura 23) e observadas em microscópio óptico com aumento de 400 X para caracterizar a morfologia das células epiteliais. Para cada exame, 100 células foram contadas em duplicata e classificadas com base na morfologia, coloração e tamanho do núcleo como: superficial (cornificada), intermediária ou parabasal (THRALL e OLSON, 1999) (Figuras 24, 25, 26).



Fig. 23 - Coloração com panótico das lâminas do esfregaço vaginal.

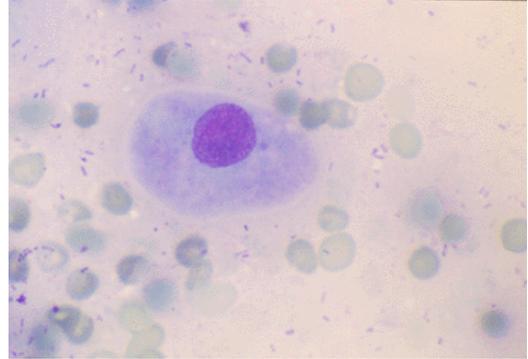


Fig. 24 - Célula epitelial vaginal parabasal (400 X – coloração Panótico).



Fig. 25 – Células epiteliais vaginais superficiais anucleadas (cornificadas) (400X – coloração Panótico).

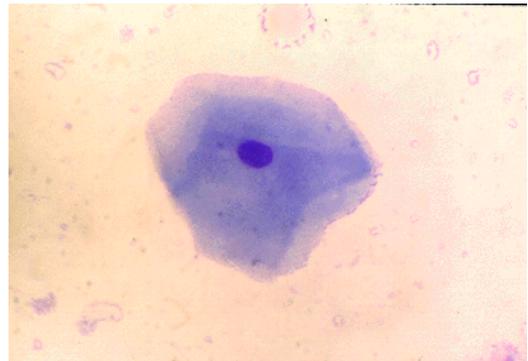


Fig. 26 – Célula epitelial vaginal superficial nucleada (400X – coloração Panótico).

### 3.8 ANÁLISE HORMONAL SÉRICA

Durante o exame laparoscópico foram coletadas amostras sanguíneas de todas as gatas domésticas do estudo (Grupos C, L e E). Devido a problemas com o processamento do sangue coletado das fêmeas do grupo C e L, somente o sangue das gatas domésticas do grupo E foi submetido à análise para dosagem de estradiol através de RIA no LDH - USP.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação do desempenho dos três grupos foi utilizado o método estatístico de comparação de médias ANOVA. A análise estatística foi dividida em três etapas, nas quais os grupos que receberam tratamento para supressão ovariana (grupos L, levonorgestrel e E, etonogestrel) foram comparados com o grupo C (controle) durante o período de tratamento para supressão ovariana (37 dias). Os grupos L e E foram também comparados com o grupo C durante e após o período de estimulação com as gonadotropinas exógenas.

Os grupos também foram avaliados individualmente através da comparação de médias ANOVA. Em cada grupo comparou-se o período de inibição ovariana com o período após a administração de gonadotropinas exógenas e o período durante e após a administração de gonadotropinas.

Para verificar o ciclo estral de cada fêmea, foram quantificadas as concentrações de estrógenos fecais, sendo calculados os valores médios ( $\pm$  erro padrão da média). Os valores basais de estradiol foram calculados utilizando um processo iterativo, no qual os valores que excederam a média + 2,0 DP (desvio padrão) foram excluídos. A média então foi recalculada e o processo de eliminação foi repetido até que nenhum valor excedesse a média + 2,0 DP. A média dos valores restantes foi considerada como valor basal.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 INIBIÇÃO OVARIANA

Durante a utilização do tratamento para supressão ovariana, o Grupo E apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos Grupos C e L (Quadro 1), observando diminuição significativa das concentrações de estradiol durante a utilização de etonogestrel. O grupo L não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao Grupo C (Quadro 1).

#### QUADRO 1 - Resultado da diferença mínima significativa durante o período de inibição ovariana dos grupos C, L, E

**DMS= 0,058  $T_{\alpha} 5\% = 2,01$**

(Grupo C - Grupo E) = 0,07 > DMS  $\Rightarrow$  **Grupo C # Grupo E**

(Grupo L - Grupo E) = 0,117 > DMS  $\Rightarrow$  **Grupo L # Grupo E**

(Grupo L - Grupo C) = 0,047 < DMS  $\Rightarrow$  **Grupo C = Grupo L**

### 4.2 PERÍODO DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM GONADOTROPINAS E PERÍODO APÓS A ESTIMULAÇÃO

Durante e após a administração das gonadotropinas (eCG/hCG), os Grupos L e E não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo C ( $p > 0,05$ ) (Quadro 2), ou seja, os grupos que receberam tratamento hormonal para inibição ovariana prévia à administração de gonadotropinas (Grupos L e E) não apresentaram diferença significativa em relação ao Grupo C, durante e após o período de estimulação ovariana.

#### QUADRO 2 - Resultado da diferença mínima significativa durante o período de estimulação com gonadotropinas e após dos grupos C, L, E

**DMS= 0,12  $T 5\% = 1,99$**

(Grupo C - Grupo E) = 0,11 < DMS  $\Rightarrow$  **Grupo C = Grupo E**

(Grupo L - Grupo E) = 0,005 < DMS  $\Rightarrow$  **Grupo L = Grupo E**

(Grupo C - Grupo L) = 0,11 < DMS  $\Rightarrow$  **Grupo C = Grupo L**

### 4.3 PERÍODO APÓS A ESTIMULAÇÃO COM AS GONADOTROPINAS EXÓGENAS

Durante o período após a administração das gonadotropinas (eCG / hCG) os Grupos L e E não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo C ( $p > 0,05$ ) (Quadro 3), ou seja, os grupos que receberam tratamento hormonal para inibição ovariana prévia à administração de gonadotropinas (Grupos L e E), não apresentaram diferença significativa em relação ao Grupo C, após o período de estimulação ovariana.

#### QUADRO 3 - Resultado da diferença mínima significativa durante o período após a estimulação com gonadotropinas dos grupos C, L, E

**DMS= 0,134 T 5% = 1,99**

(Grupo C - Grupo E) = 0,09 < DMS  $\Rightarrow$  **Grupo C = Grupo E**

(Grupo L - Grupo E) = 0,02 < DMS  $\Rightarrow$  **Grupo L = Grupo E**

(Grupo C - Grupo L) = 0,07 < DMS  $\Rightarrow$  **Grupo C = Grupo L**

### 4.4 COMPARAÇÃO DENTRO DOS GRUPOS

#### 4.4.1 Grupo Controle

As gatas do grupo controle apresentaram diferença significativa ( $p < 0,1$ ) no período de 37 dias anterior à administração das gonadotropinas (Período i) (supressão dos Grupos L e E), em relação ao período de estimulação com as gonadotropinas (est) e após a estimulação com as gonadotropinas (est+ap) (Quadro 4).

Já durante o período de estimulação com as gonadotropinas em relação ao após, não houve diferença significativa ( $p > 0,1$ ) entre as gatas.

#### QUADRO 4 - Resultado da diferença mínima significativa durante o período de inibição ovariana, estimulação com gonadotropinas e após a estimulação das gatas domésticas do grupo controle

**DMS= 0,15 T 10%= 1,67**

$G C (es+ap)^2 - G C (i)^1 = 0,21 > DMS \Rightarrow G C (i) \neq G C (es+ap)^2$

$G C (es+ap)^2 - G C (ap)^3 = 0,05 < DMS \Rightarrow G C (es+ap)^2 = G C (ap)^3$

$G C (ap)^3 - G C (i)^1 = 0,17 > DMS \Rightarrow G C (ap)^3 \neq G C (i)^1$

Nota:

$G C (i)^1$ : Gatas do grupo controle no período de inibição ovariana dos grupos L e E.

$G C (es+ap)^2$ : Gatas do grupo controle no período de estimulação com gonadotropinas e após a estimulação.

$G C (ap)^3$ : Gatas do grupo controle no período após a estimulação com as gonadotropinas.

$T \alpha (10\%)$ : 1,67

#### 4.4.2 Grupo Levonorgestrel

As gatas deste grupo não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,1$ ) no período de inibição (i) com o levonorgestrel oral em relação ao período estimulação com as gonadotropinas (est) e período após a estimulação com as gonadotropinas (est + ap) (Quadro 5).

**QUADRO 5 - Resultado da diferença mínima significativa durante o período de inibição ovariana, estimulação com gonadotropinas e após a estimulação das gatas domésticas do grupo levonorgestrel**

<p><b>DMS= 0,05 T <math>\alpha(10\%)= 1,67</math></b></p> <p><math>G L (es+ap)^2 - G L (i)^1 = 0,027 &lt; DMS \Rightarrow G L (i)^1 = G L (es+ap)^2</math></p> <p><math>G L (es+ap)^2 - G L (ap)^3 = 0,008 &lt; DMS \Rightarrow G L (es+ap)^2 = G L (ap)^3</math></p> <p><math>G L (ap)^3 - G L (i)^1 = 0,019 &lt; DMS \Rightarrow G L (ap)^3 = G L (i)^1</math></p>
--

Nota:

G L (i)<sup>1</sup>: Gatas do grupo L no período de inibição ovariana com levonorgestrel oral.

G L (es+ap)<sup>2</sup>: Gatas do grupo L no período de estimulação com gonadotropinas e após a estimulação.

G L (ap)<sup>3</sup>: Gatas do grupo L no período após a estimulação com as gonadotropinas.

#### 4.4.3 Grupo Etonogestrel

As gatas deste grupo, durante o período de supressão ovariana (i) com o implante (etonogestrel), apresentaram diferença significativa ( $p < 0,1$ ) em relação ao período estimulação com as gonadotropinas (est) e após a estimulação (est+ap) (Quadro 6). Durante o período de estimulação com as gonadotropinas e período após a estimulação com as gonadotropinas, as gatas não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,1$ ) entre si (Quadro 6).

**QUADRO 6 - Resultado da diferença mínima significativa durante o período de inibição ovariana, estimulação com gonadotropinas e após das gatas domésticas do grupo etonogestrel**

<p><b>DMS= 0,09 T 10%= 1,66</b></p> <p><math>GE (es+ap)^2 - GE (i)^1 = 0,146 &gt; DMS \Rightarrow GE (i)^1 \neq GE (es+ap)^2</math></p> <p><math>GE (es+ap)^2 - GE (ap)^3 = 0,042 &lt; DMS \Rightarrow GE (es+ap)^2 = GE (ap)^3</math></p> <p><math>GE (ap)^3 - GE (i)^1 = 0,10 &gt; DMS \Rightarrow GE (ap)^3 \neq GE (i)^1</math></p>
---

Nota:

G E (i)<sup>1</sup>: Gatas do grupo E no período de inibição ovariana com levonorgestrel oral.

G E (es+ap)<sup>2</sup>: Gatas do grupo E no período de estimulação com gonadotropinas e após a estimulação.

G E (ap)<sup>3</sup>: Gatas do grupo E no período após a estimulação com as gonadotropinas.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES HORMONAIS DURANTE O CICLO ESTRAL DAS FÊMEAS

Os valores basais de estrógenos fecais do grupo E foram menores que os valores do grupo C e L. A seguir (Tabela 2) observamos os valores referentes à média  $\pm$  EPM das concentrações de estrógenos fecais (valores basais) das gatas domésticas durante o estudo.

**TABELA 2 - Valores referentes às concentrações basais de estrógenos fecais das gatas domésticas durante o estudo**

Grupo	Animal	Média $\pm$ / EPM
Controle	Gata 1	0,03 $\pm$ 0,01
Controle	Gata 2	0,06 $\pm$ 0,005
Controle	Gata 3	0,04 $\pm$ 0,003
Levonorgestrel	Gata 4	0,07 $\pm$ 0,005
Levonorgestrel	Gata 5	0,07 $\pm$ 0,01
Levonorgestrel	Gata 6	0,03 $\pm$ 0,02
Etonogestrel	Gata 7	0,01 $\pm$ 0,002
Etonogestrel	Gata 8	0,01 $\pm$ 0,002
Etonogestrel	Gata 9	0,01 $\pm$ 0,002

Os perfis de estrógenos fecais das gatas domésticas do estudo (grupos C,L e E) estão representados nas Figuras de 27 a 35.

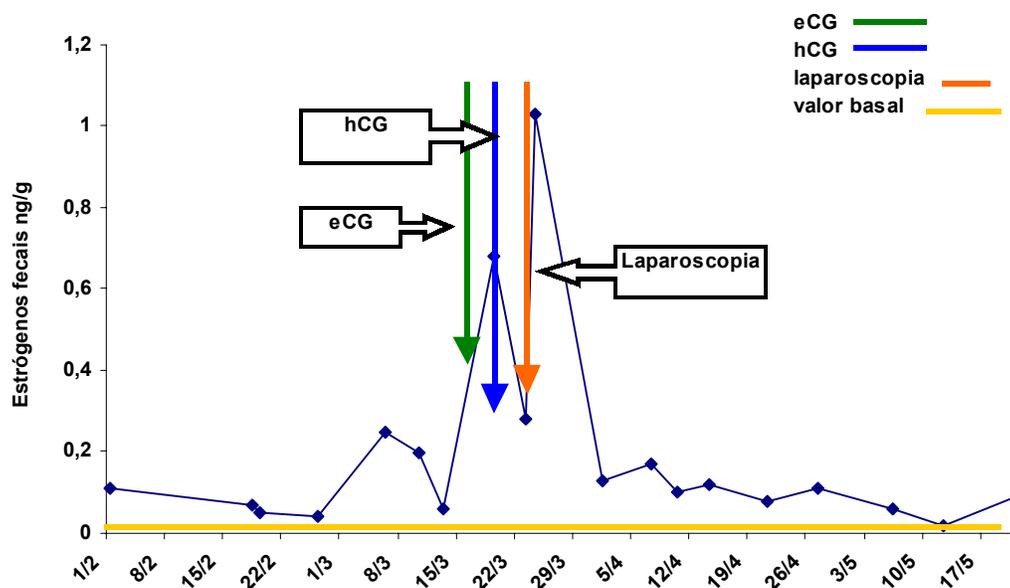


Fig. 27 - Perfil da excreção fecal de estrógenos da gata doméstica 1 do grupo controle

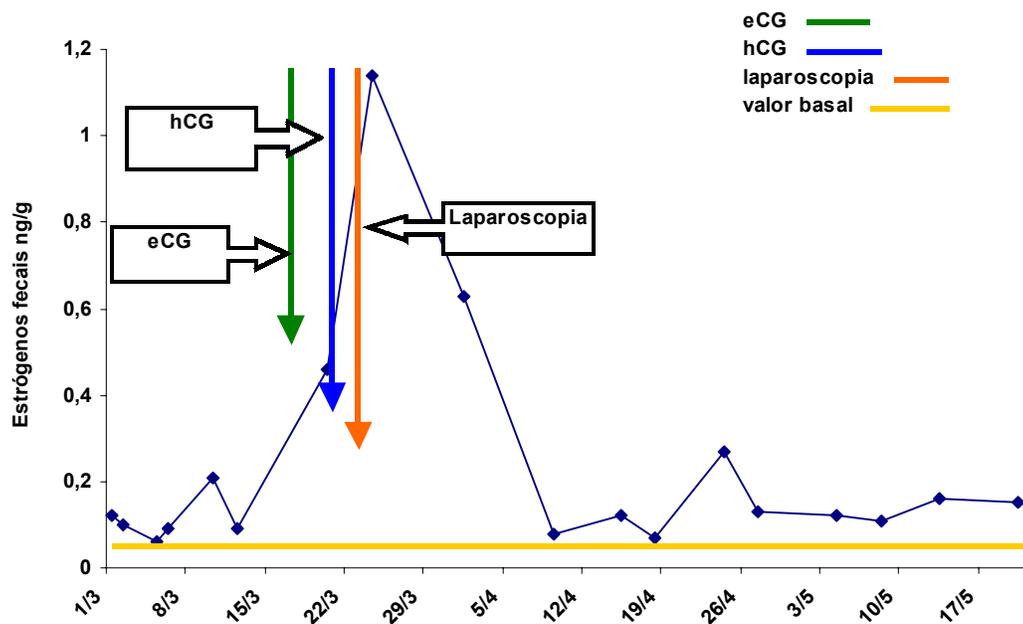


Fig. 28 - Perfil da excreção fecal de estrógenos da gata doméstica 2 do grupo controle

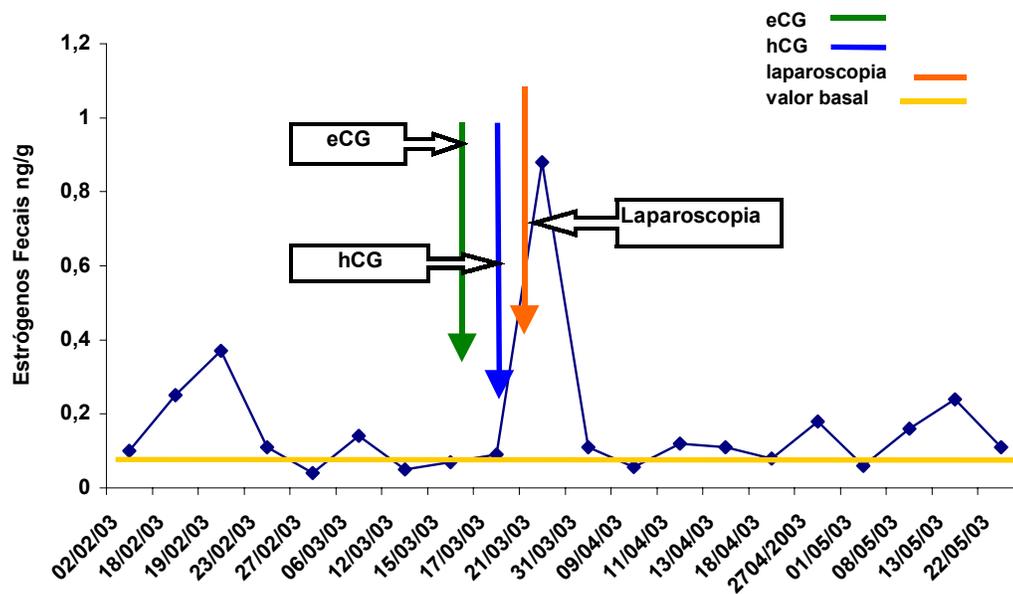


Fig. 29 - Perfil da excreção fecal de estrógenos da gata doméstica 3 do grupo controle

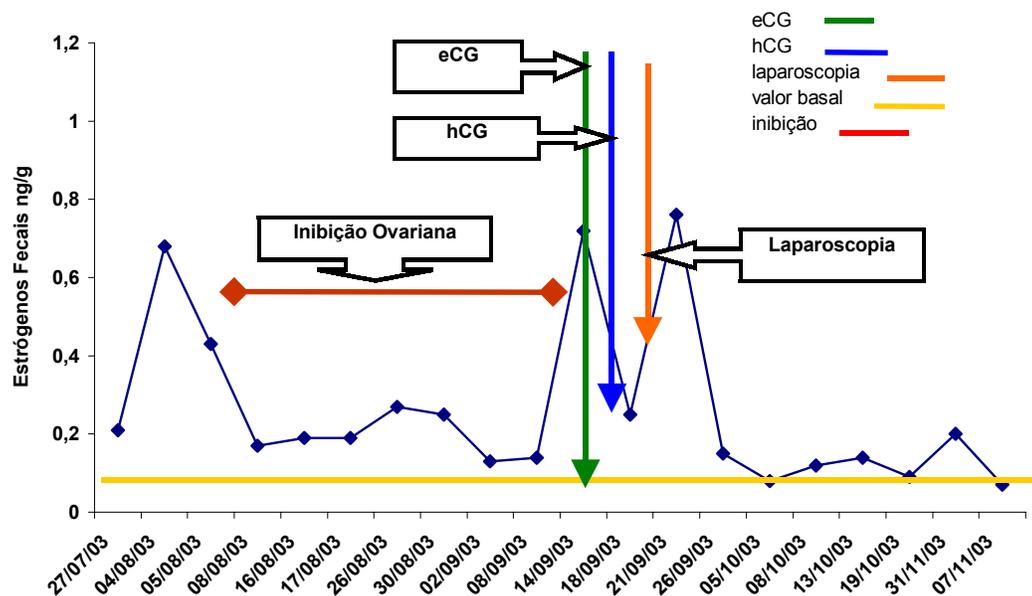


Fig. 30 - Perfil da excreção fecal de estrógenos da gata doméstica 4 do grupo levonorgestrel

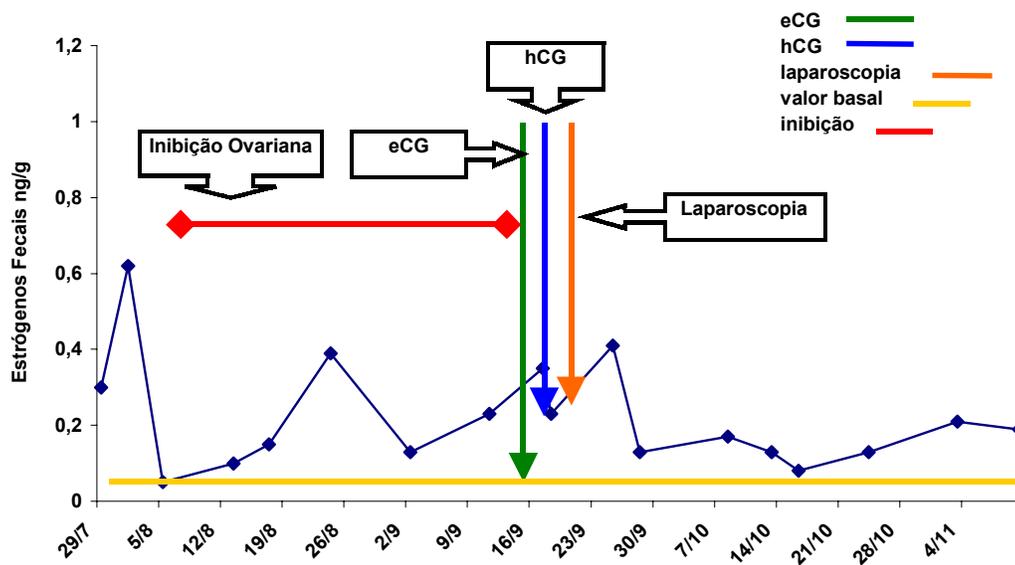


Fig. 31 - Perfil da excreção fecal de estrógenos da gata doméstica 5 do grupo levonorgestrel

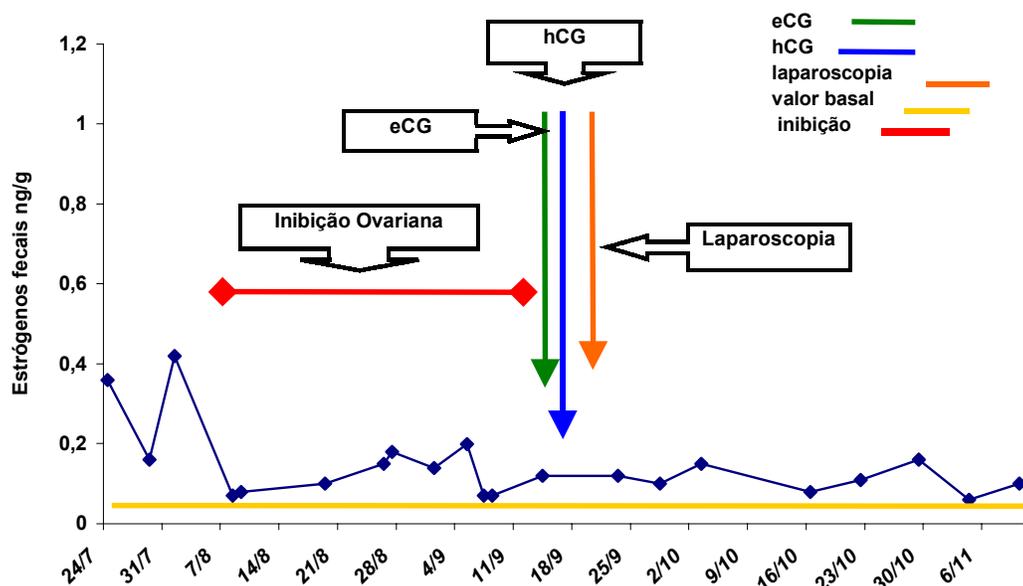


Fig. 32 - Perfil da excreção fecal de estrógenos da gata doméstica 6 do grupo levonorgestrel

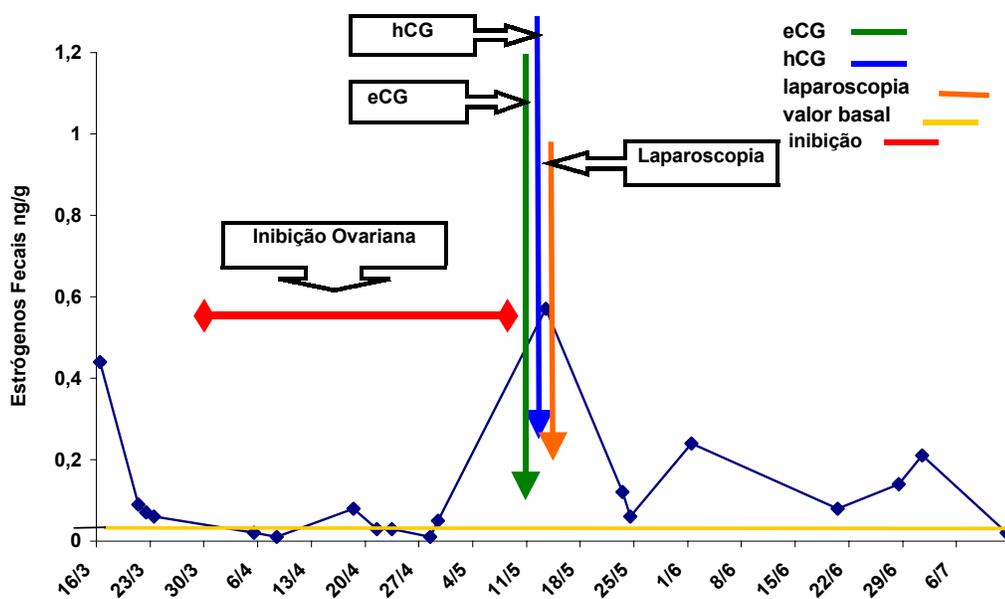


Fig. 33 - Perfil da excreção fecal de estrógenos da gata doméstica 7 do grupo etonogestrel

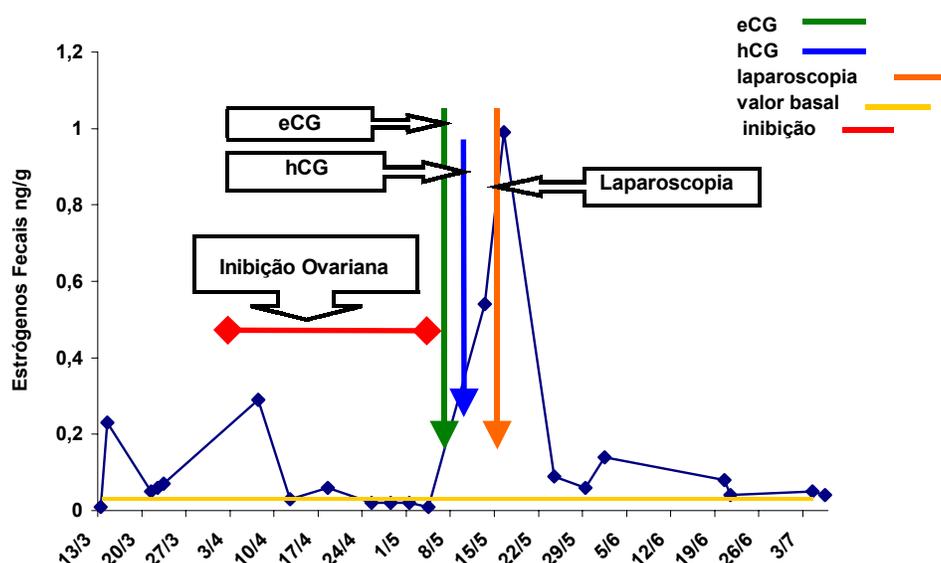


Fig. 34 - Perfil da excreção fecal de estrógenos da gata doméstica 8 do grupo etonogestrel

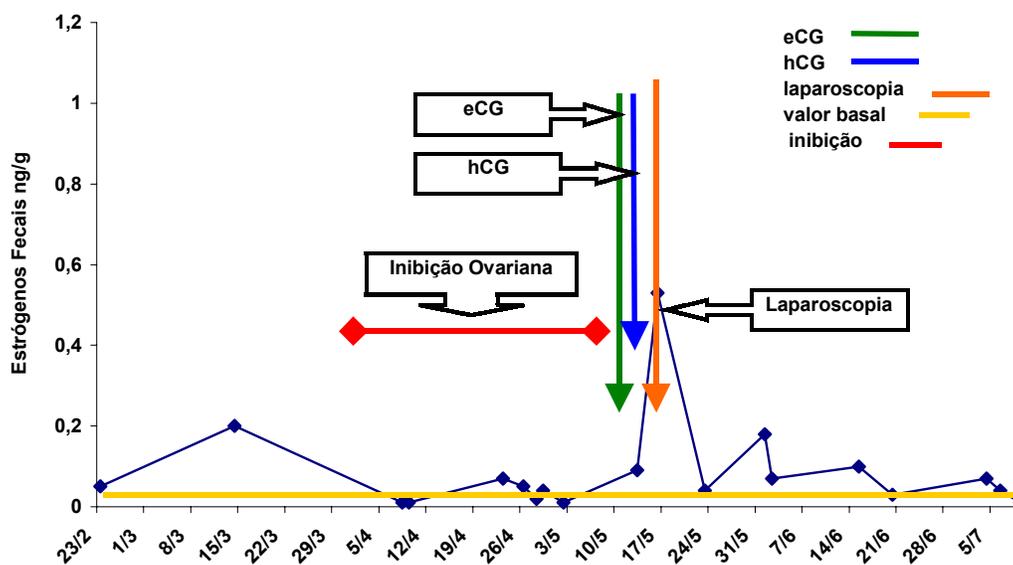


Fig. 35 - Perfil da excreção fecal de estrógenos da gata doméstica 9 do grupo etonogestrel

A seguir, estão representados os perfis de excreção fecal das gatas domésticas dos grupos C (Figura 36 e 39), grupo L (Figura 37 e 40) e grupo E (Figura 38 e 41) durante o período de inibição ovariana (37 dias) dos grupos L e E e período após a administração das gonadotropinas. Verificou-se que os níveis de estrógenos durante o período de inibição ovariana do grupo E foram

significativamente inferiores aos níveis de estrógenos dos grupos L e C. Após a administração das gonadotropinas não houve diferença significativa entre os grupos.

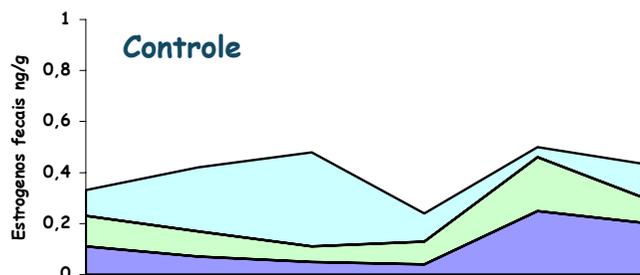


Fig. 36 – Perfil da excreção fecal de estrógenos do Grupo C durante o período de inibição dos grupos E e L.

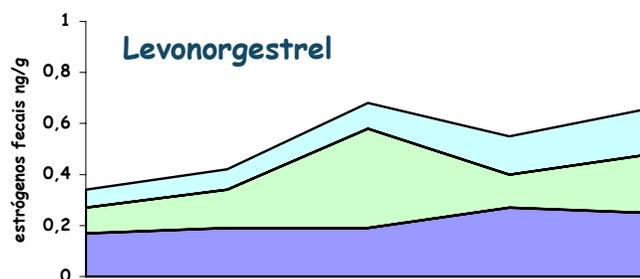


Fig. 37 – Perfil da excreção fecal de estrógenos do Grupo L durante o período de inibição com o levonorgestrel oral.

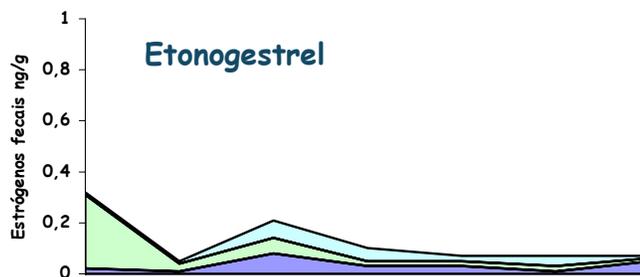


Fig. 38 – Perfil da excreção fecal de estrógenos do grupo E durante o período de inibição com implante de etonogestrel.

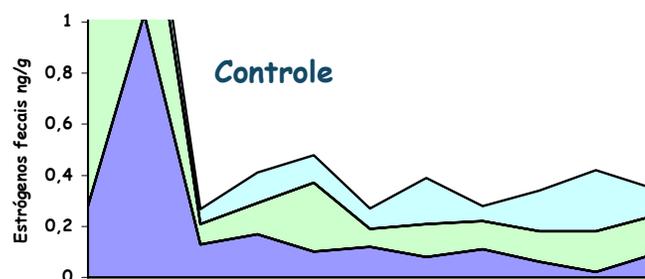


Fig. 39 – Perfil da excreção fecal de estrógenos do Grupo C após a administração das gonadotropinas.

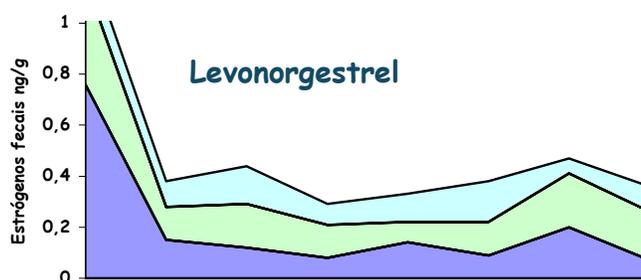


Fig. 40 – Perfil da excreção fecal de estrógenos do Grupo L após a administração das gonadotropinas.

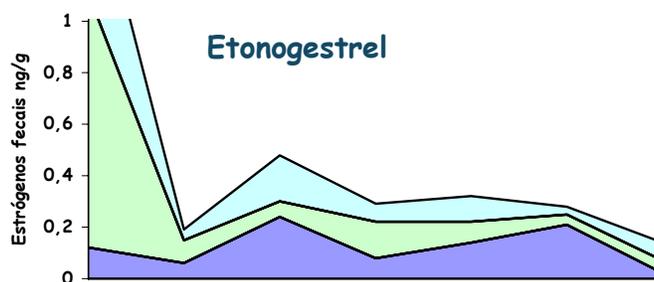


Fig. 41 – Perfil da excreção fecal de estrógenos do Grupo E após a administração das gonadotropinas.

#### 4.6 RESULTADO DO EXAME LAPAROSCÓPICO

De acordo com o exame laparoscópico, verificou-se que as gatas domésticas do grupo E apresentaram um maior número de folículos ( $7,6 \pm 3,4$ ) em relação às gatas domésticas dos grupos C ( $6,3 \pm 1,4$ ) e L ( $4,0 \pm 0,57$ ). Com relação ao número de CLs as gatas do grupo L tiveram maior número ( $5,0 \pm 1,52$ ) em relação ao grupo C ( $1,5 \pm 0,5$ ) e E ( $2,0 \pm 0,57$ ).

As médias ( $\pm$  EPM) dos resultados do exame laparoscópico estão apresentadas na Tabela 3.

**TABELA 3 - Resultados do exame laparoscópico das gatas dos grupos etonogestrel, levonorgestrel e controle (3 gatas domésticas/tratamento)**

	CONTROLE	LEVONORGESTREL	ETONOGESTREL
Diâmetro uterino (mm)	$7,0 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,3$
Diâmetro ovariano (mm)	$9,0 \pm 0,8$	$9,0 \pm 0,3$	$6,4 \pm 0,2$
Número de folículos / gata	$6,3 \pm 1,4$	$4,0 \pm 0,5$	$7,6 \pm 3,4$
Diâmetro dos folículos (mm)	$1,7 \pm 1,1$	$1,5 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$
Número de CLs / gata	$1,5 \pm 0,5$	$5,0 \pm 1,5$	$2,0 \pm 0,6$
Diâmetro dos CLs (mm)	$2,5 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,16$	$2,16 \pm 0,3$

#### 4.7 RESULTADO DA ANÁLISE HORMONAL SÉRICA

Através da análise hormonal sérica (RIA), verificou-se que todas as fêmeas do grupo E estavam com as concentrações de estradiol acima de 150 pg/ml no momento da laparoscopia indicando período de estro, coincidindo com os resultados da análise fecal e da citologia vaginal.

#### 4.7 RESULTADO DA CITOLOGIA VAGINAL

Os resultados da citologia vaginal realizada no momento do exame laparoscópico das gatas domésticas dos grupos C, L e E estão apresentados na Figura 39. Verificou-se que todas as gatas domésticas do estudo apresentaram células epiteliais vaginais características de estro (superficiais anucleadas e superficiais nucleadas) no momento do exame laparoscópico. As fêmeas do Grupo

C e L apresentaram 45% de células epiteliais superficiais anucleadas (cornificadas) / 55% de células epiteliais superficiais nucleadas e 72% de células epiteliais superficiais anucleadas (cornificadas) / 28% de células epiteliais superficiais nucleadas, respectivamente. No grupo E as fêmeas apresentaram 20% de células intermediárias, 25% de células epiteliais superficiais nucleadas e 55% de células epiteliais superficiais anucleadas (cornificadas).

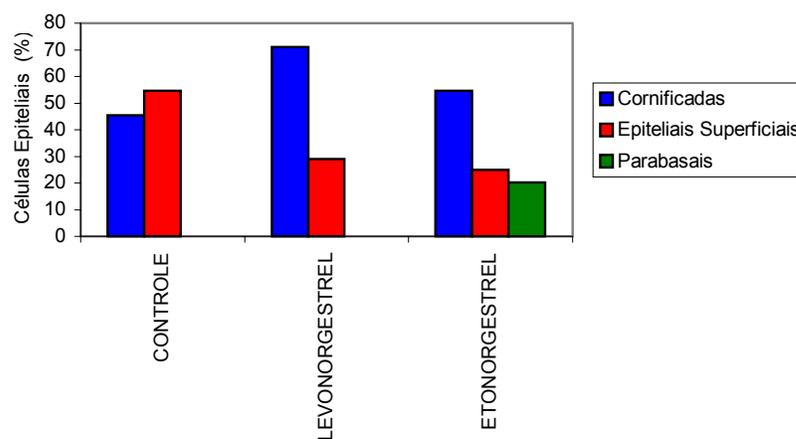


Fig.42 – Resultados da citologia vaginal realizada no momento do exame laparoscópico das gatas domésticas dos grupos C, L e E

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a inibição ovariana foi atingida nas gatas domésticas que receberam o implante de etonogestrel prévio ao protocolo de estimulação com as gonadotropinas exógenas (eCG/hCG). Foi verificado que o grupo E (etonogestrel) apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo C (controle) durante o período de inibição ovariana. Durante este período, as fêmeas do Grupo E apresentaram inatividade ovariana com baixas concentrações de estrógenos e ausência de picos. Desta forma, verifica-se que o implante de etonogestrel provocou supressão ovariana durante a sua utilização, indicando que a dose de 68 mg/implante foi eficaz em gatas domésticas no estudo. Segundo MCCANN & POTTER (1994), os contraceptivos apenas com progestágeno obtêm sua eficácia através do efeito inibidor da ovulação do progestágeno sobre o hipotálamo e a glândula pituitária. A supressão da secreção de gonadotropinas (LH e FSH) evita a ovulação. Conseqüentemente, o corpo lúteo está ausente e as concentrações de progesterona natural estão baixos. A inibição da ovulação pode ser determinada pela ausência de um pico de LH, supressão do desenvolvimento folicular e da produção de estradiol. De acordo com DAVIES et al. (1993), a ausência de ovulação e a alta eficácia contraceptiva assegurada por Implanon<sup>®</sup> (Organon do Brasil) sugerem que o etonogestrel previne adequados picos de LH. Isso resulta em uma situação na qual a ovulação é inibida e o E<sub>2</sub> endógeno é sintetizado.

Segundo PELICAN et al. (2002), estudos utilizando implantes de levonorgestrel em gatas domésticas indicaram que o mesmo inibe picos de estradiol e ovulação espontânea, apresentando resultados satisfatórios ao melhorar a resposta ovariana ao estímulo com gonadotropinas em programas de reprodução assistida. Em gatas domésticas, a supressão do ciclo estral através da utilização do hormônio levonorgestrel, prévio ao protocolo de inseminação artificial, melhora a resposta ovariana ao eCG e hCG. Ao contrário do resultado obtido por PELICAN (2004), no presente estudo, o grupo L não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo C durante o período de inibição ovariana. Durante a administração do levonorgestrel oral, as fêmeas não apresentaram inibição ovariana, verificando-se a presença de picos de estradiol em todas as fêmeas tratadas. Conseqüentemente o Grupo L não teve diferença em relação ao grupo C, não demonstrando a supressão ovariana desejada. Este resultado pode estar relacionado com o método de

fracionamento do medicamento prévio à administração, ou dose utilizada, o que pode ter influenciado de forma negativa nos resultados observados. Deve-se também levar em consideração a taxa de absorção do progestágeno oral, pois vários fatores podem influenciar, como a ingestão diária de pêlos. Novos estudos podem ser realizados utilizando doses diferentes, ou na mesma dose já utilizada com a manipulação do hormônio propriamente dito. Levando-se em consideração a relação custo/benefício, a utilização de levonorgestrel oral em novos estudos deve ser investigada devido ao menor custo e facilidade de administração, podendo ser adicionado ao alimento.

As fêmeas dos grupos E e L não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo C durante e após a administração de gonadotropinas exógenas. Segundo PELICAN (2004), os estímulos com gonadotropinas aumentam o tempo de duração do estro e das concentrações de estradiol, comparado aos níveis do período pré-inibição. Sabe-se que a estimulação com as gonadotropinas induz a uma segunda onda folicular em gatas, levando à prolongada exposição aos estrógenos. De acordo com a análise fecal, durante o período de estimulação com gonadotropinas, duas das três fêmeas do grupo E estavam com concentrações basais de estradiol, e no momento do exame laparoscópico, todas as fêmeas deste grupo apresentaram picos de estradiol. De acordo com a análise sérica, as concentrações de estradiol foram acima de 150 pg/ml no momento da laparoscopia indicando período de estro, coincidindo com os resultados da análise fecal. Após a laparoscopia apresentaram diminuição das concentrações de estradiol. Verifica-se desta forma, que as gatas deste grupo apresentaram uma resposta uniforme e constante dos ovários à estimulação com as gonadotropinas exógenas, não havendo interferência de gonadotropinas endógenas na resposta ovariana. A ausência de um aumento excessivo nas concentrações de estradiol após a laparoscopia é benéfica, não ocorrendo o hiperestrogenismo, o qual alteraria o ambiente uterino e diminuiria a taxa de prenhez. Nenhuma das fêmeas do grupo L apresentou picos de estradiol no momento da laparoscopia. Das três fêmeas deste grupo, duas apresentaram concentrações de estradiol aumentadas antes da laparoscopia, período da estimulação ovariana com as gonadotropinas exógenas. Após a laparoscopia, duas das três fêmeas do grupo L apresentaram concentrações de estradiol superiores às encontradas no momento da laparoscopia. Estas concentrações de estradiol permaneceram aumentadas por aproximadamente 4 dias. Apenas uma, das três fêmeas deste grupo, não apresentou picos de estradiol durante e após a estimulação com as gonadotropinas. Dessa forma, verifica-se uma resposta não

uniforme das fêmeas à estimulação, ocorrendo hiperestrogenismo após a laparoscopia em duas das três fêmeas tratadas com levonorgestrel oral. No grupo C foi verificado que todas as fêmeas apresentaram aumento das concentrações de estradiol no momento do exame laparoscópico e que uma das fêmeas deste grupo apresentou concentrações basais de estradiol no momento da estimulação com as gonadotropinas. Em uma das três fêmeas, as concentrações de estradiol após a laparoscopia ( $\pm 5$  dias) foram superiores às concentrações no momento da laparoscopia. As concentrações de estradiol permaneceram elevadas por  $\pm 9,3$  dias, ocorrendo hiperestrogenismo nesta fêmea.

A presença de folículo acessório e CL após a indução da ovulação contribui para baixos índices de fertilização em programas de IA em felídeos. Alguns fatores que resultam na diminuição das taxas de fertilização e de nidação embrionária em felídeos, são elevadas e prolongadas concentrações de estradiol, elevada secreção de progesterona ou luteólise prematura, as quais são ocasionadas pela hiperestimulação ovariana. Outro contribuinte para a baixa eficiência reprodutiva seguida de estimulação com gonadotropinas em felídeos selvagens é o desenvolvimento de uma segunda onda folicular e ovulação após 5–7 dias da primeira onda folicular. O desenvolvimento do folículo acessório e desenvolvimento luteal resultam numa elevada e prolongada concentração de estradiol e progesterona, os quais estão associados à interferência no transporte do embrião pelo oviduto e diminuição das taxas de prenhez (PELICAN, 2004).

Apesar da gata doméstica ser classificada como uma ovuladora induzida e ovular aproximadamente 24 horas após o coito, recentes pesquisas com gatas domésticas demonstraram que essas podem apresentar ovulações espontâneas (GUDERMUTH et al., 1997). Neste estudo, todas as fêmeas do grupo L e duas das três fêmeas do grupo E apresentaram picos de estradiol fora do período de tratamento (inibição e estimulação com gonadotropinas). Verifica-se então que cinco das nove fêmeas do estudo apresentaram picos de estradiol em períodos que não foram administrados hormônios exógenos (antes do período de supressão ovariana e após o período de estimulação com gonadotropinas). As concentrações de estradiol dos picos das fêmeas que responderam ao estímulo com gonadotropinas foram maiores que as concentrações de estradiol de outros picos apresentados fora do período dos tratamentos (inibição ovariana e gonadotropinas exógenas).

No exame laparoscópico realizado 29-39 h após a administração de hCG, foi observado que as fêmeas do grupo C apresentaram uma média de 6,3 folículos/gata, totalizando 19 folículos. Apenas duas das três fêmeas deste grupo apresentaram CL, uma com um e outra com dois CLs. As fêmeas do grupo L apresentaram em média 4,0 folículos/gata, totalizando 12 folículos. Todas as fêmeas deste grupo apresentaram CL, em média 5,0 CLs/gata, totalizando 15 CLs. As fêmeas do grupo E apresentaram em média 7,6 folículos/gata, totalizando 23 folículos. Com relação à presença de CL, duas das três fêmeas apresentaram 2,0 CLs/gata, totalizando 6 CLs. Segundo PELICAN (2004), os ovários com múltiplos e recentes pontos de ovulação, geralmente resultam nos melhores índices de prenhez em gatas domésticas, fazendo com que ocorra a presença de múltiplos folículos recentes no momento da IA. Recentes pesquisas em felídeos indicaram que fêmeas com a presença de CL maduro no momento da IA não atingem a prenhez. No grupo E foi observado grande número de folículos no momento do exame laparoscópico. Isto comprova que as fêmeas deste grupo apresentavam seus ovários quiescentes no momento da estimulação com as gonadotropinas, obtendo uma resposta mais uniforme.

Ao exame microscópico de citologia vaginal, foi observado que todas as fêmeas do estudo apresentaram células epiteliais vaginais características de estro. No grupo C, 45,3% das células epiteliais eram superficiais anucleadas (cornificadas) e 54,7% das células eram superficiais nucleadas. No grupo L, 71% das células observadas eram células superficiais anucleadas (cornificadas) e 29% eram células superficiais nucleadas. Isto indica que nesses dois grupos as fêmeas estavam em estro de período avançado. Já no grupo E, houve a presença de células intermediárias (20%), o que segundo THRALL e OLSON (1999), no período de estro as células intermediárias estão presentes em pequeno número e as células epiteliais vaginais tornam-se progressivamente cornificadas quando as concentrações de estradiol aumentam. Neste grupo 54,7% das células eram epiteliais superficiais anucleadas (cornificadas) e 75% das células eram superficiais nucleadas, classificando-se como início de estro nas fêmeas deste grupo no momento da laparoscopia.

## 6 CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado concluiu-se que:

- A utilização do implante de etonogestrel (68 mg / implante / 37 dias) prévia à administração de gonadotropinas exógenas em gatas domésticas induziu inatividade ovariana, mostrando-se eficaz, sugerindo a possibilidade de utilização prévia em programas de inseminação artificial em felídeos selvagens.
- O progestágeno levonorgestrel oral na dose de 0,075 mg/dia durante 37 dias/gata, não provocou supressão ovariana durante a sua utilização no estudo.
- O controle do ciclo estral através da utilização de etonogestrel, prévio à estimulação com gonadotropinas exógenas para a inseminação artificial, resulta em uma resposta ovariana mais uniforme.
- A inibição da atividade ovariana obtida pelo uso do etonogestrel em gata doméstica possibilita sua utilização como contraceptivo.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, C. Cidades incham na Amazônia: para que o morador urbano perceba o estrago. **O Estado de São Paulo**, a. 126, n. 40773, 2005.
- BALDWIN, C. J.; PETER, A. T.; BOSU, W. T.; DUBIELZIG, R. R. The contraceptive effects of levonorgestrel in the domestic cat. **Lab Anim Sci**, 44: 261-269, 1994.
- BARBIERI, R. L.; HORNSTEIN, M. D.; Assisted reproduction – in vitro fertilization success is improved by ovarian stimulation with exogenous pituitary suppression with gonadotropin – releasing hormone analogues. **End Rev**, 20: 249-252, 1999.
- BENNINK, H. J. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of Implanon, a single-rod etonogestrel contraceptive implant. In: **Europe Journal Contraceptive Reproduction Health Care**, 2000, Sep; 5, Suppl 2: 12-20, Free University, Brussels, Belgium.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em: <<http://www.agirazul.com.br/Especies/brasil.htm>>. Acesso em: 22 maio 2005.
- BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Assessing reproductive status in wild felids by noninvasive faecal steroid monitoring. **In Zoo Yb.**, 35: 173-191, 1997.
- BROWN, J. L.; WASSER, S. K.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. **Biol Reprod**, 51: 776-86, 1995.
- BROWN, J. L.; GRAHAM, L. H.; WIELEBNOWSKI, N.; SWANSON, W. F.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. G.. Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids. **Reprod Fertil Suppl**, 57: 71-82, 2001.
- BRUN, M. V.; BECK, C. A. C. Aplicações clínicas e experimentais da laparoscopia em cães – Artigo de revisão. **Rev Fac Zootec Vet Agro Uruguaiana**, v. 5/6, n. 1, p. 5-11, 1999.
- BURKE, T. J. Canine vaginal cytology. In: **Small Animal Reproduction and Fertility**. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1986. p. 97-111.
- CHAGAS, J.; SILVA, J.; LOPES, L.; ROBALO, S..Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. **Anim Reprod Sci**, 69:1-8, 2002.
- CHARD, T. **An introduction to radioimmunoassay and related techniques**. Elsevier, Amsterdam, 1989.
- COLBY, E. **Laboratory Animal Care**, 20, 1970.
- CROXATTO, H. B.; MAKARAINEN, L. The pharmacodynamics and efficacy of Implanon; an overview of the data. **Contraception Supplement**, 58: 91-99, 1998.

DAMARIO, M. A.; MOOMJY, M.; TORTORIELLO, D.; MOY, F.; DAVIS, O. K.; ROSENWAKS, Z. Delay of gonadotropin stimulations in patients receiving gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) therapy permits increased clinic efficiency and may enhance in vitro fertilization (IVF) pregnancy rates. **Fertil Steril**, 68: 1004-1010, 1997.

DAVIES, G. C.; LI, X. F.; NEWTON, J. R.; BEEK AVAN. COELINGH HJT. Release characteristics, ovarian activity and menstrual bleeding pattern with a single contraceptive implant releasing 3-ketodesogestrel. **Contraception**, 47: 251-61, 1993.

DONOGHUE, A. M.; JONSTHON, L. A.; LUNSON, L.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. **Biol Reprod**, 46: 972-980, 1992.

FOSSUM, G. T.; DAVIDSON, A.; PAULSON, R. J. Ovarian hyperstimulation inhibits embryo implantation in the mouse. *J in vitro Fert Embr Trans*, 6: 7-10, 1989.

FOTHERBY, K. Levonorgestrel: clinical pharmacokinetics. **Clin Pharmacokinet**, 28: 203-215, 1995.

GOODROWE, K. L.; WILDT, D. E. Ovarian response to human chorionic gonadotropin or gonadotropin hormone in cats in natural or induced estrus. **Theriogenology**, 25: 811-817, 1987.

GOODROWE, K. L.; HOWARD, J. G.; SCHMIDT, P. M.; WILDT, D. E. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. **J Reprod Fertil Suppl**, 39: 73-90, 1989.

GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiology action of progesterone in target tissues. **Endocrine Review**, 18: 502-517, 1997.

GRAHAM, L. H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. **Theriogenology**, 54: 1117-1131, 2000.

GUDERMUTH, D. F.; NEWTON, L.; DAELS, P.; CONCANNON, P. Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. **J Reprod Fertil Suppl**, 51: 177-184, 1997.

HERRON, M. A. Feline vaginal cytologic examination. **Feline Practice**, 7: 36-39, 1977.

HOWARD, J. G.; ROTH, T. L.; BYERS, A. P.; SWANSON, W. F.; WILDT, D. E. Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. **Biol Reprod**, 56: 1059-1068, 1997.

HOWARD, J. G.; BYERS, A. P.; BROWN, J. L.; BARRET, S. J.; EVANS, M. Z.; SCHWARTZ, R. J.; WILDT, D. E. Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). **Zoo Biology**, 15: 55-69, 1996.

HOWARD, J. G.; DONOGHUE, A. M.; BARONE, M. A.; GOODROWE, K. L.; BLUMER, E. S.; SNODGRASS, K.; STARNES, D.; TUCKER, M.; BUSH, M.; WILDT, D. E.

Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinoyix jubatus*). **J Zoo Wild Med**, 23: 288-300, 1992.

HUBER, J. Pharmacokinetics of Implanon: an integrated analysis. **Contraceptive Supplement**, 58: vol. 6: 85-91, 1998.

KENIGSBERG, D.; LITTMAN, B. A.; WILLIAMS, R. F.; HODGEN, G. D. Medical hypophysectomy: II, Variability of ovarian response to gonadotropin therapy. **Fertil Steril**, 42: 116, 1984.

LOFSTEDT, R. M.; PATEL, J. H. Evaluation of the ability of altrenogest to control the equine estrous cycle. **J Am Vet Med Assoc**, 194: 361-364, 1989.

MCCANN, M. F.; POTTER, L. S. Progestin-only contraception: a comprehensive review. **Contraception**, 50 (Suppl 1): S1-198, 1994.

MELLEN, J.; WILDT, D. E. AZA Taxon Advisory Group Profile Felids. **Animal Kingdom**, 2002.

MORAES, W et al. Succesful Artificial Insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*), **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**, 1997.

MORATO, R. G.; BARNABE, R. C. Biotécnicas de reprodução aplicadas à preservação de felídeos selvagens, **Revista Clínica Vet**, 12, jan./fev. 1998.

MORROW, C. J; WOLFE, B. A.; ROTH, T. L.; WILDT, D. E.; BUSH, M.; BLUMER, E. S.; ATKINSON, M. W.; MONFORT, S. L.; Comparing ovulation synchronization protocols for artificial insemination in the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). **Anim Reprod Sci**, 59: 71-86, 2000.

MUNSON, L.; MANSON, R. J. Pathological findings in the uteri of progestogen implanted exotic felids. **American Association of Zoo Veterinarians**, p. 311, 1991.

OLIVEIRA, T. G. **Neotropical cats: ecology and conservation**. São Luiz: EDUFMA, 1994.

ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. Termination of pregnancy in cats using a combination of cabergolin, a new dopamine agonist, and a synthetic PGF 2 alfa, cloprostenol. **J Reprod Fertil**, 51: 259 – 263, 1997.

PARAKKAL, S. R.; GREGORIE, A. I.; Differentiation of vaginal epithelium in the normal and hormone treated rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, 6: 117-130, 1972.

PELICAN, K. M.; WILDT, D. E.; OTTINGER, M. A.; HOWARD, J. G. Short-term ovarian suppression with levonorgestrel before gonadotropin stimulation improves ovarian response for IVF in the domestic cat. **Theriogenology**, 57: 679, 2002.

PELICAN, K. M. Ovarian suppression with the progestin levonorgestrel but not the GnRH antagonis antide, induces a consistent response to exogenous gonadotropin in the

domestic cat. **Doctor Thesis National Zoological Park, Smithsonian Institution**, Washington, DC, 2004.

RHODES, M. T.; DAVIS, D. L.; STENVESON, S. J. Flushing and altrenogest affect litter traits in gilts. **J Anim Sci**, 69: 34-40, 1991.

ROTH, T. L.; WOLFE, B. A.; LONG, J. A.; HOWARD, J. G.; WILDT, D. E. Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. **Biol Reprod**, 57: 165-171, 1997.

SAUER, M. V.; PAULSON, R. J.; LOBO, R. A. Comparing the clinical utility of GnRH antagonist to GnRH agonist in an oocyte donation program. **Gynecol Obstet Invest**, 43: 215-318, 1997.

SEAGER, S. W. J.; WILDT, D. E.; CHAKRABORTY, P. K. **Endocrinology**, 107: 1212, 1980.

SHORR, E. Effect of concomitant administration of estrogens and progesterone on vaginal smear in woman. **PROCEEDINGS OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE**, 43: 501-506, 1940.

SIMON, F; CASSARO, K; QUILLEN, P. Small felid breeding project at São Paulo Zoo. **International Zoo Yearbook**, 35: 159-164, 1997.

SIVIN, I. Contraception with Norplant implants, **Hum Reprod**, 9: 1818-1826, 1994.

SMITZ, J.; TAVANIOTOU, A.; BOURGAIN, C.; DEVROEY, P. Ovulation induction disrupts luteal phase function. **Ann N Y Acad Sci**, 943: 55-63, 2001.

SWANSON, W. F; WILDT, D. E. Strategies and progress in reproductive involving small cat species, Review Small Felids Reproduction Research. **InZoo Yb**, 35:152-159,1997.

SWANSON, W. F. Research in nondomestic species: experiences in reproductive physiology research for conservation of endangered felids. **In ILAR J.**, 44(4): 307-16, 2003.

SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Anim Reprod Sci**, 21: 82-83, jul. 2004.

THRALL, M. A.; OLSON, P. N. The vagina. In: **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. St Louis, MO: Ed. Mosby Inc., 1999. p. 240-248.

TURNER, J. W.; KIRKPATRICK, J. F. Reversible contraception in nondomestic animals. **J Zoo Wildl Med**, 22: 392-408, 1991.

TURZILLO, A. M.; NETT, T. M. Regulation of GnRH receptor gene expression in sheep and cattle. **J Reprod Fertil Suppl**, 54:75-86, 1999.

ZELEZNIK, A. J. Follicle selection in primates: "Many are called but few are chosen". **Biol Reprod**, 65: 655- 659, 2001.

WILDT, D. E. **Animal laparoscopy**. Baltimore: Williams & Wilkins. 1980. p. 73-94.

WILDT, D. E.; ROTH, T. L. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. **In Zoo Yb**, 1997, 35: 164-172.

WILDT, D. E.; BROWN, J. L.; SWANSON, W. F. Cats. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. (eds.). **Encyclopedia of Reproduction**, vol. 1. New York: Academic Press; 497-510, 1998.

WILDT, D. E.; PANKO, W. B.; SEAGER, S. W. J. Effect of prostaglandin F 2 alfa on endocrine: ovarian function in the domestic cat. **Prostaglandins**, 18: 883-892, 1979.

WILDT, D. E.; KINNEY, G. M.; SEAGER, S. W. J. Gonadotropin induced reproductive cyclicity in the domestic cat., **Lab Anim Sci.**, 28:301, 1978.

WOLFE, M. W.; ROBERSON, M. F.; STUMPF, T. T.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biol Reprod**, 41: 997-1003, 1989.

WOOD, C. M.; KORNEGAY, E. T.; SHIPLEY, C. F. Efficacy of altrenogest in synchronizing estrous in two swine breeding programs and effects on subsequent reproductive performance in sows. **J Anim Sci**, 70: 1357-1364, 1992.