

Inseminação artificial em gatos domésticos utilizando sêmen criopreservado¹

Artificial insemination in domestic cats using cryopreserved semen

Ana Izabel Silva Balbin Villaverde², Maria Denise Lopes

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP

Distrito de Rubião Jr., Botucatu, SP, CEP. 18618-000

²Correspondência: anavillaverde@fmvz.unesp.br

Resumo

Nas últimas décadas, um número expressivo de novas técnicas de reprodução assistida como; inseminação artificial (IA), transferência de embrião, fertilização *in vitro*, micromanipulação de gametas e embriões, sexagem de embriões e sêmen e transferência nuclear de célula somática vêm sendo desenvolvidas para os gatos domésticos. A aplicação desses avanços na área de reprodução assistida visa não apenas os gatos domésticos, mas principalmente os programas *in situ* e *ex situ* de conservação das espécies de felinos ameaçadas de extinção, com a finalidade de se obter mais filhotes de pais selecionados, assim, garantindo a variabilidade genética e reduzindo o intervalo entre as gerações. Nesse contexto, a utilização do sêmen criopreservado apresenta grande aplicabilidade, uma vez que permite o armazenamento do material genético por tempo indeterminado, desta forma, possibilitando a criação de um banco de recurso genético. Contudo, as taxas de prenhez obtidas após IA com sêmen criopreservado em gatos domésticos ainda são baixas, sendo influenciadas pelo local de deposição do sêmen no interior do trato reprodutivo da fêmea, pelo momento da IA em relação ao desencadeamento da ovulação e pela quantidade de espermatozoides móveis por IA. Esta revisão tem por objetivo apresentar importantes fatores relacionados à técnica de IA nos gatos domésticos com ênfase na utilização de sêmen criopreservado, tais como; local de deposição do sêmen, métodos de indução da ovulação, momento da IA, influência da sedação das gatas no sucesso do procedimento de IA e quantidade de espermatozoides móveis por IA.

Palavras-chave: gato doméstico, inseminação artificial, sêmen criopreservado, indução da ovulação.

Abstract

Within the last decades, a series of new assisted reproductive techniques such as; artificial insemination (AI), embryo transfer, in vitro fertilization, gamete/embryo micromanipulation, semen/embryo sexing and somatic cell nuclear transfer has been develop for the domestic cat. Application of the assisted reproductive improvements aims not only the domestic cat, but especially the in situ and ex situ conservation programs for feline species threatened by extinction, with the purpose to obtain more offspring from selected parents, thus, ensuring genetic diversity and reducing the interval between generations. In this context, the use of cryopreserved semen shows great applicability, once it allows the genetic material storage for an indeterminate period, this way, making possible the establishment of a genetic resource bank. However, pregnancy rates obtained following an AI procedure with cryopreserved semen in domestic cats are still low, being influenced by semen deposition site in the female reproductive tract, by AI moment in relation to ovulation occurrence and by the number of motility spermatozoa per AI. The objective of this review is to present important factors related to the AI technique given emphasis to the use of cryopreserved semen, such as; semen deposition site, ovulation induction methods, AI moment, influence of queen's sedation on the success of AI procedure and motility spermatozoa quantity per AI.

Keywords: domestic cat, artificial insemination, cryopreserved semen, ovulation induction.

Introdução

Os gatos domésticos (*Felis catus*), por serem animais de companhia, não apresentam a finalidade de multiplicação da população como é observada em outras espécies de animais de produção. Atualmente, o controle populacional de cães e gatos através de métodos anticoncepcionais vem sendo extensivamente discutido, principalmente, nos grandes centros urbanos. Apesar desse fato, e devido a diversos fatores como; problemas comportamentais, físicos, de distância entre os reprodutores ou maior aproveitamento de animais com boa genética racial, as biotécnicas da reprodução vêm ocupando um papel discreto em gatis comerciais e, especialmente, de pesquisa; onde os gatos podem servir como modelo experimental para 36 anormalidades e

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

defeitos metabólicos homólogos a doenças humanas (Migaki, 1982). Não obstante, devido a semelhanças fisiológicas com os demais membros da família felídea, facilidade de manejo e maior número de exemplares, o gato doméstico é um importante modelo experimental para os felinos selvagens ameaçados de extinção, especialmente, nas pesquisas ligadas às biotécnicas da reprodução.

Das 37 espécies de felídeos, com exceção apenas do gato doméstico, todas estão ameaçadas de extinção, segundo a Convenção de Tráfico Internacional de Espécies Ameaçadas (CITES, 1973). Como consequência da redução do número de animais e destruição do *habitat*, os felinos selvagens ficam sujeitos ao isolamento e, assim, a diminuição da variabilidade genética que leva a redução da fertilidade, maior susceptibilidade às doenças e elevação da mortalidade infanto-juvenil (Ballou, 1992; Wildt *et al.*, 1995). Nesse contexto, os programas de conservação *in situ* e *ex situ* para essas espécies podem ser beneficiadas com a utilização das técnicas de reprodução assistida, incluindo; inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), fertilização *in vitro* (FIV), micromanipulação de gametas/ embriões, sexagem espermática e clonagem. Uma das principais aplicações da IA na conservação dessas espécies é evitar a depressão genética causada pela fragmentação de grupos em vida livre, também podendo ser utilizada para contornar problemas físicos ou comportamentais e para evitar o transporte de animais para fins de acasalamento (Pukazhenthil e Wildt, 2004).

A utilização do sêmen congelado/ descongelado apresenta, indubitavelmente, maior aplicabilidade para os programas de conservação de animais selvagens, pois permite o armazenamento por tempo indeterminado e, assim, a realização de um banco genético e também o transporte do material por longas distâncias, apesar de resultar em piores taxas de prenhez e necessitar de maior quantidade de espermatozoides quando comparado ao sêmen fresco (Howard *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 2000; Tsutsui *et al.*, 2000a,b). A perda da capacidade fertilizante do sêmen descongelado nos felinos se deve em parte a uma queda acentuada na qualidade do sêmen devido, principalmente, a danos causados nas membranas plasmáticas e acrossomais (Pukazhenthil *et al.*, 1999; Leibo e Songsasen, 2002), uma vez que estas estruturas são sensíveis ao processo de congelação/ descongelação.

Quanto a utilização das gonadotrofinas exógenas, necessária para o processo de IA na maioria dos felinos, são enfrentados problemas decorrentes de fatores como a hiperestimulação ovariana (Howard *et al.*, 1992; Donoghue *et al.*, 1992; Swanson *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 2000) e diferenças na sensibilidade a estimulação hormonal entre as espécies de felinos (Swanson e Brown, 2004). Desta forma, o sucesso da inseminação artificial com sêmen congelado em felinos é um duplo desafio, pois além da notável queda na fertilidade da amostra de sêmen após descongelação, a indução hormonal do estro e/ou ovulação nas fêmeas ainda não está completamente estabelecida.

Inseminação artificial

O primeiro resultado de prenhez após IA em mamíferos foi obtido em cadelas no ano de 1784 (Spallanzani, 1784 citado por Foote, 2002). Em gatos domésticos, a primeira prenhez após IA foi relatada em 1970 por Sojka *et al.*, que utilizaram sêmen fresco e inseminação artificial intra-vaginal (IAIV). Após seis anos, Platz *et al.* (1976) reportaram o nascimento de filhotes utilizando sêmen congelado e IAIV. Em 1992, foi realizada a primeira inseminação artificial intrauterina (IAIU) (Howard *et al.*, 1992). Até o momento, existem poucos estudos a respeito da técnica de IA em gatos domésticos (Tab. 1), sendo que não há nenhum relato com a utilização de sêmen refrigerado.

Local de deposição do sêmen

O local de deposição do sêmen na monta natural ou na IA determina as barreiras anatômicas que os espermatozoides terão que transpor durante o seu trânsito até o local de fertilização. Nos gatos domésticos, ainda não foi determinado o exato local de deposição do sêmen após a monta natural. Devido a características anatômicas como; tamanho do pênis ereto do gato (comprimento de 21,2 +/- 2,2 mm e largura de 5,1 +/- 0,5 mm), profundidade da vagina na gata (45 a 50 mm) e lúmen de apenas 1 mm na vagina anterior, a qual é constituída de tecido não flexível, acredita-se que o sêmen seja depositado de 15 a 20 mm caudal a cérvix, na vagina posterior (Watson e Glover, 1993; Swanson e Godke, 1994).

Para a IA nas gatas, o sêmen pode ser depositado no fundo de vagina (Sojka *et al.*, 1970; Platz *et al.*, 1978; Tanaka *et al.*, 2000), no útero (Howard *et al.*, 1992; Tsutsui *et al.*, 2000a, b; 2003) ou até mesmo na tuba-uterina (Tsutsui *et al.*, 2001). O local de deposição do sêmen tem grande influência sobre o sucesso na obtenção de prenhez após a IA, principalmente, quando se utiliza o sêmen congelado/ descongelado, uma vez que o tempo de sobrevivência destes espermatozoides é, significativamente, menor quando comparado ao sêmen fresco.

Quando o sêmen é depositado no fundo de vagina pela técnica de IAIV, existe mais uma barreira a ser transposta, a cérvix, que juntamente com suas secreções tem a função de filtração, prevenindo que espermatozoides morfológicamente anormais possam chegar ao local de fertilização (Freundl *et al.*, 1988). Após a monta natural, foi observado que aproximadamente 70% do sêmen permanece retido na vagina das gatas

domésticas (Chatdarong *et al.*, 2004). Desta forma, considerando-se que existe uma alta incidência de teratospermia entre as espécies de felinos (Howard *et al.*, 1991; Wildt *et al.*, 1992) e que o sêmen descongelado apresenta grande perda de sua qualidade, com alterações nos padrões de movimento (Tsutsui *et al.*, 2000b; Villaverde *et al.*, 2007, comunicação pessoal), o método de deposição do sêmen mais próximo ao local de fertilização pode resultar em melhores índices de prenhez, [0% contra 75% (Villaverde *et al.*, 2007, comunicação pessoal). Outra vantagem da deposição do sêmen diretamente no interior do útero é a necessidade de uma menor quantidade de espermatozóides comparada a IAIV quando se trabalha com o sêmen fresco ou descongelado (Tab. 1).

Tabela 1. Taxas de prenhez em gatas domésticas utilizando as técnicas de inseminação artificial intra-vaginal, intrauterina e no interior da tuba uterina com sêmen congelado ou fresco.

Local de inseminação	Sêmen	Dose inseminante (10 ⁶)	Volume inseminante (µL)	Estro	Momento da IA após hCG (horas)	Taxa de concepção (%)	Referência
Intra-vaginal	Fresco ejaculado)	1,25 a 50	100	Natural	24 a 41	50	Sojka <i>et al.</i> , 1970
Intra-vaginal	Fresco (ejaculado)	5	100	Natural	0 e 24	75	Sojka <i>et al.</i> , 1970
Intra-vaginal	Fresco (ejaculado)	80	50 a 100	Natural	15 a 30	77,8	Tanaka <i>et al.</i> , 2000
Intra-vaginal	Congelado (ejaculado)	50 a 100	100	Natural ou Induzido (FSH)	24 e 48	10,6	Platz <i>et al.</i> , 1978
Intrauterino Bilateral	Fresco (ejaculado)	6,6	200	Induzido (eCG)	25 a 33 (Pré ovulação)	14,3	Howard <i>et al.</i> , 1992
Intrauterino Bilateral	Fresco (ejaculado)	6,6	200	Induzido (eCG)	31 a 50 (Após ovulação)	50	Howard <i>et al.</i> , 1992
Intrauterino Unilateral	Fresco (ejaculado)	8	30	Natural	15 a 30	80	Tsutsui <i>et al.</i> , 2000a
Intrauterino Unilateral	Congelado (ejaculado)	50	30	Natural	15 a 20	57,1	Tsutsui <i>et al.</i> , 2000b
Intrauterino Unilateral	Congelado (epidídimo)	50	40	Natural	20	27,3	Tsutsui <i>et al.</i> , 2003
Tuba-uterina Bilateral	Fresco (ejaculado)	4	10 a 20	Natural	15 a 20	42,9	Tsutsui <i>et al.</i> , 2001

Durante a realização da IAIV, a sonda de inseminação deve ser posicionada o mais próximo possível da abertura cervical. Observou-se que o cateter uretral rígido para gatos, com diâmetro de 1 mm, é fino o suficiente para ultrapassar a vagina anterior e chegar até próximo à cérvix (Zambelli *et al.*, 2004). Chatdarong *et al.* (2002), através da deposição de meio de contraste no fundo de vagina, verificaram que o posicionamento da gata em decúbito dorsal com o posterior elevado em 30° facilita a infusão do contraste da vagina para o interior do útero.

Existem várias técnicas de IAIU tais como; a laparotomia (Tsutsui *et al.*, 2000a, b; Tsutsui *et al.*, 2003), a laparoscopia (Howard *et al.*, 1992) e também a técnica de cateterização trans-cervical (Zambelli e Cunto, 2005). A inseminação artificial trans-cervical, além de não necessitar de cirurgia, também apresenta as mesmas vantagens das demais técnicas de IAIU. Vários modelos de sondas foram propostos para a técnica trans-cervical (Hurlbut *et al.*, 1988; Swanson e Godke, 1994; Chatdarong *et al.*, 2001; Zambelli e Castagnetti, 2001), contudo, devido a variações anatômicas entre as gatas, o sucesso na passagem da sonda pela cérvix é extremamente variável [70,6% (Hurlbut *et al.*, 1988), 87,5% (Swanson e Godke, 1994), 76,5% (Chatdarong *et al.*, 2001) e 50% (Zambelli e Castagnetti, 2001)]. Zambelli *et al.* (2004) também observaram que existe diferença nas taxas de sucesso na cateterização trans-cervical entre gatas com estro espontâneo (22%) e gatas com estro induzido durante o anestro (80%). Desta forma, essa variação no sucesso da passagem da sonda pela cérvix constitui uma importante desvantagem desta técnica de IA nas gatas domésticas.

Indução da ovulação

O estímulo mecânico originado pelo coito nas gatas domésticas é indispensável para que ocorra o desencadeamento da ovulação (Wildt *et al.*, 1980), contudo este estímulo está ausente na técnica de IA. Desta forma, são necessários estímulos mecânicos ou hormonais para o desencadeamento da ovulação. A maturação final dos folículos e ovulação podem ser induzidos com a aplicação de GnRH (Chakraborty *et al.*, 1979), hCG (Sojka *et al.*, 1970; Platz *et al.*, 1978; Howard *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 2000; Tsutsui *et al.*, 2000a, b) ou LH (Pope *et al.*, 2006). A indução da ovulação também pode ser realizada através de estimulação mecânica da vagina com um *swab* de algodão ou haste de vidro (Feldman e Nelson, 1996) ou com o uso de um macho vasectomizado (Platz *et al.*, 1978). Nas gatas domésticas, a indução da ovulação a partir do segundo dia do estro mostrou-se mais eficiente (Donoghue *et al.*, 1993).

Tanaka *et al.* (2000), trabalhando com gatas do segundo ao quarto dia do estro natural, obtiveram 100% de ovulações com 100 UI de hCG em duas doses com intervalo de 24 horas e de 91,7% com 250 UI de hCG em dose única. Comparando a utilização de 75 ou 100 UI em dose única do hCG, Howard *et al.* (1992) não encontraram diferenças na porcentagem de ovulações, no número de corpos lúteos (CLs) detectados no momento da IA, na taxa de prenhez e nem no número e qualidade de embriões recuperados após seis dias. Por sua vez, o GnRH quando utilizado na dose de 25 µg em dose única resultou em 100% de gatas apresentando ovulação (Chakraborty *et al.*, 1979).

Momento da inseminação artificial

A ovulação nas gatas é desencadeada de 26 a 29 horas após sua indução através de hormônios ou estimulação mecânica (Sojka *et al.*, 1970; Shille *et al.*, 1983). Levando-se em consideração que nas gatas a prenhez pode ocorrer após uma única cópula, pode-se deduzir que o sêmen do gato apresenta duração de no mínimo 26 a 29 horas, ou seja, até que ocorra a ovulação. Sojka *et al.* (1970) demonstraram que a IA ou a monta natural podem resultar em prenhez quando realizadas até 49 horas após a indução da ovulação. Adicionalmente, quando se pretende realizar a IAIV ou a IAIU pelo método trans-cervical, deve-se levar em consideração que na gata a cérvix permanece aberta do meio ao final do estro, com pequena variação individual (Chatdarong *et al.*, 2002) e, desta forma, a IA deve ser realizada preferencialmente durante este período e dentro de 49 horas após indução da ovulação.

Geralmente, é utilizada apenas uma única IA, principalmente, quando esta envolve anestesia e cirurgia, embora tenha sido demonstrado que a realização de duas inseminações com 24 horas de intervalo pode levar a um aumento de 50% na taxa de concepção na técnica de IAIV com sêmen fresco (Sojka *et al.*, 1970). Já para o sêmen descongelado, uma taxa de prenhez de 10,6% (Platz *et al.*, 1978) foi alcançada após duas IAIV com intervalo de 24 horas contra 0% quando utilizada apenas uma IAIV após 30 horas da indução da ovulação (Villaverde *et al.*, 2007, comunicação pessoal).

Sedação das fêmeas

A sedação das gatas é indispensável para a realização da IAIU, uma vez que este procedimento requer um ato cirúrgico ou passagem de uma sonda pela cérvix. Já para a IAIV, embora a sedação não seja essencial, esta facilita o posicionamento da sonda de inseminação e evita a ocorrência da reação pós-coito, a qual é resultante da estimulação intra-vaginal induzida pela sonda. Howard *et al.* (1992) observaram que a anestesia pode comprometer o processo de ovulação quando a sedação é realizada previamente ao desencadeamento da mesma, aumentando o número de folículos não ovulados e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de CLs formados. Nesse mesmo estudo, a taxa de concepção anteriormente a ovulação foi menor (14%) quando comparada à taxa obtida com a IA após a ovulação (50%) (Howard *et al.*, 1992). Em contrapartida, Tsutsui *et al.* (2000a) utilizando o mesmo protocolo de anestesia não observaram interferência da sedação sobre a indução da

ovulação e melhores resultados de prenhez foram obtidos após IAIU previamente à ovulação, embora, neste estudo tenha sido utilizada uma dose de hCG superior quando comparada a dose usado por Howard *et al.* (1992) para induzir a ovulação.

A utilização da anestesia em tigresas para o procedimento de IAIV causou uma queda no transporte dos espermatozoides no interior do útero, sugerindo que a anestesia pode reduzir a motilidade uterina e comprometer a habilidade do espermatozoide em atingir o local de fertilização (Wildt *et al.*, 1987). Embora existam indícios de que não há interferência da anestesia no transporte espermático pelo trato reprodutivo da gata (Tanaka *et al.*, 2000), não existe ainda nenhum estudo determinando a sua real influência.

Em animais como os coelhos, a fase rápida do transporte espermático é considerada um processo passivo, causada por contrações vaginais e uterinas que podem ser bloqueadas por antagonistas adrenergéticos (Overstreet e Tom, 1982). Em gatas domésticas, observou-se que, após 30 minutos da monta natural, 1,3 % dos espermatozoides já se encontravam na tuba uterina (Chatdarong *et al.*, 2004). Embora se conheça pouco a respeito do processo de transporte espermático nas gatas, talvez a monta natural, da mesma forma que é importante para desencadear a reação pós-coito, possa também ter um papel importante na estimulação da contratilidade do trato reprodutivo, auxiliando no transporte rápido dos espermatozoides.

Quantidade de espermatozoides por inseminação

No método de IAIV, a utilização de uma dose inseminante de 80×10^6 de espermatozoides móveis proporcionou um índice de 80% de prenhez com o sêmen fresco (Tanaka *et al.*, 2000). Em contrapartida, usando também sêmen fresco, Sojka *et al.* (1970) obtiveram uma taxa de prenhez de 75% utilizando apenas 5×10^6 de espermatozoides móveis em duas inseminações com intervalo de 24 horas. Já para o sêmen descongelado, uma taxa de 10,6% de prenhez foi obtida após duas inseminações, com intervalo de 24 horas, usando de 50 a 100×10^6 de espermatozoides móveis (Platz *et al.*, 1978).

Para a IAIU, foi observado que para o sêmen fresco uma dose inseminante de 8×10^6 de espermatozoides móveis, ou seja, dez vezes menor que a necessária para a IAIV, é suficiente para se obter um índice de 77,8% de prenhez (Tsutsui *et al.*, 2000a). Para o sêmen descongelado, Tsutsui *et al.* (2000b) obtiveram uma taxa de 57,1% utilizando em média $12,5 \times 10^6$ de espermatozoides móveis e inseminação unilateral. A utilização de 40×10^6 de espermatozoides móveis, divididos entre os dois cornos uterinos, resultou em uma taxa de 75% de prenhez (Villaverde *et al.*, 2007, comunicação pessoal).

Considerações finais

A técnica de IAIV, apesar de não necessitar de um procedimento cirúrgico, apresenta melhores resultados de prenhez quando se utiliza o sêmen fresco e em grande quantidade. Para o sêmen descongelado, mesmo com a utilização de duas IAIV e grande quantidade de espermatozoides, o índice de prenhez é inferior quando comparado ao obtido com sêmen fresco. Fatores como menor longevidade das células descongeladas e barreira da cérvis aos espermatozoides anormais e com baixa motilidade são importantes causas desse baixo sucesso após a IAIV utilizando o sêmen descongelado.

Visando melhores índices de prenhez após IAIV com sêmen descongelado, a realização de duas ou mais inseminações dentro de um intervalo de 24 horas e com grande quantidade de espermatozoides por inseminação pode aumentar o sucesso desta técnica. Contudo, esse protocolo leva a consequências indesejáveis como excesso de manipulação e necessidade de repedidas sedações dos animais, principalmente, quando se trabalha com animais selvagens e, também, necessidade de grande quantidade de espermatozoides, desta forma tornando essa técnica inviável na prática. Assim, apesar de algumas desvantagens como; necessidade de procedimento cirúrgico ou aquisição de aparelhos específicos, a IAIU é, certamente, o método de eleição quando se trabalha com sêmen descongelado, uma vez que oferece melhores resultados de prenhez.

Não obstante, quando se pretende a transferência dessas técnicas de IA para os felinos selvagens, é importante considerar algumas particularidades como o fato de muitos felinos selvagens ejacularem relativamente baixas concentrações de espermatozoides com alta quantidade de formas anormais (Wildt *et al.*, 1983; Howard *et al.*, 1984, 1990, 1991) e também de haver uma redução na capacidade de migração pelo trato reprodutivo da fêmea por parte desses espermatozoides morfológicamente anormais, comprometendo a transposição da barreira cervical. Desta forma, a utilização das técnicas de IAIU possibilita que uma quantidade maior de espermatozoides seja depositada próximo ao local de fertilização, aumentando a chance de sucesso nas taxas de prenhez.

Referências

Ballou JD. Potencial contribution of cryopreserved germ plasm to, the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology*, v.29, p.19-25, 1992.



- Chakraborty PK, Wildt DE, Seager SWJ.** Serum luteinizing hormone and ovulatory response to luteinizing hormone releasing hormone in the estrous and anestrus cat. *Lab Anim Sci*, v.29, p.338-344, 1979.
- CITES.** Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) of Wild Flora and Fauna, part of the Endangered Species. Act (PL 93-205, 93rd Congress) and in 50 appendices. 1973. In: Code of Federal Regulations. Washington, DC; US Government Printing Office, 1973. part 23.
- Chatdrong K, Kampa N, Axner E, Linde-Forsberg C.** Investigation of cervical patency and uterine appearance in domestic cats. *Reprod Dom Anim*, v.37, p.275-281, 2002.
- Chatdrong K, Lohachit C, Linde-Forsberg C.** Distribution of spermatozoa in the female reproductive tract of the domestic cat in relation to ovulation induced by natural mating. *Theriogenology*, v.62, p.1027-1041, 2004.
- Chatdrong K, Lohachit C, Ponglowhapam S, Linde-Forsberg C.** Transcervical catheterization and cervical patency during the estrus cycle in domestic cat. *J Reprod Fertil Suppl*, n.57, p.353-356, 2001.
- Donoghue AM, Johnston LA, Goodrowe KL, O'Brien SJ, Wildt DE.** Influence of day of oestrus on egg viability and comparative efficiency of in vitro fertilization in domestic cats in natural or gonadotrophin-induced oestrus. *J Reprod Fertil*, v.98, p.85-90, 1993.
- Donoghue AM, Johnston LA, Munson L, Brown JL, Wildt DE.** Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol Reprod*, v.46, p.972-980, 1992.
- Feldman EC, Nelson RW (Ed.).** *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Philadelphia: WB Saunders, 1996. 785p.
- Footte RH.** The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci Electr Suppl* 2, 2002. Disponível em <http://www.asas.org/symposia/esupp2/Footehist.pdf>. Acesso em 20 jan. 2006.
- Freundl G, Grimm HJ, Hofmann N.** Selective filtration of abnormal spermatozoa by the cervical mucus. *Hum Reprod*, v.3, p.277-280, 1988.
- Graham LH, Swanson WF, Brown JL.** Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. *Theriogenology*, v.54, p.1117-1131, 2000.
- Howard JG, Barone MA, Donoghue AM, Wildt DE.** The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cat. *J Reprod Fertil*, v.96, p.175-186, 1992.
- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE.** Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones and improvement of spermatozoal motility and morphology after swimming up processing. *J Androl*, v.11, p.204-215, 1990.
- Howard JG, Bush M, Hall LL, Wildt DE.** Morphological abnormalities in spermatozoa of 28 species of nondomestic felids. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 10, 1984, Urbana-Champaign, USA. *Proceedings...* Urbana-Champaign: ICAR, 1984. v.2, p.57-59.
- Howard JG, Bush M, Wildt DE.** Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *J Androl*, v.12, p.36-45, 1991.
- Hurlbut SL, Bowen MJ, Kraemer DC.** The feasibility of transcervical catheterization and nonsurgical embryo collection in the domestic cat. *Theriogenology (abstracts)*, v.29, p.264, 1988.
- Leibo SP, Songsasen N.** Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, v.49, p.1537-1543, 2002.
- Migaki G.** Compendium of inherited metabolic diseases in animals. *Prog Clin Biol Res*, v.94, p.473-501, 1982.
- Overstreet JW, Tom RA.** Experimental studies of rapid sperm transport in rabbits. *J Reprod Fertil*, v.66, p.601-606, 1982.
- Platz Jr CC, Follis T, Demorest N, Seager S.** Semen collection, freezing and insemination in the domestic cat. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 8, 1976, Kracow, Poland. *Proceedings...* Kracow: ICAR, 1976. p.1053-1055.
- Platz CC, Wildt DE, Seager SWJ.** Pregnancy in domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.52, p.279-282, 1978.
- Pope CE, Gomez MC, Dresser BL.** In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. *Theriogenology*, v.66, p.1518-1524, 2006.
- Pukazhenthhi B, Pelican K, Wildt DE, Howard JG.** Sensivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biol Reprod*, v.61, p.135-141, 1999.
- Pukazhenthhi B, Wildt DE.** Which reproduction technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.33-46, 2004.
- Shille VM, Munro C, Famer SW, Papkoff H, Stabenfeldt GH.** Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *J Reprod Fertil*, v.69, p.29-39, 1983.
- Sojka NJ, Jennings LL, Hamner CE.** Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). *Lab Anim Care*, v.20, p.198-204, 1970.

- Swanson WF, Brown JL.** International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.21-34, 2004.
- Swanson WF, Godke RA.** Transcervical embryo transfer in the domestic cat. *Lab Anim Sci*, v.44, p.288-291, 1994.
- Swanson WF, Graham K, Horohov DW, Thompson DL, Godke RA.** Ancillary follicle and secondary corpora lutea formation following exogenous gonadotropin treatment in the domestic cat and effect of passive transfer of gonadotropin-neutralizing antisera. *Theriogenology*, v.45, p.561-572, 1996.
- Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Hori T, Tsutsui T.** Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. *J Vet Med Sci*, v.62, p.1163-1167, 2000.
- Tsutsui T, Tanaka A, Hori T.** Intratubal insemination with fresh semen in cats. *J Reprod Fertil Suppl*, n.57, p.347-351, 2001.
- Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T.** Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. *J Vet Med Sci*, v.62, p.1241-1245, 2000a.
- Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T.** Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci*, v.62, p.1247-1251, 2000b.
- Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T.** Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci*, v.65, p.397-399, 2003.
- Watson PF, Glover TE.** Vaginal anatomy of the domestic cat (*Felis catus*) in relation to copulation and artificial insemination. *J Reprod Fertil Suppl*, n.47, p.355-359, 1993.
- Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ.** Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol Reprod*, v.29, p.1019-1025, 1983.
- Wildt DE, Monfort SL, Donoghue AM, Johnston LA, Howard J.** Embryogenesis in conservation biology – or how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*, v.37, p.161-184, 1992.
- Wildt DE, Phillips LG, Simmons LG, Goodrowe KL, Howard JG, Brown JL, Bush M.** Seminal-endocrine characteristics of the tiger and the potential for artificial breeding. In: Tilson RL, Seal US (Ed.). *Tigers of the world: the biology, biopolitics, management, and conservation of an endangered species*. Berkshire, UK: Noyes Publication, 1987. p.255-279.
- Wildt DE, Pukazhenthi B, Brown J, Monfort S, Howard J, Roth T.** Spermatology for understanding managing and conserving rare species. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.811-824, 1995.
- Wildt DE, Seager SWJ, Chakraborty PK.** Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology*, v.107, p.1212-1217, 1980.
- Zambelli D, Castagnetti C.** Transcervical insemination with fresh or frozen semen in the domestic cat: new technique and preliminary results. In: Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), 5, 2001, Vienna, Austria. *Proceedings...* Vienna: ESDAR, 2001. p.34. Abstract.
- Zambelli D, Buccioli M, Castagnetti C, Belluzzi S.** Vaginal cervical anatomic modification during the oestrus cycle in relation to transcervical catheterization in the domestic cat. *Reprod Dom Anim*, v.39, p.76-80, 2004.
- Zambelli D, Cunto M.** Transcervical artificial insemination in the cat. *Theriogenology*, v.64, p.698-705, 2005.