

MARCELO LOPES DE SANTANA

**COLPOCITOLOGIA, INDUÇÃO DA ATIVIDADE OVARIANA E DA
OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES A FRESCO, EM GATOS
DOMÉSTICOS.**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós -
Graduação em Medicina Veterinária
Para obtenção do título de “*Magister
Scientiae*”

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T	Santana, Marcelo Lopes de, 1973-
S232c	Colpocitologia, indução da atividade ovariana e da
2005	ovulação e transferência de embriões a fresco, em gatos
.	domésticos. / Marcelo Lopes de Santana – Viçosa : UFV, 2005. xi, 47f. : il. ; 29cm.
Viçosa.	 Orientador: Tarcísio Antônio Rego de Paula. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Inclui bibliografia. 1. Gatos domésticos - Reprodução. 2. Gatos domésti- cos – Estro. 3. Gatos domésticos – Transferência de em- briões. 4. Reprodução animal. I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.
	CDD 22.ed. 636.8

À minha amada esposa Enilda e minha filha Marcela

AGRADECIMENTOS

A Deus que me ilumina e conduz todos os passos de minha vida.

À minha família, na figura de minha esposa, meus pais, meus irmãos, sobrinhos, avôs e avós, tios e primos, que sempre me apoiaram e que são exemplos de vida para mim.

Em especial a minha esposa e companheira. Sem sua presença, não poderia ter vencido mais esta etapa, sempre me incentivando, apoiando, compartilhando todos os momentos, dentro e fora do mestrado.

A minha segunda família, na figura de Dona Rita, seus filhos e Netos.

Ao professor Tarcízio Antonio Rego de Paula pela paciência, pelo ensino, pelo exemplo de caráter, humildade, seriedade e capacidade profissional. Uma pessoa que realmente leva a sério o sentido de duas palavras: MÉDICO VETERINÁRIO e PROFESSOR ORIENTADOR.

Aos professores Pacifico Antônio Belém, Eduardo Paulino da Costa, José Domingos Guimarães, Jorge Rio Tinto de Mattos e Sergio Luís Pinto da Mata pelo apoio, conselhos profissionais e pessoais, visto que tem me orientado não só nesta etapa, mas em toda minha vida desde a graduação.

Ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade do desenvolvimento do curso.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária na figura de Luciano, Camilo, Geraldin, Célio, Cláudio, Luiz Márcio, Lucinda, Rose, “Sô Nenzim”, Divino, Maninha, Tatinha, meu saudoso e encrenqueiro vizinho do gatil, o amigo PONTE NOVA, e todos os outros funcionários que me auxiliaram de alguma forma na realização deste trabalho.

A Nilza pelo seu esforço e ajuda, ao longo destes dois anos, sempre carinhosa com os animais e disposta a ajudar na manutenção e bem estar dos animais do gatil.

Aos colegas Breno Camacho, Adolfo Lima Neto, Eduardo Ávila, Carla, Mônica, Luiz Carlos Cheriegatto, Ana Paula e Alexandre, Larissa, Ferdinan, “Goiano”, Sirlene, Pricilla e todos outros colegas que convivi durante o curso.

Muito Obrigado !!!

BIOGRAFIA

MARCELO LOPES DE SANTANA, filho de Hélio Lopes de Santana e Ana Maria Antunes Lopes, nasceu na cidade de Goiânia, estado de Goiás, em 31 de julho de 1973. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa–MG, 1991, graduando-se em 15 de dezembro de 1995. Exerceu a atividade profissional nas áreas de reprodução em bovino de corte e em laboratório farmacêutico veterinário durante oito anos. Em julho de 2003, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, na área de Reprodução e Produção Animal, na Universidade Federal de Viçosa, tendo concluído o mesmo em fevereiro de 2005.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1.0 ANTECEDENTES.....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1.2.1 Ciclo Estral da Gata Doméstica	2
1.2.2 Desenvolvimento Embrionário.....	5
1.2.3 Aspectos Endócrinos da Reprodução.....	6
1.2.4 Exames Auxiliares Para a Identificação da Fase do Ciclo Estral..	8
1.2.5 Indução da Atividade Ovariana e da Ovulação Com o Uso de Gonadotrofinas Coriônicas.....	9
1.2.6 Biotecnologias da Reprodução Assistida em Felídeos.....	9
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
2.0 Colpocitologia e Avaliação do Ciclo Estral em Gatas Domésticas sob Condições de Luminosidade Natural nas Diferentes Estações do Ano....	18
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19

2.1 INTRODUÇÃO.....	20
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
2.4 CONCLUSÕES.....	28
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
3.0 Indução da Atividade Ovariana e da Ovulação	
e Transferência de Embriões a Fresco em Gatas Domésticas.....	32
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
3.1 INTRODUÇÃO.....	34
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.4 CONCLUSÕES.....	41
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

RESUMO

SANTANA, Marcelo Lopes de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2005. **Colpocitologia, Indução da Atividade Ovariana e da Ovulação e Transferência de Embriões a Fresco, em Gatos Domésticos.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Conselheiros: Eduardo Paulino da Costa e Cláudio César Fonseca.

O experimento foi conduzido em duas etapas. A primeira etapa consistiu na realização de colpocitologia para avaliação do ciclo estral de gatas domésticas. Nesta etapa foram monitoradas por um período de 12 meses, seis gatas adultas não gestantes, sem raça definida, mantidas em um gatil em ambiente coletivo, sendo fornecido água e ração *ad libitum*. Os animais foram monitorados diariamente quanto a manifestações comportamentais das diferentes fases do ciclo estral, sendo obtidos três esfregaços vaginais semanalmente. Foram considerados os seguintes tipos celulares: células parabasais e intermediárias, células superficiais e células anucleadas, sendo analisadas cerca de 100 células em cada lâmina. Todos os animais avaliados apresentaram sinais comportamentais característicos das diferentes fases do ciclo estral durante todo o ano. O número médio de ciclos foi de 11,2 ao ano, sendo 8,8 observados nos meses de maior insolação e 2,4 nos meses de menor insolação média. Neste período a duração média dos ciclos estrais foi de 22,5 dias, enquanto no outono e inverno a duração média dos ciclos foi de 53 dias. As células parabasais e intermediárias estavam em maiores proporções no pós-estro (57,4%), reduzindo drasticamente no proestro (22,1%) e atingindo os menores valores observados no período de estro (15,95%). As células superficiais apresentaram menores variações durante as fases do ciclo estral sendo 28,7% no pós-estro, 43,6% no proestro e 33,2 % no estro. Já as células anucleadas

apresentaram aumento considerável do período de proestro para o período de estro (34,3 % para 51,0 %), sendo no período de pós-estro registrado os menores valores (13,9%). A segunda etapa consistiu na indução da atividade ovariana e da ovulação, objetivando coleta e transferência de embriões. Nesta etapa foram utilizadas, dezesseis gatas domésticas adultas e dois machos adultos reprodutores. Todas as fêmeas receberam uma única aplicação de 150 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) no pós-estro, como indutor da atividade ovariana, e 80 a 84 horas após, receberam uma única aplicação de 100 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) como indutor da ovulação. Após a aplicação de hCG, oito gatas doadoras foram naturalmente acasaladas. As oito gatas receptoras receberam estímulo extra de indução da ovulação através da manipulação de um swab intravaginal. De cinco a seis dias após a aplicação de hCG, as gatas foram submetidas a uma laparotomia, para a coleta dos embriões, a qual foi efetuada através de lavagem uterina transcornual. Foram cirurgicamente inovulados em média seis embriões, classificados como mórula compacta e blastocisto dos tipos I a III, em quatro receptoras. Três animais apresentaram gestação confirmada por ultrassonografia aos 36 dias sendo que destes dois animais pariram ninhadas com dois e quatro filhotes, respectivamente 66 e 63 dias após a indução da ovulação. Excetuando-se um natimorto, todos os filhotes apresentaram desenvolvimento normal.

ABSTRACT

SANTANA, Marcelo Lopes de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2005.
Colpocitology, Induction of the Ovarian Activity and of the Ovulation and Fresh Embryo Transfer, in Domestic Cats. Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Committee members: Eduardo Paulino da Costa and Cláudio César Fonseca.

The experiment was led in two stages. The first stage consisted of the accomplishment of colpocitology for evaluation of the cycle estral of domestic cats. In this stage six queens non pregnant, without defined race, were monitored by a period of 12 months and maintained in a collective atmosphere, being supplied water and ration *ad libitum*. The animals were monitored daily as to estrous behavior of the different phases of the estrous cycle, being weekly obtained three vaginal smears. The following cellular types were considered: Parabasal Cells and Intermediate Cell; Superficial Cells and Anuclear Cells, being analyzed and quantified about 100 cells in each sheet. All the appraised animals presented estrous behavior of the different phases of the cycle estral. The medium number of cycles was from 11,3 a year and about 70% of the estrous cycles they showed in the period of November to April (spring and summer). In this period the medium duration of the estrous cycles in the researched animals, was of 22,5 days, while in the autumn and winter the medium duration of the cycles was of 53 days. The Parabasal Cells and Intermediate were in larger proportions in the post-estrus (57,4%), reducing drastically in the proestrus (22,1%) and reaching the smallest values observed in the estrus (15,95%). The superficial cells presented smaller variations during the phases of the estrous cycle being 28,7% in the post-estrus, 43,6% in the proestrus and 33,2% in the estrus. The Anuclear Cells already presented considerable increase of the period of proestrus for the estrus (34,3% for 51,0%), being in the period of post-estrus registered the smallest values (13,9%). The second stage consisted of the induction of the ovarian activity and of the ovulation, aiming at collection and transfer of embryos. In this stage were used, sixteen queens and two tom. All the females

received an only application of 150 UI of Gonadotrofina Equine Coriônica (eCG) in the post-estrus, as inductor of the ovarian activity, and 80-84h after they received an only application of 100 UI of Chorionic Gonadotropins Human Coriônica (hCG) as inductor of the ovulation. After the hCG application, the queens donors were just coupled naturally. The recipients received extra incentive of induction of the ovulation through the manipulation of a swab intravaginal. Targeting recovery from donors, the uterus were excised six days after hCG administration from donors under general anesthesia, and the uterine horns were flushed downward. The embryos were infused into the uterine horn on average six embryos, classified as compacted morulae and early blastocysts of the types I, II, III in four recipients. Three animals impregnated, these two animals had two and four newborns respectively, and duration of pregnancy was respectively 66 and 63 days after the induction of the ovulation. Being excepted one newborn, all the newborns presented normal development.

1.0 ANTECEDENTES

1.1 INTRODUÇÃO

O gato doméstico tem sido usado intensamente como modelo experimental para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida incluindo maturação e fertilização de embriões *in vitro* (Bowen, 1977; Johnston et al., 1996; Karja et al., 2002), acompanhamento da embriogênese e migração embrionária (Swanson et al., 1994), desenvolvimento de embriões *in vitro* (Goodrowe et al. 1988; Skrzyszowska et al., 2002; Gómez et al., 2003), indução artificial da ovulação (Greulich, 1934; Tsutsui et al., 1989), cultivo de embriões (Jewgenow et al., 1995; Murakami et al., 2002;), transferência de embriões (Tsutsui et al., 2000; Kitiyanant et al., 2003) e criopreservação de embriões (Ballou, 1992; Gómez, et al., 2003), tendo em vista o seu uso potencial em espécies de felídeos não domésticos (Swanson et al., 1996; Pope, 2000).

A crescente degradação ambiental provocada pelos desmatamentos, construções de barragens, acidentes como derramamento de produtos químicos, e queimadas, têm como consequência direta à redução e a fragmentação dos inúmeros ecossistemas, levando uma grande diversidade de espécies a sofrerem rápido declínio em seu número com consequente perda da diversidade genética (Guimarães, 2002). A pressão contínua de caça ilegal e a diminuição progressiva do habitat levaram, segundo os critérios de Mace & Lande (1991) e IUCN (1995), a inclusão de todas as espécies de felídeos silvestres brasileiras à condição de ameaçadas de extinção. Devido a isto, nos últimos dez anos, a conservação destes felídeos tem sido foco da pesquisa em reprodução e de programas de treinamento voltados para as Américas principalmente Brasil, México e U.S.A. (Swanson & Brown, 2004).

Técnicas de reprodução assistida podem viabilizar a manutenção de uma variabilidade genética nas populações em cativeiro e selvagens, visto estas últimas estarem muitas vezes presentes em habitats fragmentados, o que limita as trocas gênicas e promove consangüinidade (Wildt et al., 1993; Swanson et al., 1996). Desta forma, a troca de material genético entre instituições, e até mesmo em populações selvagens, pode ser realizada com diminuição dos custos de transporte e do estresse nestes animais.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Ciclo Estral da Gata Doméstica

O gato doméstico é classicamente definido como uma espécie poliestral sazonal nos países do hemisfério norte. Segundo Jemmett & Evans (1977), neste mesmo hemisfério, mais da metade dos animais de pêlo curto ciclaram durante todo o ano e animais de pêlo longo apresentam períodos de anestro. Em condições de laboratório, com 12 a 14 horas de luz/dia, o anestro pode ser reduzido e mesmo eliminado em gatas (Johnston et al., 1996; Pope, 2000). Nas condições climáticas brasileiras, poucos relatos foram observados. Ávila et al. 2003 descreveram que na Zona da Mata mineira, gatas mantidas em condições de iluminação natural, sem haver o coito, ciclaram durante todo o ano, não sendo observada presença de anestro. Estes animais são ovuladores induzidos, ou seja, a ovulação só ocorre depois do coito, que induz a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez leva ao aumento sérico do hormônio luteinizante (LH), culminando com a ovulação (Wildt et al., 1980; Johnson & Gay, 1981; Goodrowe et al., 1989). Porém, o aumento sérico da progesterona em animais que não copularam, sustenta a hipótese da ovulação espontânea ou da luteinização folicular em algumas gatas, provavelmente quando estas recebem estímulo visual ou pela liberação de feromônios provenientes do acasalamento de outras gatas no estro (Johnston et al., 1996; Johnston et al., 2001).

Enquanto um único coito é suficiente para estimular a liberação de LH na coelha, outra ovuladora induzida (Hilliard et al., 1964), a gata usualmente necessita de múltiplos coitos para estimular altas taxas de ovulação (Concannon, 1980; Goodrowe et al., 1989), embora um único coito tenha sido capaz de induzir a ovulação em algumas gatas (Wildt et al., 1980; Wildt et al., 1981; Schmidt et al., 1983).

Outros estímulos, que não o coito, incluindo estimulação direta da vagina e a administração de hormônios como a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), mostraram ser eficientes em estimular a liberação de ovócitos maduros (Pope et al., 1993; Pope, 2000). Greulich (1934) estimulou diretamente a vagina de gatas no estro com um bastão de vidro numa profundidade em torno de 1,5 cm. Entre 25 e 144h após a estimulação, realizou

ovariohisterectomia em todos animais, constatando pontos hemorrágicos na superfície ovariana.

Os estágios do ciclo estral da gata incluem: proestro, estro, pós-estro, diestro e anestro (Johnston et al., 2001). A duração do ciclo estral, na ausência de coito, varia entre 14 e 21 dias (Goodrowe et al., 1989). Na figura 1 observa-se a relação entre os possíveis estágios do ciclo estral da gata doméstica.

O proestro é dificilmente observado (Shille et al., 1979; Christiansen, 1988), sendo que na maioria das gatas se confunde com o estro (Johnston et al., 2001). Quando o proestro ocorre, é caracterizado pelo comportamento de esfregar-se contra objetos, agachamento, sapateamento, lordose, vocalização e lateralização da cauda sem que ocorra a aceitação ao macho. A duração deste estágio é de zero a dois dias (Johnston et al., 2001). A fase do proestro está associada a um abrupto aumento na concentração de estrógeno circulante devido a um rápido crescimento folicular.

O estro é de fácil observação, durando em média de 5 a 7 dias (Christiansen, 1988; Pope, 2000) ocorrendo aceitação ao macho. É neste estágio que ocorre a máxima atividade folicular e maior secreção de estrógenos na fêmea. As características comportamentais durante o estro são: sapateamento e flexão dos membros; hiperextensão dos membros pélvicos causando lordose; lateralização da cauda e apresentação da vulva para a monta; vocalização (Johnston et al., 2001).

Caso não ocorra o coito, o próximo estágio é denominado de pós-estro, sendo um período de 8 a 10 dias sem manifestações de comportamentos sexuais até o próximo ciclo (Johnston et al., 2001).

O diestro é a fase luteal do ciclo estral, que sucede ao estro em gatas que foram induzidas a ovular. Em animais que copularam, porém falharam na concepção, a duração deste período é em torno de 40 dias sendo denominado de pseudogestação (Goodrowe et al., 1989; Johnston et al., 2001). Nas gatas que tiveram sucesso na concepção, a persistência luteal dura aproximadamente 60 dias para a manutenção da gestação, finalizando com a regressão do corpo lúteo e queda da progesterona a níveis basais próximo ao parto.

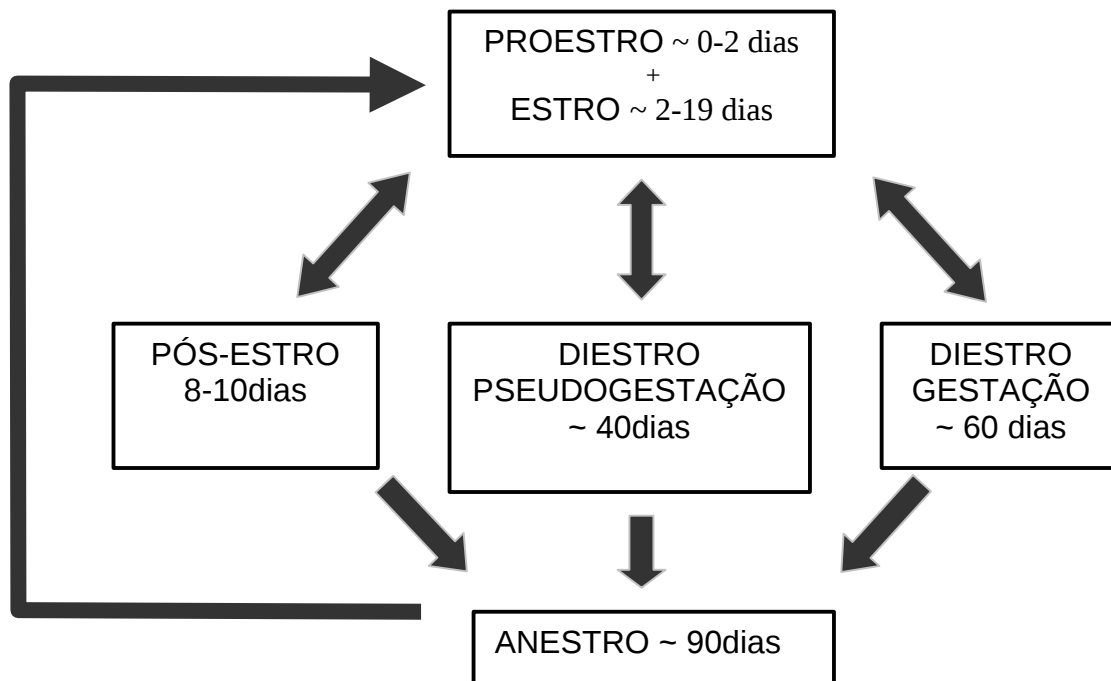


Figura 1- Inter-relação entre possíveis estágios do ciclo estral de gatas domésticas (Johnston et al., 2001).

A atividade ovariana nas gatas está diretamente correlacionada com a duração do fotoperíodo, assim, gatas podem apresentar ausência de atividade ovariana em determinada época do ano, naqueles países com marcada variação sazonal da luminosidade dia. Esta fase é denominada de anestro sazonal (Chakraborty et al., 1979; Johnston et al., 2001). Já em países onde a variação de insolação é menor, como no caso do Brasil, esta inatividade sazonal, quando ocorre, é bem atenuada havendo apenas um aumento no intervalo entre os ciclos estrais no outono e inverno (Ávila et al., 2003).

A morfologia ovariana durante o período ovulatório foi fotograficamente documentada (Wildt et al., 1977; Wildt & Seager, 1978). Os folículos maduros (folículos de Graaf) são vistos como suaves proeminências na superfície ovariana (3 a 5mm de diâmetro), em marcado contraste com os avermelhados e proeminentes corpos hemorrágicos pós-ovulatórios. O corpo hemorrágico dá lugar ao corpo lúteo (CL) entre o terceiro e o quarto dia após o coito, ainda permanecendo pontos hemorrágicos em sua superfície. Entre os dias 12 e 16 após o coito, o corpo lúteo apresenta uma coloração alaranjada e diâmetro em torno de 4,5mm (Wildt et al., 1981).

Fisiologicamente na gata, cerca de três a sete folículos primordiais se desenvolvem até um diâmetro de 1 a 2mm durante o proestro (Christiansen, 1988; Goodrowe et al., 1989). Depois do coito, os folículos ativados aumentam em tamanho e, na ovulação, o ovócito é liberado juntamente com as células da corona radiata e do *cumulus oophorus* (Goodrowe et al., 1989). Segundo Christiansen (1988), a ovulação ocorre de 24 a 50 horas após o coito. Já Wildt et al. (1981) monitoraram por laparoscopia o momento da ovulação verificando sua ocorrência em torno de 56 h após o primeiro coito.

1.2.2 Desenvolvimento Embrionário

O desenvolvimento embrionário *in vivo* na gata doméstica apresenta-se de maneira bifásica, com uma clivagem inicial mais lenta, seguido de um período de sucessivas clivagens em curto espaço de tempo. A maioria dos embriões sofre a primeira clivagem 64 horas após o coito, sendo que às 76 horas, a maioria dos embriões já sofreu sua terceira clivagem, permanecendo ainda na tuba uterina durante as 136 horas iniciais após o coito (figura 2). A partir desse período os embriões entram no útero no estágio de mórula compacta e blastocisto inicial, cerca de 5,5 dias após o primeiro coito (figura 2) (Swanson et al., 1994).

Antes da implantação embrionária, ocorre migração embrionária. Swanson et al. (1994) observaram mais pontos de implantação em um corno uterino do que corpos lúteos no ovário ipsilateral. A implantação embrionária começa aos 13 dias após o coito, depois do rompimento da zona pelúcida no dia 12 (Dresser et al., 1988).

O período de gestação dura em média 66 dias variando de 62 a 71 dias do primeiro coito (Tsutsui et al., 1993; Root et al., 1995; Johnston et al., 1996; Johnston et al., 2001). Os métodos de diagnóstico de gestação mais utilizados são: palpação trans-abdominal, ultra-sonografia e radiografia. Segundo Johnston et al. (1996) o tamanho da ninhada está entre um e cinco filhotes, com média de 3,7 por parto, não existindo relação entre número de filhotes e a duração da gestação.

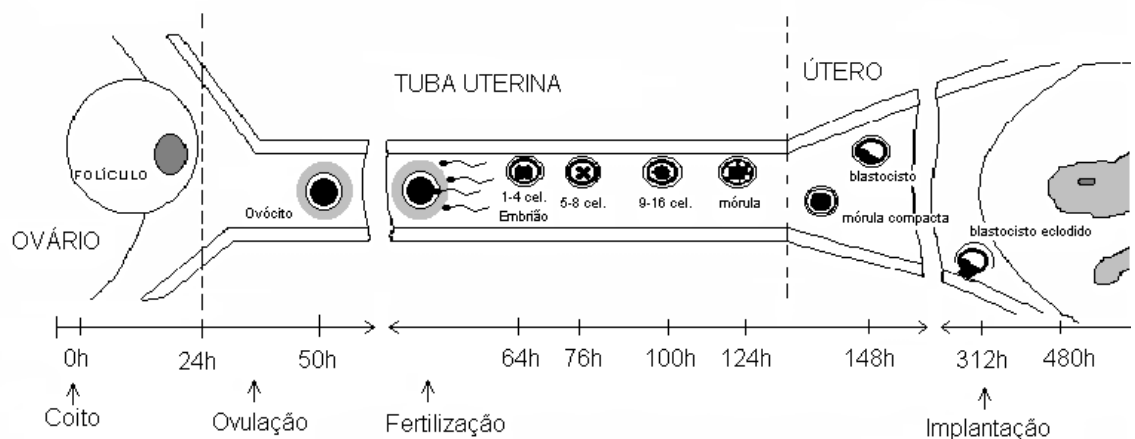


Figura 2- Esquema de ovulação, fertilização do ovócito e desenvolvimento embrionário em gatas domésticas.

1.2.3 Aspectos Endócrinos da Reprodução

O comportamento estral ocorre durante o pico de crescimento folicular com elevação do 17β estradiol no plasma acima de 70 pmol.L^{-1} , ocorrendo simultaneamente a cornificação da mucosa vaginal (Shile et al., 1979). A flutuação nas concentrações séricas de 17β estradiol está relacionada com a dinâmica folicular, sendo causada principalmente pela maturação e ruptura do folículo (Wildt et al., 1981). Os autores comentam ainda que não existe qualquer relação direta entre a concentração ou duração de 17β estradiol circulante com menor ou maior resposta do LH, porém títulos maiores que 20 pg/mL de 17β estradiol plasmático estão relacionados com a receptividade sexual da fêmea e intensa atividade folicular.

As concentrações séricas de LH permanecem $<10 \text{ ng/mL}$ até que estímulo suficiente, copulatório ou outro, inicie a sua liberação pela hipófise. Perfil similar é observado para as gatas que ovulam com um único coito (Wildt et al., 1980). O número de coitos está intimamente relacionado com a resposta hipofisária de LH. Quando múltiplos coitos ocorrem com intervalos menores que 2 horas, o pico de LH é alcançado

rapidamente e declina a valores basais 12-24 horas após os coitos (Concannon et al., 1980; Shille et al., 1983). Coitos ocorrendo a cada 3 horas, aumentam a duração da liberação de LH e os valores permanecem elevados por 24 horas após o primeiro coito, decrescendo a valores basais 38 horas após o primeiro coito (Wildt et al., 1980; Schmidt et al. 1983). Segundo Wildt et al. (1981) pode ocorrer uma segunda onda de LH, de menor duração e intensidade, cerca de 24 horas após a onda pico de LH. Coitos nos dois primeiros dias do estro originam ondas de LH de maior duração e intensidade quando comparados a coitos após o segundo dia do estro (Wildt et al., 1981).

As concentrações observadas no pico de LH após a coito (50-70 ng/mL) (Wildt et al., 1980, 1981; Schmidt et al., 1983) são 10 a 50% menores que os níveis máximos que a hipófise é capaz de produzir. O pico de LH após a administração de GnRH exógeno chega a 540 ng/mL e 115 ng/mL em fêmeas no estro e no anestro, respectivamente (Chakraborty et al., 1979).

Durante o estro, as concentrações de progesterona circulantes permanecem <1ng/mL até o pico de LH surgir. Paape et al. (1975) verificaram que a ovulação ocorre 48 h antes do aumento da progesterona. Contudo, amostragens sanguíneas sequenciais têm demonstrado que o aumento da progesterona é coincidente com a ovulação (Wildt et al., 1981; Schmidt et al., 1983).

Evidências endócrinas e histológicas indicam que o CL na gata pseudogestante permanece funcional por 35-44 dias (Paape et al., 1975; Verhage et al., 1976; Wildt et al., 1981). Dados endócrinos sugerem que o CL, na gata gestante, permanece funcional por toda a gestação, regredindo próximo ao pós-parto (Verhage et al., 1976; Schmidt et al., 1983).

A fase luteal é definida como o intervalo após o coito, apresentando concentrações de progesterona sérica >1 ng/mL (Shille et al., 1979; Wildt et al., 1981). Na gata pseudogestante, a fase luteal inicia-se a partir do 4º dia após o coito, sendo que o pico de progesterona sérica acontece por volta do 14º dia depois do coito (60-90 ng/mL). Este pico é sustentado até o 41º dia e então decresce a valores inferiores a 1ng/mL (Verhage et al., 1976; Wildt et al., 1981; Johnston et al., 2001). A administração de Prostaglandina F2 α (PGF2 α) em gatas na fase luteal, não induz a regressão do corpo lúteo (CL) formado após o cruzamento com um macho vasectomizado (Shille et al., 1979) ou pela administração parenteral de hCG (Wildt et al., 1979). O CL não decresce em tamanho e a concentração de progesterona circulante

permanece constante. O útero também não influencia o processo de luteólise, visto que experimentos realizando histerectomia em gatas, não causaram a regressão do CL (Shille et al., 1979; Wildt et al., 1979; Weeler et al. 1994).

A progesterona sérica na gata gestante geralmente tem um pico próximo ao dia 26 (Dia 1= dia do pico de LH) (Schmidt et al., 1983). Em gatas, o pico de progesterona tem sido mensurado de 11 a 60 dias após a ovulação com concentrações entre 13,5 a 57,0 ng /mL, sugerindo que os níveis circulantes desse hormônio não são bons critério para identificação da gestação (Schmidt et al., 1983). Os níveis de progesterona na gata prenhe são mantidos por 25 a 28 dias a mais do que na gata pseudogestante (Verhage et al., 1976; Schmidt et al., 1983), sendo que a concentração sérica de progesterona é de 12,7-15,9 nmol.L⁻¹ próximo ao parto e reduzindo a 3,18 nmol.L⁻¹ imediatamente após o parto (Johnston et al., 1996).

1.2.4 Exames Auxiliares Para a Diferenciação das Fases do Ciclo Estral

A detecção das diferentes fases do ciclo estral da gata é possível por meio de acompanhamento colpocitológico (Toniollo et al., 1995; Ávila et al., 2003). Schutte (1967) observou que cada fase do ciclo estral apresenta características próprias, inclusive citologicamente, porém sua definição só é possível por meio de sucessivas leituras de esfregaços. No hemisfério norte as gatas são descritas como poliestrais sazonais, comumente apresentando ciclos, principalmente nas estações primavera e verão (Pratt, 1983). Já nas condições climáticas brasileiras, onde a alteração de incidência luminosa é pequena, estes animais ciclam durante o ano todo (Ávila et al. 2003; Mattos et al., 2003). Segundo Pratt (1983) as células da mucosa vaginal durante o proestro, apresentam núcleos proeminentes, numa proporção entre núcleo e citoplasma (N: C) de aproximadamente 1:1. Com o aparecimento do estro, estas células tendem a aumentar o volume de citoplasma apresentando bordas irregulares e queratinizadas, ao mesmo tempo em que os núcleos tornam-se picnóticos, reduzindo intensamente a proporção N:C para 1:6 a 1:10. Shille et al.(1979) observaram que a cornificação da mucosa vaginal ocorre durante o pico de crescimento folicular com elevação plasmática do 17 estradiol acima de 70 pmol.L⁻¹ ocorrendo simultaneamente ao comportamento estral.

1.2.5 Indução da Atividade Ovariana e da Ovulação Com o Uso de Gonadotrofinas Coriônicas

A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) ou o hormônio folículo estimulante (FSH), podem ser utilizados para a indução de atividade ovariana e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) pode ser usada para indução da ovulação em felídeos (Platz, et al. 1978; Pope et al., 1998). Os resultados obtidos desta indução exógena da atividade ovariana e ovulação são semelhantes aos observados na reprodução natural (Cline, et al., 1980). Mattos et al. (2003) avaliaram esfregaços vaginais em gatas domésticas tratadas com diferentes doses de eCG e hCG, e observaram que não houve diferença estatística na proporção dos tipos celulares entre os grupos tratados. Devido a meia vida plasmática do eCG ser longa, aproximadamente 120 h, uma única injeção do mesmo estimula a atividade folicular em felídeos, ao contrario do FSH, que deve ser ministrado em várias dosagens diárias devido a sua curta persistência circulatória.

Para a coleta de embriões, o tratamento com gonadotrofina deve ser iniciado preferencialmente no estágio pós-estro, o qual pode ser determinado pela ausência de comportamento do estro ou acompanhamento por citologia vaginal. Vários protocolos (intervalos e dosagens) já foram testados, tendo resultados variados em relação ao número de embriões, bem como a qualidade dos mesmos. Os melhores resultados foram obtidos utilizando 100 UI hCG após 80-84h da aplicação do eCG (Goodrowe et al., 1988; Donoghue et al., 1992; Pope et al., 1998).

Segundo Swanson et al. (1995) o uso das gonadotrofinas para indução da atividade ovariana em intervalos muito curtos, estimula a síntese de imunoglobulinas que neutralizam o efeito desejável das gonadotrofinas. Para prevenir a produção dessas imunoglobulinas, um intervalo de aproximadamente seis meses deve ser respeitado entre os regimes de indução ovulatória.

1.2.6 Biotecnologias da Reprodução Assistida em Felídeos

O sucesso no processo de inseminação artificial em felídeos é dependente do sítio de depósito de sêmen no trato genital feminino. Baixas taxas de gestação são observadas com o depósito intravaginal (Platz et al., 1978). Howard (1999)

responsabiliza a anestesia pelo comprometimento no transporte espermático em fêmeas não cirurgicamente inseminadas. Para contornar este problema, foi desenvolvida a técnica de inseminação intra-uterina (Howard et al., 1992), embora mesmo esta apresente resultados dependentes do momento da anestesia. Se esta for feita no período pré-ovulatório apenas algumas fêmeas ovulam e a taxa de prenhes é baixa. Porém, se a intervenção cirúrgica for realizada no período pós-ovulatório a taxa de prenhes se eleva para 50% (Howard et al., 1992; Donoghue et al., 1996). A ovulação induzida ocorre cerca de 25 a 27 horas após a injeção de hCG. Assim, a anestesia para a inseminação artificial não deve exceder a 36 horas após a aplicação do hCG, visto que a degeneração do ovócito inicia-se logo após a ovulação, com viabilidade não ultrapassando 14 horas *in vivo* (Howard et al., 1992).

A fertilização de ovócitos em felídeos pode ser conseguida através de monta natural (Kraemer et al., 1979), inseminação artificial (Howard et al., 1992; Donoghue et al., 1996; Swanson et al., 1996), fertilização *in vitro* (Bowen, 1977; Johnston et al., 1989; Pope et al., 1993) e até mesmo injeção intracitoplasmática de espermatozóide (Pope et al., 1998). A coleta do sêmen para fertilização pode ser feita através de manipulação digital, vagina artificial (Platz et al., 1978), eletroejaculação (Goodrowe et al., 1989; Pope et al., 1993; Swanson et al., 1996; Donoghue et al., 1996; Howard, 1999) e mesmo da recuperação de espermatozoides do ducto deferente ou da cauda do epidídimo, após orquiectomia (Bowen, 1977; Niwa et al., 1985) ou *post-mortem* (Goodrowe et al., 1989).

A recuperação de embriões e sua transferência intra e inter específica, tem sido alcançada em felídeos (Kraemer et al., 1979; Bowen et al., 1982; Pope et al., 1993; Pope, 2000). O momento ideal para recuperação na gata doméstica está entre 6 e 9 dias após o coito (Kraemer et al., 1979), visto que nestes animais os embriões entram no útero 4,5 a 5 dias após a ovulação, a maioria em estágio de mórula (Swanson et al., 1994) com implantação destes próximo aos 13 dias após o coito (Dresser et al., 1988). As fêmeas receptoras podem estar naturalmente sincronizadas e a estimulação da ovulação ser conseguida por meio do cruzamento com gatos vasectomizados (Kraemer et al., 1979) ou serem sincronizadas através do uso parenteral de gonadotrofinas coriônicas (Goodrowe et al., 1989; Pope et al., 1993, 1998; Pope, 2000).

Swanson & Godke (1994) propõem uma técnica transcervical de recuperação e transferência de embriões menos invasiva, porém por dificuldades no trato genital

feminino a técnica mais utilizada ainda é por meio de intervenção cirúrgica (Kraemer et al., 1979; Dresser et al., 1988; Kanda et al., 1995; Pope, 2000; Tsutsui et al., 2000). O procedimento descrito consiste na realização de laparotomia com exposição de um corno uterino, introdução de cateteres em suas extremidades e lavagem uterina para a coleta dos embriões, sendo o procedimento repetido no corno contralateral. Outra técnica descrita é a lavagem uterina transcornual, que consiste na lavagem de ambos os cornos simultaneamente, com taxas de recuperação de embriões semelhantes à técnica tradicional, com vantagens de ser mais rápida e menos traumática (Santana et al. 2004).

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, E.C, Paula, T.A.R., Coutinho, A.C.R., Minami, A., Araújo, A.C., 2003. Avaliação do ciclo estral de gatas domésticas (*Felis catus*) através de colpocitologia. In: XIII Simpósio de Iniciação Científica, 2003, Viçosa. Anais, Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 2003, p.760.
- Ballou, J.D., 1992. Potential contribution of cryopreserved germ plasma to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology*, 29: 9-25.
- Bowen, R.A., 1977. Fertilization in vitro of feline ova by spermatozoa from the ducts deferens. *Biology of Reproduction*, 17: 144-147.
- Bowen, R. A., Olson, P. N., Olson, J. D., Nett, T. M., 1982. Concentration of reproductive hormones in canine serum throughout late anoestrus, proestrus and oestrus. *Biology of Reproduction*, 27: 1196-1206.
- Chakraborty, P.L., Wildt, D.E., Seager, S.W.W.J., 1979. Serum LH and Ovulatory response to LH-RH in the estrous and anoestrous domestic cat. *Laboratory Animal Science*, 29: 338-344.
- Christiansen, I.J. 1988. Reprodução no cão e no gato. Ed.Manole Ltda, São Paulo-SP.
- Cline, E.M., Jennings, L.L., Sojka, N.J., 1980. Breeding laboratory cats during artificially induced oestrus. *Laboratory Animal Science*, 30: 1003-1005.
- Concannon P, Hodgson, B., Lein, D., 1980. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biology of Reproduction*, 23:111-117.

- Donoghue, A.M., Johnston, L.A., Munson, L. Brown, J.L., Wildt, D.E.1992. Influence of gonadotrophin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 46: 972-980.
- Donoghue, A. M., Byers, A. P., Johnston, L. A., Armstrong, D.L., Wildt, D.E., 1996. Timing of ovulation after gonadotrophin induction and its importance to successful intrauterine insemination in tiger (*Panthera tigris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 107(1): 53-58.
- Dresser, B. L., Gelwicks, E. J., Wach, K. B., Keeler, G. L., 1988. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. *Journal Experimental Zoo*, 246(2): 180-186.
- Gomez, M.C., Pope, E.C., Harris, R., Mikota, S., Dresser, B.L., 2003. Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology*, 60: 239-251.
- Goodrowe, K.L., Wall, R.J., O'brien, S.J., Schmidt, P.M.S., Wildt, D.E., 1988. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 39: 355-372.
- Goodrowe, K.L., Howard, J.G, Schmidt, P.N, Wildt, D.E, 1989. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 39: 73-90.
- Greulich, W.W., 1934. Artificially induced ovulation in the cat (*Felis domestica*). *The Anatomical Record*, 58(3): 217-224
- Guimarães, M. A. B. V., 2002. Biotecnologia aplicada aos animais silvestres: aspectos éticos e conservacionistas. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.26 , n.2, abr./jun. 2002.
- Hilliard, J. G., Hayward, J. N., Sawyer, C. H., 1964. Postcoital patterns of secretion of pituitary gonadotropin and ovarian progestin in the rabbit. *Endocrinology*, 75: 957-961.
- Howard, J.G., Barone, M.A., Donoghue, A.M., Wildt, D.E., 1992. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96: 175-186.

- Howard, J.G. Assisted reproduction techniques in non-domestic carnivores.. In: Fowler M.E. & Miller R.E. Zoo and Wildlife medicine. Current Therapy 4, 61: 449-457 Ed. W.B. Saunders, United States of American, 1999.
- IUCN, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 1995. Felid Conservation Assessment and Management Plan Global Captive Action Recommendations p 230 Compiled by the IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN.
- Jemmett, J. E., Evans, J. M., 1977. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. *Journal Small Animal Practice*, 18: 31-37.
- Jewgenow, K., Göritz, F, 1995. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterisation before and after culture. *Animal Reproduction Science*, 39: 285-297.
- Johnson, L.M. and Gay, V. L. 1981 Luteinizing hormone in the cat. Mating induced secretion. *Endocrinology*. 109(1): 247-252.
- Johnston, L.A., O'Brien, S. J., Wildt, D. E., 1989. In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete-Research*, 24(3): 343-356.
- Johnston, S.D., Root, M.V., Olson, P.N.S., 1996. Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. *Animal Reproduction Science*, 42: 261-274.
- Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R., Olson, P.N.S., 2001. The feline oestrous cycle. *Canine and Feline Theriogenology*, 25: 396-405.
- Kanda, M., Oikawa, H., Nakao, H., Tsutsui, T., 1995. Early embryonic development in vitro and embryo transfer in the cat. *Journal Veterinary Medicine Science*, 57: 641-646.
- Karja, N.W.K., Otoi, T., Murakami M., Fahrundin, M., Suzuki, T., 2002. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology*, 57: 2289-2298.
- Kitiyanant, Y., Saikhun, J., Pavasuthipaisit, K., 2003. Somatic cell nuclear transfer in domestic oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. *Theriogenology*, 59: 1775-1786.

- Kraemer D.C., Flow B.L., Schrivier M.D., Kinney G.M., Pennycook, J.W., 1979. Embryo transfer in the non human primate, feline and canine. *Theriogenology*, 11:51-62.
- Mace, G. M., Lande, R., (1991). Assessing extinction threats: toward a revaluation of IUCN threatened species categories. *Conservation Biology*, 5: 148-157.
- Mattos, M.R.F., Mattos, L.S., Silva, L.D.M., 2003. Vaginal cytology in queens with estrous induced with equine chorionic gonadotrophin. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98(547): 135-138.
- Murakami, M. Otoi, T. Karja, N.W.K., Ooka, A., Suzuki, T., 2002. Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization. *Reproductive Domestic Animal*, 37: 352-356.
- Niwa, K., Ohara, K., Hosoi, Y., Iritani, A., 1985 . Early events of in-vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 74: 657-660.
- Paape, S.R., Shille, V.M., Seto, H., Stabenfeldt, G.H., 1975. Luteal activity in the pseudopregnant cat. *Biology of Reproduction*, 13: 470-474.
- Platz, C.C., Wildt, D.E., Seager, S.W.J. 1978. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52: 519-527.
- Pope, C.E., Keller, G.L., Dresser, B.L., 1993. In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 47: 189-201.
- Pope, C. E., Johnson, C.A., McRae, M.A., Keller, G. L., Dresser B. L., 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Animal Reproduction Science*, 53: 221-236.
- Pope, C.E., 2000. Embryo Technology in Conservation Efforts for Endangered Felids *Theriogenology*, 53(1): 163-174.
- Pratt, P.W., 1983. *Feline Medicine VMD*. American Veterinary Publications, INC. 1st edition, chapter 15: 511-519.
- Root, M.V.; Johnston, S.D.; Olson, P. N., 1995. Oestrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 31(5): 429-433.

- Roth, T. L., Swanson, W.F., Wildt, D.E. 1995. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro. *Biology of Reproduction*, 51: 441-451.
- Santana, M.L., Neto, A.L., Ávila, E.C., Almeida, M.R., Toledo, C.S., Chierregatto L.C., Paula, T.A.R., Costa, E.P., 2004. Técnica de lavagem uterina transcervical para coleta de embriões em gatas domésticas (*Felis catus*) para uso potencial em felídeos silvestres. In: Congresso Brasileiro ABRAVAS, Jaboticabal, SP.
- Schmidt, P.M., Chakraborty, P. K., Wildt, D.E. 1983. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behaviour in the cat. II Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum oestrus. *Biology of Reproduction*, 28: 657-671.
- Schutte, A.P., 1967 apud Toniollo, G.H.; Cury, S.R.; Vicente, W.R.R.; Camacho, A.A.; Garcia, J.M.; Vantini, R. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, 32 (2):125-129.
- Shille, V.M., Lundstrom, K.E., Stanbenfeldt G.H., 1979. Follicular function in the domestic cat as determinate by estradiol-17 concentrations in plasma: Relation to estrous behaviours and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction*, 21: 953-963.
- Shille, V. M., Munro, C., Farmer, S. W., Papkoff, H., Stabenfeldt, G. H., 1983. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 69(1): 29-39.
- Skrzyszowska, M., Katska, L. Rynska, B., Kania, G. Smorag, Z., Pienkowski, M., 2002. In vitro developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. *Theriogenology* 58: 1615-1621.
- Swanson, W.F., Godke, R.A., 1994. Transcervical embryo transfer in the domestic cat. *Laboratory Animal Science*, 44(3): 288-291.
- Swanson, W.F., Roth, T.L., Wildt, D.E., 1994. In vivo embryogenesis, embryo migration and embryonic mortality in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 51: 452-464.
- Swanson, W.F., Horohov, D.W.; Godke, R.A., 1995. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 105: 35-41.

- Swanson, W.F., Howard, J.G., Roth, T.L., Brown, J.L., Alvarado, T., Burton, M., Starnes, D. Wildt, D.E., 1996. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotropins and laparoscopic insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 106: 87-94.
- Swanson, W.F., Brown, J.L., 2004. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *American Reproduction Science*, 82: 21-34.
- Toniollo, G.H., Cury, S.R., Vicente, W.R.R., Camacho, A.A., Garcia, J.M., Vantini, R 1995. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, 32 (2):125-129.
- Tsutsui, T., Sakai,Y., Matsui,Y., Sato M., Yamane, I., Murao,I., Stabenfeldt, G.H., 1989. Induced ovulation in cats using porcine pituitary gland preparation during the non-breeding season. *Japanese Journal Veterinary Science*, 51(4): 677-683.
- Tsutsui, T., Stabenfeldt, G.T., 1993. Biology ovarian cycle, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47: 29-35.
- Tsutsui, T., Yamane, I., Hattori, I., Kurossawa, N., Matsunaga, H., Murao, I, Kanda, M., Hori, T., 2000. Feline embryo transfer during the non-breeding season. *Journal Veterinary Medicine Science*, 62:1169-1175.
- Verhage, H.G., Beamer, N.B., Brenner, R.M. 1976. Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. *Biology of Reproduction*, 14: 579-585.
- Weeler, A. G, Lean, J, Walker, M 1994. Peripheral progesterone concentrations in the phase luteal ewe: effects of a beta. *Journal of Endocrinology*, 116(1): 137-147.
- Wildt, D.E., Levinson, C.J., Seager, S.W.J. 1977. Laparoscopic exposure and sequential observation of the ovary of the cycling bitch. *The Anatomical Record*, 189: 443-450.
- Wildt, D.E., Seager, S.W.J., 1978. Ovarian response in the estral cat receiving varying doses of hCG. *Hormonal Research*, 9: 144.
- Wildt, D. E., Panko, W.B.; Seager, S. W. 1979. Effect of prostaglandin F2 alpha on endocrine-ovarian function in the domestic cat. *Prostaglandins*, 18(6): 883-892.
- Wildt, D.E., Seager, S.W.J, Chakraborty, P.K. 1980. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology*, 107:212.

- Wildt, D.E, Chan, S.Y., Seager, S.W., Chakraborty, P. K., 1981. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behaviour in the cat. Relationships during the coitus- induced luteal phase and during the oestrous period without mating. *Biology of Reproduction*, 25(1):15-18.
- Wildt, D. E., Seal, U. S. and Rall, W. F., 1993. Genetic resource banks and reproductive technology for wildlife conservation. In *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*. Ed. JG Cloudand, GH Thorgaard. Plenum Press, New York, 159-173.

2.0 Colpocitologia e Avaliação do Ciclo Estral em Gatas Domésticas Sob Condições de Luminosidade Natural nas Diferentes Estações do Ano.

RESUMO

Foram monitoradas por um período de 12 meses, seis gatas adultas não gestantes, sem raça definida, mantidas em um gatil em ambiente coletivo, sendo fornecido água e ração *ad libitum*. Os animais foram monitorados diariamente quanto a manifestações comportamentais das diferentes fases do ciclo estral, sendo obtidos três esfregaços vaginais semanalmente. Foram considerados os seguintes tipos celulares: células parabasais e intermediárias, células superficiais e células anucleadas, sendo analisadas e quantificadas cerca de 100 células em cada lâmina. Todos os animais avaliados apresentaram sinais comportamentais característicos das diferentes fases do ciclo estral durante todo o ano. O número médio de ciclos foi de 11,2 ao ano, sendo 8,8 observados nos meses de maior insolação e 2,4 nos meses de menor insolação média. Neste período a duração média dos ciclos estrais foi de 22,5 dias, enquanto no outono e inverno a duração média dos ciclos foi de 53 dias. As células parabasais e intermediárias estavam em maiores proporções no pós-estro (57,4%), reduzindo drasticamente no proestro (22,1%) e atingindo os menores valores observados no período de estro (15,95%). As células superficiais apresentaram menores variações durante as fases do ciclo estral sendo 28,7% no pós-estro, 43,6% no proestro e 33,2 % no estro. Já as células anucleadas apresentaram aumento considerável do período de proestro para o período de estro (34,3 % para 51,0 %), sendo no período de pós-estro registrado os menores valores (13,9%).

Palavras-chave: Gatas domésticas; Colpocitologia; Ciclo Estral.

ABSTRACT

Six queens non pregnant, without defined race, were monitored by a period of 12 months and maintained in a collective atmosphere, being supplied water and ration *ad libitum*. The animals were monitored daily as to estrous behavior of the different phases of the estrous cycle, being weekly obtained three vaginal smears. The following cellular types were considered: Parabasal Cells and Intermediate Cell; Superficial Cells and Anuclear Cells, being analyzed and quantified about 100 cells in each sheet. All the appraised animals presented estrous behavior of the different phases of the cycle estral. The medium number of cycles was from 11,3 a year and about 70% of the estrous cycles they showed in the period of November to April (spring and summer). In this period the medium duration of the estrous cycles in the researched animals, was of 22,5 days, while in the autumn and winter the medium duration of the cycles was of 53 days. The Parabasal Cells and Intermediate were in larger proportions in the post-estrus (57,4%), reducing drastically in the proestrus (22,1%) and reaching the smallest values observed in the estrus (15,95%). The superficial cells presented smaller variations during the phases of the estrous cycle being 28,7% in the post-estrus, 43,6% in the proestrus and 33,2% in the estrus. The Anuclear Cells already presented considerable increase of the period of proestrus for the estrus (34,3% for 51,0%), being in the period of post-estrus registered the smallest values (13,9%).

Key words: Cats, Colpocytology, Estrous Cycle

2.1 INTRODUÇÃO

O ciclo reprodutivo dos carnívoros domésticos e silvestres apresenta características extremamente específicas em relação às demais ordens animais. Mesmo nos carnívoros domésticos a quantidade de informações ainda está aquém daquela veiculada em animais de maior exploração zootécnica. Especificamente em relação à morfofisiologia reprodutiva felina, aspectos básicos ainda necessitam serem definidos.

Segundo Burke (1975) as gatas atingem a puberdade entre 4 e 12 meses de idade, embora Joshua (1971) tenha observado que gatas com menos de 3 meses de idade podem apresentar o 1º estro. Já para Shille & Stabenfeldt (1978), o estabelecimento da puberdade está mais relacionado com o peso corporal atingido pelo animal (2,3 a 2,5 Kg) do que com a idade. Gatas domésticas apresentam ciclo reprodutivo classificado como poliestral sendo que, mais da metade dos animais de raça de pêlo curto ciclam durante todo ano e animais de raças de pêlo longo apresentam um período de anestro em condições naturais de luz (Jemmett & Evans 1977). Em condições de laboratório, animais submetidos 12 a 14 horas de luz/dia, o anestro pode ser reduzido e até mesmo eliminado (Pope, 2000).

A duração do ciclo estral da gata, na ausência de cópula, é de 14 a 21 dias (Goodrowe et al., 1989). Estes animais são ovuladores induzidos, ou seja, a ovulação só ocorre após o coito, que desencadeia um processo de liberação do hormônio GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), que por sua vez leva ao aumento sérico do hormônio LH (hormônio luteinizante) culminando com a ovulação (Wildt et al. 1980; Johnson & Gay, 1981; Goodrowe et al. 1989).

Na coelha, outra espécie ovuladora induzida, um único coito é capaz de desencadear a liberação de LH com conseqüente ovulação (Hillard et al. 1964). Embora a gata também apresente liberação de LH circulante após um único coito, altas taxas de ovulação somente são observadas quando múltiplos coitos são efetuados (Concannon, 1980; Wildt et al., 1980; Wildt et al., 1981; Schimidt et al., 1983).

Os estágios do ciclo estral na gata podem incluir: proestro, estro, pós-estro, diestro e anestro. O proestro, quando manifestado, pode durar até 2 dias, no qual as fêmeas atraem os machos para o coito, porém, ainda não se apresentam receptivas. Esta fase está associada a um abrupto aumento nas concentrações de estrógeno circulante (Johnston et al., 2001).

O estágio seguinte é denominado estro, de fácil identificação, com duração média de 5 a 7 dias, sendo diferenciado do proestro pela aceitação do macho (Shille et al., 1979; Christiansen, 1988; Pope, 2000). É neste estágio que ocorre a máxima atividade folicular e maior secreção de estrógenos (Johnston et al., 2001). Não ocorrendo o coito, ocorre regressão folicular instalando-se assim um período denominado de pós-estro, com duração de 8 a 10 dias. Havendo o coito, instala-se uma fase luteal, com duração variável, na qual a fêmea não mais apresenta receptibilidade ao macho. Gatas que falharam na concepção apresentam um período de persistência luteal de aproximadamente 40 dias, também denominado pseudogestação (Verhage et al., 1976; Goodrowe et al., 1989; Johnston et al., 2001). Já em animais gestantes, a fase luteal perdura até o parto, com aproximadamente 60 dias (Johnston et al., 2001).

O anestro é o período de inatividade ovariana descrito em animais do hemisfério norte. Nesta fase a fêmea não atrai machos, não apresenta comportamento sexual nem exibe evidências de atividade ovariana (Chakraborty, et al., 1979; Johnston et al., 2001).

Durante o ciclo estral da gata ocorrem alterações no epitélio vaginal em resposta às variações dos níveis séricos de estrógeno, desencadeando um processo cíclico de maturação e queratinização celular (Schutte, 1967; Bell et al., 1973; Sokolowski, 1973; McDonald, 1978; Endler, 1979). Christiansen (1988) descreve os diferentes tipos celulares presentes no esfregaço vaginal, em decorrência do grau de queratinização como células parabasais, células intermediárias, células superficiais e células anucleadas. A citologia vaginal pode assim ser utilizada, tanto no acompanhamento das fases do ciclo estral, como também para diagnóstico de possíveis distúrbios ou doenças reprodutivas (Herron, 1977; Vannucchi et al., 1997). Este método, primeiramente utilizado em cadelas, tem sido adaptado para espécie felina sendo, entretanto, ainda pouco utilizado. O presente trabalho teve por objetivo a identificação do perfil citológico da mucosa vaginal, frente às diferentes manifestações comportamentais do ciclo estral, em animais mantidos em condições climáticas do sudeste brasileiro.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram monitoradas por um período de 12 meses, seis gatas adultas não gestantes, sem raça definida, mantidas em um gatil de 24 m², sendo 12 m² de solário, pertencente ao setor de Morfologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) localizada a latitude -20:45:14 e longitude 42:52:55, a insolação media mensal variou entre 10,9 horas (junho) e 13,4 horas (dezembro). As gatas foram mantidas em ambiente coletivo, na presença de três machos reprodutores isolados em baias individuais. Todos os animais receberam água e ração *ad libitum*.

Os animais foram monitorados diariamente quanto a manifestações comportamentais das diferentes fases do ciclo estral. Foram considerados como sinais de receptividade da fêmea: esfregar a face e pescoço contra objetos, agachamento, sapateamento, lordose, lateralização de cauda e vocalização. Já a caracterização do pós-estro foi através da redução abrupta dos sinais de receptividade até o início de um novo ciclo.

De cada animal, foram obtidos três esfregaços vaginais semanalmente. Os esfregaços foram obtidos por meio de swab de algodão umedecido, com solução fisiológica, inserido no vestibulo vaginal no sentido dorso-cranial e rotacionado a cerca de 1cm de profundidade (Figura 1). Os swabs foram rolados sobre lâminas de vidro, as quais foram coradas pelo método Panótico rápido. Ao microscópio de luz, foram analisados e quantificados os tipos celulares presentes, sendo avaliadas cerca de 100 células em cada lâmina.

Foram considerados os seguintes tipos celulares: células parabasais e intermediárias, oscilando entre redondas a ovais, com 15 a 30µm de diâmetro, com núcleo vesicular relativamente grande, envolvido por um citoplasma não-queratinizado transparente (Figura 1a); células superficiais, poligonais com diâmetro entre 30 e 60µm, com núcleo picnótico com menos de 6µm de diâmetro, o citoplasma pode estar acidófilo, devido à presença do precursor da queratina (Figura 1b); e finalmente as células anucleadas, que são superficiais totalmente queratinizadas, com 30 a 60µm de diâmetro, sem núcleo evidente (Figura 1c).

Dados percentuais dos diferentes tipos celulares foram compilados com as diferentes fases do ciclo estral, avaliadas por meio das manifestações comportamentais observadas.

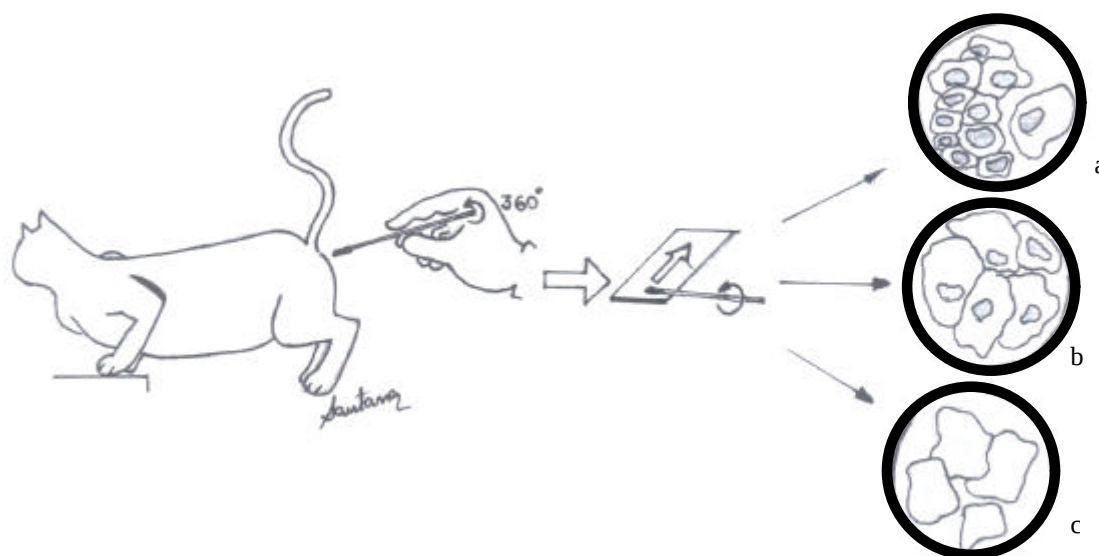


Figura 1: Esquematização da coleta e confecção do esfregaço vaginal em gata doméstica e representação dos principais tipos celulares encontrados. (a) células parabasais e intermediárias; (b) células superficiais nucleadas e (c) células anucleadas.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferente do observado no hemisfério norte, onde há a presença de um período de anestro sazonal em animais mantidos sob a influência da luz ambiente (Chakraborty et al., 1979; Johnston et al., 2001), no presente trabalho todos os animais apresentaram atividade ovariana ao longo do ano.

Todos os animais avaliados apresentaram sinais comportamentais característicos das fases do ciclo estral, sendo o proestro e o estro caracterizados pelos mesmos sinais clínicos de receptividade. A diferenciação entre estas fases foi realizada apenas pelo perfil colpocitológico. Embora alguns autores cite a presença do metaestro como fase integrante do ciclo estral da gata (Pratt, 1983; Toniollo et al., 1995), o metaestro conceitualmente é caracterizado pelo período de desenvolvimento do corpo lúteo (Johnston et al., 2001). Por serem as gatas ovuladoras induzidas, naqueles animais não cruzados não ocorre a formação de corpos lúteos, sendo o período subsequente ao estro denominado pós-estro.

Na América do Norte e Continente Europeu as gatas são descritas como poliestrais sazonais, comumente apresentando ciclos principalmente nas estações primavera e verão (Pratt, 1983). Nas coordenadas geográficas em que foi conduzido o experimento, os meses de maior insolação média foram de setembro (12 horas) a março (12,2 horas), observando-se o maior pico em dezembro (13,4 horas), (Tabela 1). Já os meses de menor insolação média foram os meses de abril (11,6 horas) a agosto (11,4 horas) atingindo menor insolação no mês de junho (10,9 horas), (Tabela 1). O número de ciclos estrais detectados no presente experimento está descrito na tabela 1. O número médio de ciclos foi de 11,2 ao ano, sendo 8,8 observados nos meses de maior insolação e 2,4 nos meses de menor insolação média. No Gráfico 1 pode-se observar uma forte correlação ($r = 0,82$) entre a quantidade de ciclos estrais e insolação nos diferentes meses do ano. A duração média dos ciclos estrais nos animais pesquisados, foi de 22,5 dias nos meses de maior insolação, enquanto nos meses de menor insolação a duração média dos ciclos foi de 53 dias, ou seja, um aumento de 135% na duração do período interestral no outono e inverno. Na América do Norte, Johnston et al. (2001) descrevem valores semelhantes de duração do ciclo estral, nos meses de maior insolação, porém descrevem um anestro sazonal nos meses de menor insolação. Assim, embora no presente experimento, tenha sido observada uma clara influência sazonal, com redução da atividade cíclica ovariana, a presença de ciclos estrais nos meses de menor insolação média, descaracteriza um anestro sazonal bem definido. O aumento no período interestral nos animais pesquisados, durante os meses de menor insolação, deveu-se a variações na duração do pós-estro, uma vez que as demais fases do ciclo estral mantiveram-se constante em relação aos meses de maior insolação. A duração do proestro manteve-se constante em aproximadamente dois a três dias e o estro variou entre três a cinco dias em todos os animais em todas as estações do ano. Valores semelhantes são descritos nestas fases em animais criados na América do Norte (Chakraborty et al., 1979; Johnston et al., 2001).

Tabela 1. Número de ciclos estrais mensais, seus respectivos percentuais médios, número médio de horas de insolação, em gatas domésticas mantidas em cativeiro sob luminosidade natural.

MESES DO ANO	ANIMAIS						Nº Total de Ciclos	Percentual Médio Mensal (%)	Insolação Média Mensal (horas)
	1	2	3	4	5	6			
Janeiro	2	1	2	2	2	1	10	14,9	13,2
Fevereiro	2	2	3	2	1	1	11	16,3	12,8
Março	1	1	2	1	1	1	7	10,4	12,2
Abril	1	0	1	1	0	1	4	6,0	11,6
Maio	0	0	0	1	1	0	2	3,0	11,1
Junho	1	1	1	0	0	0	3	4,5	10,9
Julho	1	0	1	1	0	0	3	4,5	11,0
Agosto	0	0	1	0	0	1	2	3,0	11,4
Setembro	1	1	2	1	1	0	6	9,0	12,0
Outubro	1	1	1	1	1	0	5	7,5	12,6
Novembro	1	1	1	1	0	1	5	7,5	13,1
Dezembro	1	1	3	2	1	1	9	13,4	13,4
TOTAL	12	9	18	13	8	7	67	100,0	157,4

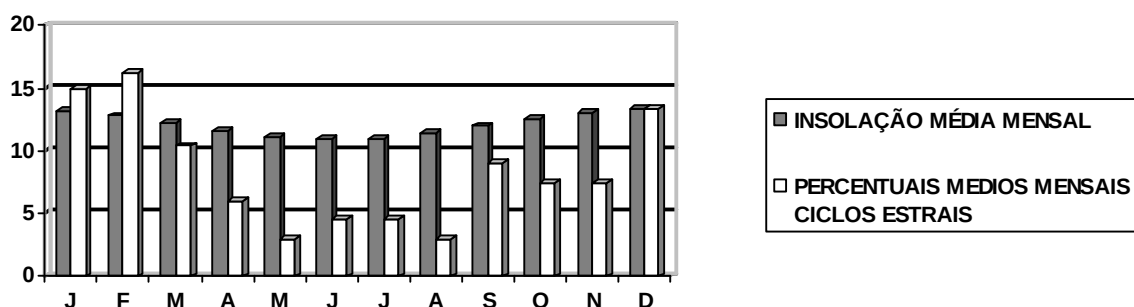


Gráfico 1- Insolação média mensal e percentual médio mensal de ciclos estrais em gatas domésticas mantidas em cativeiro sob iluminação natural.

Schutte (1967) descreveu variações na composição citológica do epitélio vaginal em decorrência da fase do ciclo estral em cadelas, estas variações citológicas são devidas à influência do estrógeno sobre a proliferação das camadas superficiais do

epitélio estratificado pavimentoso e de progestágenos sobre a maturação das camadas mais profundas (Toniollo et al., 1995). Na cadela, durante o estro, de 90 a 100% dos tipos celulares observados no esfregaço vaginal são células anucleadas (Concannon, 1989), já em gatas os valores observados para este tipo celular durante o estro, não ultrapassaram os 50% no presente experimento (Tabela 2), valores próximos aos descritos na literatura (Toniollo et al., 1995; Feldman & Nelson, 1996; Johnston et al., 2001, Mattos et al., 2003).

Segundo Pratt (1983), as células da mucosa vaginal durante o proestro apresentam núcleos proeminentes, numa proporção entre núcleo e citoplasma (N:C) de aproximadamente 1:1. com o aparecimento do estro, estas células tendem a aumentar o volume de citoplasma apresentando bordas irregulares e queratinizadas ao mesmo tempo em que os núcleos tornam-se picnóticos, reduzindo intensamente a proporção N:C para 1:6 até 1:10. A cornificação da mucosa vaginal ocorre durante o pico de crescimento folicular com elevação do 17β estradiol no plasma acima de 70 pmol.L^{-1} , ocorrendo simultaneamente ao comportamento estral (Shile et al., 1979). A presença de células sangüíneas está mais relacionada com manipulação inadequada do que com a fase do ciclo estral.

Na Tabela 2 estão relacionados os percentuais dos diferentes tipos celulares observados nas diferentes fases do ciclo estral nos animais do presente experimento. Células parabasais e intermediárias estavam em maiores proporções (57,4%) no pós-estro, reduzindo drasticamente no proestro (22,1%) e atingindo os menores valores observados no período de estro (15,95%). As células superficiais apresentaram menor variação durante as fases do ciclo estral (28,7% no pós-estro, 33,2 % no estro e 43,6% no proestro). Já as células anucleadas apresentaram aumento considerável do período de proestro para o período de estro (34,3 % para 51,0 %), sendo no período de pós-estro registrado os menores valores (13,9%). Valores percentuais semelhantes são descritos na literatura, para estes tipos celulares (Toniollo et al., 1995; Feldman & Nelson, 1996; Johnston et al., 2001, Mattos et al., 2003).

Tabela 2. Fases do ciclo estral, tipos celulares e suas respectivas médias, em gatas domésticas, mantidas em cativeiro sob luminosidade natural.

ANIMAIS							
Fases do Ciclo Estral / Tipos Celulares	1	2	3	4	5	6	Média dos Tipos Celulares
PROESTRO							
Céls. Parabasais e Intermediarias	25,5	29,3	23,4	26,9	13,0	14,5	22,1
Células Superficiais	46,9	36,2	46,2	32,4	51,4	48,5	43,6
Células Anucleadas	27,6	34,5	30,4	40,7	35,6	37,0	34,3
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
ESTRO							
Céls. Parabasais e Intermediarias	6,1	18,6	16,8	19,1	19,6	15,3	15,9
Céls Superficiais	42,4	35,0	31,2	32,3	27,4	30,6	33,2
Céls Anucleadas	51,5	46,4	52,0	48,6	53	54,1	50,9
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PÓS-ESTRO							
Céls. Parabasais e Intermediarias	63,9	53,9	47,3	59,0	60,9	59,1	57,4
Céls Superficiais	22,0	32,5	35,4	27,6	26,7	28,3	28,7
Céls Anucleadas	14,1	13,6	17,3	13,4	12,4	12,6	13,9
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

O comportamento do perfil colpocitológico nas diferentes fases subsequentes de pós-estro, proestro e estro, podem ser resumidos como: uma elevação abrupta das células anucleadas; queda em mesma intensidade das células parabasais e intermediárias e manutenção da população de células superficiais (Gráfico 2), concordando com os relatos da literatura (Toniollo et al., 1995; Feldman & Nelson, 1996; Johnston et al., 2001, Mattos et al., 2003).

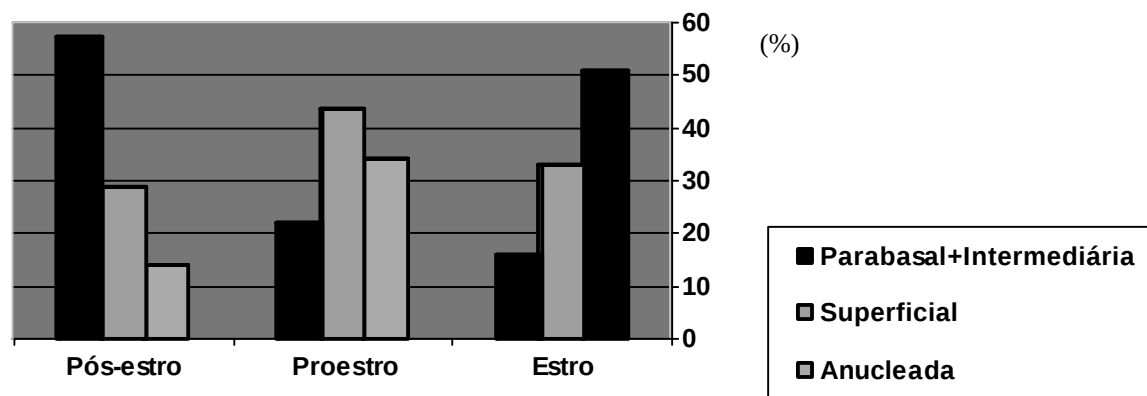


Gráfico 2: Médias dos percentuais de células do epitélio vaginal nos estágios do ciclo estral de gatas domésticas, mantidas em cativeiro sob luminosidade natural.

2.4 CONCLUSÕES

1) Nas condições climáticas do sudeste brasileiro, gatas adultas mantidas sob luminosidade natural apresentam atividade ovariana durante todo o ano.

2) A variação do fotoperíodo nas diferentes estações do ano é fator crítico para a atividade ovariana em gatas adultas, havendo um aumento considerável no período interestral, especificamente do pós-estro, nas estações de menor incidência luminosa.

3) O perfil dos tipos celulares ao longo do ciclo estral, é semelhante ao citado na literatura para gatas com atividade ovariana regular, sendo o monitoramento colpocitológico, um exame auxiliar de boa precisão para a definição das diferentes fases do ciclo estral em gatas domésticas.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bell E.T.; Bailey, J.B.; Christie, D.W. 1973. apud Toniollo, G.H.; Cury, S.R.; Vicente, W.R.R.; Camacho, A.A.;Garcia, J.M.; Vantini, R. 1995. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science. 32(2): 125-129.
- Burke T.J. 1975. apud Toniollo, G.H.; Cury, S.R.; Vicente, W.R.R.; Camacho, A.A.;Garcia, J.M.; Vantini, R. 1995. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science. 32(2): 125-129.
- Chakraborty, P.L., Wildt, D.E., Seager, S.WW.J. 1979. Serum LH and Ovulatory response to LH-RH in the estrous and anoestrous domestic cat. Laboratory Animal Science. 29: 338-344.
- Christiansen, I.J. 1988. Reprodução no cão e no gato. Ed. Manole Ltda, São Paulo, Brasil.
- Concannon P, Hodgson, B., Lein, D. 1980. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. Biology of Reproduction. 23:111-117.
- Concannon, P.W., McCann, J.P., Temple, M. 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. Journal of Reproduction Fertility, Suppl. 39: 3-25.
- Endler, V.O. 1979. apud Toniollo, G.H.; Cury, S.R.; Vicente, W.R.R.; Camacho, A.A.; Garcia, J.M.; Vantini, R. 1995. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science. 32(2): 125-129.
- Feldman, E.C. & Nelson, R.W. (1996). Feline reproduction. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Edition 2nd. Ed. Wbsaunders Company, 9: 740-768.
- Goodrowe, K.L; Howard, J.G.; Schmidt, P.N.; Wildt, D.E. 1989. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and *in vitro* fertilization. Journal of Reproduction and Fertility. Suppl. 39: 73-90.
- Herron , M.A, 1977. Feline vaginal cytological examination. Feline Practice. 7: 36-39.
- Hilliard, J. G.; Hayward, J. N. & Sawyer, C. H. (1964) Postcoital patterns of secretion of pituitary gonadotropin and ovarian progestin in the rabbit. Endocrinology. 75: 957-961.

- Jemmett, J. E. & Evans, J. M. (1977) A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. *Journal Small Animal Practice*. 18: 31-37.
- Johnson, L.M.; Gay, V. L. 1981 Luteinizing hormone in the cat. Mating induced secretion. *Endocrinology*. 109(1): 247-252.
- Johnston, D.S.; Kustritz, M.V.R., Olson, P.N.S. 2001. The feline oestrous cycle. *Canine and Feline Theriogenology*. 25: 396-405.
- Joshua, J.O. 1971. apud Toniollo, G.H.; Cury, S.R.; Vicente, W.R.R.; Camacho, A.A.; Garcia, J.M.; Vantini, R. 1995. 32(2): 125-129.
- Mattos, M.R.F.; Mattos, L.S. ; Silva, L.D.M. 2003. Vaginal cytology in queens with estrous induced with equine chorionic gonadotrophin. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 98(547), 135-138.
- McDonald, L.E. 1978. apud Toniollo, G.H.; Cury, S.R.; Vicente, W.R.R.; Camacho, A.A.; Garcia, J.M.; Vantini, R. 1995. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*. 32(2): 125-129.
- Pope C.E. 2000. Embryo Technology in Conservation Efforts for Endangered Felids *Theriogenology*, 53(1): 163-174.
- Pratt, P.W., 1983. *Feline Medicine* VMD American Veterinary Publications. INC. 1st edition ,chapter 15: 511-519.
- Schmidt, P.M., Chakraborty, P. K., Wildt, D.E. 1983. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behaviour in the cat. II Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum oestrus. *Biology of Reproduction*. 28: 657-671.
- Schutte, A.P. 1967 apud Toniollo, G.H.; Cury, S.R.; Vicente, W.R.R.; Camacho, A.A.; Garcia, J.M.; Vantini, R 1995. 32 (2):125-129.
- Shille, V.M., Lundstrom, K.E., Stabenfeldt. G.H. 1979. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 B concentrations in plasma: Relation to oestrous behaviours and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction*. 21: 953-963.
- Shille, V.M., Stabenfeldt, G.H. 1980. Current concepts in reproduction of the dog and cat. *Advanced Veterinary Science Complement Medical*. 24: 211-243.
- Sokolowski, J. 1973. apud Toniollo, G.H.; Cury, S.R.; Vicente, W.R.R.; Camacho, A. A.; Garcia, J.M.; Vantini, R. 1995. 32(2): 125-129.

- Toniollo, G.H.; Cury, S.R.; Vicente, W.R.R.; Camacho, A.A.; Garcia, J.M.; Vantini, R. 1995. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*. 32(2): 125-129.
- Vannucchi, C.I., Satzinger, S. and Santos, S.E.C. (1997). Técnicas de citologia vaginal como método de diagnóstico da fase do ciclo estral em cadelas. *Clinical Veterinary*. 9: 14-19.
- Verhage, H.G., Beamer, N.B., Brenner, R.M. 1976. Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. *Biology of Reproduction*. 14: 579-585.
- Wildt, D.E., Seager, S.W.J, Chakraborty, P.K. 1980. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology*. 107:212.
- Wildt, D.E, Chan, S.Y., Seager, S.W., Chakraborty, P. K. 1981. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behaviour in the cat. Relationships during the coitus- induced luteal phase and during the oestrous period without mating. *Biology of Reproduction*, 25(1): 15-18

3.0 Indução da Atividade Ovariana e da Ovulação e Transferência de Embriões a Fresco em Gatas Domésticas

RESUMO

Foram utilizadas, dezesseis gatas domésticas adultas e dois machos adultos reprodutores, mantidos no gatil experimental do setor de Morfologia DVT-UFV. Todas as fêmeas receberam uma única aplicação de 150 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) no pós-estro, como indutor da atividade ovariana, e 80 a 84 horas após, receberam uma única aplicação de 100 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) como indutor da ovulação. Após a aplicação de hCG, oito gatas doadoras foram naturalmente acasaladas. As oito gatas receptoras receberam estímulo extra de indução da ovulação através da manipulação de um swab intravaginal. De cinco a seis dias após a aplicação de hCG, as gatas foram submetidas a uma laparotomia, para a coleta dos embriões, a qual foi efetuada através de lavagem uterina transcornual. Foram cirurgicamente inovulados em média seis embriões, classificados como mórula compacta e blastocisto dos tipos I a III, em quatro receptoras. Três animais apresentaram gestação confirmada por ultrassonografia aos 36 dias sendo que destes dois animais pariram ninhadas com dois e quatro filhotes, respectivamente 66 e 63 dias após a indução da ovulação. Excetuando-se um natimorto, todos os filhotes apresentaram desenvolvimento normal.

Palavras-chave: Gonadotrofinas Coriônicas, Transferência de Embriões, Gata Doméstica

ABSTRACTS:

They were used, sixteen queens and two tom, maintained in the experimental gatil of Morphology DVT-UFV'S section. All the females received an only application of 150 UI of Gonadotrofina Equine Coriônica (eCG) in the post-estrus, as inductor of the ovarian activity, and 80-84h after they received an only application of 100 UI of Chorionic Gonadotropins Human Coriônica (hCG) as inductor of the ovulation. After the hCG application, the queens donors were just coupled naturally. The recipients received extra incentive of induction of the ovulation through the manipulation of a swab intravaginal. Targeting recovery from donors, the uterus were excised six days after hCG administration from donors under general anesthesia, and the uterine horns were flushed downward. The embryos were infused into the uterine horn on average six embryos, classified as compacted morulae and early blastocysts of the types I, II, III in four recipients. Three animals impregnated, these two animals had two and four newborns respectively, and duration of pregnancy was respectively 66 and 63 days after the induction of the ovulation. Being excepted one newborn, all the newborns presented normal development.

Key Words: Chorionic Gonadotropins, Embryo Transfer, Domestic Cat

3.1 INTRODUÇÃO

O gato doméstico tem sido usado intensamente como modelo experimental para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida incluindo maturação e fertilização de embriões *in vitro* (Bowen, 1977; Johnston et al., 1996; Karja et al., 2002), acompanhamento da embriogênese e migração embrionária (Swanson et al., 1994), desenvolvimento de embriões *in vitro* (Pope et al., 1998; Gómez et al., 2003), indução artificial da ovulação (Greulich, 1934; Tsutsui et al., 1989), cultura de embriões (Jewgenow et al., 1995; Murakami et al., 2002;), transferência de embriões (Goodrowe et al., 1988; Pope, 2000; Tsutsui et al., 2000) e criopreservação de embriões (Ballou, 1992; Leibo & Songsasen, 2002) tendo em vista o seu uso potencial em espécies de felídeos não domésticos (Swanson et al., 1996; Pope, 2000).

A crescente degradação ambiental provocada pelos desmatamentos, construções de barragens, acidentes como derramamento de produtos químicos e queimadas têm como consequência direta à redução e a fragmentação dos inúmeros ecossistemas, levando uma grande diversidade de espécies a sofrerem rápido declínio em seu número com a consequente perda da diversidade genética (Guimarães, 2002). A pressão contínua de caça ilegal e a diminuição progressiva do habitat levaram, segundo os critérios de Mace & Lande (1991) e IUCN (1995) a inclusão de todas as espécies de felídeos silvestres brasileiras a condição de ameaçadas de extinção.

A gata doméstica é classicamente definida como uma espécie poliestral sazonal nos países do hemisfério norte (Jemmett & Evans, 1977; Johnston et al., 1996; Pope, 2000). Nas condições climáticas brasileiras estes animais ciclam durante todo o ano, não sendo observada a presença de anestro sazonal (Ávila et al., 2003).

Os estágios do ciclo estral na gata podem incluir: proestro, estro, pós-estro, diestro e anestro. O proestro, quando manifestado, pode durar até 2 dias, no qual as fêmeas atraem os machos para o coito, porém, ainda não se apresentam receptivas (Johnston et al., 2001). O estro é facilmente detectado, apresentando duração média de 5 a 7 dias e é caracterizado pela aceitação ao macho (Shille et al., 1979; Christiansen, 1988; Pope, 2000). Estes animais são ovuladores induzidos, ou seja, a ovulação só ocorre depois do coito. Este induz a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez leva ao aumento sérico do hormônio luteinizante (LH), culminando com a ovulação (Wildt et al., 1980; Johnson & Gay, 1981; Goodrowe et al.,

1989), a qual ocorre de 24 a 50 horas após o coito (Christiansen, 1988). Fisiologicamente na gata, cerca de 3 a 7 folículos primordiais se desenvolvem até um diâmetro de 1 a 2mm durante o proestro (Christiansen, 1988; Goodrowe et al., 1989).

Não ocorrendo o coito, a gata não é induzida a ovular havendo regressão folicular, instalando-se assim um período denominado de pós-estro, com duração de 8 a 10 dias. Gatas que falham na concepção apresentam um período de persistência luteal de aproximadamente 40 dias, também denominado pseudogestação (Verhage et al., 1976; Goodrowe et al., 1989; Johnston et al., 2001). Já em animais gestantes, a fase luteal perdura até o parto, com aproximadamente 60 dias (Johnston et al., 2001). Segundo Johnston et al. (1996) o tamanho da ninhada está entre um e cinco filhotes com média de 3,7 por parto, não existindo relação entre número de filhotes e duração da gestação.

A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) ou o hormônio folículo estimulante (FSH), podem ser utilizados para a indução de atividade ovariana e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) pode ser usada para indução da ovulação em felídeos (Pope et al., 1993; Pope et al., 1998). Os resultados obtidos desta indução exógena da atividade ovariana e ovulação são semelhantes aos observados na reprodução natural (Cline et al., 1980). Para a coleta de embriões, o tratamento com gonadotrofina deve ser iniciado preferencialmente no estágio pós-estro, o qual pode ser determinado ou pela ausência de comportamento do estro ou pela análise colpocitológica. Os melhores resultados foram obtidos utilizando 100 UI hCG após 80-84h da aplicação do eCG (Goodrowe et al., 1988; Donoghue et al., 1992; Pope et al., 1998).

Segundo Swanson et al. (1995) o uso das gonadotrofinas para indução da atividade ovariana em intervalos muito curtos, estimula a síntese de imunoglobulinas que neutralizariam o efeito das gonadotrofinas. Em programas de reprodução assistida em felinos, o sucesso no processo de inseminação artificial é dependente do sítio de depósito de sêmen, uma vez que baixas taxas de gestação são observadas com o depósito intravaginal (Platz et al., 1978) e animais anestesiados apresentam comprometimento no transporte espermático e ovulação (Howard et al., 1992; Howard, 1999). Uma vez que a ovulação induzida ocorre cerca de 25-27 horas após a injeção de hCG e a viabilidade do ovócito é de pelo menos 14 horas *in vivo*, os melhores resultados para inseminação intra-uterina ocorrem cerca de 36 horas após a indução hormonal da ovulação (Howard et al., 1992; Donoghue et al., 1996; Howard, 1999).

Após a fertilização a maioria dos embriões permanece na tuba uterina durante as 136 h iniciais, ou seja, os embriões entram no útero como mórula compacta ou blastocisto inicial, a partir de 5,5 dias após a ovulação, realizando migrações transuterinas antes de sua implantação (Swanson et al., 1994). A implantação dos embriões começa aos 13 dias após o coito, depois do rompimento da zona pelúcida no dia 12 (Dresser et al., 1988).

A recuperação de embriões e sua transferência intra e inter específica, tem sido alcançada em felídeos (Kraemer et al., 1979; Pope et al., 1993; Pope, 2000). A recuperação na gata doméstica deve ser feita entre seis e nove dias após o coito (Kraemer et al., 1979). Swanson & Godke (1994) propõem uma técnica transcervical de recuperação e transferência de embriões menos invasiva, porém a técnica mais utilizada é por meio de intervenção cirúrgica (Kraemer et al., 1979; Dresser et al., 1988; Pope, 2000; Tsutsui et al., 2000).

A maioria dos trabalhos relacionados na literatura, sobre a reprodução assistida de gatos domésticos, foi conduzida nas condições climáticas do hemisfério norte. Assim, visto que a reprodução da gata doméstica é sazonalmente influenciada por oscilações climáticas, principalmente de fotoperíodo, o presente trabalho teve por objetivo adaptar os protocolos de indução exógena da atividade ovariana e da ovulação, coleta e classificação e transferência de embriões em felinos domésticos, nas condições climáticas brasileiras, para posterior aplicação em espécies não domésticas ameaçadas de extinção.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 16 gatas domésticas adultas, oito com características da raça siamesa e oito sem características de raça definida (SRD). Os animais foram mantidos em colônia em um gatil com área de 24m², incluindo um solário de 12 m², pertencente ao setor de Morfologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) com latitude -20:45:14 e longitude 42:52:55. Utilizaram-se ainda dois machos adultos reprodutores com características da raça siamesa, os quais foram mantidos em recintos individuais de 2m² de área coberta e solário de 0,5m², no interior do referido gatil. Todas as fêmeas foram monitoradas por meio de esfregaço vaginal

com o intuito de se detectar o período de pós-estro, no qual foi iniciado o protocolo de indução da atividade ovariana.

Foram realizados quatro procedimentos de coleta e transferência de embriões. Em cada procedimento foram utilizadas como doadoras duas gatas com características da raça siamesa e como receptoras duas gatas sem raça definida. A cada procedimento, todas as fêmeas receberam uma única aplicação de 150 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG), por via intramuscular, como indutor da atividade ovariana. Cerca de 80 a 84h após a aplicação de eCG, foi aplicado, também em todas as gatas, 100 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) como indutor da ovulação. Imediatamente após a aplicação de hCG, apenas as gatas doadoras foram acasalada com um macho reprodutor, sendo o mesmo trocado a cada 24 horas, por um período total de 72 horas. Os machos foram trocados para garantir maior número de acasalamentos e reduzir a possibilidade de falha individual do macho. As gatas receptoras receberam estímulo extra de indução da ovulação por meio de da manipulação de um swab intravaginal, em movimentos circulares, duas vezes ao dia durante o mesmo período de acasalamento das doadoras. Após este período, as doadoras retornaram ao convívio comunitário no gatil.

De cinco a seis dias após a aplicação de hCG, as gatas de cada procedimento foram submetidas a uma laparotomia pré-retroumbilical na linha alba, sob anestesia geral usando associação quetamina/xilazina na dosagem de 15mg/Kg e 1mg/Kg respectivamente por via intramuscular profunda, para a coleta e transferência dos embriões. Em cada animal foram contabilizados os números de corpos lúteos e folículos ovulatórios em cada ovário. Para a coleta dos embriões foi desenvolvida uma técnica de lavagem uterina transcornual. Esta consiste na exposição simultânea das extremidades tubárias de cada corno uterino, estabilização das mesmas, através da utilização de pinça hemostática no ligamento próprio do ovário e cateterização dos cornos com cateteres venosos de calibre 18 G. Seringas foram acopladas aos cateteres, sendo uma delas preenchida com volume conhecido de meio para coleta de embriões (Talp Heps) e a outra vazia. Foi produzido um fluxo contínuo por meio de injeção do meio num corno uterino e aspiração simultânea no outro, promovendo a lavagem de ambos os cornos uterinos e coleta dos embriões. Este procedimento foi repetido por duas a três vezes. O lavado uterino foi depositado em placa de petri estéril e feito a varredura em microscópio estereoscópico, para o registro, quantitativo e qualitativo dos embriões e demais estruturas coletadas. A classificação morfológica dos embriões foi feita segundo

o preconizado pelo IETS (1998). Apenas aqueles considerados com qualidade I, II e III foram transferidos. Para isto, em média seis embriões foram posicionados entre colunas de ar no interior de uma sonda rígida do tipo “tom cat” número 7, e inovulados na extremidade cranial do corno com maior número de corpos lúteos em cada gata receptora. O monitoramento da gestação foi feito por exames ultrassonográficos a cada 15 dias.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários protocolos vêm sendo divulgados na literatura para a indução da atividade ovariana, como a utilização de eCG, da gonadotrofina sérica de égua prenhe (PMSG) ou do hormônio folículo estimulante hipofisário (FSH-p) (Pope et al., 1998; Tsutsui et al., 2000; Mattos et al., 2001; Mattos et al., 2003). Segundo Wildt et al. (1978) o FSH embora eficiente para a estimulação da atividade ovariana, apresenta meia vida muito curta, necessitando de várias aplicações diárias o que pode causar uma hiperestimulação. O uso do eCG, na dosagem de 50 a 150 UI apresenta resultados extremamente satisfatórios em dose única (Goodrowe et al., 1988; Pope et al., 1998; Tsutsui et al., 2000). No presente experimento o uso de 150 UI de eCG, foi efetivo para a indução do desenvolvimento folicular em todos os animais utilizados.

O uso de gonadotrofina coriônica humana (hCG) é relatado em todos os trabalhos para a indução da ovulação em gatas previamente estimuladas ao desenvolvimento folicular, embora seja descrita uma grande amplitude de doses (Wildt et al., 1978; Platz, et al. 1978; Dresser et al., 1988; Howard et al., 1992; Pope et al., 1993; Kanda et al., 1995; Pope et al., 1998; Tsutsui et al., 2000; Mattos et al., 2001; Mattos et al. 2003). No presente experimento a dosagem de 100 UI de hCG, 84 horas após a pré-estimulação com eCG foi efetivo na promoção da ovulação em todos os animais utilizados, visto que foi observada média de 13,5 e 20 corpos lúteos nas fêmeas doadoras e receptoras respectivamente, embora, em média, cerca de 7 folículos não ovulados foram observados na laparotomia (tabela 1 e 2).

Na Tabela 1 estão descritos os números de embriões e ovócitos recuperados em cada animal doador. Embora subjetiva, a taxa de recuperação nestes animais, ou seja, o número de embriões e de ovócitos computados em relação ao número de corpos lúteos

observados, foi de 66%, valor muito próximo ao descrito por Tsutsui et al., (2000) (74%). Ainda na tabela 1 pode-se observar que, com exceção da doadora número 6, a qual apresentava hidrossalpinge no momento da cirurgia, foram raros os embriões degenerados recuperados. Dos 42, embriões não degenerados recuperados em todas as doadoras, 69% foram classificados como mórulas compactas de excelente qualidade (tipo I), 4,8% foram mórulas compactas de boa qualidade (tipo II), 12% foram mórulas compactas de qualidade regular (tipo III), 9,5% foram blastocitos iniciais de excelente qualidade e 4,8% foram blastocitos iniciais de boa qualidade (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação e quantificação de embriões e número de corpos lúteos, folículos ovarianos e ovócitos coletados em gatas doadoras após indução da atividade ovariana e da ovulação.

CLASSIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA											
Data	Doadora	*CL	Folículos Ovarianos	Número Embriões Coletados	Ovócito	**MCI	MCII	MCIII	***BLI	BLII	****Deg.
23/04	01	17	01	02	-	-	-	-	-	-	02
23/04	02	19	16	16	-	08	-	03	03	02	-
21/05	03	17	01	06	-	03	02	-	-	-	01
21/05	04	19	06	00	12	-	-	-	-	-	-
30/09	05	09	06	13	-	12	-	1	-	-	-
30/09	06	12	09	15	-	03	-	-	-	-	12
04/11	07	06	07	04	-	03	-	01	-	-	-
04/11	08	09	09	02	01	-	-	-	01	-	01
Números Totais	08	108	55	58	13	29	02	05	04	02	16
Média	1,00	13,50	6,88	7,25	1,63	3,63	0,25	0,63	0,50	0,25	2,00

*CL: N° de Corpos Lúteos

** MCI, II, III: N° Mórula compacta tipo I, II, III

*** BLI, II: N° Blastocisto Inicial tipo I, II

****Deg.: N° Embriões degenerados

No processo de embriogênese, aproximadamente cinco dias após a ovulação os embriões entram no útero como mórula compacta em sua maioria (Swanson et al., 1994). Os melhores resultados na transferência de embriões foram observados quando da utilização de mórulas compactas (Swanson et al., 1994; Tsutsui et al., 2000). Devido a isto, no presente experimento foi adotado o protocolo de recuperação dos embriões entre cinco e seis dias após a indução da ovulação. A técnica descrita para lavagem uterina, para recuperação dos embriões, mostrou-se eficiente visto que nenhuma das

gatas doadoras apresentou gestação, mesmo não recebendo qualquer tratamento abortivo.

Dos oito animais selecionados como receptores de embriões, apenas quatro animais foram utilizados, um a cada procedimento, visto que: um animal apresentava piometrite, no momento da cirurgia; outro apresentou má formação do trato genital feminino e outros dois não foram utilizados por número insuficiente de embriões no procedimento. Como se observa na Tabela 2, cerca de seis embriões foram inovulados em cada receptora, a maioria mórula compacta do tipo I.

Tabela 2- Classificação e quantificação de embriões transferidos. Número de corpos lúteos e folículos ovarianos em gatas receptoras após indução da atividade ovariana e da ovulação.

Data	Receptoras	CL*	Folículos Ovarianos	Número Embriões Transferidos	CLASSIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA				
					MCI	MCII	MCIII	*BL I	BL II
23/04	01	23	09	-	-	-	-	-	-
23/04	02	17	01	08	03	-	03	-	02
21/05	03	16	06	05	03	02	-	-	-
21/05	04	n	n	-	-	-	-	-	-
30/09	05	n	n	-	-	-	-	-	-
30/09	06	20	08	06	06	-	-	-	-
04/11	07	n	n	-	-	-	-	-	-
04/11	08	24	15	05	03	-	01	01	-
Num	8,0	100,0	39,0	24,0	15,0	2,0	4,0	1,0	2,0
Totais									
Média	1,00	20,00	7,88	6,00	3,75	0,50	1,00	0,25	0,50

n: Animal não utilizado

*CL: N° de Corpos Lúteos

** MCI, II e III: Mórula compacta tipo I, II e III

*** BL I e II: Blastocisto Inicial tipo I e II

A receptora número dois recebeu oito embriões, sendo três MCI, três MCIII e dois BLII, apresentou gestação de 66 dias, com parto normal de dois filhotes saudáveis. A receptora número três recebeu três embriões MCI e dois embriões MCII, apresentando gestação de 63 dias, com parto normal de quatro filhotes sendo um natimorto, com má formação cefálica, e três filhotes saudáveis. A receptora número seis recebeu seis embriões MCI, porém não apresentou qualquer sinal de gestação. A receptora oito recebeu cinco embriões sendo três MCI, um MCIII e um BLI, apresentou vesículas embrionárias nos primeiros exames ultrassonográficos, porém estas não foram detectadas a partir dos 45 dias da gestação, evidenciando um quadro de abortamento.

Todos os filhotes nascidos apresentaram características da raça siamesa, acompanhando o padrão fenotípico apresentado pelos pais biológicos. Apresentaram desenvolvimento normal sendo desmamados aos 60 dias de idade.

Experimentos latino-americanos de indução da atividade ovariana e da ovulação, com transferência de embriões e nascimento de filhotes saudáveis em gatas domésticas, não haviam sido descritos na literatura. Desta forma o presente trabalho pode representar um importante passo para a preservação de espécies de felinos neotropicais, uma vez que tecnologias de reprodução assistida, desenvolvidas em espécies domésticas, apresentam real potencial de uso em espécies não domésticas (Ballou, 1992; Pope et al., 1993; Swanson et al., 1996; Pope, 2000). A pressão contínua de caça ilegal e a diminuição progressiva do habitat levaram, segundo os critérios de Mace & Lande (1991), Tewes & Everett (1986), Tewes & Schmidly (1987) e IUCN (1995) a inclusão de todas as espécies de felídeos silvestres brasileiras a condição de ameaçadas de extinção. Segundo Swanson & Brown (2004), nos últimos dez anos, programas de conservação a partir de reprodução assistida destes felídeos, têm-se avolumado principalmente no Brasil, México e U.S.A. Recentemente resultados práticos, encorajadores, têm sido relatados envolvendo felinos silvestres como, por exemplo, o nascimento de um filhote de *Felis sylvestris lybica*, fruto de uma transferência interespecífica gestado em uma gata doméstica (Pope, 2000).

O desenvolvimento e adaptação de técnicas em reprodução assistida podem viabilizar a manutenção de uma variabilidade genética viável à sobrevivência de espécies selvagens hoje ameaçadas. (Ballou, 1992; Wildt et al., 1992; Wildt et al., 1993; Swanson et al., 1996).

3.4 CONCLUSÕES

1) O protocolo de 150 UI de eCG utilizado para indução da atividade ovariana, mostrou-se eficiente, visto que, 100% dos animais apresentaram sinais comportamentais de estro.

2) O protocolo de 100 UI de hCG com intervalo de 80-84h após a indução da atividade ovariana, , mostrou-se eficiente como indutor da ovulação, visto que 100% dos animais apresentaram corpos lúteos à laparotomia..

3) A taxa de recuperação dos embriões apresentou valores dentro dos padrões descritos na literatura, sendo a técnica desenvolvida de lavagem uterina transcornual, eficiente para a recuperação de todos os embriões.

4) O protocolo de transferência de embriões testado foi efetivo com gestação a termo, dentro dos padrões de duração e número de filhotes da espécie, em 50% dos animais receptores.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, E.C; Paula, T.A.R.; Coutinho, A.C.R.; Minami, A.; Araújo A.C. 2003. Avaliação do ciclo estral de gatas domésticas (*Felis catus*) através de colpocitologia. In: XIII Simpósio de Iniciação Científica, 2003, Viçosa. Anais, Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 2003, p.760.
- Ballou, J.D. (1992). Potential contribution of cryopreserved germ plasma to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology*, 29:19-25.
- Bowen, R. A. (1977) Fertilization in vitro of feline ova by spermatozoa from the ducts deferens. *Biology of Reproduction*, 17, 144-147.
- Bowen, R. A.; Olson, P. N.; Olson, J. D. & Nett, T. M. (1982) Concentration of reproductive hormones in canine serum throughout late anoestrus, proestrus and oestrus. *Biology of Reproduction*, 27, 1196-1206.
- Byers, A.P.; Barone, M.A.; Donoghue, M.; Wildt, D.E.1992.Mature domestic cat oocyte does not express a cortical granule-free domain. *Biology of Reproduction*, 47:709-715.
- Christiansen, I.J. 1988. Reprodução no cão e no gato. Ed.Manole Ltda, São Paulo.
- Cline, E.M., Jennings, L.L., Sojka, N.J.1980.Breeding laboratory cats during artificially induced oestrus. *Laboratory Animal Science*, 30: 1003-1005.
- Donoghue, A.M., Johnston, L.A., Munson, L. Brown, J.L., Wildt, D.E.1992. Influence of gonadotrophin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 46: 972-980.

- Donoghue, A. M.; Byers, A. P.; Johnston, L. A.; Armstrong, D.L.; Wildt, D.E. 1996. Timing of ovulation after gonadotrophin induction and its importance to successful intrauterine insemination in tiger (*Pantera tigris*) . Journal of Reproduction and Fertility, 107(1): 53-58.
- Dresser, B. L.; Gelwicks, E. J.; Wach, K. B.; Keeler, G.L.1988. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. Journal Exp. Zoo, 246(2): 180-186.
- Gómez, M.C.; Pope, E.C.; Harris, R. ; Mikota, S., Dresser, B.L. 2003. Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. Theriogenology, 60:239-251.
- Goodrowe, K.L; Howard, J.G; Schmidt, P.N; Wildt, D.E 1989. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. Journal of Reproduction and Fertility, Suppl. 39, 73-90.
- Goodrowe, K.L.; Wall, R.J.; O'brien, S.J.; Schmidt, P.M.S.; Wildt, D.E. 1988. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. Biology of Reproduction, 39: 355-372.
- Guimarães, M. A. de B. V., 2002. Biotecnologia aplicada aos animais silvestres: aspectos éticos e conservacionistas. Revista Brasileira Reprodução Animal, v.26: n.2, abr./jun. 2002.
- Greulich, W.W., 1934. Artificially induced ovulation in the cat (*Felis domestica*). The Anatomical Record, 58:3, 217-224
- Howard, J.G.; Barone, M.A.; Donoghue, A.M.; Wildt, D.E. 1992. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. Journal of Reproduction and Fertility, 96, 175-186.
- Howard, J.G. Assisted reproduction techniques in non-domestic carnivores.. In: Fowler M.E.& Miller R.E. Zoo and Wildlife medicine. Current Therapy 4, 61: 449-457 Ed. W.B. Saunders, United States of American, 1999.
- IETS, Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (1998). String fellow, D.A. Seidel, SM p. 109-140.
- IUCN International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (1995). Felid Conservation Assessment and Management Plan Global Captive Action

- Recommendations p 230 Compiled by the IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN.
- Jemmett, J. E. & Evans, J. M. 1977. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. *J. Small Anim. Pract.* 18, 31-37.
- Jewgenow, K.; Göritz, F. 1995. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterisation before and after culture. *Animal Reproduction Science*, 39, 285-297.
- Johnson, L.M.; Gay, V. L. 1981. Luteinizing hormone in the cat. Mating induced secretion. *Endocrinology*. 109(1): 247-252.
- Johnston, S.D.; Root, M.V. and Olson, P.N.S. (1996). Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. *Animal Reproduction Science*, 42: 261-274.
- Johnston, S.D.; Kustritz, M.V.R. and Olson, P.N.S. (2001). The feline oestrous cycle. *Canine and Feline Theriogenology*, 25: 396-405.
- Kanda, M.; Oikawa, H.; Nakao, H.; Tsutsui, T. 1995. Early embryonic development in vitro and embryo transfer in the cat. *Journal Veterinary Medicine Science*, 57:641-646.
- Karja, N.W.K.; Otoi, T.; Murakami M.; Fahrundin, M., Suzuki, T. 2002. *Theriogenology*, 57: 2289-2298.
- Kitiyant, Y., Saikhun, J., Pavasuthipaisit, K., 2003. Somatic cell nuclear transfer in domestic oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. *Theriogenology*, 59: 1775-1786.
- Kraemer, D.C.; Flow, B.L.; Schrivier, M.D.; Kinney, G.M.; Pennycook, J.W. 1979. Embryo transfer in the non human primate, feline and canine. *Theriogenology*.
- Leibo, S.P. and Songsasen, N., 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57: 303-326.
- Mace, G. M. and Lande, R. (1991). Assessing extinction threats: toward a revaluation of IUCN threatened species categories. *Conservation Biology*, 5, 148-157.
- Mattos, M.R.F.; Silva, T.F.P; Pereira, B.S.; Silva A.R.; Ferreira, M.A.L., Uchoa, D.C.; Cardoso, R.C.S.; Domingues, S.F.S.; Costa-Filho, J.C.; Silva, L.D.M., 2001. Embryo transfer in domestic cats: first success in Latin America. *Errata dos Anais do II Congresso Internacional de Medicina Felina – CIMFEL*, 14-17 de junho, Rio de Janeiro, pp. 2-3.

- Mattos, M.R.F. ; Mattos, L.S. ; Silva, L.D.M. 2003. Vaginal cytology in queens with estrous induced with equine chorionic gonadotrophin. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98(547), 135-138.
- Murakami, M. Otoi, T. Karja, N.W.K., Ooka, A., Suzuki, T. 2002. Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization. Swanson, W.F., Horohov, D.W., Godke, R.A., 1995. *Reproductive Dom. Animal*, 37, 352-356.
- Platz, C.C., Wildt, D.E., Seager, S.W.J. 1978. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52, 519-527.
- Pope, C. E.; Johnson, C.A.; McRae, M.A.; Keller, G. L.; Dresser B. L. 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Animal Reproduction Science*, 53, 221-236.
- Pope, C.E.; Keller, G.L.; Dresser, B.L. 1993. In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 47, 189-201.
- Pope, C.E. (2000). Embryo Technology in Conservation Efforts for Endangered Felids *Theriogenology*, 53, 1: 163-174.
- Roth, T. L., Swanson, W.F., Wildt, D.E. 1994. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro. *Biology of Reproduction*, 51: 441-451.
- Shille, V.M., Lundstrom, K.E., Stanbenfeldt G.H. 1979. Follicular function in the domestic cat as determinate by estradiol-17 β concentrations in plasma: Relation to estrous behaviours and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction*, 21: 953-963.
- Shille, V.M., Lundstrom, K.E., Stanbenfeldt G.H. 1979. Follicular function in the domestic cat as determinate by estradiol-17 β concentrations in plasma: Relation to estrous behaviours and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction*, 21: 953-963.
- Skrzyszowska, M., Katska, L. Rynska, B., Kania, G. Smorag, Z., Pienkowski, M., 2002. In vitro developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. *Theriogenology* 58, 1615-1621.

- Swanson, W.F. & Godke, R.A., 1994. Transcervical embryo transfer in the domestic cat. *Laboratory Animal Science*, 44(3):288-291.
- Swanson, W.F.; Roth, T.L.; Wildt, D.E. 1994. In vivo embryogenesis, embryo migration and embryonic mortality in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 51: 452-464.
- Swanson, W.F., Horohov, D.W., Godke, R.A., 1995. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 105: 35-41.
- Swanson, W.F., Howard, J.G.; Roth, T.L.; Brown, J.L.; Alvarado, T.; Burton, M.; Starnes, D. Wildt, D.E. 1996. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotropins and laparoscopic insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 106, 87-94.
- Tewes, M. E. and Everett, D. D. (1986). Status and distribution of the endangered ocelot and jaguarondi in Texas. In *Cats of the World: Conservation and Management*, pp 147-158 Eds SD Miler and DD Everett. National Wildlife Federation, Washington DC.
- Tsutsui, T.; Sakai, Y.; Matsui, Y.; Sato M.; Yamane, I.; Murao, I.; Stabenfeldt, G.H., 1989. Induced ovulation in cats using porcine pituitary gland preparation during the non-breeding season. *Japanese Journal Veterinary Science*, 51(4): 677-683.
- Tsutsui, T.; Yamane, I.; Hattori, I., Kurossawa, N.; Matsunaga, H.; Murao, I.; Kanda, M., Hori, T., 2000. Feline embryo transfer during the non-breeding season. *Journal Veterinary Medicine Science*, 62:1169-1175.
- Verhage, H.G., Beamer, N.B., Brenner, R.M. 1976. Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregnancy. *Biology of Reproduction*, 14: 579-585.
- Wildt, D.E., Seager, S.W.J. 1978. Ovarian response in the estral cat receiving varying doses of hCG. *Hormonal Research* 9: 144.
- Wildt, D.E., Seager, S.W.J, Chakraborty, P.K. 1980. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology*. 107:212.

- Wildt, D.E.; Monfort, S.L.; Donoghue, A.M.; Johnston L.A; Howard, J.G. 1992. Embryogenesis in conservation biology-or how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*, 37, 161-184.
- Wildt, D. E.; Seal, U. S. and Rall, W. F. (1993a) Genetic resource banks and reproductive technology for wildlife conservation. In *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*. pp 159-173 Eds JG Cloudand GH Thorgaard. Plenum Press, New York.
- Wood, T.C., Byers, A.P., Jenette, B.E., Wildt, D.E. 1995. Influence of protein and hormone supplementation on in vitro maturation and fertilization of domestic cat eggs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 104: 315-323.