

TATIANE MICHELETTI RIBEIRO SILVA

**O uso de altrenogest para protocolos de reprodução assistida em  
gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Orientador: Prof. Dr. Nei Moreira

Curitiba, 2009

Silva, Tatiane Micheletti Ribeiro

O USO DE ALTRENOGEST PARA PROTOCOLOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*) / Tatiane Micheletti Ribeiro Silva – Curitiba, 2009.

96f.

Orientador: Nei Moreira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

1. Felídeos. 2. Animais silvestres. 3. Reprodução

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “O USO DE **ALTRENOGEST PARA REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM GATO-DO-MATO-PEQUENO** (*Leopardus tigrinus*)” apresentada pela Mestranda TATIANE MICHELETTI RIBEIRO SILVA declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata aprovada para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 18 de dezembro de 2009

Professor Dr. Nei Moreira  
Presidente/Orientador

Professor Dr. Romildo Romualdo Weiss  
Membro

Dra. Priscila Viau Furtado  
Membro

*À Gaia, pelo milagre da vida...*

## Agradecimentos...

Primeiramente aos meus pais, à minha madrasta, à minha avó e tias, e às minhas irmãs, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram.

Aos meus grandes amigos que tanto amo, em especial ao meu afilhado Lucas, pois sem vocês a vida seria completamente sem graça.

Ao meu namorado pelo apoio nas horas mais necessárias, por me ajudar a (quase) sempre manter a calma e por estar sempre do meu lado, mesmo às vezes tão longe.

À minha cadela Khaloo, que agüentou bravamente morar em um apartamento durante o primeiro ano do Mestrado e nunca me deixou sentir sozinha.

Ao meu querido orientador Dr. Nei Moreira por toda a atenção dada durante o trabalho, e em especial por sua dedicação à área, ao meu comitê de orientação, os professores Dr. Luiz E. Kozicki e Dr. Romildo R. Weiss e aos alunos de graduação da UFPR que me auxiliaram em diversos procedimentos durante o trabalho.

Meus sinceros agradecimentos à Itaipu Binacional, na pessoa do veterinário Wanderlei de Moraes, por ter permitido a realização do experimento do Capítulo 03 dentro do Hospital Veterinário e no Criadouro de Animais Silvestres (CASIB) do Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional.

Agradeço também a todos os responsáveis por manter o Hospital Veterinário, o Zoológico e o CASIB, aos funcionários e tratadores que muito me auxiliaram durante esse trabalho e em especial ao veterinário Zalmir S. Cubas, ao biólogo Marcos José de Oliveira e à bióloga Rosana P. Almeida por toda ajuda e amizade nesses últimos anos.

Agradeço à Dra. Priscila Viau Furtado e ao Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, pelo auxílio e por permitir o uso do Laboratório de Dosagens Hormonais da USP para a extração das amostras do experimento.

Agradeço aos responsáveis pelo Centro de Conservação e Pesquisa do *Smithsonian Institute*, em especial à Dra. Janine Brown e à Sarah Putman, por me proporcionarem todo o material, a estrutura e o alojamento para o processamento das amostras nos Estados Unidos. Sem esse auxílio, o trabalho jamais teria sido concluído.

A todos que, de uma maneira ou outra, foram fundamentais para a realização desse trabalho, muito obrigada.

*"No semblante de um animal que não fala,  
há todo um discurso que somente  
um espírito sábio pode entender"*

*- Poema Hindu*

## RESUMO

O desmatamento é comprovadamente uma das maiores causas da perda de biodiversidade no planeta. Esforços para evitar que mais espécies sejam perdidas são necessários em diversas frentes. Uma das frentes que vem sendo propagada, em especial na conservação de animais de topo de cadeia como os felídeos, é a conservação *ex situ*. A manutenção de diversidade biológica e genética é uma das preocupações dos pesquisadores que atuam com a conservação de espécies de felídeos, já que estes são animais que desaparecem rapidamente de áreas desmatadas. Com isso, a reprodução em cativeiro dessas e de outras espécies ameaçadas vem se apresentando como uma solução viável para auxiliar na conservação. Duas linhas de trabalho são comuns em criadouros e zoológicos: reprodução natural e a reprodução assistida. Na primeira, os animais são pareados e espera-se que se reproduzam e criem seus filhotes de maneira natural. Na segunda, técnicas como inseminação artificial e fertilização *in vitro*, entre outras, são utilizadas. Cada uma das linhas apresenta vantagens e desvantagens, assim como obstáculos a serem superados. Em especial, com técnicas de reprodução assistida como, por exemplo, com o monitoramento endócrino não-invasivo, é possível compreender de maneira mais profunda a fisiologia reprodutiva dessas espécies ameaçadas, em especial de pequenos felídeos, que são menos estudados do que grandes felídeos. No presente trabalho, objetivou-se observar o perfil hormonal de fêmeas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) com e sem a administração de uma progestina previamente à administração das gonadotropinas exógenas eCG (gonadotropina coriônica eqüina) e hCG (gonadotropina coriônica humana). Foi possível concluir que a progestina altrenogest (Regumate®, Intervet, São Paulo), quando administrada por ao menos 14 dias previamente à administração de gonadotropinas eCG e hCG, reduz a média das concentrações de estrógenos e progestágenos, apresentando respostas mais homogêneas, assim como menores chances de quadros de hiperestrogenismo. Esses quadros são freqüentes com o uso dessas gonadotropinas, e são apontados como uma das principais causas das falhas na reprodução assistida de pequenos felídeos. Além disso, a progestina se mostrou eficaz na redução da atividade ovariana durante o período em que foi administrada.

Palavras-chave: Felídeos; indução à ovulação; reprodução assistida

## ABSTRACT

Deforestation is absolutely one of the primary causes of biodiversity loss on our planet. Efforts to avoid losing more species are needed in different ways. One of the fronts that has been propagated, especially regarding the conservation of top chain animals as felids, is the *ex situ* conservation. The maintenance of biological and genetic diversity is one of the concerns of researchers worried about the maintenance of Felidae species, as this species disappear quickly from deforested areas. Thus, the captive breeding of this and other endangered species is reported as a feasible solution to assist in conservation. Two approaches are common in zoos and breeding centers: natural breeding and assisted reproduction. For natural breeding the animals are paired and expected to breed naturally. The assisted reproduction counts on techniques like artificial insemination and in vitro fertilization, among others, to reproduce their animals. Each of them has advantages, disadvantages, and barriers to be overcome. Although the first approach is easier, with the use of assisted reproduction techniques, such as non-invasive endocrine monitoring, it is possible to understand more thoroughly the reproductive physiology of endangered species like small felids, which are less studied than the big cats. The present study aimed to observe the hormonal profile of small spotted cat (*Leopardus tigrinus*) females, with and without the administration of a progestin, before the administration of the exogenous gonadotropins eCG (equine chorionic gonadotropin) and hCG (human chorionic gonadotropin). The altrenogest (Regumate®, Intervet, Sao Paulo) prior to administration of exogenous gonadotropins eCG and hCG. It was possible to conclude that the progestin altrenogest (Regumate®, Intervet, Sao Paulo), when administered for at least 14 days prior to the administration of eCG and hCG gonadotropins, reduces the average concentrations of estrogens and progestins, showing more homogeneous responses and less likely to present hyperestrogenic responses. These responses are frequent after the use of gonadotropins, and are pointed out as a major cause of failures in assisted reproduction of small cats. In addition, the progestin proved to be effective in reducing ovarian activity during the period when it was administered.

Keywords: Felidae; ovulation induction; assisted reproduction



### Lista de Tabelas

Tabela 1 - Informações gerais sobre as fêmeas de gato-do-mato-pequeno utilizadas.....	54
Tabela 2 - Médias das concentrações antes e após a aplicação de eCG em ambas as fases, e seus respectivos desvios-padrão.....	58

### Lista de Figuras

Figura 1 - Calendário de duração de coletas e indicação das datas de administração de eCG, hCG, inseminação artificial (IA) e colocação (♂) e retirada (♂x) de machos.....	55
Figura 2 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1620 (>12 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	61
Figura 3 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1620 (>12), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias), com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	61
Figura 4 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 2284 (> 4 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	62
Figura 5 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 2284 (> 4 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias), com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	62
Figura 6 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1909 (9 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	63
Figura 7 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1909 (9 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias) , com intervalo de 103 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	63
Figura 8 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1707 (11 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	64
Figura 9 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1707 (11 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias) , com intervalo de 103 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	64
Figura 10 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 2061 (>7 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	65
Figura 11 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 2061 (>7 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias), com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	65

Figura 12 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1895 (>9 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	66
Figura 13 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno ( <i>L. tigrinus</i> ), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1895 (>9 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias), com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG. ....	66
Figura 14 - Concentração média e erro padrão de E prévio à administração de eCG em ambas as fases, para todas as fêmeas. Valores marcados com asteriscos são significativamente diferentes entre si ( $p<0,05$ ). ....	67
Figura 15 - Concentração média e erro padrão de E posterior à administração de eCG em ambas as fases, para todas as fêmeas. Valores marcados com asteriscos são significativamente diferentes entre si ( $p<0,05$ ). ....	68
Figura 16 - Concentração média e erro padrão de P posterior à administração de eCG em ambas as fases, para todas as fêmeas. Valores marcados com asteriscos são significativamente diferentes entre si ( $p<0,05$ ). ....	68
Figura 17 – Médias e erros-padrão das concentrações basais de metabólitos de estrógenos na primeira e na segunda fase do experimento, após a aplicação do eCG. Valores marcados com asteriscos são significativamente diferentes entre si ( $p<0,05$ ). ....	69

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. OBJETIVOS GERAIS .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2. REPRODUÇÃO NATURAL DE FELÍDEOS SELVAGENS EM CATIVEIRO - DIFICULDADES E ORIENTAÇÕES .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Estresse .....	18
2.1.2. Manejo .....	19
2.1.3. Recintos .....	20
2.1.4. Nutrição.....	21
2.1.5. Acompanhamento clínico .....	22
<b>2.2. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>22</b>
<b>3. REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM FELÍDEOS SELVAGENS – UMA REVISÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. ASPECTOS DA REPRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
3.2.1. Monitoramento hormonal .....	29
3.2.2. Influência da sazonalidade na reprodução.....	29
3.2.3. Protocolos espécie-específicos para IA, FIV e Transferência de embriões (TE) .....	30
3.2.4. Resposta ovariana às gonadotropinas .....	31
3.2.5. Ovulação .....	32
<b>3.3. BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS .....</b>	<b>33</b>
3.3.1. IA (Inseminação artificial), FIV (Fertilização in vitro), ICSI (Injeção intracitoplasmática de espermatozóide) e TE (transferência de embriões) .....	33
3.3.2. Supressão da atividade ovariana .....	35
3.3.3. Maturação de oócitos e embriões in vitro .....	36
3.3.4. Criopreservação e refrigeração de sêmen .....	38

3.3.5. Criopreservação e refrigeração de embriões, ovário, oócitos e testículos .....	39
3.3.6. Espermatozóides epididimários e testiculares .....	40
3.3.7. Transplantes de órgãos reprodutivos .....	41
3.3.8. Uso de animais soropositivos.....	41
<b>3.4. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>
<b>4. O USO DE ALTRENOGEST PARA REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (<i>LEOPARDUS TIGRINUS</i>).....</b>	<b>50</b>
<b>4.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
4.2.1 Animais e coleta de dados .....	53
4.2.2. Indução de supressão ovariana e hormônios gonadotrópicos .....	54
4.2.3 Protocolo de extração e do enzimoimunoensaio.....	56
4.2.4 Análise de dados.....	57
<b>4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
4.3.1. Dosagens hormonais .....	58
4.3.2 Ciclo prévio ao uso de eCG e hCG .....	67
4.3.3 Ciclo posterior ao uso de eCG e hCG .....	67
<b>4.4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>4.5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>
<b>VITA .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO I - NORMAS DOS PERIÓDICOS REVISTA BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL E THERIOGENOLOGY.....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A expansão das áreas agrícolas e o rápido crescimento populacional urbano estão reduzindo drasticamente as áreas naturais e, com elas, a diversidade biológica. O relatório oficial da *Millennium Ecosystem Assessment* (2007) indicou que, anualmente, cerca de 130.000 Km<sup>2</sup> de florestas tropicais são derrubadas, dando lugar, principalmente, a atividades agropecuárias. No Brasil, todos os biomas sofreram perdas significativas nas últimas duas décadas. Segundo dados da Associação SOS Mata Atlântica (2008), por exemplo, a Mata Atlântica já perdeu cerca de 93% de seu território original de 1.300.000 Km<sup>2</sup>.

Embora os efeitos do desmatamento afetem praticamente todas as populações silvestres, espécies de topo de cadeia ecológica, como os felídeos, são especialmente prejudicados em função das alterações ambientais causadas pelo Homem. O principal resultado das altas taxas de desmatamento é que as populações dessas espécies estão com taxa de mortalidade superior ao seu crescimento populacional normal, o que é preocupante em se tratando de preservação de biodiversidade.

Diversas frentes estratégicas são necessárias para conter a redução da diversidade biológica, e a reprodução em cativeiro de espécies ameaçadas é uma delas. Nessa frente de trabalho é possível trabalhar com duas abordagens principais: reprodução natural e reprodução assistida, incluindo a formação de bancos de reserva genômica.

Os programas de reprodução em cativeiro têm a responsabilidade de reproduzir espécies ameaçadas para fins conservacionistas, garantindo a funcionalidade da reprodução assistida como elemento essencial para a preservação dessas espécies. Um exemplo de programa bem sucedido é o Plano de Sobrevivência de Espécies (SSPs) da Associação Americana de Aquários e Zoológicos (AZA). O objetivo principal do plano estabelecido para pequenos felídeos é manter a diversidade genética em no mínimo 90% por até cem anos, de 5 das 28 espécies de pequenos felídeos do mundo, incluindo a jaguatirica brasileira (*Leopardus pardalis mitis*). O plano também prevê a proteção dessas espécies em seu habitat natural (SWANSON, 2006).

Pesquisas relacionadas à fisiologia reprodutiva realizadas no Brasil com pequenos felídeos já caracterizaram padrões reprodutivos em três espécies (MORAES et al., 1997; MOREIRA et al., 2001; SWANSON e BROWN, 2004), avaliaram o impacto de agentes estressores e a importância do enriquecimento ambiental (MOREIRA et al.,

2007), examinaram respostas ovarianas e imunológicas a gonadotropinas exógenas (PAZ et al., 2005) e determinaram a interferência da nutrição na produção espermática (SWANSON e BROWN, 2004; PAZ et al., 2006) e na qualidade de oócitos recuperados (SWANSON et al., 2002). Mesmo com bons resultados dos estudos citados, muitos outros ainda são necessários para auxiliar efetivamente a conservação das espécies de pequenos felídeos no Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT 2007. Current State & Trends Assessment. **Disponível em** <<http://www.millenniumassessment.org/>>. **Acesso em** 31/10/2009.
2. MORAES, W.; MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; LACERDA, O.; GOMES, M.L.F.; MUCCILOLO, R.G.; SWANSON, W.F. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). In: **Proceedings of American Association of Zoo Veterinarians**, 1997, Houston. Anais...Texas: AAZV, 1997. p.334-336. Resumo.
3. MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; MORAES, W.; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; PASQUALI, O.L.; GOMES, M.L.F.; MORAIS, R.N.; WILDT, D.E.; BROWN, J.L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v.20, n.2, p.103-116, 2001.
4. MOREIRA, N.; BROWN, J.L.; MORAES, W.; SWANSON, W.F.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, v.26, p.441 - 460, 2007.
5. PAZ, R.C.R.; MORATO, R.G.; CARCIOFI, A.C.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; PESSUTI, C.; SANTOS, E.F.; FERREIRA, F.; BARNABE, R.C. Influence of nutrition on the quality of semen in Jaguars (*Panthera onca*) in Brazilian zoos. **International Zoo Yearbook**, v.40, n.1, p.351-359, 2006.
6. PAZ, R.C.R.; SWANSON, W.F.; DIAS, E.A.; ADANIA, C.H.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C. Ovarian and immunological responses to alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Zoo Biology**, v.24, p.247–260, 2005.

7. SOS MATA ATLÂNTICA 2008. Relatório de Atividades 2008. **Disponível em** <<http://www.sosma.org.br>>. **Acesso em** 31/10/2009.
8. SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.21-34, 2004.
9. SWANSON, W.F. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. **Theriogenology**, v.66, p.49-58, 2006.
10. SWANSON, W.F.; PAZ, R.C.R.; MORAIS, R.N.; GOMES, M.L.F.; MORAES, W.; ADANIA, C.H. Influence of species and diet on efficiency of in vitro fertilization in two endangered Brazilian felids—the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.593, 2002.

## **1.1. OBJETIVOS GERAIS**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade da progestina altrenogest como redutor temporário da atividade ovariana em fêmeas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), assim como verificar a existência ou não de quadros de hiperestrogenismo e a homogeneidade da resposta hormonal com e sem o uso da progestina prévia à aplicação de gonadotropinas exógenas.

## **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Observar as diferenças dos níveis de metabólitos de estrógenos e de progestágenos em fêmeas de gato-do-mato-pequeno sem o uso da progestina altrenogest e com o uso da mesma, durante o período prévio e posterior à aplicação de eCG;



## **2. Revisão em reprodução natural de felídeos selvagens em cativeiro - dificuldades e orientações**

*Formatado para a Revista Brasileira de Reprodução Animal*

**Resumo:** Para evitar maiores perdas de biodiversidade é necessário direcionar esforços para diversas áreas da conservação, como a reprodução em cativeiro. O maior obstáculo, porém, é a condição de estresse crônico que diversos animais desenvolvem em cativeiro por deficiências relacionadas ao manejo, condições de recinto, nutrição e acompanhamento clínico. Essa revisão objetivou elencar os aspectos referentes às maiores dificuldades considerando a reprodução natural de felídeos em cativeiro, e concluiu que melhores resultados na reprodução de felídeos em cativeiro, certamente são derivados de baixos índices de estresse crônico no plantel.

**Palavras-chave:** Reprodução em cativeiro, estresse, manejo em cativeiro, felídeos neotropicais.

## **Natural reproduction of wild felids in captivity – difficulties and orientations**

**Abstract:** Efforts in different areas of conservation, like captive breeding, are extremely important to avoid further loss of biodiversity. The biggest obstacle in this approach however, is the condition of chronic stress that several animals develop in captivity because of failures related to the management, enclosure conditions, nutrition and health. This review aimed to list the main aspects considering the natural reproduction of felids in captivity, and concluded that good results in the reproduction of felids in captivity are certainly derived from low levels of chronic stress.

**Keywords:** Captive breeding, stress, management in captivity, Neotropical felids.

## 2.1. INTRODUÇÃO

O desmatamento, a redução e o isolamento de áreas de floresta são os principais fatores responsáveis pela perda de diversidade biológica no planeta. Para mitigar os efeitos da rápida perda de diversidade genética, esforços devem ser direcionados para a conservação da fauna em várias frentes estratégicas, com a reprodução de animais em cativeiro como ferramenta auxiliar.

Há um consenso entre pesquisadores de que é necessário um maior esforço para a compreensão da biologia reprodutiva de espécies selvagens ameaçadas, de modo a aumentar a eficiência reprodutiva, diminuir a taxa de mortalidade neonatal em cativeiro e criar bancos de reserva genética (MELLEN, 1991; BROWN, 1994; KLEIMAN, 1996; MORATO e BARNABE, 1998; MOREIRA et al., 2001; SWANSON et al., 2003).

Até mesmo pesquisadores que não concordam integralmente com a estratégia de reprodução em cativeiro, sugerem que não havendo a possibilidade de conservação das espécies em seu habitat natural, a reprodução em cativeiro pode ser uma alternativa viável (SNYDER et al., 1996). Portanto, em face das inúmeras ameaças à vida selvagem, é necessário investir também nas ações para a conservação *ex situ*, sendo fundamental para isso o conhecimento da biologia reprodutiva das espécies alvo.

Diversos trabalhos indicam um grande potencial das técnicas de reprodução assistida (RA) para felídeos cativos (POPE, 2000; SWANSON e BROWN, 2004; PELICAN et al., 2006; SWANSON, 2006; ANDRABI e MAXWELL, 2007). Porém, ainda é necessário aprimorar muitas das técnicas para que a RA se apresente efetivamente como uma ferramenta útil na conservação de espécies silvestres.

Nesse contexto, a reprodução natural em cativeiro, utilizando-se o manejo genético populacional, sobressai como uma forma mais simples de se manter a diversidade genética em pequenas populações. Cruzamentos planejados e introdução periódica de material genético de novos fundadores permitem uma administração da variabilidade genética de populações cativas (e ocasionalmente de populações em vida livre), evitando a perda de diversidade genética (ANDRABI e MAXWELL, 2007). Em longo prazo, isso apresenta um efeito muito benéfico para a conservação de pequenas populações (SWANSON, 2006).

Além disso, há fortes indícios de que o *inbreeding*, ou seja, a reprodução entre indivíduos com carga genética muito semelhante, esteja associado a um aumento no

risco de extinção de espécies em condição crítica (SWANSON, 2006). Há também evidências de que a teratospermia em machos de felídeos silvestres é, em parte, causada pela redução na diversidade genética (PUKAZHENTHI et al., 2006). O *inbreeding* também apresenta outras conseqüências como uma maior taxa de mortalidade neonatal (RALLS et al., 1988), além de maior susceptibilidade a doenças e outros defeitos genéticos derivados da alta taxa de homozigose. Dessa maneira, a reprodução natural programada de espécies ameaçadas se apresenta como uma boa alternativa no auxílio à manutenção da biodiversidade.

Entretanto, dificuldades nessa frente de pesquisa são evidenciadas quando a reprodução natural é comprometida por vários fatores, sendo o mais relevante deles o estresse crônico. Diversos fatores podem ser responsáveis por desencadear condições de estresse crônico, também denominado *distresse* (do inglês *distress*) (CARLSTEAD e SHEPHERDSON, 1994), como manejo, condições de recinto, nutrição e acompanhamento clínico inadequados.

### 2.1.1 Estresse

As alterações fisiológicas decorrentes do estresse são resultantes da interação do animal com o meio e permitem reações frente a situações de risco (MOBERG, 2000). Todos os animais apresentam mecanismos fisiológicos reativos e adaptativos a situações estressantes, tais como alterações comportamentais, endócrinas, imunológicas e do sistema nervoso autônomo (MÖSTL e PALME, 2002). Situações críticas que provocam uma reação defensiva do organismo são normalmente benéficas, pois garantem a sobrevivência dos seres vivos em seu habitat (MOBERG, 2000).

Em cativeiro, quando submetido a um fator estressante, um animal pode não encontrar uma alternativa adequada para sua reação e essa falta de possibilidade de fuga ou luta podem gerar alterações fisiológicas que afetam o bem-estar e a homeocinese orgânica, vindo o animal a sofrer o “*distresse*” (MOBERG, 2000; MÖSTL e PALME, 2002), termo utilizado para o estresse crônico.

Portanto, é imprescindível reconhecer o momento em que o estresse agudo se torna crônico (MOBERG, 2000) em animais cativos. Recentemente, foi comprovada correlação positiva entre comportamento estereotipado e altas concentrações de corticóides em leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*) (WIELEBNOWSKI et al., 2002),

gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) (MOREIRA et al., 2007). A identificação de distúrbios comportamentais e de alterações na concentração hormonal, acessadas por meio de ensaios imunológicos, quando utilizadas em conjunto, podem indicar exatamente o momento em que o estresse em cativeiro passa a ser caracterizado como distresse.

O distresse afeta a saúde dos animais em cativeiro de diversas maneiras (MOBERG, 2000) mas, sem dúvida, a mais evidente é o comprometimento das funções reprodutivas (CARLSTEAD e SHEPHERDSON, 1994). Ele exerce uma influência direta na fisiologia sexual, alterando a produção de hormônios reprodutivos como o estradiol, a progesterona e a testosterona. A resposta fisiológica ao estresse envolve um mecanismo de ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) quando o animal se encontra em uma situação de ameaça. Essa ativação estimula a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo, que incita a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise e conseqüentemente de glicocorticóides pelo córtex da adrenal.

Por meio do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal (HPG) os hormônios de resposta ao estresse inibem a ação do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), que, por sua vez, não atua apropriadamente na liberação dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH), alterando as funções reprodutivas nas fêmeas. Portanto, uma quantidade elevada e freqüente de cortisol na circulação ocasiona uma diminuição na eficiência reprodutiva (CARLSTEAD e SHEPHERDSON, 1994).

Deve-se ressaltar que é necessário mais de um indicador de estresse para se concluir que um determinado animal está sofrendo os efeitos do distresse. O fator complicador nessa avaliação é que tanto respostas adequadas ao estresse, quanto respostas que promovem distresse, apresentam-se endocrinologicamente da mesma maneira, havendo a liberação de glicocorticóides. Portanto, é necessário utilizar outros parâmetros de avaliação da condição fisiológica do animal estudado, além do monitoramento endócrino não invasivo como, por exemplo, o acompanhamento comportamental (MOBERG, 2000).

### 2.1.2. Manejo

Em cativeiro, o estresse crônico é ocasionado principalmente pelo manejo incorreto dos animais, sendo fatores causadores de estresse recintos inadequados, alta densidade populacional, relação social inadequada para a espécie, alimentação

desequilibrada e cuidados médicos e sanitários insuficientes (SWANSON et al., 2002; WIELEBNOWSKI et al., 2002; MOREIRA et al., 2007; CROSIER et al., 2007).

A compreensão do animal cativo é que o ser humano é um predador e, portanto, representa uma ameaça à sua sobrevivência. Para animais de vida livre recém chegados ao cativeiro, o fato de ter que visualizar, ouvir e inalar o odor de pessoas ou animais estranhos é por si só um fator extremamente estressante. Na prática o que se vê é que muitos animais acabam se acostumando com a presença humana com o passar do tempo, apesar disso não significar que o animal encontra-se completamente adaptado. Animais que não se adaptam completamente ao cativeiro podem sobreviver, mas em alguns casos podem apresentar subfertilidade ou infertilidade.

Mesmo animais já acostumados ao manejo diário preservam o estado de alerta e se alteram na presença humana. Uma medida recomendável nos programas de reprodução de animais em zoológicos e criadouros é conscientizar e treinar tratadores e outros funcionários envolvidos no manejo diário dos animais para a correta observação de comportamento. Isso deve ocorrer, pois são eles que normalmente estão mais em contato com os animais e, portanto, devem estar preparados para observar e informar qualquer alteração de comportamento como, por exemplo, casais que apresentem interações agonísticas, fêmeas em cio e animais com alterações fisiológicas (claudicando, sem apetite, etc.).

### 2.1.3. Recintos

Fêmeas de gato-do-mato-pequeno apresentaram aumento na concentração de glicocorticóides fecais e alterações de comportamento indicativas de estresse, quando transferidas de recintos espaçosos e ambientados para recintos pequenos e sem ambientação (MOREIRA et al., 2007). Além disso, nesse trabalho foi comprovada uma diminuição da atividade esteroidogênica tanto em fêmeas de gato-do-mato-pequeno quanto em fêmeas de gato-maracajá, associada ao aumento da atividade adrenocortical (MOREIRA et al., 2007). Isso indica que a dimensão e o enriquecimento dos recintos são fatores de extrema importância para a redução do estresse associado ao cativeiro em felídeos (MOREIRA et al., 2007).

Outro problema em potencial para a reprodução de felídeos silvestres *ex situ* é a supressão da atividade ovariana em fêmeas e da produção espermática causada pelo manejo inadequado. Em fêmeas de guepardo (*Acinonyx jubatus*), a causa principal do anestro ou da irregularidade do ciclo estral é a manutenção de fêmeas

adultas em um mesmo recinto, seja em pares ou em grupos onde existe uma relação de dominância bem estabelecida (WIELEBNOWSKI et al., 2002). A fêmea subordinada pode apresentar supressão da atividade ovariana, passando a ciclar normalmente após a separação da fêmea dominante (WIELEBNOWSKI et al., 2002).

Em relação a machos de guepardo, existem evidências de que animais cativos apresentam maior concentração basal de corticóides ( $p=0,005$ ) e menor concentração de testosterona ( $p=0,05$ ) do que guepardos em vida livre, sendo isso decorrente do estresse crônico em cativeiro (TERIO et al., 2004). Apesar de Wildt et al. (1987) não terem encontrado diferença significativa na concentração espermática em guepardos cativos ( $n=20$ ) e em vida livre ( $n=8$ ), existem indícios de que, apesar de machos cativos dessa espécie ( $n=60$ ) apresentarem um volume maior de ejaculado, a concentração espermática desses animais seja significativamente menor do que a de animais de vida livre ( $n=97$ ) (CROSIER et al., 2007). Essa diferença nos resultados possivelmente é resultado dos diferentes protocolos anestésicos utilizados, além da grande diferença no número amostral entre os trabalhos.

#### 2.1.4. Nutrição

Em geral, nos zoológicos brasileiros, esses animais recebem dieta composta basicamente de carne (músculos) e vísceras. Quando se considera as necessidades básicas do gato doméstico (*Felis catus*), essa dieta pode ser deficiente em diversas vitaminas e minerais como cálcio, fósforo, cobre, manganês, vitaminas A, D e E, ácido fólico e biotina (PAZ et al., 2006) e afetar não só o desempenho reprodutivo dos animais, como também deixá-los mais suscetíveis a doenças infecto-parasitárias.

Em 2006, Paz et al. demonstraram que machos de onça-pintada (*Panthera onca*) ( $n=8$ ) que tiveram a alimentação suplementada com vitaminas e minerais apresentaram melhora na qualidade do ejaculado e redução das anormalidades espermáticas. Da mesma maneira que atua em machos, uma dieta balanceada melhora a qualidade e fertilidade de oócitos em fêmeas de jaguatirica e de gato-domato-pequeno (SWANSON et al., 2002). Estes trabalhos demonstraram a importância do fornecimento de dietas balanceadas quando se almeja o sucesso reprodutivo em animais mantidos em cativeiro.

As deficiências nutricionais podem ser também causadas pelo consumo insuficiente de alimentos. O estresse causado por contenção física diária e continuada pode levar um animal a não se alimentar e, conseqüentemente, apresentar sinais de

deficiência nutricional. Dessa maneira, a deficiência nutricional pode ser tanto um fator causador de estresse, como uma manifestação do próprio estresse.

### *2.1.5. Acompanhamento clínico*

O acompanhamento clínico rotineiro de animais mantidos em zoológicos e criadouros é de extrema importância. Afecções derivadas do estresse são reconhecidamente comuns em várias espécies de animais, incluindo o ser humano (MOBERG, 2000). Em um trabalho recente de meta-análise, Segerstrom e Miller (2004) consideraram mais de trezentos artigos que relacionavam o estresse com alterações no sistema imune e concluíram que o estresse agudo (duração de poucos minutos) está associado a estímulo de parâmetros indicadores da imunidade natural (imunidade celular) e à supressão de algumas funções da imunidade específica (imunidade humoral). O inverso ocorre com estressores de duração um pouco mais longa, preservando parâmetros da imunidade humoral e suprimindo a imunidade celular. Já no caso de estresse crônico, ocorre a supressão tanto da imunidade humoral como da celular. Portanto, a medição de parâmetros imunológicos (celular e humoral), juntamente com o acompanhamento dos níveis de glicocorticóides, podem ser ferramentas para indicar a ocorrência ou não de distresse em um determinado animal e deve ser considerada como uma alternativa para o acompanhamento do bem estar de animais silvestres cativos (MOBERG, 2000).

O estresse crônico pode ser considerado, portanto, um dos principais fatores predisponentes de falhas reprodutivas em felídeos silvestres cativos, e deve ser evitado ao máximo. Da mesma maneira, deve-se prezar sempre por boas práticas de manejo, nutrição, disponibilizar recintos adequados e respeitar diferenças biológicas e necessidades específicas de cada espécie, a fim de auxiliar na reprodução natural em cativeiro de felídeos ameaçados.

## **2.2. REFERÊNCIAS**

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



2. 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. **Biology of Reproduction**, v.51, p.776-786, 1994.
3. CARLSTEAD, K.; SHEPHERDSON, D.J. Effects of environmental enrichment on Reproduction. **Zoo Biology**, v.13, p.447-58, 1994.
4. CROSIER, A.E.; MARKER, L.; HOWARD, J.G.; PUKAZHENTHI, B.S.; HENGHALI, J.N.; WILDT, D.E. Ejaculate traits in the Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*): influence of age, season and captivity. **Reproduction, Fertility and Development**. v.19, p.370–382, 2007.
5. KLEIMAN, D.G. Reproduction: *Introduction*. In: KLEIMAN, D.G.; ALLEN M.E.; THOMPSON, K.V.; LUMPKIN, S. **Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques**. Chicago: The University of Chicago Press, 1996, p. 377-378.
6. MELLEEN, J.D. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids. **Zoo Biology**, n.10, p.95–110, 1991.
7. MOBERG G.P. Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. In: MOBERG, G.P., MENCH, J.A. **The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare**. Oxon: CABI Publishing, 2000, p.1-22.
8. MORATO, R.G.; BARNABE, R.C. Biotécnicas de Reprodução Aplicadas à Preservação de Felídeos Selvagens. **Clínica Veterinária**, n.12, p.24-26, 1998.
9. MOREIRA, N.; BROWN, J.L.; MORAES, W.; SWANSON, W.F.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, v.26, p.441 - 460, 2007.
10. MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; MORAES, W.; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; PASQUALI, O.L.; GOMES, M.L.F.; MORAIS, R.N.; WILDT, D.E.; BROWN, J.L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v.20, n.2, p.103-116, 2001.
11. MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.67–74, 2002.
12. PAZ, R.C.R.; MORATO, R.G.; CARCIOFI, A.C.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; PESSUTI, C.; SANTOS, E.F.; FERREIRA, F.; BARNABE, R.C. Influence of nutrition on the quality of semen in Jaguars (*Panthera onca*) in Brazilian zoos. **International Zoo Yearbook**, v.40, n.1, p.351-359, 2006.

13. PELICAN, K.M.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.; HOWARD, J.G. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. **Theriogenology**, v.66, n.1, p.37-48, 2006.
14. POPE, C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**, v.53, p.163-174, 2000.
15. PUKAZHENTHI, B.; COMIZZOLI, P.; TRAVIS, A.J.; WILDT, D.E. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.77-90, 2006.
16. RALLS, K.; BALLOU, J.D.; TEMPLETON, A. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. **Conservation Biology**, v.2, n.2, p.185-193., 1988.
17. SNYDER, N.F.R.; DERRICKSON, S.R.; BEISSINGER, S.R.; WILEY, J.W.; SMITH, T.B.; TOONE, W.D.; MILLER, B. Limitations of captive breeding in endangered species recovery. **Conservation Biology**, v.10, n.2, p.338-348, 1996.
18. SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.21-34, 2004.
19. SWANSON, W.F.; JOHNSON, W.E.; CAMBRE, R.C.; CITINO, S.B.; QUIGLEY, K.B.; BROUSSET, D.M.; MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **Zoo Biology**, v.22, p.421-441, 2003.
20. SWANSON, W.F.; PAZ, R.C.R.; MORAIS, R.N.; GOMES, M.L.F.; MORAES, W.; ADANIA, C.H. Influence of species and diet on efficiency of in vitro fertilization in two endangered Brazilian felids—the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.593, 2002.
21. TERIO, K.A.; MARKER, L.; MUNSON, L. Evidence for chronic stress in captive but not free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*) based on adrenal morphology and function. **Journal of Wildlife Diseases**, v.40, n.2, p.259–266, 2004.
22. WIELEBNOWSKI, N.C.; FLETCHALL, N.; CARLSTEAD, K.; BUSO, J.M.; BROWN, J.L. Non-invasive assessment of adrenal activity associate with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. **Zoo Biology**, n.21, p.77–98, 2002.

23. WILDT, D.E.; O'BRIEN, S.J.; HOWARD, J.G.; CARO, T.M.; ROELKE, M.E.; BROWN, J.L.; BUSH, M. Similarity in ejaculate-endocrine characteristics in captive versus free-ranging cheetahs of two subspecies. **Biology of Reproduction**, v.36, p.353–360, 1987.

### 3. Reprodução assistida em pequenos felídeos selvagens – uma revisão

*Formatado e enviado para a Revista Brasileira de Reprodução Animal*

**Resumo:** A reprodução em cativeiro é uma das ferramentas para a conservação *ex situ* de diversas espécies, incluindo os felídeos que, em sua maioria, estão ameaçados de extinção. Esforços em diversas frentes estão sendo feitos para evitar o desaparecimento desses carnívoros em todo o mundo. O objetivo desta revisão foi compilar as informações disponíveis sobre os aspectos reprodutivos da família Felidae e as biotécnicas reprodutivas aplicáveis a essas espécies. Concluiu-se que, para se obter maior sucesso na conservação dessas espécies, é necessário ampliar o conhecimento sobre os aspectos da reprodução de felídeos selvagens, assim como aprimorar as técnicas empregadas na reprodução assistida de modo a sobrepôr as dificuldades e limitações de cada uma delas.

**Palavras-chave:** Reprodução em cativeiro, falhas reprodutivas, felídeos neotropicais, inseminação artificial, transferência de embriões.

## **Assisted reproduction in small wild felids – a review**

**Abstract:** The reproduction of wild animals in captivity has been presented as a viable alternative to ensure genetic variability and survival of several species, including the wild felids, which are threatened with extinction. Efforts in several fronts are being made to avoid disappearance of these carnivores around the world. This review aimed to compile information available on the reproductive aspects of the family Felidae and reproductive biotechnology for these species. In conclusion, to achieve success in the conservation of these species it is necessary to extend our knowledge about the aspects of felid reproduction, as well as improve the assisted reproduction techniques to overcome the difficulties and limitations.

**Keywords:** Captive reproduction, reproductive failures, Neotropical felids, artificial insemination, embryo transfer.

### 3.1. INTRODUÇÃO

É de conhecimento geral que a destruição dos biomas em decorrência das atividades humanas está colocando em risco a biodiversidade do planeta. A perda de habitat, principalmente pelo desmatamento, é a principal causa de extinção das espécies. Com essa perspectiva sombria para a diversidade biológica, zoológicos e criadouros que mantêm espécies raras devem assumir o papel de banco de reserva genômica, tanto *in vivo* como *in vitro*.

A reprodução natural de espécies ameaçadas de extinção, utilizando-se o manejo genético populacional, é a forma mais simples de se manter a diversidade genética em pequenas populações cativas. Porém, a reprodução natural pode ser altamente comprometida pelo estresse geralmente desenvolvido em cativeiro (MOBERG, 2000). Para transpor essas limitações inerentes à reprodução natural, é necessário utilizar as modernas técnicas de reprodução assistida que permitem melhorar os índices reprodutivos e manter a variabilidade genética em pequenas populações de animais cativos.

Donoghue et al. (1993) relataram o primeiro nascimento de um felídeo silvestre por inseminação artificial com laparoscopia: um tigre-siberiano (*Panthera tigris altaica*). Desde então, houve avanços significativos nessa área. Mesmo com esses avanços, porém, a reprodução artificial de animais selvagens em cativeiro ainda está longe da condição ideal (SWANSON, 2006).

Os principais obstáculos para o sucesso da reprodução assistida em felídeos silvestres, principalmente nas espécies de pequeno porte, são os conhecimentos ainda limitados sobre o comportamento e fisiologia das espécies pertencentes a essa família (SWANSON, 2005; BROWN, 2006; ANDRABI e MAXWELL, 2007). É imprescindível dispor, por exemplo, de informações confiáveis sobre sazonalidade reprodutiva, ciclo estral, sensibilidade ovariana, maturidade, senilidade reprodutiva e tipo de ovulação (SWANSON, 2005; BROWN, 2006).

Essa revisão aborda os aspectos reprodutivos da família Felidae e o estado da arte das técnicas de reprodução assistida, com suas limitações e aplicações potenciais.

## 3.2. ASPECTOS DA REPRODUÇÃO

### 3.2.1. Monitoramento hormonal

O monitoramento hormonal é imprescindível nas pesquisas em reprodução, pois fornece informações sobre a fisiologia reprodutiva das espécies e a condição fisiológica do animal estudado. Saber se uma fêmea está ciclando, em que fase do ciclo estral ela se encontra, como estão suas concentrações hormonais e como estão as concentrações de andrógenos no macho, são algumas das informações necessárias para o sucesso da reprodução assistida. As técnicas de monitoramento hormonal preferencialmente utilizadas no momento são as não invasivas, ou seja, as que empregam ensaios imunológicos para quantificar hormônios em fezes, urina e saliva de animais (BROWN et al., 1994; GRAHAM, 2004; VIAU et al., 2005).

O imunoensaio começou a ser utilizado em felídeos silvestres no início da década de 90 (BROWN et al., 1994) e diversas inovações têm surgido desde então, tanto nos protocolos como nos materiais e equipamentos utilizados (GRAHAM, 2004). No Brasil, Viau et al. (2005) validaram a técnica do radioimunoensaio em fase sólida para a quantificação de progesterona e  $17\beta$ -estradiol em fêmeas de a onça-pintada (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro. Um exemplo a respeito da evolução na utilização de diferentes materiais para os ensaios é o trabalho de Accorsi et al. (2008). Recentemente, esses pesquisadores comprovaram a eficácia da utilização de pêlos na avaliação de cortisol em cão e gato doméstico.

Até meados da década de 1990 utilizava-se o radioimunoensaio para quantificar a concentração hormonal em excrementos e secreções. Atualmente, prefere-se o enzimoimunoensaio, que é mediado por reações enzimáticas e não requer o uso de substâncias radioativas, prejudiciais à saúde humana e ao ambiente. As limitações são os custos relativamente altos das análises e, para o Brasil, o fato de poucos laboratórios realizarem estes testes com materiais procedentes de animais silvestres.

### 3.2.2. Influência da sazonalidade na reprodução

Para o sucesso dos trabalhos de reprodução assistida é necessário conhecer o efeito da sazonalidade na reprodução das espécies. Por exemplo, o gato doméstico (*Felis catus*) no hemisfério norte produz espermatozóides o ano todo, porém, a reprodução ocorre normalmente na primavera e verão (BLOTTNER e JEWGENOW,

2007). Nota-se uma redução significativa na produção de espermatozoides nos meses de dezembro e janeiro (inverno no hemisfério norte) e um aumento na concentração espermática no mês de março (primavera no hemisfério norte) (BLOTTNER e JEWGENOW, 2007). Esse fato está possivelmente ligado aos efeitos da sazonalidade reprodutiva na fêmea, que em regiões temperadas é poliéstrica sazonal (BROWN, 2006), ou seja, apresenta ciclos estrais apenas na primavera e verão.

Um exemplo do sucesso da aplicação das técnicas de reprodução assistida para sobrepor as dificuldades da sazonalidade reprodutiva nessas espécies é o trabalho de Roth et al. (1997). Segundo esses pesquisadores, o leopardo-das-neves (*Uncia uncia*), apesar de ser uma espécie conhecida por sua reprodução sazonal, apresenta resposta à administração de gonadotropinas exógenas durante o ano todo, apesar de ter apresentado número significativamente maior ( $p < 0,05$ ) de corpos lúteos (CLs) durante a estação reprodutiva.

A sazonalidade pode comprometer a obtenção de espermatozoides viáveis para a fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), e influência a taxa de clivagem de embriões *in vitro* (POPE et al., 2006). Ainda, segundo Pope et al. (2006), embriões de gata doméstica gerados de oócitos extraídos no período de quiescência dos ovários, ou seja, fora do período reprodutivo, podem ter a viabilidade comprometida, pois não se desenvolvem da mesma maneira que embriões gerados a partir de oócitos coletados em períodos reprodutivos.

Para melhorar os resultados na reprodução assistida, as pesquisas a serem desenvolvidas precisam aperfeiçoar as técnicas de maturação de oócitos e de aumento da concentração espermática de sêmen colhido em períodos de baixa produção de espermatozoides. Quando a coleta de oócitos em espécies sazonais é feita fora do período reprodutivo pode-se lançar mão da maturação de oócitos com antioxidantes (cisteína ou ácido ascórbico) e FSH (hormônio folículo-estimulante). Essas técnicas foram comprovadamente eficazes na melhoria do desenvolvimento *in vitro* de embriões de gato doméstico (COMIZZOLI et al., 2003) e também podem ser úteis para espécies selvagens.

### 3.2.3. Protocolos espécie-específicos para IA, FIV e Transferência de embriões (TE)

Segundo levantamento feito por Pelican et al. (2006), o sucesso dos procedimentos de IA, FIV e TE em felídeos silvestres, determinado pelo nascimento e



sobrevivência dos filhotes, tem sido menor que 20%. A extrapolação de protocolos de espécies domésticas para silvestres é um artifício ainda muito utilizado (BROWN, 2006), mas que não é ideal, pois cada espécie tem particularidades fisiológicas. Acredita-se que os baixos índices de sucesso na reprodução assistida de felídeos silvestres são decorrentes desse desconhecimento da fisiologia reprodutiva (BROWN, 2006) e da ausência de técnicas laboratoriais mais refinadas para as espécies (SWANSON, 2006). Segundo Brown et al. (1995), e corroborado por Moreira et al. (2001), as particularidades fisiológicas das espécies podem ser, portanto, em parte, responsáveis pelas baixas taxas reprodutivas em felídeos neotropicais cativos, quando empregadas técnicas de reprodução assistida.

#### 3.2.4. Resposta ovariana às gonadotropinas

As gonadotropinas exógenas são utilizadas para induzir o crescimento folicular e ovulação fora do período de estro da fêmea. A resposta ovariana às gonadotropinas exógenas, porém, varia não só entre espécies, mas também entre indivíduos de uma mesma espécie (HOWARD et al., 1997; POPE et al., 2006). Assim, diferentes protocolos hormonais foram desenvolvidos para diferentes espécies de felídeos, incluindo o leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*), o guepardo (*Acinonyx jubatus*) e a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (SWANSON e BROWN, 2004). A resposta ovariana às gonadotropinas também pode variar com o intervalo entre as aplicações dos hormônios. Macromoléculas exógenas como o eCG, aplicadas a intervalos curtos podem sensibilizar o sistema imunológico da fêmea, havendo a formação de imunocomplexos que interferem na resposta ovariana, na eficácia da inseminação artificial e na recuperação de oócitos (PELICAN et al., 2006).

Estudos recentes sobre superovulação em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) indicaram que o intervalo de quatro meses entre aplicações alternadas de eCG/hCG (gonadotropina coriônica eqüina/gonadotropina coriônica humana) e pFSH/pLH (hormônio folículo estimulante suíno/hormônio luteinizante suíno) não reduzem a resposta ovariana (PAZ et al., 2005). Além desse trabalho, Crichton et al. (2003) já haviam concluído que a utilização de pFSH e pLH em tigres (*Panthera tigris*), em intervalo de três meses entre aplicações, é efetiva, pois não há a formação de imunocomplexos nesse período (CRICHTON et al., 2003).

Pesquisas futuras precisam indicar os melhores protocolos como dose e intervalo de aplicação de gonadotropinas para cada espécie. Além disso, os estudos

precisam focar em protocolos mais específicos para indução à superovulação (para coleta de oócitos) ou protocolos para IA.

### 3.2.5. Ovulação

Para qualquer procedimento de IA ou TE é necessário que a fêmea trabalhada esteja prestes a ovular ou recém-ovulado, ou seja, com condições adequadas em se tratando de ambiente uterino, como é de conhecimento geral. Rotineiramente, em cativeiro, são utilizadas gonadotropinas exógenas que simulam hormônios endógenos para que as fêmeas entrem em estro, apresentando crescimento de folículos e ovulação. Dessa maneira, quantificando-se os hormônios reprodutivos é possível se estar certo sobre a atividade ovariana, o tipo de ovulação apresentada, a duração do estro e o exato momento da ovulação.

Um dos primeiros estudos para a quantificação de hormônios sexuais em fezes de felídeos silvestres foi realizado por Brown et al. (1995), em leopardo-nebuloso e indicou que, nessa espécie, pode ocorrer tanto ovulação espontânea quanto induzida. Moreira et al. (2001) identificaram ovulações espontâneas com maior frequência em gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) do que em gato-do-mato-pequeno e jaguatirica. Esses trabalhos indicaram que podem ocorrer ovulações espontâneas e a conseqüente formação de corpos lúteos (CL) em fêmeas mantidas isoladas de machos. Segundo Pelican et al. (2008), a presença de CL pode comprometer a resposta ovariana às gonadotropinas exógenas, já que uma fêmea que apresenta CL conseqüentemente produz progestágenos, o que reduz a resposta ovariana às gonadotropinas exógenas. Além desse fato, diferentemente de outras espécies, a prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  não surte efeito quando aplicada com o intuito de regredir o corpo lúteo (WILDT et al., 1979), o que leva os pesquisadores da área a uma busca por protocolos alternativos.

O CL mantém a produção contínua de progesterona e altera a resposta fisiológica do organismo à administração de análogos do FSH e LH. Em espécies que têm ovulação induzida, a simples presença de corpos lúteos pode interferir na resposta às gonadotropinas exógenas. Isso ocorre, pois a progesterona circulante reduz a atividade ovariana através de retroalimentação negativa no eixo hipotalâmico-hipofisário. Quando a progesterona é produzida pelo corpo lúteo (CL), não há como controlar sua concentração, pois depende exclusivamente da regressão do CL. Por

isso, para aumentar o sucesso nos procedimentos de IA, buscam-se protocolos que suprimam a atividade ovariana de forma reversível e controlável (PELICAN et al., 2006).

### 3.3. BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS

#### 3.3.1. IA (*Inseminação artificial*), FIV (*Fertilização in vitro*), ICSI (*Injeção intracitoplasmática de espermatozóide*) e TE (*transferência de embriões*)

A inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), seguidas da transferência de embriões (TE) são técnicas desenvolvidas para facilitar o manejo reprodutivo e aumentar a eficiência reprodutiva, especialmente quando acompanhadas de adequada sobrevivência fetal e neonatal.

A vantagem da IA em relação à ICSI e à FIV é ser uma técnica aperfeiçoada e bastante utilizada em diversas espécies, e que já permitiu a geração de filhotes em nove espécies de felídeos (SWANSON e BROWN, 2004; SWANSON, 2006), incluindo a jaguatirica e o gato-do-mato-pequeno, tendo sido essas as primeiras gestações de felídeos silvestres por IA no Brasil (MORAES et al., 1996). Embora a ICSI e a FIV apresentem maior probabilidade de gerar embriões viáveis, pois há maior controle do ambiente e maior chance de fecundação do oócito pelo espermatozóide, existem diversas vantagens na utilização da IA, sendo uma delas o fato de ser um procedimento relativamente simples e eficaz, desde que utilizado sêmen de boa qualidade e os protocolos de indução do desenvolvimento folicular e da ovulação tenham sido bem estabelecidos.

Outra vantagem da IA é a possibilidade de utilização tanto de sêmen resfriado quanto criopreservado, o que torna desnecessário o transporte de animais de uma instituição à outra para fins de acasalamento. Essa facilidade é muito útil nos dias de hoje, pois o intercâmbio de animais entre instituições está cada vez mais difícil em razão de barreiras sanitárias e leis ambientais (WILDT e ROTH, 1997; SWANSON e BROWN, 2004; SWANSON, 2006; ANDRABI e MAXWELL, 2007).

Tsutsui (2006) relatou que a taxa de sucesso na inseminação artificial em gatas domésticas ainda é muito baixa, embora seja viável tanto com sêmen fresco quanto congelado. Outros autores também confirmam essa dificuldade na reprodução

assistida dos pequenos felídeos silvestres (SWANSON e BROWN, 2004; PELICAN et al., 2006). Especula-se que esse insucesso esteja relacionado à variabilidade na resposta ovariana, procedimento cirúrgico, uso de anestésicos ou aumento de cortisol. Lacerda-Neto et al. (2003) relataram que gatas domésticas submetidas a cirurgias para inseminação têm as concentrações de cortisol aumentadas após os procedimentos cirúrgicos, retornando aos níveis basais após aproximadamente 72 horas, o que indica que procedimentos cirúrgicos podem ser fatores de estresse prolongado.

O que é necessário ser também investigado é se as cirurgias em si afetam as taxas de fecundação e a viabilidade dos embriões. Lacerda-Neto et al. (2003) concluíram que pode haver a interferência do cortisol na liberação do hormônio reprodutivo LH logo após os procedimentos cirúrgicos, apesar das concentrações de LH não terem sido significativamente diferentes nos períodos analisados de 24, 48 e 72 horas após o procedimento. Até então, uma outra hipótese havia sido levantada quando Howard et al. (1992) constataram que fêmeas submetidas à laparoscopia após a administração de gonadotropinas que ainda não haviam ovulado (sem presença de CL) apresentavam menor taxa de prenhez do que fêmeas que já haviam ovulado. Segundo os autores, esse resultado indica que possivelmente há uma interferência da anestesia na ovulação.

Tsutsui (2006) sugeriu que para aumentar as taxas reprodutivas em felídeos mantidos em cativeiro seria necessário desenvolver técnicas não cirúrgicas de IA para a deposição de sêmen no útero, o que eliminaria o efeito da elevação pós-cirúrgica do cortisol. Porém, mesmo eliminando o efeito da elevação do cortisol pela cirurgia, é possível que ainda ocorra uma elevação do cortisol devido à contenção física e química dos animais estudados.

A inseminação via laparoscopia tem apresentado bons resultados em diversas espécies de felídeos (SWANSON, 2001; SWANSON et al., 2002), mas ainda precisa ser aprimorada, especialmente nas espécies de pequeno porte, como o gato-do-mato-pequeno (MOREIRA e MORAES, 2009, comunicação pessoal).

A fertilização *in vitro* (FIV) é uma técnica relativamente difundida em animais silvestres, tendo sido testada em diversas espécies de felídeos neotropicais, como no gato-do-mato-pequeno e jaguatirica (SWANSON, 2001; SWANSON et al., 2002) e na onça-pintada (MORATO et al., 2000). Apesar de ser uma técnica relativamente simples (a partir do momento em que se possui o oócito maturado e o sêmen capacitado), a FIV apresenta baixa taxa de sucesso para certas espécies de felídeos, mesmo quando

os oócitos recuperados para o procedimento são de boa qualidade (MORATO et al., 2000). Pope et al. (1998) realizaram um dos primeiros trabalhos com a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), tendo sido produzidos dez embriões a partir de 18 oócitos recuperados de uma fêmea de gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*); dos dez embriões produzidos, cinco haviam sido inseminados com sêmen fresco e cinco com sêmen criopreservado. Embora não tenha havido nascimento após a transferência dos embriões para gatas domésticas, o trabalho demonstrou que a técnica pode ser aprimorada e aplicada com sucesso em felídeos silvestres. Outros trabalhos foram desenvolvidos em leão (*Panthera leo*) e gato-pescador (*Prionailurus viverrinus*), tendo havido bons resultados na obtenção de embriões pela ICSI, mas nenhum nascimento (POPE et al., 2006).

A ICSI é uma das técnicas de reprodução assistida mais caras (em razão do custo do micromanipulador que realiza a injeção do espermatozóide), mas é também a técnica que pode apresentar a maior taxa de sucesso na concepção de embriões devido à precisão com que a fecundação é conduzida. Estudos em vacas mostraram que até mesmo a injeção de esperma não-viável resultou no nascimento de bezerros vivos (GOTO et al., 1991). É ainda uma técnica pouco utilizada em projetos de pesquisa sobre reprodução de animais silvestres. Poucos trabalhos com nascimento de filhotes foram produzidos até o momento, com destaque para o trabalho com o primata macaco-caranguejeiro (*Macaca fascicularis*) de NG et al. (2002) e o trabalho com gato-doméstico de POPE et al. (1995).

### 3.3.2. Supressão da atividade ovariana

É possível que os resultados ainda insatisfatórios da inseminação artificial em felídeos silvestres sejam decorrentes da variabilidade da resposta às gonadotropinas exógenas (PELICAN et al., 2006). Essa hiperestimulação ovariana pode gerar um quadro de hiperestrogenismo, com alteração do ambiente uterino e conseqüente inviabilidade embrionária. Essas alterações podem levar à luteólise prematura e reabsorção embrionária (PELICAN et al., 2006).

A taxa de sucesso das técnicas de inseminação artificial com sêmen fresco é significativamente maior em guepardo (HOWARD et al., 1997) e gato doméstico (TSUTSUI et al., 2000) do que em gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá (SWANSON e BROWN, 2004; PELICAN et al., 2006). Tanto o guepardo quanto o gato doméstico ciclam de forma intermitente o ano todo. Fêmeas de guepardo permanecem

em anestro na maior parte do tempo, enquanto que gatas domésticas, em regiões temperadas, apresentam alguns períodos de anestro no ano. Isso pode explicar porque essas espécies respondem mais adequadamente à IA quando submetidas a protocolos de indução à ovulação. Por terem os ovários quiescentes por mais tempo, há maior probabilidade dessas fêmeas serem induzidas à ovulação com gonadotropinas exógenas, sem a interferência das gonadotropinas endógenas e, portanto, com menor possibilidade de ocorrer hiperestrogenismo e alterações do ambiente uterino (PELICAN et al., 2006).

No recente estudo realizado por Pelican et al. (2008), o progestágeno levonorgestrel se mostrou eficiente para suprimir a atividade ovariana em gata doméstica, não apenas nas fêmeas que apresentavam ovulação induzida, mas também nas que apresentavam ovulação espontânea, produzindo resultados semelhantes ao trabalho de Pelican et al. (2005). Dessa maneira, busca-se o desenvolvimento de protocolos hormonais que resultem na inativação ovariana reversível, como o uso de progestinas (BROWN et al., 1995; BALLAROTTI, 2005; BROWN, 2006; PELICAN et al., 2005; PELICAN et al., 2006; PELICAN et al., 2008; SWANSON, 2006).

Segundo Munson (2006), certas progestinas, como o levonorgestrel (Norplant<sup>®</sup>, Population Council, Nova Iorque), previnem a prenhez não pela supressão da atividade ovariana, mas pela alteração da motilidade do oócito nas trompas e redução da receptividade endometrial ao oócito. Essa mesma autora desaconselha o uso de progestinas como redutoras de atividade ovariana. Porém, além do trabalho de Pelican et al. (2008) com o levonorgestrel, previamente citado, o estudo de Ballarotti (2005) também demonstrou que, em gatas domésticas progestinas como o etonogestrel (Implanon<sup>®</sup>, Organon International, Holanda) reduzem a atividade ovariana. Em gato doméstico, leopardo-nebuloso (PELICAN, 2009, comunicação pessoal) e, segundo nossa experiência em gato-do-mato-pequeno, a ação do altrenogest (Regumate<sup>®</sup>, Intervet, São Paulo) também é comprovadamente eficaz para redução de atividade ovariana. Esses estudos podem ser úteis no desenvolvimento de novos protocolos de IA em felídeos silvestres, considerando-se que diminui a possibilidade de ocorrência de hiperestrogenismo após a estimulação com gonadotropinas exógenas quando a atividade ovariana encontra-se reduzida (PELICAN et al., 2008).

### 3.3.3. *Maturação de oócitos e embriões in vitro*

Em relação à maturação de oócitos para FIV ou ICSI, diversos trabalhos em gatas domésticas demonstraram que quanto mais desenvolvido o oócito na coleta, maior a viabilidade para fecundação após atingir a metáfase II (POPE et al., 2006). Após a FIV ou a ICSI, é necessária a maturação dos embriões *in vitro* (MIV) para que os mesmos se desenvolvam até o estágio de blastocisto, quando estarão prontos para serem transferidos para uma fêmea receptora.

Com animais domésticos é feita a cultura em grupo (maturação de diversos embriões juntos), o que proporciona melhores índices de crescimento e desenvolvimento embrionário em comparação ao cultivo de células isoladas (SPINDLER et al., 2006). Como embriões de felídeos de espécies ameaçadas de extinção produzidos em laboratório são escassos, dificilmente são utilizadas técnicas como a cultura em grupo. Porém, Spindler et al. (2006) comprovaram a eficácia da utilização de embriões de outras espécies (de roedores e de bovinos) como estímulo para o desenvolvimento dos embriões de gatas domésticas.

Para o sucesso das técnicas de cultura de embriões é fundamental a utilização de meios adequados de cultura para que ocorra a clivagem dos embriões. Paz et al. (2009) sugerem que após a estimulação com hCG e pFSH/pLH é possível coletar oócitos imaturos de jaguatirica e gato-do-mato-pequeno e maturá-los em meios específicos para que possam atingir o estágio de Metáfase II. Alguns estudos em gato doméstico demonstraram que os embriões apresentam respostas específicas a diferentes carboidratos no meio, conforme o estágio de desenvolvimento em que se encontram (HERRICK et al., 2007). Foi também comprovada certa sensibilidade dos embriões a aminoácidos essenciais presentes no meio de cultura (HERRICK et al., 2007). Embora tenha havido avanço significativo nesta área, são necessárias pesquisas que permitam definir outros componentes essenciais aos meios de cultura (HERRICK et al., 2007). Pope et al. (2006) obtiveram melhores resultados no desenvolvimento de blastocistos com o uso de 25ng/mL de FCE (fator de crescimento epidérmico) e 100ng/mL de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina - 1) nos meios de cultura.

A maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica recente e encontra-se em desenvolvimento. Pesquisas sobre estimulação ovariana e coleta e cultura de oócitos são importantes para melhor aplicação das técnicas de FIV e ICSI e, conseqüentemente, melhor desenvolvimento embrionário. Porém, o desenvolvimento

de meios adequados de cultura para a maturação de embriões é essencial para o sucesso dos protocolos de MIV.

#### 3.3.4. Criopreservação e refrigeração de sêmen

A técnica de inativação ovariana e posterior IA com sêmen criopreservado oferece vantagens que devem ser levadas em conta. Apesar da inseminação com sêmen fresco resultar em taxas reprodutivas maiores que com sêmen criopreservado (SWANSON, 2006), nem sempre é possível realizá-la por causa de dificuldades logísticas com a colheita de sêmen e imediata inseminação. Uma vantagem da inseminação com sêmen criopreservado é a facilidade de intercâmbio de material genético entre instituições, o que é essencial para a conservação *ex situ*.

Sabe-se, porém, que a criopreservação de sêmen afeta negativamente a funcionalidade espermática (BAUDI et al., 2007; FICKEL et al., 2007). Para minimizar os efeitos indesejáveis das baixas temperaturas sobre os espermatozoides, trabalhos como o de Baudi et al. (2007) e Fickel et al. (2007) recomendaram adaptar os protocolos de espécies domésticas para espécies silvestres. Para que se consiga manter a integridade espermática após o descongelamento são necessários investimentos em pesquisas, especialmente nas áreas de citologia e criobiologia, composição de membranas e transição de fases do espermatozoide, resistência a crioprotetores (LUVONI, 2006), análise do coeficiente de permeabilidade da água e de crioprotetores, permeabilidade da membrana espermática, análise da resposta espermática ao estresse hipo- e hiperosmótico e monitoramento microscópico da formação de cristais de gelo intra- e extracelular (FICKEL et al., 2007).

Fickel et al. (2007) consideraram importante investir no aprimoramento de protocolos de criopreservação que deram certo em animais domésticos e que podem ser utilizados em animais silvestres. Algumas propostas de trabalho incluem pesquisas para o aperfeiçoamento de crioprotetores e meios de cultura; o aprimoramento de protocolos de congelamento; e a melhoria das técnicas de sexagem de espermatozoides. Nas últimas duas décadas foram publicados diversos trabalhos sobre criopreservação e descongelamento de espermatozoides em felídeos silvestres, buscando manter a viabilidade celular. Porém, nenhum protocolo utilizado conseguiu manter as taxas de viabilidade do ejaculado pós-descongelamento tão elevadas



quanto as geralmente obtidas em animais domésticos (DONOGHUE, 1993; SWANSON e BROWN, 2004; SWANSON et al., 2006).

A refrigeração de sêmen é um procedimento comum e aparentemente não causa alteração do material seminal (POPE et al., 2006). Harris et al. (2002) conseguiram obter desenvolvimento embrionário de oócitos de boa qualidade fecundados com sêmen fresco e refrigerado a 4°C (em meio de cultura) por até 14 dias.

### 3.3.5. Criopreservação e refrigeração de embriões, ovário, oócitos e testículos

A criopreservação de embriões de felídeos silvestres é uma realidade, mas ainda não se apresenta como uma técnica de uso rotineiro. Isso certamente ocorrerá quando as técnicas de congelamento e maturação de embriões *in vitro* estiverem mais avançadas. Poucos trabalhos desenvolvidos em felídeos silvestres conseguiram produzir embriões viáveis a partir de embriões criopreservados e transferi-los para fêmeas receptoras (GÓMEZ et al., 2003). As espécies de felídeos silvestres que foram reproduzidas pela transferência de embriões após criopreservação foram: gato-silvestre-africano (*Felis silvestris*) e caracal (*Caracal caracal*) por Pope et al. (2000), e jaguatirica por Swanson et al. (2002).

De acordo com Swanson e Brown (2004), a fertilização *in vitro* e a criopreservação de embriões são técnicas relativamente simples e que, em geral, apresentam resultados satisfatórios. Apesar das técnicas não apresentarem muita dificuldade de procedimentos, dificilmente filhotes são obtidos, principalmente em razão das falhas na sincronização hormonal das fêmeas receptoras e das dificuldades em se estabelecer um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento dos embriões (SWANSON e BROWN, 2004; PELICAN et al., 2008).

Para a preservação *in vitro* de material genético de fêmeas de espécies raras, pode-se lançar mão da refrigeração temporária de células e tecidos obtidos por ovário-histerectomia (POPE et al., 2006). Apesar da refrigeração de sêmen ser um procedimento comum (POPE et al., 2006), há poucos trabalhos que tratam da refrigeração de ovários para a retirada de oócitos. Dois desses trabalhos foram os de Wolfe e Wildt (1996) e Naoi et al. (2007).

Wolfe e Wildt (1996) descobriram que ovários armazenados a 4°C por até 72 horas são capazes de fornecer oócitos que chegam à metáfase II depois de

maturados; e que apenas oócitos armazenados por no máximo 24 horas produzem blastocistos depois de fertilizados. Pesquisas recentes de Naoi et al. (2007) indicaram que essa técnica só é eficiente quando o órgão reprodutivo é armazenado a 4°C por um período máximo de 6 horas após sua retirada. Portanto, a refrigeração de ovários pode ser utilizada para preservar oócitos de fêmeas que acabaram de morrer ou de fêmeas que, por alguma razão clínica, tiveram que ser submetidas à ovariectomia.

Até o momento não há relatos de criopreservação de oócitos de felídeos, e as informações sobre essa técnica são ainda escassas. Não se sabe, por exemplo, de protocolos que reduzam o efeito tóxico da sacarose sobre os oócitos de felídeos (MURAKAMI et al., 2004), substância utilizada no processo de criopreservação.

Da mesma maneira, apesar de apresentar sucesso com algumas espécies de roedores, ainda não existem relatos de trabalhos que obtiveram tecidos testiculares de felídeos viáveis após sua criopreservação (PUKAZHENTHI et al., 2006).

### 3.3.6. Espermatozóides epididimários e testiculares

Quando se trabalha com espécies ameaçadas de extinção, todo indivíduo é considerado de alto valor para a diversidade genética populacional; e não há dúvida de que a reprodução assistida é uma ferramenta muito útil nas políticas de conservação da fauna, pois possibilita que se obtenha o máximo aproveitamento genético. Segundo Swanson (2006), recomenda-se utilizar todos os indivíduos machos geneticamente saudáveis nos programas de reprodução em cativeiro de espécies em perigo de extinção, aumentando, dessa forma, a diversidade genética intra-populacional. Outras publicações (YANAGIMACHI, 1998; HEWITSON et al., 2002; SAID et al., 2003) descreveram a retirada de espermatozóides diretamente do testículo e do epidídimo e sua utilização na ICSI, podendo, com essa técnica, ser possível a produção de embriões de diferentes espécies de mamíferos.

Com essa técnica é possível citar nascimentos de camundongo, com a utilização de espermátides e espermátócitos secundários para fecundação dos oócitos (YANAGIMACHI, 1998), de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), cujos oócitos foram fertilizados com espermátides e espermatozóides testiculares (HEWITSON et al., 2002), e de rato, fertilizado com apenas cabeças de espermatozóides testiculares e epididimários (SAID et al., 2003). Com felídeos, o trabalho pioneiro de Comizzoli et al. (2006) mostrou a possibilidade de fertilização e o potencial de desenvolvimento de

embriões formados pela injeção de espermatozóides testiculares em oócitos de gatas domésticas maturados *in vitro*.

Essas técnicas conjuntas permitem aproveitar o material genético de animais que estão prestes a morrer, que morreram recentemente ou animais que, por alguma disfunção, não apresentem a capacidade de ejacular (COMIZZOLI et al., 2006).

### 3.3.7. *Transplantes de órgãos reprodutivos*

Já foram realizados transplantes de ovários entre gatas domésticas, tendo ocorrido desenvolvimento folicular até o estágio antral (JEWGENOW e PARIS, 2006). Porém, Snedaker et al. (2004) desenvolveram técnicas cirúrgicas para transplantar testículos de felídeos jovens para receptores de outros gêneros e espécies, mas da mesma classe como, por exemplo, para o rato (*Rattus rattus*). Esse tipo de transplante é complexo, porém previne a perda de importante material genético de animais jovens que venham a óbito antes de atingir a maturidade sexual.

### 3.3.8. *Uso de animais soropositivos*

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o herpesvírus felino - 1 (FHV-1) são responsáveis por afecções reprodutivas e abortos em gatas domésticas (KUSTRITZ, 2006). É fundamental para a conservação *ex situ*, que se evite a introdução desses agentes infecciosos em populações cativas de felídeos silvestres. Em populações já contaminadas, deve-se atuar para impedir a disseminação de patógenos, tanto para populações cativas como para animais livres. Poucos trabalhos relatam as taxas de animais soropositivos no Brasil, tanto em populações cativas, quanto de vida livre. Um desses trabalhos testou 30 indivíduos de diferentes espécies, provenientes da região do Parque Estadual do Morro do Diabo, estado de São Paulo. Nesse trabalho não foram encontrados anticorpos para FIV em gato doméstico (n=17), suçuarana (*Puma concolor*, n=2), onça-pintada (n=7), e jaguatirica (n=4) (NAVA et al., 2004). Alguns autores propõem que exista baixa incidência do vírus da leucemia felina (FeLV) em populações de vida livre e que a infecção seja rara em populações cativas no Brasil (FILONI et al., 2003; FILONI e CATÃO-DIAS, 2005). Mesmo com poucas evidências da existência desses agentes infecciosos em animais cativos e livres, medidas preventivas devem ser adotadas contra a disseminação desses vírus entre populações de felídeos mantidas em cativeiro.

Alguns autores mencionaram que a chance de transmissão horizontal de FIV (JORDAN et al., 1996) e FHV-1 (SWANSON et al., 2006) por IA é reduzida quando ocorre a criopreservação de sêmen. Seis fêmeas de gato doméstico inseminadas com sêmen criopreservado contaminado com FIV não foram infectadas no trabalho desenvolvido por Jordan et al. (1996) e, da mesma maneira, não houve a detecção por PCR do vírus da FHV-1 no sêmen de quatro machos de gato-de-Pallas (*Felis manul*) positivos para o herpesvírus felino (SWANSON et al., 2006). Apesar de não terem sido confirmadas até o momento a transmissão horizontal ou vertical pela utilização de sêmen previamente criopreservado para IA e FIV, essa hipótese não pode ser desconsiderada. Dessa maneira, o uso de animais soropositivos para doenças virais deve, a princípio, ser rejeitado. Alguns pesquisadores buscam a criação de técnicas seguras de tratamento do sêmen para torná-lo livre de agentes infecciosos e possibilitar o uso de machos portadores de viroses em programas de reprodução *ex situ* (NAIDA LOSKUTOFF, 2008, comunicação pessoal).

Apesar dos avanços que vêm ocorrendo na área de reprodução assistida de animais selvagens desde a década de 1990, os resultados obtidos ainda são insatisfatórios. As pesquisas demandam alto investimento em profissionais experientes, equipamentos e suprimentos, mas se justificam pelos resultados significativos que trazem à conservação de espécies ameaçadas de extinção. É necessário que haja também maior esforço de governos, órgãos financiadores, instituições de ensino e pesquisa e da comunidade científica para incentivar a pesquisa e o avanço tecnológico nessa área de conhecimento.

Para melhorar as taxas de reprodução de espécies ameaçadas de extinção é necessário ampliar a pesquisa básica em fisiologia reprodutiva e aprimorar as técnicas de reprodução assistida (como manipulação *in vitro* de gametas e embriões) e os protocolos hormonais para a indução de desenvolvimento folicular e ovulação. A utilização das biotécnicas de reprodução assistida pode contribuir para minimizar o risco de extinção de inúmeras espécies consideradas vulneráveis ou ameaçadas e, garantir um futuro para as mesmas, consideradas importantes para a manutenção do equilíbrio natural do nosso planeta.

### **3.4. REFERÊNCIAS**

1. ACCORSI, P.A.; CARLONI, E.; VALSECCHI, P.; VIGGIANI, R.; GAMBERONI, M.; TAMANINI, C.; SEREN, E. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. **General and Comparative Endocrinology**, n.155, p.398–402, 2008.
2. ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C.; A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, n.99, p.223-243, 2007.
3. BALLAROTTI, DT. Avaliação de protocolos para indução de inatividade ovariana em gatas domésticas. Curitiba, 2005. 65 f. **Dissertação de Mestrado** (Mestre em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná.
4. BAUDI, D.L.K.; JEWGENOW, K.; PUKAZHENTHI, B.S.; SPERCOSKI, K.M.; SANTOS, A.S.; REGHELIN, A.L.S.; CANDIDO, M.V.; JAVOROUSKI, M.L.; MÜLLER, G.; MORAIS, R.N. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v.69, n.2, p.204-211, 2007.
5. BLOTTNER, S.; JEWGENOW, K. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.536–540, 2007.
6. 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. **Biology of Reproduction**, v.51, p.776-786, 1994.
7. BROWN, J.L.; WILDT, D.E.; GRAHAM, L.H.; BYERS, A.P.; COLLINS, L.; BARRETT, S.; HOWARD, J.G. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. **Biology of Reproduction**, v.53, p.93-102, 1995.
8. BROWN, J.L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**. v.66, p.25-33, 2006.
9. CARLSTEAD, K.; SHEPHERDSON, D.J. Effects of environmental enrichment on reproduction. **Zoo Biology**, v.13, p.447-58, 1994.
10. COMIZZOLI, P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. In vitro development of domestic cat embryos following intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, n.6-7, p. 1659-1663, 2006.
11. COMIZZOLI, P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. Overcoming poor in vitro nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season. **Reproduction**, v.126, p.809–816, 2003.

12. CRICHTON, E.G.; BEDOWS, E.; MILLER-LINDHOLM, A.K.; BALDWIN, D.M.; ARMSTRONG, D.L.; GRAHAM, L.H.; FORD, J.J.; GJORRET, J.O.; HYTTEL, P.; POPE, C.E.; VAJTA, G.; LOSKUTOFF, N.M. Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and in vitro embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). **Biology of Reproduction**, v.68, p.105–113, 2003.
13. DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; ARMSTRONG, D.L.; SIMMONS, L.G.; WILDT, D.E. Birth of a Siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.24, p.185-189, 1993.
14. FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v.53, p.81–89, 2007.
15. FILONI, C.; ADANIA, C.H.; DURIGON, E.L.; CATÃO-DIAS, J.L. Serosurvey of feline leukemia virus and lentiviruses in captive small Neotropical felids in São Paulo state, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.34, n.1, p. 65-68, 2003.
16. FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J.L. Infecções por retrovírus (FeLV e FIV) em felídeos selvagens – revisão – parte 1. **Clínica Veterinária**, v.53, p.56-64, 2005.
17. GÓMEZ, M.C.; JENKINS, J.A.; GIRALDO, A.; HARRIS, R.F.; KING, A.; DRESSER, B.L.; POPE, C.E. Nuclear transfer of synchronized African wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1032–1041, 2003.
18. GRAHAM, L.H. Non-invasive monitoring of reproduction in zoo and wildlife species, **Annual Review of Biomedical Sciences**, v.6, p.91-98, 2004.
19. GOTO, K., KINOSHITA, A., TAKUMA, Y., OGAWA, K. Birth of calves after the transfer of oocytes fertilized by sperm injections. **Theriogenology**, v.35, p.205-221, 1991.
20. HERRICK, J.R.; BOND, J.B.; MAGAREY, G.M.; BATEMAN, H.L.; KRISHER, R.L.; DUNFORD, A.S.; SWANSON, W.F. Toward a feline optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of in vitro fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown in vivo. **Biology of Reproduction**, v.76, p.858–870, 2007.

21. HEWITSON, L.; MARTINOVICH, C.; SIMERLY, C.; TAKAHASHI, D.; SCHATTEN, G. Rhesus offspring produced by intracytoplasmic injection of testicular sperm and elongated spermatids. **Fertility and Sterility**, v.77, p.794–801, 2002.
22. 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. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1059-1068, 1997.
23. JEWGENOW, K.; PARIS, M.C.J. Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. **Theriogenology**, v.66, p.93–100, 2006.
24. JORDAN, H.L.; HOWARD, J.G.; SELTON, R.K.; WILDT, D.E.; TOMPKINS, W.A.; KENNEDY-STOSKOPF, S. Transmission of feline immunodeficiency virus in domestic cats via artificial insemination. **Journal of Virology**, v. 70, n.11, p.8224-8228, 1996.
25. KUSTRITZ, M.V.R. Clinical management of pregnancy in cats, **Theriogenology**, v.66, p.145–150, 2006.
26. LACERDA-NETO, J.C.; BARBOSA, J.C.; LUNARDI, L.O.; SILVA, A.A.M.R.; GENARO, G. Effects of surgical stress on the secretion of luteinizing hormone, testosterone and cortisol in the domestic cat (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.4, p.211-214, 2004.
27. LUVONI, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v.66, p.101–111, 2006.
28. MOBERG G.P. Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. In: MOBERG, G.P., MENCH, J.A. **The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare**. Oxon: CABI Publishing, 2000, p.1-22.
29. MORAES, W.; MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; LACERDA, O.; GOMES, M.L.F.; MUCCILOLO, R.G.; SWANSON, W.F. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). In: **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**, 1997, Houston. Anais...Texas: AAZV, 1997. p.334-336. Resumo.
30. MORATO, R.G.; VERRESCHIC, I.T.N.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; CASSARO, K.; PESSUTI, C.; BARNABE, R.C. Seasonal variation in the endocrine–testicular

- function of captive jaguars (*Panthera onca*), **Theriogenology**, v.61, p.1273-1281, 2004.
31. MORATO, R.G.; CRICHTON, E.G.; PAZ, R.C.R.; ZUGE, R.M.; MOURA, C.A.; NUNES, A.L.V.; TEIXEIRA, R.H.; PORTO-LACERDA-NETO, L.R.; MAHLMEISTER, P.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; CORRÊA, S.H.R.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; ARMSTRONG, D.L.; LOSKUTOFF, N.M. Ovarian stimulation and successful in vitro fertilization in the jaguar (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v.53, n.1, p.339, 2000.
32. MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; MORAES, W.; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; PASQUALI, O.L.; GOMES, M.L.F.; MORAIS, R.N.; WILDT, D.E.; BROWN, J.L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v.20, n.2, p.103-116, 2001.
33. MUNSON, L. Contraception in felids. **Theriogenology**, v.66, p.126–134, 2006.
34. MURAKAMI, M.; OTOI, T.; KARJA, N.W.K.; WONGSRIKEAO, P.; AGUNG, B.; SUZUKI, T. Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose, **Cryobiology**, v.48, p.341–348, 2004.
35. NAOI, H.; OTOI, T.; SHIMAMURA, T.; KARJA, N.W.; AGUNG, B.; SHIMIZU, R.; TANIGUCHI, M.; NAGAI T. Developmental competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24h. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, p.271-277, 2007
36. NAVA, A.F.D.; PETERKA, C.R.L.; BANDEIRA, D.D. Avaliação da prevalência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) em felinos domésticos e silvestres da região do Parque Estadual do Morro do Diabo, SP. In: **VIII Congresso e XIII Encontro da ABRAVAS**, 2004, Jaboticabal. Anais... São Paulo: ABRAVAS, 2004. p.85. Resumo.
37. NG, S.C.; MARTELLI, P.; LIOW, S.L.; HERBERT, S.; OH, S.H. Intracytoplasmic injection of frozen-thawed epididymal spermatozoa in a nonhuman primate model, the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). **Theriogenology**, v.58, p.1385-1397, 2002.
38. PAZ, R.C.R.; SWANSON, W.F.; DIAS, E.A.; ADANIA, C.H.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C. Ovarian and immunological responses to alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Zoo Biology**, v.24, p.247–260, 2005.
39. PAZ, R.C.R.; ADANIA, C.H.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C. Análise citogenética de oócitos de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-mato-



- pequeno (*Leopardus tigrinus*) coletados após estimulação ovariana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.46, n.4, p.309-316, 2009.
40. PELICAN, K.M.; BROWN, J.L.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J.G. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. **General and Comparative Endocrinology**, v.144, p. 110–121, 2005.
41. PELICAN, K.M.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J.G. Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. **Domestic Animals Endocrinology**, v.34, p.160–175, 2008.
42. PELICAN, K.M.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.; HOWARD, J.G. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. **Theriogenology**, v.66, n.1, p.37-48, 2006.
43. POPE, C.E.; CRICHTON, E.G.; GÓMEZ, M.C.; DUMAS, C.; DRESSER, B.L. Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by in vitro fertilization of oocytes with flow-sorted sperm. **Theriogenology**, v.71, p.864-871, 2009.
44. POPE, C.E.; GÓMEZ, M.C.; DRESSER BL. In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century, **Theriogenology**, v.66, p.59-71, 2006.
45. POPE, C.E.; JOHNSON, C.A.; MCRAE, M.A.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L.; Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.53, p. 221–236, 1998.
46. POPE, C.E.; MCRAE, M.; KELLER, G.; DRESSER, B. In vitro and in vivo development in cat oocytes following intracytoplasmic sperm injection or subzonal insemination. **Theriogenology**, v.43 p.302, 1995 (Abstract).
47. POPE, C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**, v.53, p.163-174, 2000.
48. PUKAZHENTHI, B.; COMIZZOLI, P.; TRAVIS, A.J.; WILDT, D.E. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.77-90, 2006.
49. ROTH, T.L.; ARMSTRONG, D.L.; BARRIE, M.T.; WILDT, D.E. Seasonal effects on ovarian responsiveness to exogenous gonadotrophins and successful

- artificial insemination in the snow leopard (*Uncia uncia*). **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.285–295, 1997.
50. SAID, S.; HAN, M.S.; NIWA, K. Development of rat oocytes following intracytoplasmic injection of sperm heads isolated from testicular and epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.60, p.359–69, 2003.
51. SNEDAKER, A.K.; HONARAMOOZ, A.; DOBRINSKI, I. A game of cat and mouse: xenografting of testis tissue from domestic kittens results in complete cat spermatogenesis in a mouse host. **Journal of Andrology**, v.25, n.6, p.926–930, 2004.
52. SPINDLER, R.E.; CRICHTON, E.G.; AGCA, Y.; LOSKUTOFF, N.M.; CRITSER, J.; GARDNER, D.K.; WILDT, D.E. Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions. **Theriogenology**, v.66, p.82–92, 2006.
53. SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. International training programs in Reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.21-34, 2004.
54. SWANSON, W.F.; JOHNSON, W.E.; CAMBRE, R.C.; CITINO, S.B.; QUIGLEY, K.B.; BROUSSET, D.M.; MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **Zoo Biology**, v.22, p.421-441, 2003.
55. SWANSON, W.F.; MAGGS, D.J.; CLARKE, H.E.; NEWELL, A.E.; BOND, J.B.; BATEMAN, H.L.; KENNEDY-STOSKOPF, S. Assessment of viral presence in semen and Reproductive function of frozen-thawed spermatozoa from Palla's cat (*Otocolobus manul*) infected with feline herpesvirus, **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.37, n.3, p.336–346, 2006.
56. SWANSON, W.F.; PAZ, R.C.R.; MORAIS, R.N.; GOMES, M.L.F.; MORAES, W.; ADANIA, C.H. Influence of species and diet on efficiency of in vitro fertilization in two endangered Brazilian felids—the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.593, 2002.
57. SWANSON, W.F. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. **Theriogenology**, v.66, p.49-58, 2006.
58. SWANSON, W.F. Reproductive biotechnology and conservation of the forgotten felids—the small cats. In: **Proceedings of the 1st International Symposium**

- on Assisted Reproductive Technologies: Conservation & Genetic Management Wildlife.** Omaha: NE, 2001. p.100–120.
59. SWANSON, W.F. The need to breed: The role of Reproductive sciences in small cat conservation In: **2005 Annual Conference Proceedings.** Chicago: AZA, 2005.
60. TSUTSUI, T.; TANAKA, A.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; MURAI, M.; ANZAI, M.; HORI T. Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, p.1241–1245, 2000.
61. TSUTSUI, T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.122-125, 2006.
62. VIAU, P.; FELIPPE, E.C.G.; OLIVEIRA, C.A. Quantificação de esteróides fecais de fêmeas de onça-pintada (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro: validação da técnica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.4, p.267-275, 2005.
63. WILDT, D.E.; PANKO, W.B.; SEAGER, S.W.J. Effect of prostaglandin F<sub>2α</sub> on endocrine-ovarian function in the domestic cat. **Prostaglandins**, v.18, p.883-892, 1979.
64. WILDT, D.E.; ROTH, T.L. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. **International Zoo Yearbook**, v.35, p.164-172, 1997.
65. WOLFE, B.A.; WILDT, D.E. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, n.1, p.135-41, 1996.
66. YANAGIMACHI, R. Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. **Human Reproduction**, v.13, p.87–98, 1998.

#### **4. O uso de altrenogest para reprodução assistida em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*)**

*Formatado para a Revista Theriogenology*

**Resumo:** Estudos sobre características reprodutivas de espécies silvestres, em especial sobre a flutuação hormonal de fêmeas sob tratamentos com gonadotropinas exógenas, são de grande valia para auxiliar a conservação *ex situ*. Alguns trabalhos recentes apontam resultados positivos no uso de progestinas para reduzir a atividade ovariana de fêmeas, previamente à administração das gonadotropinas. O presente estudo teve o objetivo de identificar a ação de uma progestina, o altrenogest (Regumate<sup>®</sup>, Intervet, São Paulo), como redutor da atividade ovariana em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*). Foram utilizadas seis fêmeas (n=6) alocadas no Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional (Foz do Iguaçu, PR) e o estudo foi dividido em duas etapas. A primeira, contou somente com a aplicação das gonadotropinas exógenas eCG e hCG, e a segunda com a administração da progestina anteriormente à aplicação das gonadotropinas. Foram coletadas fezes e quantificadas as concentrações de metabólitos de estrógenos e progestágenos, por ensaio imunoenzimático. Como resultado, observou-se uma redução nos valores da primeira para a segunda fase, para metabólitos de estrógeno antes e após a aplicação das gonadotropinas e para metabólitos de progesterona após a aplicação das gonadotropinas. Esse estudo comprova a eficácia do uso de altrenogest em fêmeas de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) para reduzir a atividade ovariana e evitar quadros de hiperestrogenismo após a administração de eCG e hCG, demonstrado pelas respostas hormonais mais homogêneas com o uso da progestina.

**Palavras-chave:** Reprodução em cativeiro, falhas reprodutivas, felídeos neotropicais, indução de ovulação, progestina.

## **The use of altrenogest in small spotted cat (*Leopardus tigrinus*)**

**Abstract:** Studies on reproductive characteristics of wild species is of great value to help *ex situ* conservation, especially regarding females hormonal fluctuation under gonadotropin treatments. Some recent studies show positive results when using progestin to reduce females' ovarian activity prior to the administration of gonadotropins. This study aimed to identify the action of a progestin, altrenogest (Regumate<sup>®</sup>, Intervet, São Paulo), as a reducer of ovarian activity in small spotted cat (*Leopardus tigrinus*). Six females allocated in the Biological Refuge that belongs to Itaipu Binational (Foz do Iguassu, PR) were used in this study, and it was divided into two stages. In the first stage, the exogenous gonadotropins eCG and hCG were administered, and in the second stage, before administering the exogenous gonadotropins, the altrenogest progestin was administered. Feces were collected and concentrations of estradiol-17 $\beta$  (E) and progesterone (P) were quantified by an enzyme immunoassay. As a result, there was a reduction in the values from first to the second stage for estrogen metabolites before and after the administration of the gonadotropins and metabolites progesterone after the administration of the gonadotropins. This study demonstrates the efficacy of the use of altrenogest in small spotted cat (*Leopardus tigrinus*) to reduce the ovarian activity and avoid hyperestrogenism after administration of eCG and hCG as with the use of the progestin the hormonal responses were more homogenous.

**Keywords:** Captive reproduction, reproductive failures, Neotropical felids, ovulation induction, progestin.

## 4.1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora (CITES) e da União Nacional para a Conservação da Natureza (IUCN). Todas as 36 espécies de felídeos silvestres, classificadas em 15 famílias, estão ameaçadas de extinção em algum grau (CITES, 2009; IUCN, 2009). Apesar das condições muitas vezes críticas de algumas dessas populações, há poucos dados disponíveis sobre as características reprodutivas de diversas dessas espécies, especialmente em se tratando de pequenos felídeos. Os felídeos neotropicais de pequeno porte são ainda menos conhecidos quanto à sua história natural, fisiologia e estado de conservação na natureza (SWANSON, 2001).

Apesar da facilidade de se reproduzir algumas espécies de felídeos em zoológicos e criadouros, com outras espécies é mais difícil de obter resultados satisfatórios em relação à reprodução em cativeiro (PELICAN et al., 2005; GOULD & WOODRUFF, 2006). Essa dificuldade se apresenta especialmente em espécies de pequeno porte como o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*).

Com tão diferentes mecanismos de reprodução dentro da mesma família Felidae (PELICAN et al., 2006), é fundamental que se amplie o conhecimento em relação à fisiologia reprodutiva de cada uma das espécies. Dessa maneira, será possível não só um melhor manejo dos espécimes em cativeiro, como também o aprimoramento na reprodução desses exemplares (BROWN, 2006).

Mesmo com diversas pesquisas realizadas nos últimos quinze anos objetivando, entre outros, ampliar o conhecimento em relação à atividade ovariana e respostas das fêmeas de felídeos silvestres à administração de gonadotropinas exógenas (BROWN et al., 1995; HOWARD et al., 1997; MOREIRA et al., 2001; CRICHTON et al., 2003; PAZ et al., 2005; PELICAN et al. 2005; PELICAN et al., 2008), existe a necessidade urgente de estudos que possam prever com maior acuidade a resposta ovariana de fêmeas submetidas a esses tratamentos (PELICAN et al., 2006).

Tratamentos com gonadotropinas muitas vezes resultam em respostas ovarianas fora do padrão normal em diversas espécies de felídeos. Isso leva os cientistas a creditarem a esses protocolos de estimulação ovariana o baixo sucesso na reprodução de felídeos em cativeiro (PELICAN et al., 2005; BROWN, 2006; PELICAN et al., 2006). As causas mais comuns para as baixas taxas de prenhez após a estimulação com gonadotropinas são as consequências da hiperestimulação ovariana. Essa hiperestimulação pode levar a elevados níveis de estrogênio, prematura ou

excessiva liberação de progesterona ou mesmo a insuficiência luteal, causando uma luteólise prematura (PELICAN et al., 2006; PELICAN et al., 2008).

Atualmente, existe uma grande necessidade de se desenvolver protocolos de estimulação ovariana que promovam respostas homogêneas após a administração de gonadotropinas exógenas, ou seja, protocolos que evitem o hiperestrogenismo (BROWN, 2006). Pesquisas recentes que buscam aperfeiçoar o uso de progestinas como forma de controlar a atividade ovariana em felídeos têm demonstrado resultados promissores em promover respostas ovarianas mais homogêneas (BROWN, 2006; PELICAN et al., 2005; PELICAN et al., 2006; PELICAN et al., 2008).

Em gato doméstico (*Felis catus*) a ação da progestina altrenogest (Regumate<sup>®</sup>, Intervet, Holanda) foi comprovadamente eficaz como redutora da atividade ovariana, auxiliando na redução de quadros de hiperestrogenismo após a aplicação das gonadotropinas exógenas indutoras de ovulação (STEWART et al., 2010).

O presente trabalho objetivou testar o uso da progestina altrenogest em fêmeas de gato-do-mato-pequeno como redutor de atividade ovariana, previamente à aplicação dos hormônios indutores de ovulação eCG (gonadotropina coriônica equina) e hCG (gonadotropina coriônica humana). Também se objetivou testar se essa redução de atividade evitou o hiperestrogenismo e resultou em uma resposta hormonal mais homogênea. A hipótese a ser testada é de que haverá redução das médias dos valores de metabólitos de estrogênio tanto antes quanto após a aplicação das gonadotropinas exógenas eCG e hCG, assim como a redução nos valores de metabólitos de progesterona após a aplicação de eCG e hCG, com o uso da progestina.

## **4.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### *4.2.1 Animais e coleta de dados*

Foram utilizadas no estudo fêmeas de gato-do-mato-pequeno (n=6), todas alojadas no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) no Refúgio Biológico Bela Vista, Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1 - Informações gerais sobre as fêmeas de gato-do-mato-pequeno utilizadas neste experimento (2008)**

Identificação	Idade	Histórico Reprodutivo	Origem
1620	> 12 anos	Já reproduziu em cativeiro	Natureza
2284	> 4 anos	Não reproduziu em cativeiro	Natureza
1909	9 anos	Nunca reproduziu	Cativeiro
1707	11 anos	Já reproduziu em cativeiro	Cativeiro
2061	> 7 anos	Não reproduziu em cativeiro	Natureza
1895	> 9 anos	Já reproduziu em cativeiro	Natureza

As fêmeas foram mantidas em recintos individuais, ambientados e com alimentação diária alternando entre pescoço (230g), rato inteiro (180g) e carne bovina (360g), fornecida sempre no final da tarde, além de água *ad libitum*.

Foram coletadas diariamente as fezes mais frescas, sempre pela manhã, e armazenadas em sacos plásticos identificados com o número do animal em *freezer* a uma temperatura aproximada de -20°C onde permaneceram até a data da extração. As amostras analisadas (n=392) foram coletadas cinco vezes por semana do dia 22/10/2008 ao dia 12/12/2008, referentes à primeira etapa do trabalho, e do dia 02/03/2009 ao dia 24/04/2009 referentes à segunda etapa, totalizando 53 dias de coleta por fêmea para cada fase.

#### 4.2.2. Indução de supressão ovariana e hormônios gonadotrópicos

O estudo foi dividido em duas etapas, utilizando-se as mesmas fêmeas (n=6) em ambas, como controle delas mesmas. Na primeira etapa foram administradas gonadotropinas exógenas, o eCG com intuito de estimular o desenvolvimento folicular, e o hCG para induzir a ovulação. Na segunda etapa, realizada 115 dias depois, foi administrado o altrenogest via oral (Regumate®, Intervet, São Paulo) previamente à aplicação das gonadotropinas exógenas. Essa progestina foi administrada durante 14 dias, com intuito de reduzir a atividade ovariana e tornar a resposta às gonadotropinas mais homogênea. O eCG foi administrado cerca de 48-72 horas depois da última administração da progestina.

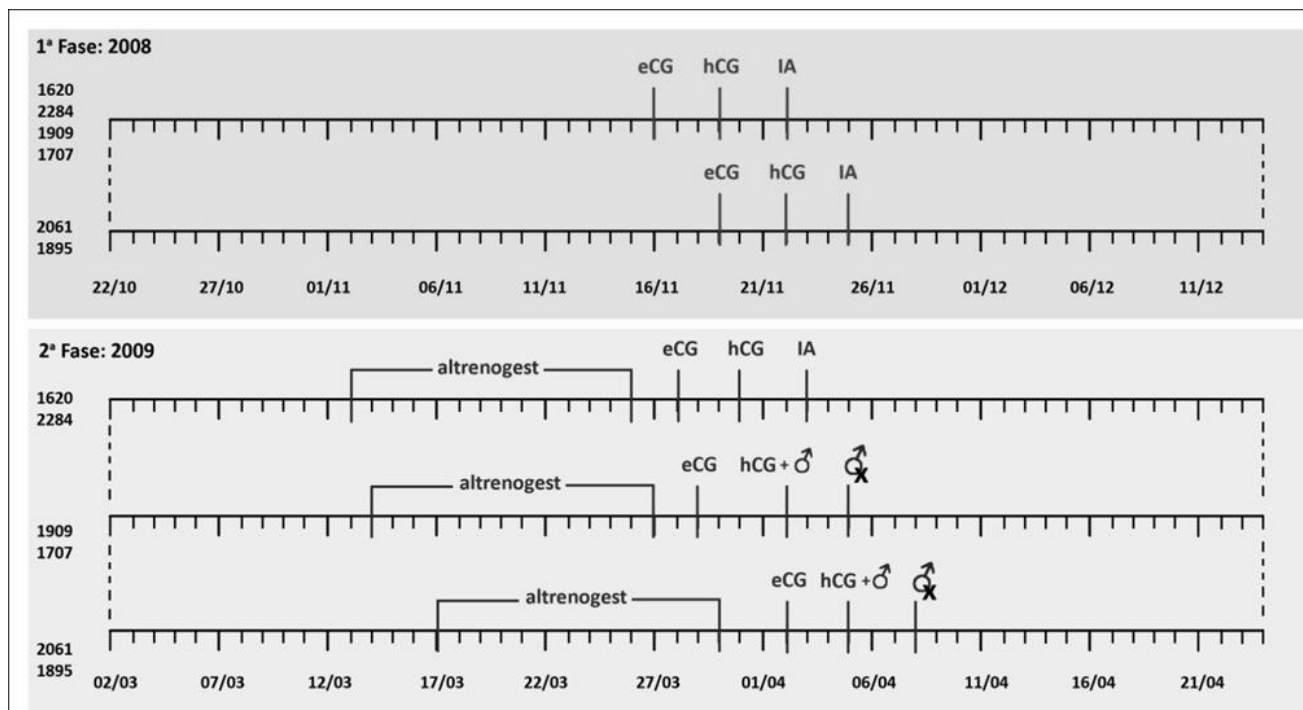
O altrenogest foi administrado na dosagem de 0,3 mg/kg de peso como sugerido por Pelican (2009, comunicação pessoal), por não existirem referências ao uso desse hormônio para a espécie. Essa dose se encontra entre a dose funcional



administrada para gato doméstico (*Felis catus*), de 0,1 mg/kg, e a dose administrada para leopardo-nebuloso (*Oncifelis nebulosa*), de 0,6 mg/kg.

O protocolo para utilização das gonadotropinas foi o mesmo sugerido por Swanson e Brown (2004) e Pelican et al. (2006), que indica a administração de eCG e hCG com diferença de 80-84 horas entre ambas, para todas as fêmeas na primeira fase, e para quatro das fêmeas na segunda fase. Esse protocolo já produziu ninhadas de oito espécies de felídeos, inclusive de gato-do-mato-pequeno (PELICAN et al., 2006; MORAES et al., 1996). Um segundo protocolo de administração das gonadotropinas exógenas foi testado na segunda fase nas Fêmeas 1909 e 1707, alterando o tempo entre a administração de eCG e hCG para 103 horas. As dosagens foram de 200UI de eCG e 150UI de hCG, via injeção intramuscular para todas as fêmeas.

Todas as fêmeas na primeira etapa e duas fêmeas (1620, 2284) na segunda etapa foram inseminadas artificialmente por laparoscopia, cerca de 65 a 72 horas após a aplicação do hCG. As outras quatro fêmeas (1909,1707, 2061,1895) na segunda etapa foram alocadas com machos após a administração do hCG, durante aproximadamente 72 horas. Apesar desses procedimentos, nenhuma fêmea ficou prenhe (Figura 1).



**Figura 1 - Calendário de duração de coletas e indicação das datas de administração de eCG, hCG, inseminação artificial (IA) e colocação (♂) e retirada (♂x) de machos**

#### 4.2.3 Protocolo de extração e do ensaio

Na data da extração, as amostras foram separadas e processadas para metabólitos de estrógeno (E) e de progesterona (P). Foram processadas aproximadamente cinco amostras por semana para estrógeno (E) e três amostras por semana para progesterona (P).

Considerando ambas as etapas do trabalho, foram coletadas amostras durante aproximadamente três semanas antes e três semanas após as injeções hormonais, de cada fêmea. O número máximo de amostras analisadas por fêmea foi de 38 amostras para E, e 23 amostras para P. O número mínimo de amostras analisadas por fêmea foi de 27 amostras para E e 17 amostras para P.

A extração se deu da seguinte maneira:

1. Foi pesado 0,5g de fezes úmidas bem misturadas e colocadas em tubos de ensaio identificados;
2. Foram adicionados 5ml de metanol 80% (metanol P.A. 80; H<sub>2</sub>O 20) em cada tubo;
3. Os tubos foram homogeneizados em um Vórtex por 10 minutos;
4. As amostras foram centrifugadas a 3500rpm durante 15 minutos;
5. Foi colocado 3ml do sobrenadante obtido em um segundo conjunto de tubos identificados, e;
6. O sobrenadante foi seco no segundo conjunto de tubos sob ar comprimido em banho-maria (47-49°C).

Esse protocolo de extração é um dos protocolos desenvolvidos pelo Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) da Universidade de São Paulo, localizado em São Paulo, Brasil, e comumente utilizado para diversas espécies (VIAU, 2009, comunicação pessoal).

Depois de secas as amostras foram processadas no Laboratório de Pesquisas Hormonais do Centro de Conservação e Pesquisa do *Smithsonian Institute*, em Front Royal, EUA, de acordo com protocolo descrito por Brown et al. (2009). O coeficiente de variação (CV) dos padrões comparando cada ponto da curva padrão entre os ensaios foi inferior a 13,94% para E, e inferior a 12,92% para P, com exceção dos valores de concentração de uma das concentrações de Controle e do valor padrão correspondente a 100ng/g de hormônio, que foram inferiores a 17,58% para P.

O anticorpo utilizado para o ensaio de metabólitos de estradiol foi o soro policlonal anti-E2 R4972, conjugado de peroxidase de raiz forte, e para o ensaio

de metabólitos de progesterona o soro monoclonal CL425, ambos fornecidos por C. Munro (University of California, Davis, CA, EUA).

#### *4.2.4 Análise de dados*

Após o processamento das amostras, foram criados gráficos com os valores correspondentes às concentrações de metabólitos de estrógenos e progestágenos em ng/g de fezes úmidas. As comparações estatísticas foram feitas entre a primeira e a segunda fase, analisados os dados referentes ao período anterior à administração das gonadotropinas exógenas para estrógenos, e os dados referentes ao período posterior à administração do eCG para estrógenos (E) e progestágenos (P). Devido à natureza das amostras, não foi possível aplicar nenhuma medida de normalização, e por essa razão utilizou-se o teste de Mann-Whitney U (não-paramétrico para dois grupos de amostras independentes).

### **4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### *4.3.1. Ingestão da progestina*

A progestina foi colocada na alimentação diária das fêmeas, e teve uma taxa de aceitação variando entre 64% e 89% para cada fêmea. Essa taxa foi calculada pelo peso de alimentação não ingerida, constatada na manhã do dia seguinte do fornecimento de cada refeição. Dessa maneira ao menos 0,192 mg/kg de progestina foi ingerida diariamente pelos animais.

O procedimento ideal para garantir que fosse administrado 100% da dosagem da progestina seria fornecer a mesma diariamente adicionada a uma quantidade reduzida de algum alimento irresistível ao animal, anteriormente à administração da porção de alimentação diária, e aguardar a ingestão total da mesma. Esse procedimento, porém, é de grande dificuldade na rotina diária de um zoológico ou centro de reprodução. Dessa maneira, o trabalho focou na possibilidade real de se adotar como rotineiras práticas de reprodução assistida em instituições que trabalham com reprodução de felídeos.

### 4.3.2. Dosagens Hormonais

Os resultados referentes à concentração média de metabólitos de estrógenos e progesterona, além de seus respectivos desvios-padrão, são apresentados na Tabela 2. Em geral, houve redução dos valores apresentados na Tabela 2 entre a primeira e a segunda fase do estudo. Esse é o primeiro indício de que o uso da progestina não é eficiente somente para reduzir a atividade ovariana durante sua administração, como também para reduzir concentrações de E e P após a administração de eCG e hCG quando essas são utilizadas.

**Tabela 2 - Médias das concentrações de metabólitos de estradiol e progesterona, antes e após a aplicação de eCG sem (1ª Fase) e com (2ª Fase) a aplicação de altrenogest. Valores em negrito (p<0,05) indicam diferença significativa entre os valores de cada coluna.**

<b>Média e erro-padrão de metabólitos de estradiol do período anterior à aplicação de eCG</b>						
	<b>1620</b>	<b>2284</b>	<b>1909</b>	<b>1707</b>	<b>2061</b>	<b>1895</b>
1ª Fase	121,98 ± 10,56	88,07 ± 13,2	161,94 ± 32,85	237,8 ± 63,25	162,27 ± 23,86	89,83 ± 20,57
2ª Fase	134,33 ± 11,8	52,3 ± 4,46	91,17 ± 8,05	89,19 ± 9,56	74,78 ± 11,69	54,61 ± 5,87
valor de p	0.719785	0.002881	0.103743	0.009661	0.000415	0.273165

<b>Média e erro-padrão de metabólitos de estradiol do período posterior à aplicação de eCG</b>						
	<b>1620</b>	<b>2284</b>	<b>1909</b>	<b>1707</b>	<b>2061</b>	<b>1895</b>
1ª Fase	184,08 ± 34,94	205,23 ± 44,01	303,81 ± 73,86	248,56 ± 51,77	803,69 ± 333,41	370,03 ± 129,75
2ª Fase	99,71 ± 11,92	146,31 ± 34,4	127,09 ± 26,09	92,16 ± 9,9	158,03 ± 54,22	42,11 ± 7,79
valor de p	0.001961	0.507801	0.057739	0.016517	0.034294	0.002663

<b>Média e erro-padrão de metabólitos de progesterona do período posterior à aplicação de eCG</b>						
	<b>1620</b>	<b>2284</b>	<b>1909</b>	<b>1707</b>	<b>2061</b>	<b>1895</b>
1ª Fase	17471,05 ± 3134,91	34203,81 ± 5538,91	47876,79 ± 14035,74	27120,87 ± 4508,44	64600,02 ± 19832,34	42704,44 ± 7207,98
2ª Fase	5468,78 ± 1354,32	40577,87 ± 11359,38	6488,17 ± 1457,54	15529,77 ± 3237,48	65383,52 ± 13600,37	26543,71 ± 4307,63
valor de p	0.001562	1.000000	0.000220	0.047914	0.886403	0.192639

Após as dosagens hormonais nas fezes, foram geradas as Figuras de 2 a 13. Em geral, os gráficos da flutuação hormonal apresentaram visível redução nas concentrações hormonais da primeira para a segunda fase. Algumas fêmeas, porém (1909, 1707, 1895) mesmo apresentando concentrações reduzidas na segunda fase, não apresentaram picos hormonais regulares, o que pode indicar que a progestina, causou uma redução hormonal excessiva ou prolongada (mesmo com a retirada do hormônio) e potencialmente prejudicial à tentativa de reproduzir essas fêmeas. Por essa razão, é essencial que novos estudos sejam conduzidos a fim de testar diferentes dosagens da progestina para estabelecer uma concentração realmente eficaz para

reduzir a atividade hormonal após a aplicação de gonadotropinas (evitar quadros de hiperestrogenismo), porém, sem causar uma redução hormonal excessiva. Stewart et al. (2010) determinaram que a dosagem de 0.044 mg/kg é suficiente para causar redução da atividade esteroideogênica em gato-doméstico e observaram um completo retorno ao ciclo estral.

Experimentos anteriores já haviam demonstrado a efetividade e a longa duração dos hormônios eCG e hCG para estimular a ovulação, e muitas vezes causando uma segunda onda de crescimento folicular, o que se acredita ser um fator comprometedor para a prenhez das fêmeas (PELICAN et al., 2006) No presente experimento também foi possível observar, com exceção à Fêmea 1620 (Figura 2), discutida posteriormente, duas ou mais ondas foliculares após a administração das gonadotropinas na primeira fase. Já em relação à segunda fase, houve redução no número de ondas foliculares para todas as fêmeas, com exceção da 1909, como é possível observar nos gráficos.

Aparentemente o protocolo de 103 horas (intervalo entre a administração do eCG e do hCG) utilizado para as fêmeas 1909 e 1707, teve um efeito negativo na flutuação hormonal, já que a fêmea 1909 apresentou um perfil de metabólitos de estradiol reduzido e dois picos de E, sendo um inclusive anterior à administração do hCG (Figura 7), enquanto a fêmea 1707 apresentou picos muito reduzidos e desuniformes (Figura 9) na segunda fase. O protocolo de 80-84 horas foi testado em gato doméstico no início da década de 90 por Donoghue et al. (1992), sendo comparado a protocolos mais longos e apresentando o melhor resultado. Esse protocolo foi testado nos anos seguintes por diversos pesquisadores com gato doméstico (HOWARD et al., 1992; POPE et al., 1998; TSUTSUI, 2006). Desde então vem sendo utilizado com sucesso para diversas espécies de felídeos silvestres (MORAES et al., 1996; SWANSON et al., 1996; SWANSON et al., 2002; ROTH et al., 1997; PAZ et al., 2005). De acordo com a literatura, existem indícios substanciais de que protocolos mais longos não apresentam bons resultados para uma estimulação ovariana apropriada, entretanto, não se deve descartar o fato de que nas fêmeas 1909 e 1707 a dosagem da progestina administrada ter tido um efeito supressor maior que o esperado.

A Fêmea 1895 também apresentou valores de pico de E muito reduzidos na segunda fase, em relação à primeira. Nesse caso, o fato de não se ter coletado amostras do período de 01/04 a 10/04 pode ser responsável pela falta de ao menos um pico após a administração das gonadotropinas. Portanto, é possível que nesse período tenha havido um pico de E, já que foi o período subsequente à administração

do hCG, mas que esse não tenha sido verificado nos gráficos pela falta de amostras no período. É possível também que a administração de progestina tenha tido uma influência maior na Fêmea 1895, o que impediu o crescimento folicular e ovulação mesmo após a administração das gonadotropinas exógenas, assim como pode ter ocorrido com as Fêmeas 1909 e 1707.

A Fêmea 1620 também apresentou picos muito reduzidos de E durante a segunda fase, beirando o valor máximo basal. Essa fêmea é a mais idosa do plantel (> 12 anos) e, durante a primeira fase, foi a que apresentou os valores basais mais baixos para E e P. Também foi a fêmea que apresentou os resultados mais semelhantes ao que se esperaria num ciclo estral normal, ou seja, sem a influência de gonadotropinas exógenas, durante a primeira fase. Isso pode ser um indicador de que a atividade ovariana natural dessa fêmea já se encontrava reduzida como resultado de sua idade avançada.

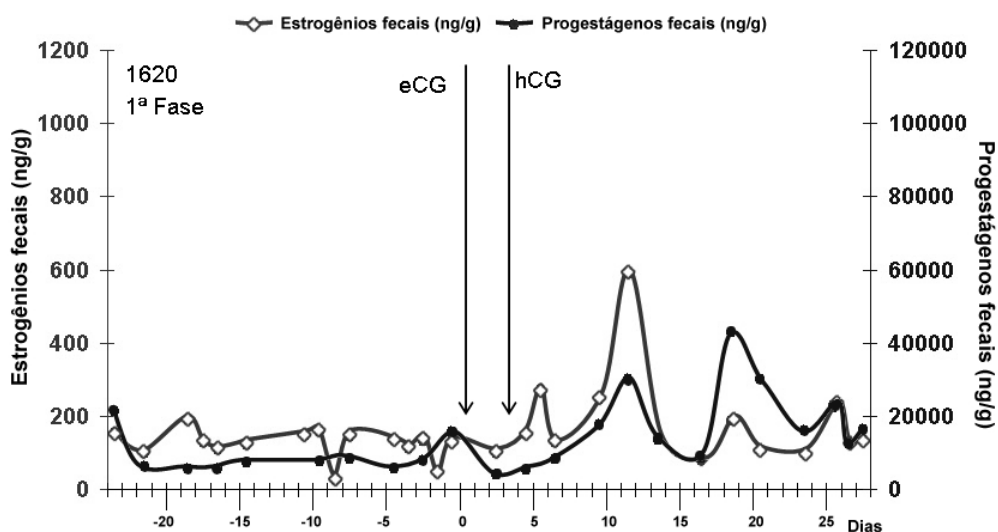


Figura 2 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1620 (>12 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG.

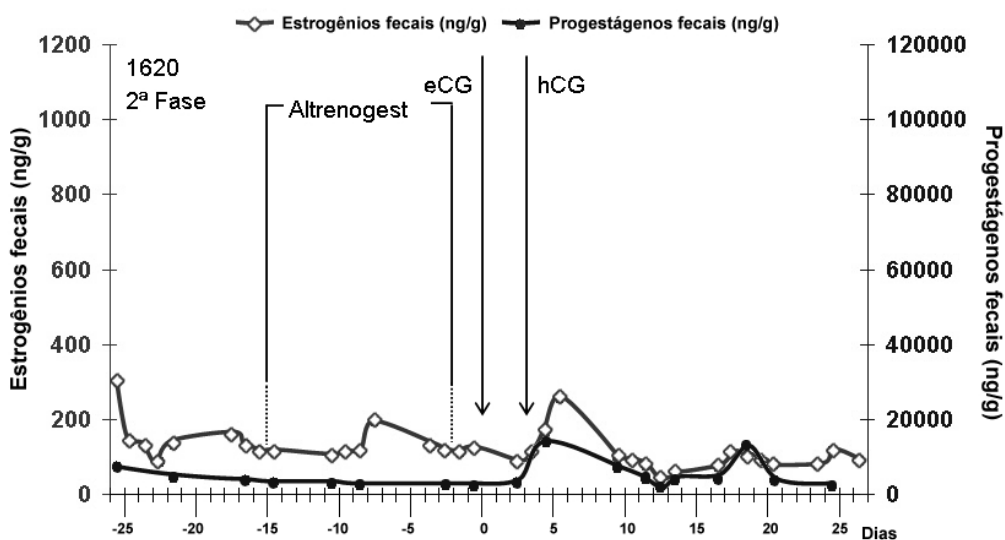


Figura 3 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1620 (>12 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias), com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG.

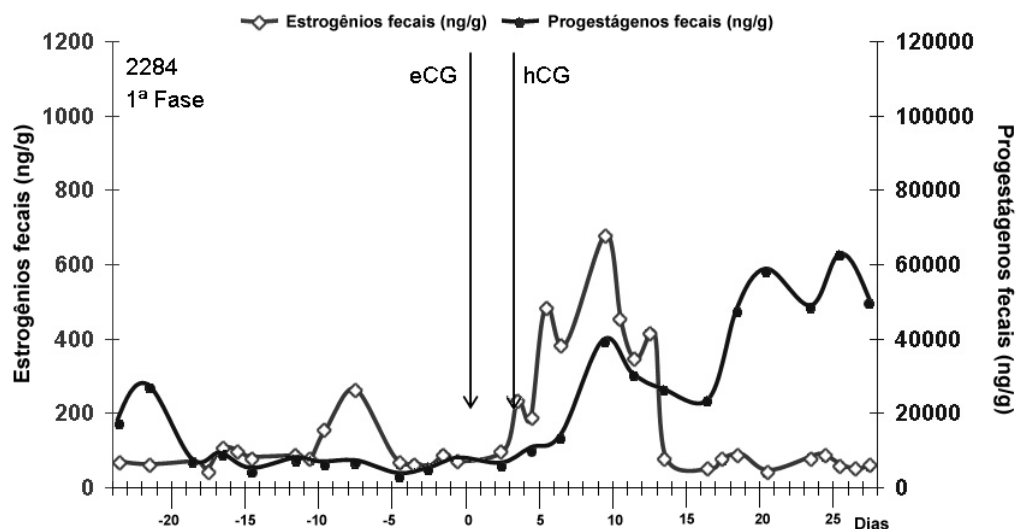


Figura 4 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 2284 (> 4 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG.

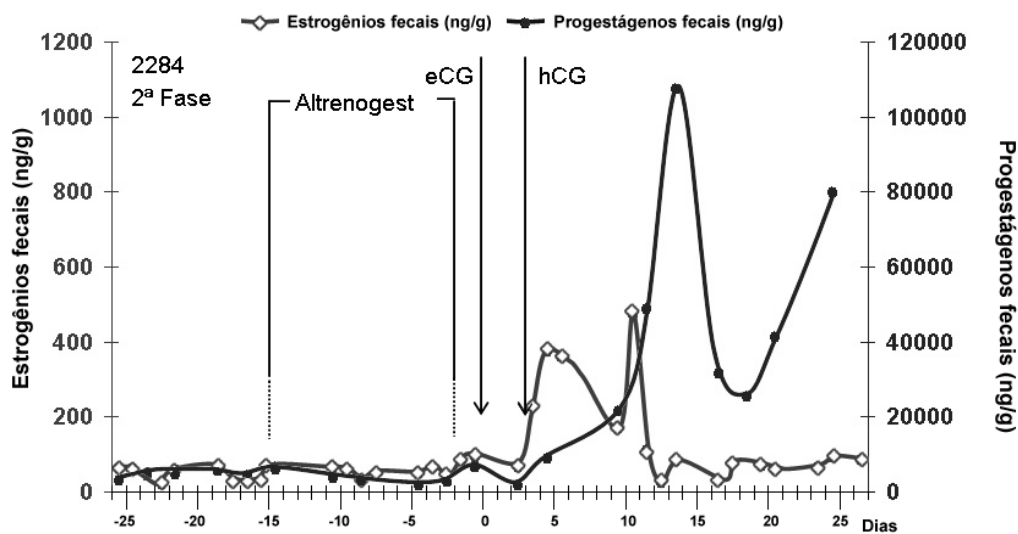


Figura 5 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 2284 (> 4 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias), com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG.



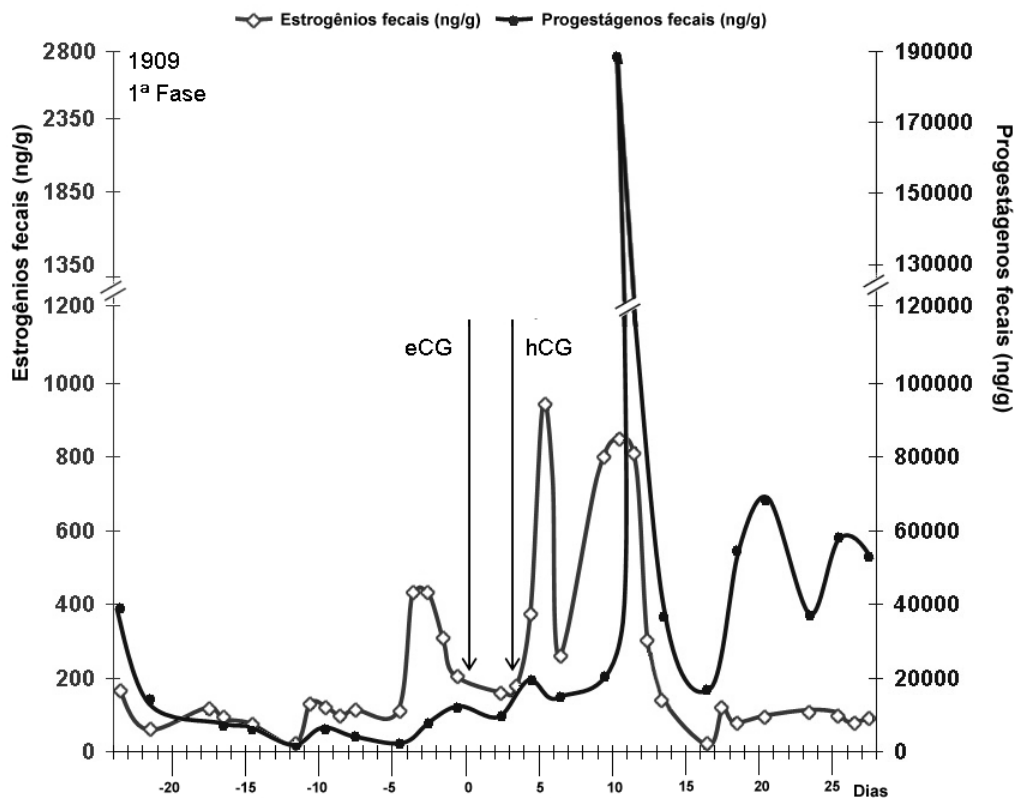


Figura 6 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1909 (9 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG.

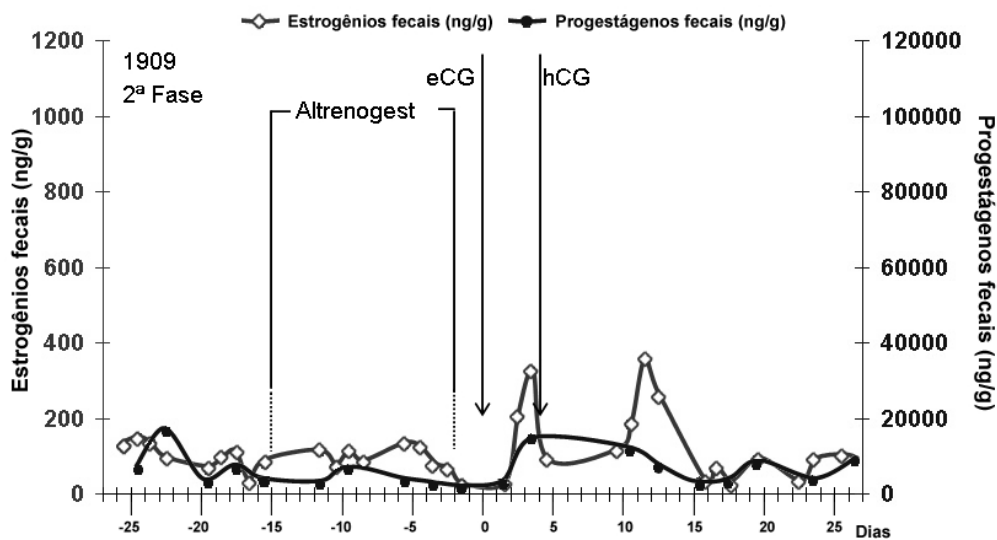


Figura 7 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1909 (9 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias), com intervalo de 103 horas entre a administração do eCG e do hCG.

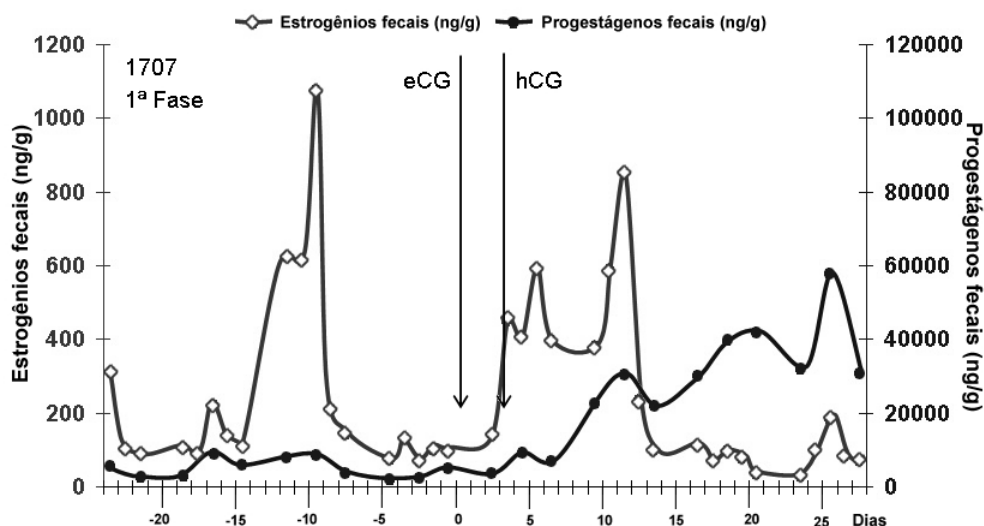


Figura 8 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1707 (11 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG.

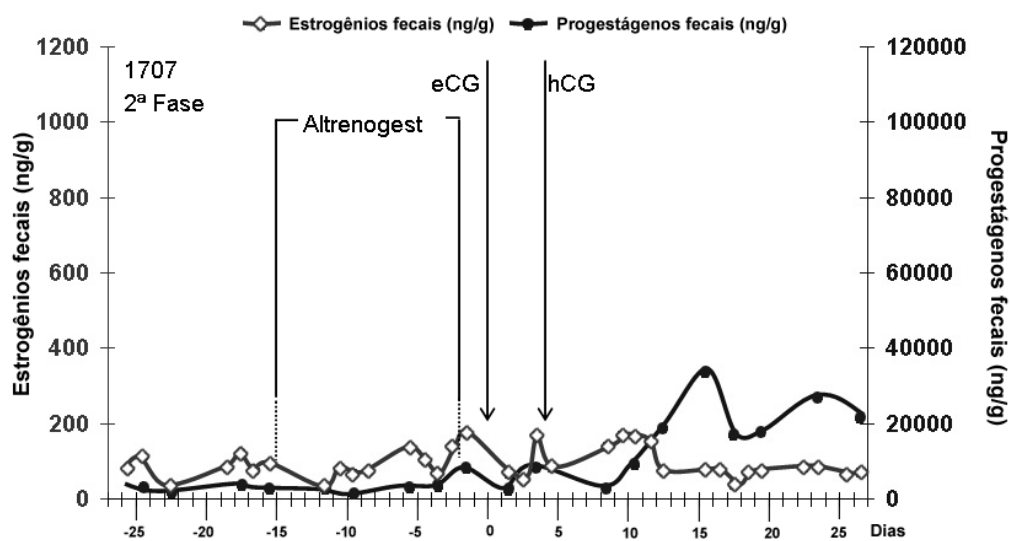


Figura 9 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1707 (11 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias), com intervalo de 103 horas entre a administração do eCG e do hCG.

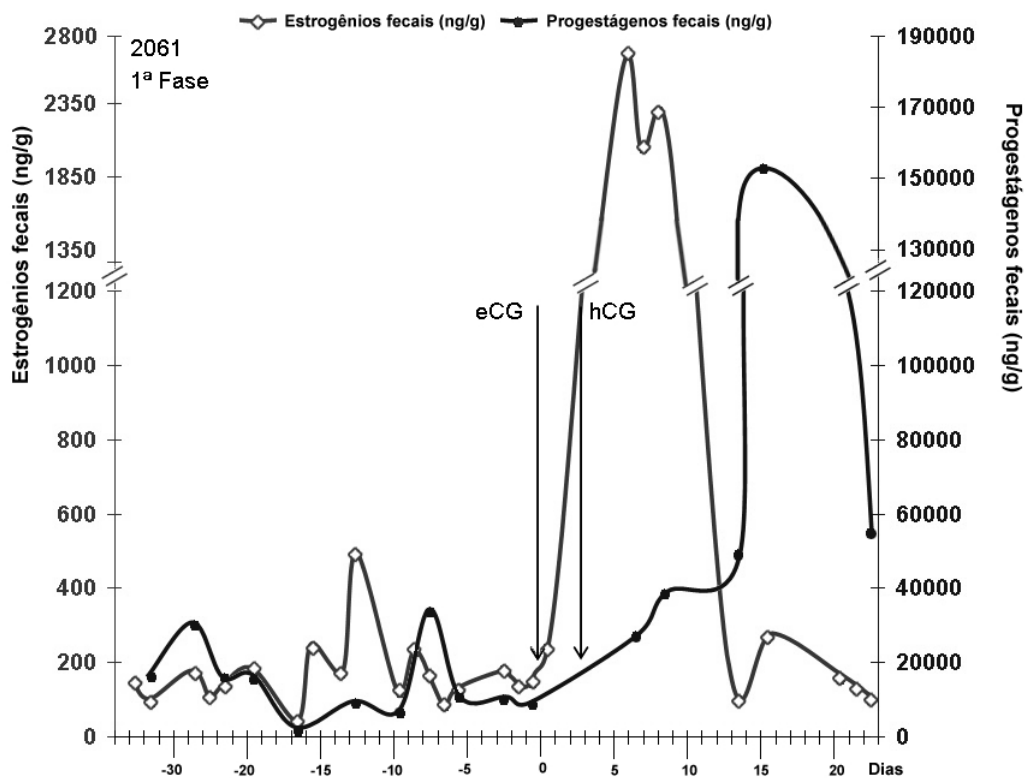


Figura 10 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 2061 (>7 anos), sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG.

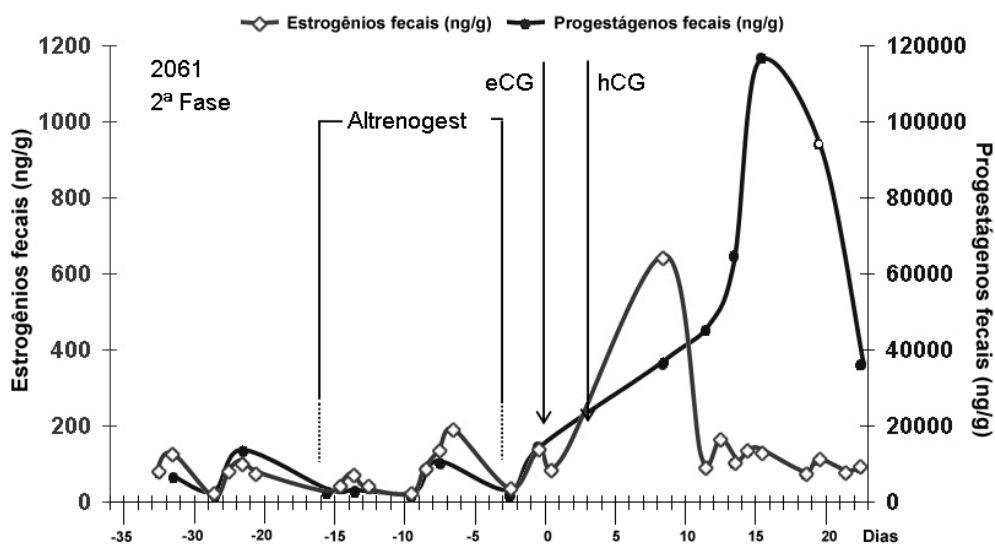


Figura 11 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 2061 (>7 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias), com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG.

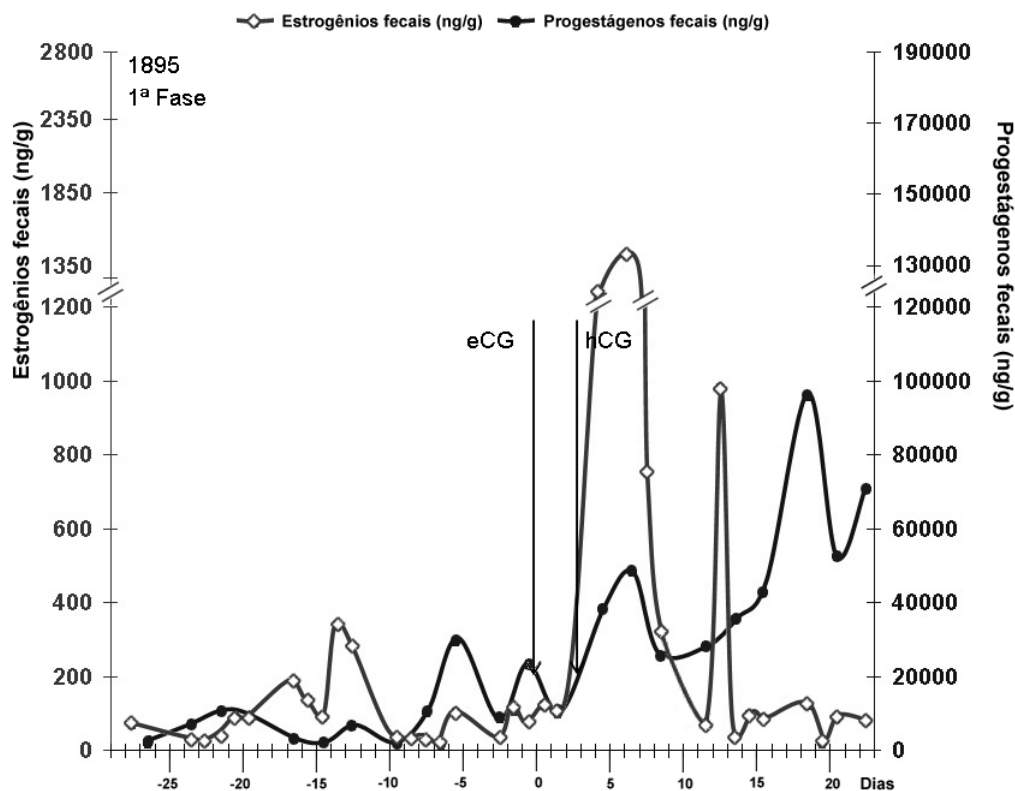


Figura 12 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1895 (>9 anos) sem o uso de altrenogest, com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG.

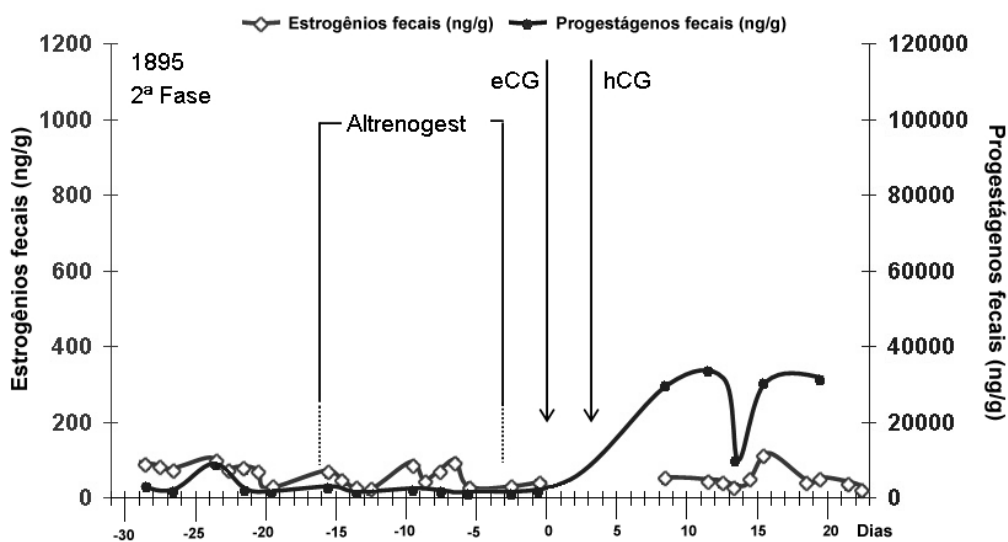
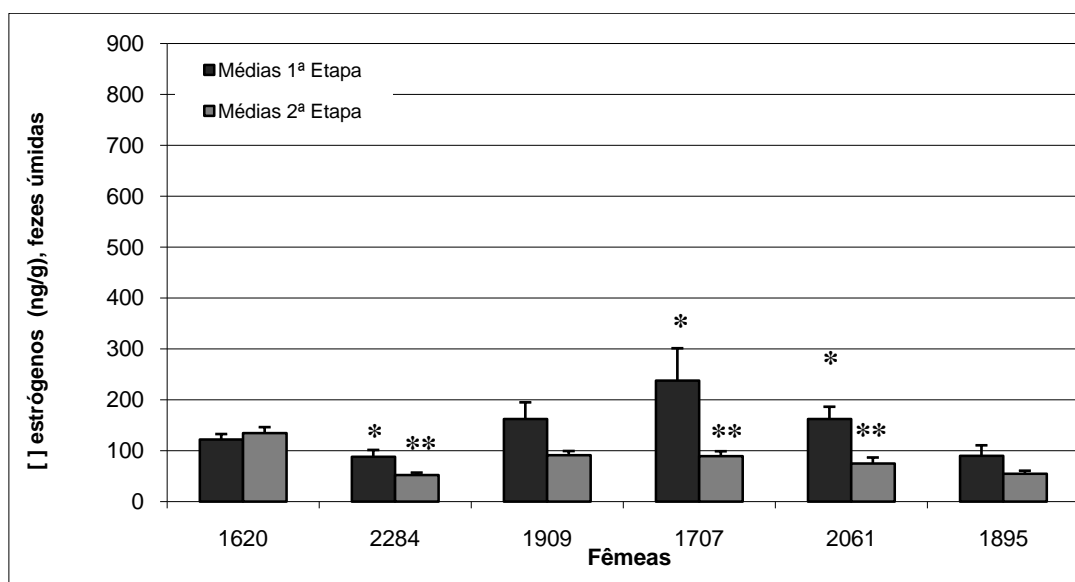


Figura 13 - Concentrações de metabólitos de estrógenos (E) e progestágenos (P) em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), em ng/g de fezes úmidas da Fêmea 1895 (>9 anos), com o uso de altrenogest (intervalo de 14 dias), com intervalo de 80-84 horas entre a administração do eCG e do hCG.

#### 4.3.3. Ciclo prévio ao uso de eCG e hCG

Em relação à flutuação hormonal do E anterior à aplicação do eCG, os resultados comparativos entre ambas as fases demonstrou ser significativa a diferença ( $p < 0,05$ ) para as fêmeas 2284, 1707 e 2061, conforme a Figura 14. Porém, é possível observar uma tendência à diminuição dos valores de média e erro padrão para todas as fêmeas na segunda fase, com exceção à fêmea 1620. Com isso, apresentam-se fortes indícios da eficácia do tratamento com a progestina altrenogest para reduzir a atividade ovariana, em especial, o crescimento folicular.

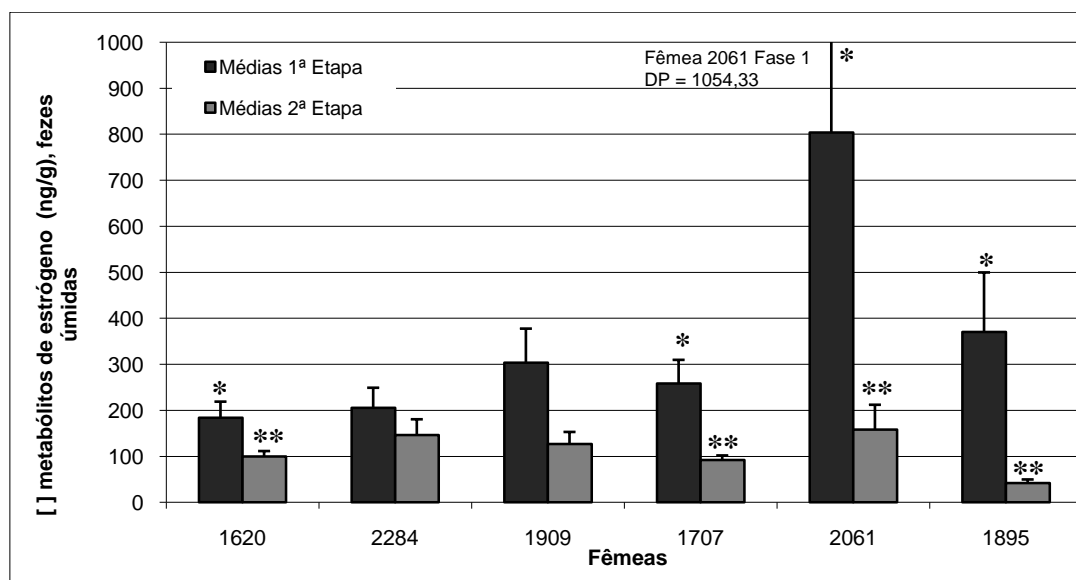


**Figura 14 - Concentração média e erro padrão de E prévio à administração de eCG em ambas as fases, para todas as fêmeas. Valores marcados com asteriscos são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).**

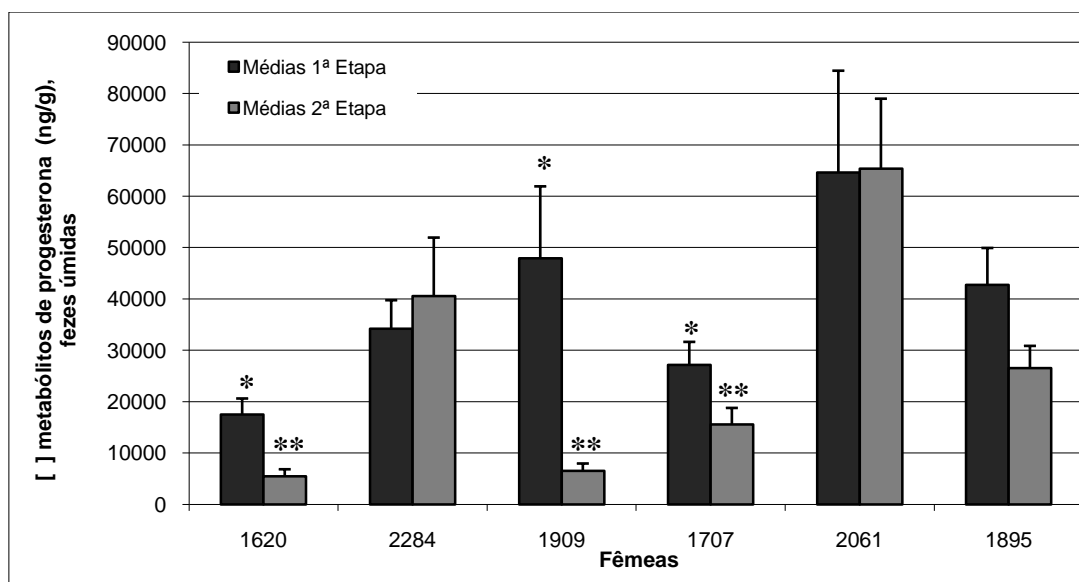
#### 4.3.4. Ciclo posterior ao uso de eCG e hCG

Individualmente, o ciclo após a administração das gonadotropinas foi significativamente diferente apenas as fêmeas 1620, 1707, 2061 e 1895 para E e 1620, 1909 e 1707 para P ( $p < 0,05$ ) (Figuras 15 e 16). Na análise referente ao E (Figura 15), é visível a redução tanto das médias gerais quanto dos erros padrão das amostras da primeira para a segunda fase. A redução das médias gerais individuais das fêmeas pode indicar que a ação da progestina previamente à administração de eCG reduziu a freqüência de altos valores de E, características de hiperestrogenismo. Da mesma forma, a redução nos erros padrão das amostras nos dá indícios de um comportamento hormonal mais homogêneo e consistente.

Em relação à P, houve indícios de redução das concentrações e erros padrão, de todas as fêmeas, com exceção à Fêmea 2284. Essa fêmea apresentou dois picos de P na segunda fase, enquanto na primeira, havia apresentado três. Porém, os picos apresentados na segunda fase foram de concentrações mais altas, o que levou ao resultado apresentado na Figura 16.



**Figura 15 - Concentração média e erro padrão de E posterior à administração de eCG em ambas as fases, para todas as fêmeas. Valores marcados com asteriscos são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).**



**Figura 16 - Concentração média e erro padrão de P posterior à administração de eCG em ambas as fases, para todas as fêmeas. Valores marcados com asteriscos são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).**

Na Figura 17 é possível observar que as médias de todas as fêmeas para as concentrações basais de metabólitos de estradiol, após a administração das

gonadotropinas, são estatisticamente diferentes ( $p=0,000021$ ) entre as duas fases do estudo. Isso demonstra matematicamente a eficácia da progestina, de uma maneira geral, em reduzir as concentrações de estradiol posteriormente à administração das gonadotropinas.

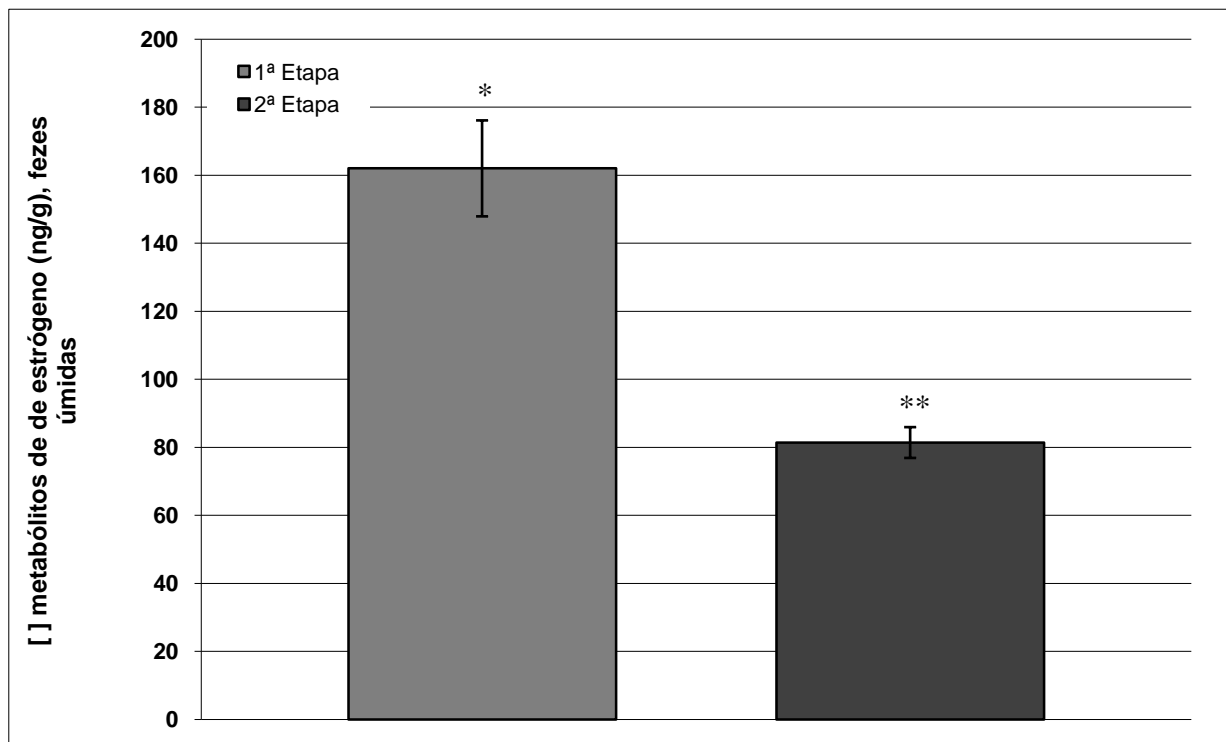


Figura 17 – Médias e erros-padrão das concentrações basais de metabólitos de estrógenos na primeira e na segunda fase do experimento, após a aplicação do eCG. Valores marcados com asteriscos são significativamente diferentes entre si ( $p<0,05$ ).

#### 4.4. CONCLUSÕES

1. A progestina altrenogest reduz a atividade ovariana em fêmeas de gato-do-mato-pequeno quando administrada em concentrações acima de 0,192mg/kg de peso corporal, por via oral, a partir de 14 dias de administração.
2. Houve visível redução na média das concentrações de estrógenos, sugerindo que quadros de hiperestrogenismo não ocorreram, quando administrada a progestina altrenogest em fêmeas de gato-do-mato-pequeno, em concentrações acima de 0,192mg/kg de peso, previamente às gonadotropinas exógenas.
3. Houve visível redução no desvio padrão dos valores de E, sugerindo que houve uma resposta mais homogêneas em relação à flutuação hormonal (E e P), quando administrada a progestina altrenogest em fêmeas de gato-do-mato-pequeno, em concentrações acima de 0,192mg/kg de peso, previamente às gonadotropinas exógenas.



#### 4.5. REFERÊNCIAS

1. BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**. n.1, v. 66, p.5-13, 2006.
2. BROWN, J.L.; WILDT, D.E.; GRAHAM, L.H.; BYERS, A.P.; COLLINS, L.; BARRETT, S.; HOWARD, J.G. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. **Biology of Reproduction**, v.53, p.93-102, 1995.
3. BROWN, J.L.; WALKER, S.; STEINMAN, K.. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. **Endocrine Research Laboratory**, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, Manual: 1-93, 2009
4. BROWN, J.L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**. v.66, p.25-33, 2006.
5. BROWN, J.L.; WILDT, D.E.; WIELEBNOWSKI, N.; GOODROWE, K.L.; GRAHAM, L.H.; WELLS, S.; HOWARD, J.G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p.337-46, 1996
6. CITIES 2009. CITIES Appendix I e II. Versão 2009. **Disponível em** <[www.cites.org](http://www.cites.org)>. **Acessado em** 18/10/09.
7. CRICHTON, E.G.; BEDOWS, E.; MILLER-LINDHOLM, A.K.; BALDWIN, D.M.; ARMSTRONG, D.L.; GRAHAM, L.H.; FORD, J.J.; GJORRET, J.O.; HYTTEL, P.; POPE, C.E.; VAJTA, G.; LOSKUTOFF, N.M. Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and in vitro embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). **Biology of Reproduction**, v.68, p.105–113, 2003.
8. DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; MUNSON, 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. **Biology of Reproduction**, v.46, p.972-980, 1992.
9. 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. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1059-1068, 1997.
10. IUCN 2009. Red List of Threatened Species. Version 2009.1. **Disponível em** [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) **Acessado em** 18/10/09.
11. MORAES, W.; MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; LACERDA, O.; GOMES, M.L.F.; MUCCILO, R.G.; SWANSON, W.F. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). In: **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**, 1997, Houston. Anais...Texas: AAZV, 1997. p.334-336. Resumo.
12. MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; MORAES, W.; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; PASQUALI, O.L.; GOMES, M.L.F.; MORAIS, R.N.; WILDT, D.E.; BROWN, J.L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v.20, n.2, p.103-116, 2001.
13. PAZ, R.C.R.; SWANSON, W.F.; DIAS, E.A.; ADANIA, C.H.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C. Ovarian and immunological responses to alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Zoo Biology**, v.24, p.247–260, 2005.
14. PELICAN, K.M.; BROWN, J.L.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J.G. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. **General and Comparative Endocrinology**, v.144, p. 110–121, 2005.
15. PELICAN, K.M.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.; HOWARD, J.G. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. **Theriogenology**, v.66, n.1, p.37-48, 2006.
16. PELICAN, K.M.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J.G. Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. **Domestic Animals Endocrinology**, v.34, p.160–175, 2008.
17. POPE, C.E.; JOHNSON, C.A.; MCRAE, M.A.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L.; Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.53, p. 221–236, 1998.

18. ROTH, T.L.; ARMSTRONG, D.L.; BARRIE, M.T.; WILDT, D.E. Seasonal effects on ovarian responsiveness to exogenous gonadotrophins and successful artificial insemination in the snow leopard (*Uncia uncia*). **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.285–295, 1997.
19. STEWART, R.A.; PELICAN, K.M.; BROWN, J.L.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J.G. Oral progestin induces rapid, reversible suppression of ovarian activity in the cat. **General and Comparative Endocrinology**, v.166, p.409-416, 2010.
20. SWANSON, W.F.; HOWARD, J.G.; ROTH, T.L.; BROWN, J.L.; ALVARADO, T.; BURTON, M.; STARNES, D.; WILDT, D.E. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p.87-94, 1996.
21. SWANSON, W.F. Reproductive biotechnology and conservation of the forgotten felids — the small cats. In: **Proceedings of the 1st International Symposium on Assisted Reproductive Technologies: Conservation & Genetic Management Wildlife**. Omaha: NE, 2001. p.100–120.
22. SWANSON, W.F.; PAZ, R.C.R.; MORAIS, R.N.; GOMES, M.L.F.; MORAES, W.; ADANIA, C.H. Influence of species and diet on efficiency of in vitro fertilization in two endangered Brazilian felids—the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.593, 2002.
23. SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. International training programs in Reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.21-34, 2004.
24. TSUTSUI, T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.122-125, 2006.

**VITA****Tatiane Micheletti Ribeiro Silva**

Bióloga formada em 2007 com monografia realizada na área de conservação de aves de rapina. Durante a graduação atuou em diversas áreas dentro da Universidade, desenvolvendo e atuando em projetos universitários e profissionalizantes como: micropropagação vegetal (orquídeas) (2007), monitoramento ambiental (2004, 2006, 2008), e organização de coleções científicas e identificação de ictiofauna (2004).



Também realizou estágios fora da universidade, como no Centro de Pesquisa do Pantanal (Miranda, MS) no projeto “*Estimating the density of a jaguar population in the Brazilian Pantanal using camera-traps and capture–recapture sampling in combination with GPS radio-telemetry*” (2004) e no Refúgio Biológico da Itaipu Binacional em “Métodos de Falcoaria” (2007). Durante a graduação, também desenvolveu diversos cursos de extensão universitária, sendo os mais importantes: “Treinamento em Ecologia de Grandes Mamíferos” (Projeto Puma, 2005), “Pesquisa em Ocupação da Onça-Pintada na Serra do Mar” (Projeto Puma, 2006).

Em 2007 ingressou no Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná (Curitiba), onde está para concluir com sua dissertação na área de reprodução de pequenos felídeos silvestres. Em 2008 auxiliou na organização do curso de “Atualização em Endocrinologia de Animais Selvagens”, com ministrantes expoentes na área como a Dra. Janine L. Brown e a Dra. Susan Walker. Em 2009 passou um mês no Centro de Conservação e Pesquisa do *Smithsonian Institute* (Front Royal, EUA) como estagiária, analisando as amostras desta dissertação de Mestrado.

Atualmente é aluna bolsista da Fundação Erasmus Mundus, desenvolvendo um Mestrado-duplo (double degree) no curso de Manejo Sustentável de Florestas Tropicais (SUTROFOR), na Universidade de Bangor (Bangor University, Wales), Grã-Bretanha. Em 2010 realizará o segundo ano do Mestrado europeu na Universidade Técnica de Dresden (Technische Universität Dresden, Dresden) na Alemanha.

## **ANEXO I - Normas dos periódicos Revista Brasileira de Reprodução Animal e Theriogenology**

### **Revista Brasileira de Reprodução Animal - Instruções aos autores**

A Revista Brasileira de Reprodução Animal destina-se à publicação de artigos técnicos, revisões, traduções autorizadas pelos autores, observações clínicas e informes gerais, tendo como enfoque principal a divulgação da ciência, notadamente em tópicos de interesse da reprodução animal.

A Revista Brasileira de Reprodução Animal, a partir do v.29 de 2005, é publicada exclusivamente *on line* e está disponível no *website* do CBRA (<http://www.cbra.org.br/publicações/rbra.do>)

Toda correspondência deverá ser encaminhada a: Dr. Rômulo Cerqueira Leite, Coordenador do Comitê Editorial

Revista Brasileira de Reprodução Animal

E-mail: [rbra@cbra.org.br](mailto:rbra@cbra.org.br)

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA

Alameda das Princesas, 1275 - Bairro São José - 31275-180 Belo Horizonte - MG

Fone: (031)491-7122 / Fax: (031)491-7025.

E-mail: [cbra@cbra.org.br](mailto:cbra@cbra.org.br) e *Website*: <http://www.cbra.org.br>

#### Submissão de manuscritos

.: Todos os manuscritos devem ser originais e os direitos autorais transferidos à Revista Brasileira de Reprodução Animal.

.: Os autores são inteiramente responsáveis pelos dados, conceitos e informações contidas nos artigos

.: Os manuscritos devem ser encaminhados por e-mail, preferencialmente, ou por correio em CD-ROM legível por PC devidamente identificado. As ilustrações devem ser enviadas em arquivo separado.

.: A redação do manuscrito deverá estar de acordo com a lexicologia e sintaxe do idioma português.

#### Unidades de medida. Abreviaturas e símbolos

.: As unidades de medida devem ser usadas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades. As abreviaturas e símbolos devem ser evitados, exceto quando usar unidades padrão de medidas.

#### Processo de revisão

.: Os manuscritos serão submetidos a pelo menos dois relatores (referees) e retornarão aos autores para revisão de acordo com as sugestões dos relatores. O manuscrito revisado deverá ser enviado ao Editor.

## Preparação do manuscrito

Texto e formato dos arquivos: Digitar em folha A4 (21.0 x 29.7) com 3cm de margens, fonte Times New Roman 12, continuamente e sem formatação, com linhas numeradas consecutivamente e paginado. O arquivo eletrônico (.doc) deverá ser compatível Word for Windows (versão 6.0 ou superior).

## Seções do manuscrito:

Título

Título em inglês

Autor(es)

Endereço

Resumo

Palavras-chave

Abstract

Keywords

Corpo do trabalho

Referências bibliográficas

Agradecimentos

Tabelas

Figuras

.: Título: O título deve ser sucinto mas representativo do conteúdo do manuscrito. As palavras do título deverão estar em negrito, com somente a primeira letra da primeira palavra em maiúsculo (exceto no caso de nomes próprios). As palavras serão escritas em letras minúsculas. Se o trabalho teve suporte financeiro e/ou é parte de tese ou dissertação, estes dados serão colocados no rodapé da página, sem chamada específica.

.: Título em inglês: Logo abaixo do título em português, entre parêntesis e substituindo-se o negrito por itálico.

.: Autor(es): Os nomes dos autores e colaboradores, virão abaixo do título, por extenso e destacando em itálico o sobrenome paterno, seguidos de chamadas na forma de expoentes em algarismos arábicos. Os endereços dos autores serão colocados logo abaixo do último autor, segundo a ordem das chamadas. É necessário indicar o e-mail do autor de contato.

.: Resumo: Narrativa do assunto do manuscrito, com seus principais resultados e conclusões, limitada a 100 palavras (750 caracteres com espaço) em um só parágrafo.

.: Palavras-chave: Palavras ou expressões que identificam o conteúdo do manuscrito, não ultrapassando o limite de quatro.

.: Abstract: Versão em inglês do Resumo.

.: Keywords: Versão em inglês das Palavras-chave.

.: Corpo do trabalho: Introdução, Desenvolvimento do assunto (obs.: Comentários finais/Conclusões aparecerão no(s) parágrafo(s) final(is), na seqüência do texto, sem título próprio).

.: Agradecimentos: Os agradecimentos deverão ser expressos com brevidade.

.: Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos organizados em linhas e colunas. Serão construídas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. Se houver necessidade de grupos de dados no corpo da tabela, salta-se uma linha em branco. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas

.: Figura: Refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. As fotografias, no tamanho de 7,5 x 11,0 cm, devem ser bem nítidas e de bom contraste, indicando no verso a orientação para impressão (flecha para cima), nome do autor e a qual figura se refere. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. Recomenda-se o envio das figuras em arquivo à parte, listando-se as respectivas legendas ao final do texto.

.: Referências bibliográficas: Adotam-se as normas da ABNT-NB-66 simplificadas.

Citação no texto: Indique a fonte entre parêntesis após a citação, para evitar a interrupção na seqüência do texto. No caso de nomes de autores que integrados no texto, a data de publicação é mencionada entre parêntesis, depois do nome do autor. Diversas referências para mesma citação são listadas em ordem cronológica e havendo coincidência, usa-se a ordem alfabética de autor.

Exemplos: Dunne (1967), Morril (1967), Nutrient ... (1968), Lopes e Moreno (1974) Ferguson et al. (1979). ou (Dunne, 1967; Morril, 1967; Nutrient ..., 1968; Lopes e Moreno, 1974; Ferguson et al., 1979).

Lista de referências: Referenciar somente trabalhos citados e publicados. Usar "no prelo" somente quanto houver aceite formal. As referências devem ser listadas em ordem alfabética.

#### Periódicos

Anuário Estatístico do Brasil, Rio de Janeiro: IBGE, v.48, 1987/88. p.351.

Ferguson JA, Reeves WC, Hardy JL. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am J Vet Res, v.40, p.5-10, 1979.

Holenweger JA, Tagle R, Wasserman A, Schim FA, Franckel S. Anestesia geral del canino. Not Med Vet, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa:

Dunne HW (Ed.). Enfermedades del cerdo, México: UTEHA, 1967.

Lopes CAM, Moreno G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 14, 1974, São Paulo. Anais ... São Paulo: CBMV, 1974. p.97. Resumo.

Morril CC Infecciones por clostrídios. In: Dunne, H.W. (ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

Nutrient requirements of swine, 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968, p.19-20.

Silva NQ Peritonioscopia na égua. 1971. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte 1971.

Documentos eletrônicos (Exemplos retirados da NBR 6023/agosto 2000):

.: Documento publicado disponibilizado em meio eletrônico. Após a referência padrão do documento impresso, informar os elementos que identificam o tipo de acesso. Ex.:

Arranjo tributário. Diário do Nordeste On Line, Fortaleza, 27.nov.1998. Disponível em <http://www.diariodonordeste.com.br>>. Acesso em 28 nov. 1998.

Guncho MR A educação à distância e a biblioteca universitária. In: Seminário de Bibliotecas Universitárias, 10, 1998, Fortaleza. Anais ... Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1CD.

Política. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática, 1998. Disponível em <http://www.priberam.pt/dIDPLO>>. Acesso em 8 mar. 1999.

Silva IG. Pena de morte para o nasciturno. O Estado de São Paulo, São Paulo, 19 set. 1998. Disponível em :[http://www.providafamilia.org/pena\\_morte\\_nasciturno.htm](http://www.providafamilia.org/pena_morte_nasciturno.htm)>. Acesso em 19.set. 1998.

Silva RN, Oliveira R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPe, 4, 1996, Recife. Anais eletrônicos ... Recife: UFPe, 1996. Disponível em <http://www.prospeq.ufpe.br/anais/anais/educ/ce04.htm>. Acesso em 21 jan. 1997.

.: Documento de acesso exclusivo em meio eletrônico

Birds from Amapá; Banco de dados. Disponível em <http://www.bdt.org/bdt/avifauna/aves>. Acesso em 25 nov. 1998.

Bioline Discussion List. List maintained by the Bases de Dados Tropical, BDT, in Brasil. Disponível em: [lisserv@bdt.org.br](mailto:lisserv@bdt.org.br). Acesso em 25 nov. 1998.

Civitas. Coordenação de Simão Pedro p. Marinho. Desenvolvido pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1995-1998. Apresenta textos sobre urbanismo e desenvolvimento de cidades. Disponível em: [gcsnet.com.br/oamis/civitas](http://gcsnet.com.br/oamis/civitas)>. Acesso em 27 nov. 1998.

Citação de citação (ABNT-NB 896)

Somente a obra consultada no original deverá aparecer na lista de referências bibliográficas. No texto, serão citados o autor e a data do documento original, seguidos da expressão citado por e do autor e data da obra consultada.



Trabalhos não publicados (ABNT-NB 896)

Não fazem parte da lista de referências bibliográficas. Mencionam-se em nota de rodapé os dados bibliográficos disponíveis. Por exemplo: (\*) Plano de urbanização do Morro do Pavão, de autoria de José de Souza Carvalho, executado através do Convênio TBAN/BCNF, 1978 (Em fase de elaboração).

Informação verbal (ABNT-NBR 10520)

Identificada apenas no texto. Após a informação, coloca-se a expressão (informação verbal).

Informações complementares

.: A reprodução e tradução de qualquer artigo para fins comerciais são proibidas, sendo que transcrição em outras revistas científicas deve ser precedida de anuência do editor.

[Janeiro, 2005; junho de 2005; Agosto de 2005]

.../RBRA eletrônica/Normas & Modelos/RBRA Eletrônica Instruções aos autores.doc

Alameda das Princesas, 1.275 - São José CEP: 31275-180 - Belo Horizonte, MG - Brasil

Fone: (031) 491-7122 - Fax: (031) 491-7025

email: cbra@cbra.org.br

## **Theriogenology Journal - Guide for Authors**

An International Journal of Animal Reproduction

Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to Theriogenology. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Aims and Scope

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. Theriogenology publishes only material that has never been previously published and is not being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Contribution

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Technical Notes

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Technical Notes are concise, comprehensive descriptions of technical aspects of innovative methods (that will not be subsequently published as a full-length paper). The entire submitted manuscript typically should not exceed approximately 12 double-spaced pages.

### Page Charges

This journal has no page charges.

### BEFORE YOU BEGIN

#### Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>

#### Policy and Ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; EC Directive 86/609/EEC for animal experiments; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. This must be stated at an appropriate point in the article.

#### Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>

#### Submission Declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published

elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

### Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright> ) Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions> ). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>

### Retained Author Rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>

### Role of the Funding Source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>

### Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

### Sponsored Articles

This journal offers authors the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please view our Sponsored Articles page at <http://www.elsevier.com/sponsoredarticles>

### Language Services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>

### Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the online submission site of this journal ( <http://ees.elsevier.com/therio/> ) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

### Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliation (department, institution, city and country) and email addresses of up to 5 potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject but have no close connection with any of the authors. In addition, Referees should be from institutions other than (and preferably countries other than) those of any of the Authors. You may also suggest reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so. The Editors retain the right to choose reviewers as deemed

appropriate. All submissions will be reviewed by at least two anonymous reviewers to evaluate them for originality, clear statement of a hypothesis, appropriate experimental design, completeness of methods, a logical and comprehensive discussion, and conclusions that are supported by data.

## PREPARATION

### Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

### Use of Word-processing Software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format and double spaced. It is important that all pages and lines are numbered. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your word processor.

### LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively the standard document class "article".

The Elsevier LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

### Article Structure

#### Subdivision - Numbered Sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line, with one blank line above and below each heading.

#### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. In most cases, this section should not exceed approximately 2 double-spaced pages.

#### Materials and Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### Results

Results should be clear and concise, and should correspond to data collection as described in Materials and Methods.

#### Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### Essential Title Page Information

**Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

**Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

**Corresponding author.** Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

#### Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

#### Genbank

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. Note that in the final

version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

### Math Formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### Image Manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

### Electronic Artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

Submit each figure as a separate file.



A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

#### Please do not:

- Supply embedded graphics in your word processor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimized for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Non-Electronic Artwork

Provide all illustrations as high-quality printouts, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Number illustrations consecutively in the order in which they are referred to in the text. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. Clearly mark all illustrations on the back (or - in case of line drawings - on the lower front side) with the figure number and the author's name and, in cases of ambiguity, the correct orientation.

Mark the appropriate position of a figure in the article.

#### Color Artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in

the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### Figure Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### Text Graphics

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further under Electronic artwork. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately.

### Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### References

#### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

#### Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed

separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Connor EE, Ashwell MS, Dahl GE. Characterization and expression of the bovine growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. *Domest Anim Endocrinol* 2002;22:189-99.

Reference to a book:

[2] Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. *Principles of Laboratory Animal Science*, Revised Edition. Elsevier B.V., 2001.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Betteridge KJ. Embryo Transfer. In: *Reproduction in Domesticated Animals*, King GJ (Ed.), World Animal Science B9, Elsevier B.V., 1993, pp. 413-8.

#### Journal Abbreviations Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

#### Supplementary Material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com> In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the

article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

#### Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but do not do both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) until extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis until extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from the fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage

- embryo: a conceptus from 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

#### Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and figure and table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

#### Units of Measure:

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h - hour

kg - kilogram

L - liter

mL - milliliter

$\mu$ L - microliter

m - meter

min - minute

mo - month

sec - second

v:v - volume ratio

wk - week

wt/vol - weight per volume

yr - year

#### Routes of treatment:

id - intradermal

im - intramuscular  
iu - intrauterine  
iv - intravenous  
sc - subcutaneous  
po - oral

Statistical expressions:

ANOVA - analysis of variance  
CV - coefficient of variation  
df - degrees of freedom  
F - variance ratio  
NS - not significant  
P - probability  
SD - standard deviation  
SEM - standard error of the mean  
r - correlation coefficient

Additional information:

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition*.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the *CBE Manual* or a current English language collegiate-level dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions about the preparation of your manuscript.

Submission Checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this *Guide for Authors* for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>

## AFTER ACCEPTANCE

### Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal Physics Letters B):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

### Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address, then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by

post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

#### Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

#### AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.