



Reprodução assistida em felídeos selvagens – uma revisão

Assisted reproduction in wild felids – a review

T. Micheletti¹, Z.S. Cubas², W. Moraes², M.J. Oliveira², L.E. Kozicki¹, R.R. Weiss¹, N. Moreira³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

²Itaipu Binacional, Refúgio Biológico Bela Vista, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

³Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, Palotina, PR, Brasil.

Correspondência: tati_micheletti@yahoo.com.br

Resumo

A reprodução em cativeiro é uma das ferramentas para a conservação *ex situ* de felídeos selvagens que, em sua maioria, estão ameaçados de extinção. Esforços em diversas frentes estão sendo feitos para evitar o desaparecimento desses carnívoros em todo o mundo. Para se obter sucesso na conservação dessas espécies, no entanto, é necessário ampliar o conhecimento sobre os aspectos da reprodução delas, assim como aprimorar as técnicas empregadas em sua reprodução assistida de modo a transpor as dificuldades e limitações de cada uma dessas técnicas. O objetivo desta revisão é compilar as informações disponíveis sobre os aspectos reprodutivos da família *Felidae* e as biotécnicas reprodutivas aplicáveis a essas espécies.

Palavras-chave: reprodução em cativeiro, fertilização *in vitro*, felídeos, inseminação artificial.

Abstract

Reproduction in captivity has been presented as a tool to ex situ conservation of wild felids that are, mostly, threatened with extinction. Efforts in several fronts are being made to avoid disappearance of these carnivores around the world. However, to achieve success in the conservation of these species it is necessary to extend our knowledge about the aspects of felid reproduction, as well as improve the techniques employed in assisted reproduction to overcome the difficulties and limitations of these techniques. This review aimed to compile the information available on the reproductive aspects of the family Felidae and reproductive biotechnology for these species.

Keywords: Captive reproduction, *in vitro* fertilization, felids, artificial insemination.

Introdução

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

A reprodução natural de espécies ameaçadas de extinção, utilizando-se o manejo genético populacional, é a forma mais simples de se manter a diversidade genética em pequenas populações cativas. Porém, a reprodução natural pode ser comprometida por vários fatores, sendo a mais relevante o estresse crônico ao qual os animais estão sujeitos quando em cativeiro. Essa condição crônica de estresse é denominada distresse (do inglês *distress*; Carlstead e Shepherdson, 1994) e não há dúvida de que esse desequilíbrio prejudica a reprodução natural dos animais (Moberg, 2000). Para transpor tais limitações inerentes à reprodução natural, é necessário utilizar as modernas técnicas de reprodução assistida que permitem melhorar os índices reprodutivos e manter a variabilidade genética em pequenas populações de animais cativos.

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

O principal obstáculo para o sucesso da reprodução assistida em felídeos silvestres, principalmente nas espécies de pequeno porte, são os conhecimentos ainda limitados sobre o comportamento e a fisiologia das espécies pertencentes a essa família (Brown, 2006; Andrabi e Maxwell, 2007; Swanson, 2007). É imprescindível dispor, por exemplo, de informações confiáveis sobre sazonalidade reprodutiva, ciclo estral, sensibilidade ovariana, maturidade, senilidade reprodutiva e tipo de ovulação (Brown, 2006; Swanson, 2007).

Esta revisão aborda os aspectos reprodutivos da família *Felidae* e o estado da arte das técnicas de reprodução assistida, suas limitações e aplicações para essas espécies, com o objetivo de compilar as informações disponíveis sobre essa família.

Aspectos da reprodução

Monitoramento hormonal

O monitoramento hormonal é indispensável nas pesquisas em reprodução, pois fornece informações sobre a fisiologia reprodutiva das espécies e a condição fisiológica do animal estudado. Ter conhecimento sobre o nível de atividade ovariana de uma fêmea, se esta apresenta ou não ciclos hormonais regulares, em que fase do ciclo estral esta se encontra, os níveis de concentrações hormonais circulantes, além de informações sobre as concentrações de andrógenos em machos, é essencial para o sucesso da reprodução assistida. O tipo de monitoramento hormonal para animais silvestres preferencialmente utilizado no momento é baseado em técnicas não invasivas, ou seja, que empregam ensaios imunológicos para quantificar hormônios em fezes, urina e saliva (Graham, 2004).

O imunoensaio começou a ser utilizado em felídeos silvestres no início da década de 90 (Brown et al., 1994), e diversas inovações têm surgido desde então, tanto nos protocolos como nos materiais e equipamentos utilizados (Graham, 2004). Um exemplo a respeito da evolução na utilização de diferentes materiais para os ensaios é o trabalho de Accorsi et al. (2008). Recentemente, esses pesquisadores comprovaram a eficácia da utilização de pelos na mensuração de cortisol em cão e gato domésticos.

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

Influência da sazonalidade na reprodução

Para o sucesso dos trabalhos de reprodução assistida, é necessário identificar se há o efeito da sazonalidade na reprodução das espécies e, se sim, é preciso conhecê-lo. O gato doméstico no hemisfério norte, por exemplo, produz espermatozoides o ano todo, apesar de a reprodução ocorrer normalmente na primavera e no verão (Blottner e Jewgenow, 2007). Nessa região, nota-se uma redução significativa na produção de espermatozoides nos meses de dezembro e janeiro (inverno) e um aumento na concentração espermática no mês de março (primavera; Blottner e Jewgenow, 2007). Esse fato está possivelmente ligado aos efeitos da sazonalidade reprodutiva na fêmea, que, em regiões temperadas, é poliéstrica sazonal (Brown, 2006), apresentando ciclos estrais apenas na primavera e no verão. Em condições tropicais, ocorre a poliéstrica anual tanto em gatas domésticas quanto em fêmeas de jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá (Moreira et al., 2001).

Um exemplo do sucesso na aplicação das técnicas de reprodução assistida para transpor as dificuldades da sazonalidade reprodutiva em espécies de felídeos é o trabalho de Roth et al. (1997). Segundo esses pesquisadores, o leopardo-das-neves (*Uncia uncia*), que se reproduz sazonalmente, apesar de apresentar número significativamente maior ($P < 0,05$) de corpos lúteos (CL) durante a estação reprodutiva, responde à administração de gonadotrofinas exógenas durante o ano todo.

A sazonalidade pode, ainda, comprometer a obtenção de espermatozoides viáveis para a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), e influenciar a taxa de clivagem de embriões *in vitro* (Pope et al., 2006). Embriões de gata doméstica gerados de oócitos extraídos no período de quiescência dos ovários, ou seja, fora do período reprodutivo, podem ter a viabilidade comprometida, pois não se desenvolvem da mesma maneira que embriões gerados a partir de oócitos coletados em períodos reprodutivos (Spindler e Wildt, 1999). Neste estudo, os autores compararam a viabilidade de oócitos coletados em diferentes períodos reprodutivos e identificaram que poucos oócitos com boa qualidade foram obtidos a partir de ovários quiescentes, extraídos fora da época reprodutiva. O potencial de desenvolvimento *in vitro* desses oócitos variou de 'muito reduzido' a praticamente 'inexistente' quando comparados com o desenvolvimento de oócitos recuperados durante as estações de atividade reprodutiva (Spindler e Wildt, 1999). É necessário, portanto, desenvolver pesquisas visando aperfeiçoar as técnicas de maturação de oócitos e de aumentar a viabilidade espermática do sêmen colhido em períodos de baixa produção espermática.

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

*Protocolos espécie-específicos para inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (TE)*

Segundo levantamento feito por Pelican et al. (2006), o sucesso dos procedimentos de inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (TE) em felídeos silvestres, determinado

pelo nascimento e sobrevivência dos filhotes, é atualmente menor que 20%. A extrapolação de protocolos de animais domésticos para espécies silvestres é um artifício ainda muito utilizado (Brown, 2006), porém não ideal. Particularidades fisiológicas de cada espécie tornam, muitas vezes, a extrapolação de protocolos ineficiente. Acredita-se que os baixos índices de sucesso na reprodução assistida de felídeos silvestres são decorrentes do desconhecimento da fisiologia reprodutiva (Brown, 2006) e da ausência de técnicas laboratoriais mais refinadas para as espécies selvagens (Swanson, 2006). Portanto, essas particularidades fisiológicas podem ser, em parte, responsáveis pelas baixas taxas reprodutivas em felídeos neotropicals cativos, quando empregadas técnicas de reprodução assistida (Brown et al., 1995; Moreira et al., 2001).

Resposta ovariana às gonadotrofinas

Gonadotrofinas exógenas são utilizadas para induzir o crescimento folicular e a ovulação fora do período de estro da fêmea. A resposta ovariana a elas, no entanto, varia não só entre espécies, mas também entre indivíduos de uma mesma espécie (Howard et al., 1997; Pope et al., 2006). Assim, diferentes protocolos hormonais foram desenvolvidos para diferentes espécies de felídeos, incluindo o leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*), o guepardo (*Acinonyx jubatus*) e a jaguatirica (*Leopardus pardalis*; Swanson e Brown, 2004).

A resposta ovariana às gonadotrofinas também pode variar com o intervalo entre as aplicações dos hormônios. Macromoléculas exógenas como o eCG (gonadotropina coriônica equina), aplicadas sucessivamente em intervalos curtos, podem sensibilizar o sistema imunológico da fêmea, induzindo a formação de imunocomplexos que interferem na resposta ovariana, na eficácia da inseminação artificial e na recuperação de oócitos (Pelican et al., 2006). Estudos recentes sobre superovulação em jaguatirica e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) indicaram que o intervalo de quatro meses entre aplicações alternadas de eCG/hCG (gonadotropina coriônica equina/gonadotropina coriônica humana) e FSH/LH purificados (hormônio foliculo estimulante purificado/hormônio luteinizante purificado) não reduz a resposta ovariana (Paz et al., 2005). Em outro estudo, Crichton et al. (2003) concluíram que a utilização de pFSH e pLH em tigres (*Panthera tigris*) em intervalo de três meses entre aplicações é efetiva, pois não houve evidências da formação de imunocomplexos nos animais (Crichton et al., 2003).

Pesquisas futuras precisam indicar os melhores protocolos, como dose e intervalo de aplicação de gonadotrofinas, para cada espécie. Entretanto, estas pesquisas precisam de mais bases fisiológicas. É necessário que novos estudos foquem em protocolos específicos para indução à superovulação (para coleta de oócitos) ou para IA.

Ovulação

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

Um dos primeiros estudos que objetivou a quantificação de hormônios sexuais em fezes de felídeos silvestres foi realizado por Brown et al. (1995), em leopardo-nebuloso. Esse estudo indicou que, nessa espécie, a ovulação pode ocorrer tanto de maneira espontânea quanto induzida. Moreira et al. (2001) identificaram ovulações espontâneas e com maior frequência em gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) do que em gato-do-mato-pequeno e jaguatirica. Esses trabalhos sugerem que podem ocorrer ovulações espontâneas e a consequente presença de CL em fêmeas mantidas isoladas de machos. Segundo Pelican et al. (2008), a presença de CL pode comprometer a resposta ovariana às gonadotrofinas exógenas, já que uma fêmea que apresenta CL consequentemente produz progesterona, o que reduz a resposta ovariana às gonadotrofinas exógenas. Além desse fato, diferentemente de outras espécies (i.e., bovinos), a prostaglandina F2 α não surte efeito quando aplicada com o intuito de regredir o corpo lúteo em gatas domésticas no início da fase luteal (Wildt et al., 1979). Wildt et al. (1979) sugerem inclusive que, em determinados exemplares, essa prostaglandina possa ter um efeito luteotrófico, apesar de não explorarem a razão pela qual isso ocorre. De qualquer maneira, o fato de a prostaglandina F2 α não apresentar efeito luteolítico em gatas domésticas leva os pesquisadores da área a uma busca por protocolos alternativos.

O CL mantém a produção contínua de progesterona e altera a resposta fisiológica do organismo à administração de análogos do FSH e LH. Em espécies que têm ovulação induzida, a simples presença de CL pode interferir na resposta às gonadotrofinas exógenas. A progesterona circulante reduz a atividade ovariana por meio de retroalimentação negativa no eixo hipotalâmico-hipofisário. Dessa maneira, é necessária a busca por protocolos que suprimam a atividade ovariana de forma reversível e controlável (Pelican et al., 2006), para que seja possível aumentar o sucesso nos procedimentos de IA. Drogas que competem pelos receptores de

progesterona, como a aglepristone (Alizin[®]; Virbac, Alemanha) e a mifepristone (Mifeprex[®]; Danco Laboratories, EUA), vêm sendo utilizadas com sucesso para induzir aborto ou mesmo evitar a implantação de óvulos em fêmeas de gata doméstica. Diversos trabalhos indicam sucesso quando da utilização de aglepristone durante o início (Goericke-Pesch et al., 2010), meio (Fieni et al., 2006) e final (Georgiev et al., 2010) de gestação em gatas. Até o momento, não existem trabalhos sobre o uso de tais drogas em espécies de felídeos silvestres.

Biotécnicas reprodutivas

IA (inseminação artificial), FIV (fertilização in vitro), ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoide) e TE (transferência de embriões)

Inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), seguidas da transferência de embriões (TE), são técnicas desenvolvidas para aumentar o número de indivíduos reproduzidos de maneira assistida, garantindo especialmente a sobrevivência fetal e a neonatal.

A vantagem da IA em relação à ICSI e à FIV reside no fato de esta ser uma técnica aperfeiçoada e bastante utilizada em diversas espécies, a qual já permitiu a geração de filhotes em nove espécies de felídeos (Swanson e Brown, 2004; Swanson, 2006), incluindo a jaguatirica e o gato-do-mato-pequeno, tendo sido essas as primeiras gestações de felídeos silvestres por IA no Brasil (Moraes et al., 1997). Embora a ICSI e a FIV apresentem maior probabilidade de gerar embriões viáveis, já que há um maior controle do ambiente uterino e maiores chances de fecundação do oócito pelo espermatozoide, existem diversas vantagens na utilização da IA. Uma delas é o fato de ser um procedimento relativamente simples, mas ainda dependente do aperfeiçoamento de protocolos de indução do desenvolvimento folicular e da ovulação.

Outra vantagem da IA é a possibilidade de utilização tanto de sêmen resfriado quanto criopreservado, o que torna desnecessário o transporte de animais de uma instituição a outra para fins de acasalamento.

Tsutsui (2006) relatou que a taxa de sucesso na inseminação artificial em gatas domésticas ainda é muito baixa, embora a IA seja viável tanto com sêmen fresco quanto congelado. Outros autores também confirmam essa dificuldade na reprodução assistida dos pequenos felídeos silvestres (Swanson e Brown, 2004; Pelican et al., 2006). Especula-se que esse insucesso esteja relacionado à variabilidade na resposta ovariana, à necessidade de um procedimento cirúrgico para a deposição intrauterina do sêmen em pequenos felídeos, ao uso de anestésicos, ao estresse de captura e, nos casos de IA cirúrgica, ao estresse pós-operatório. Lacerda-Neto et al. (2004) relataram que gatas domésticas submetidas a cirurgias para inseminação apresentaram concentrações de cortisol aumentadas após os procedimentos cirúrgicos, retornando aos níveis basais após aproximadamente 72 horas, o que indica que procedimentos cirúrgicos podem ser fatores de estresse prolongado.

O que é necessário ser também investigado é se as cirurgias em si afetam as taxas de fecundação e a viabilidade dos embriões. Lacerda-Neto et al. (2004) concluíram que pode haver a interferência do cortisol na liberação do hormônio reprodutivo LH logo após os procedimentos cirúrgicos, apesar de as concentrações de LH não terem sido significativamente diferentes nos períodos analisados de 24, 48 e 72 horas após o procedimento. Os autores utilizaram como protocolo anestésico a combinação de cloridrato de cetamina (20 mg/kg, intramuscular, Francotar; Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda., Brasil) e xilazina (1 mg/kg, intramuscular, Coopazine; Coopers do Brasil LTDA., Brasil). Essa hipótese já havia sido levantada quando Howard et al. (1992) constataram que fêmeas as quais, após a administração de gonadotrofinas, ainda não haviam ovulado (sem presença de CL) quando do procedimento laparoscópico, apresentavam menor taxa de prenhez do que fêmeas que já haviam ovulado quando do procedimento. Segundo os autores, esse resultado indica que possivelmente há uma interferência da anestesia na ovulação. Entretanto, em um estudo mais recente, Tsutsui et al. (2000) constataram que a taxa de concepção foi maior ($P < 0,05$) quando a inseminação foi feita antes da ovulação. Tsutsui utilizou um protocolo anestésico que inclui um pré-tratamento das fêmeas com sulfato de atropina (0,05mg/kg), seguido de maleato de acepromazina (0,025 mg/kg) e cetamina (5 mg/kg) para a indução anestésica, e a manutenção da anestesia com halotano. Novos estudos precisam ser realizados para elucidar as razões pelas quais tal divergência ocorreu. Uma hipótese seriam os protocolos anestésicos utilizados, considerando-se as diferenças entre princípios ativos e doses empregadas, que podem influenciar na profundidade anestésica e consequente estresse associado.

Tsutsui (2006) sugeriu que, para aumentar as taxas reprodutivas em felídeos mantidos em cativeiro, seria necessário desenvolver técnicas não cirúrgicas (i.e., transvaginal) de IA para a deposição de sêmen no corno uterino, o que eliminaria o efeito da elevação pós-cirúrgica do cortisol. Porém, mesmo eliminando o efeito da elevação do cortisol pela cirurgia, é possível que ainda ocorra uma elevação dele devido à contenção física e química dos animais estudados. A inseminação via laparoscopia tem apresentado bons resultados em diversas espécies de felídeos (Swanson, 2001; Swanson et al., 2002), mas ainda precisa ser aprimorada, especialmente nas espécies de pequeno porte, como o gato-do-mato-pequeno (Moreira, 2009, UFPR, Palotina, Brasil; informação verbal).

A fertilização *in vitro* (FIV) é uma técnica relativamente difundida em animais silvestres, tendo sido

testada em diversas espécies de felídeos neotropicais, como em gatos-do-mato-pequenos e jaguatiricas (Swanson, 2001; Swanson et al., 2002) e em onças-pintadas (Morato et al., 2000). Apesar de ser uma técnica relativamente simples, a partir do momento em que se possui o oócito maturado e o sêmen capacitado, a produção *in vitro* de embriões (PIV) apresenta baixa taxa de sucesso para certas espécies de felídeos, mesmo quando os oócitos recuperados para o procedimento são de boa qualidade (Morato et al., 2000). Pope et al. (1998) realizaram um dos primeiros trabalhos com a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), tendo sido produzidos 10 embriões a partir de 18 oócitos recuperados de uma fêmea de gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*). Dos 10 embriões produzidos, cinco haviam sido inseminados com sêmen fresco e cinco com sêmen criopreservado. Embora não tenha havido nascimentos após a transferência dos embriões para gatas domésticas (transferência interespecífica), o trabalho demonstrou que a ICSI pode ser aprimorada e aplicada com sucesso em felídeos silvestres. Em um estudo prévio, Pope et al. (1993) demonstraram que é possível a transferência interespecífica de embriões de gatos selvagens asiáticos (*Felis sylvestrus ornata*) para gatas domésticas, com nascimento de filhotes viáveis. Essa técnica, porém, é extremamente dependente das espécies trabalhadas e dos protocolos utilizados, e é necessário, portanto, o desenvolvimento dela a fim de ser possível sua utilização de maneira eficiente em diferentes espécies.

A ICSI é uma das técnicas de reprodução assistida mais caras (em razão do custo do micromanipulador que realiza a injeção do espermatozoide), mas é também a técnica que pode apresentar a maior taxa de sucesso na concepção de embriões devido à precisão com que a fecundação é conduzida. É ainda uma técnica pouco utilizada em projetos de pesquisa sobre reprodução de animais silvestres, sendo raros os trabalhos produzidos até o momento. Trabalhos com o uso dessa técnica foram desenvolvidos em leão (*Panthera leo*) e gato-pescador (*Prionailurus viverrinus*), tendo havido bons resultados na obtenção de embriões, apesar de nenhum nascimento (Pope et al., 2006).

Supressão da atividade ovariana

É possível que os resultados ainda insatisfatórios da inseminação artificial em felídeos silvestres sejam decorrentes da variabilidade da resposta às gonadotrofinas exógenas (Pelican et al., 2006) e da falta de técnicos treinados para a realização de tal procedimento. A alta concentração hormonal decorrente da aplicação de gonadotrofinas em períodos de estro pode gerar uma hiperestimulação ovariana, a qual pode provocar um quadro de hiperestrogenismo, com alteração do ambiente uterino e consequente inviabilidade embrionária. Essa ocorrência pode levar à luteólise prematura e à reabsorção embrionária (Pelican et al., 2006).

A taxa de sucesso das técnicas de inseminação artificial com sêmen fresco é significativamente maior em guepardo (Howard et al., 1997) e gato doméstico (Tsutsui et al., 2000) do que em gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá (Swanson e Brown, 2004; Pelican et al., 2006). Tanto fêmeas de guepardo como de gato doméstico em regiões temperadas ciclam de forma intermitente o ano todo. Fêmeas de guepardo permanecem em anestro a maior parte do tempo, enquanto gatas domésticas apresentam alguns períodos de anestro durante o ano. Isso pode explicar por que essas espécies respondem mais adequadamente à IA quando submetidas a protocolos de indução à ovulação. Por terem os ovários quiescentes por mais tempo, há maior probabilidade de essas fêmeas serem induzidas à ovulação com gonadotrofinas exógenas, sem o somatório da concentração dessas com hormônios endógenos. Isso resulta em uma menor possibilidade de ocorrência de hiperestrogenismo ou de alterações do ambiente uterino (Pelican et al., 2006).

No recente estudo realizado por Pelican et al. (2008), o progestágeno levonorgestrel (Norplant[®]; Wyeth Pharmaceuticals, EUA) se mostrou eficiente em suprimir a atividade ovariana em gatas domésticas, não apenas nas fêmeas que apresentavam ovulação induzida, mas também nas que apresentavam ovulação espontânea, produzindo resultados semelhantes ao trabalho de Pelican et al. (2005). Dessa maneira, busca-se o desenvolvimento de protocolos hormonais que resultem na inativação ovariana reversível, como o uso de progestágenos (Brown et al., 1995; Ballarotti, 2005; Pelican et al., 2005, 2006, 2008; Brown, 2006; Swanson, 2006).

Segundo Munson (2006), certos progestágenos, como o levonorgestrel, previnem a prenhez não pela supressão da atividade ovariana, mas pela alteração da motilidade do oócito nas tubas e redução da receptividade endometrial ao oócito. Essa mesma autora desaconselha o uso de progestágenos como redutores de atividade ovariana. Porém, além dos trabalhos de Pelican et al. (2005, 2008), o estudo de Ballarotti (2005) também demonstrou que, em gatas domésticas, progestágenos como o etonogestrel (Implanon[™]; Merck Sharp & Dohme, EUA) reduzem a atividade ovariana. Em gato doméstico, leopardo-nebuloso (Pelican, 2009, University of Minnesota, Minnesota, EUA; informação verbal) e em gato-do-mato-pequeno (Micheletti et al., 2011, UFPR, Curitiba, Brasil; informação verbal), o altrenogest (Regumate[®]; Intervet/Schering-Plough Animal Health, EUA) também é eficaz na redução da atividade ovariana. Esses estudos podem ser úteis no desenvolvimento de novos protocolos de IA em felídeos silvestres.

Cultivo de embriões in vitro

Diversos trabalhos com gatas domésticas demonstraram que quanto mais desenvolvido o oócito na

coleta, maior a viabilidade para fecundação após atingir a metáfase II (Pope et al., 2006). Após a FIV ou a ICSI, é necessário o cultivo dos embriões *in vitro* (CIV) para que eles se desenvolvam até o estágio de blastocisto expandido, de quatro a seis dias (Pope et al., 2006), quando estarão prontos para serem transferidos para uma fêmea receptora.

Em felídeos domésticos, o cultivo de embriões é feito em grupo (cultivo de vários embriões na mesma gota ou poço), o que proporciona melhores índices de crescimento e desenvolvimento embrionário em comparação ao cultivo de células isoladas (Spindler et al., 2006). Como a produção em laboratório de embriões de felídeos ameaçados de extinção é escassa, dificilmente são utilizadas técnicas como o cultivo em grupo intraespecífico. Porém, Spindler et al. (2006) comprovaram a eficácia da utilização de embriões de outras espécies (de roedores e de bovinos) para o cultivo conjunto com embriões de gatas domésticas como estímulo para o desenvolvimento deles.

Para o sucesso das técnicas de cultivo de embriões, é fundamental a utilização de meios de cultivo adequados para que ocorra a clivagem deles. Alguns estudos em gato doméstico demonstraram que os embriões apresentam respostas específicas a diferentes carboidratos no meio, conforme o estágio de desenvolvimento em que se encontram (Herrick et al., 2007). Foi também comprovada certa sensibilidade dos embriões a aminoácidos essenciais presentes no meio de cultivo (Herrick et al., 2007). Embora tenha havido avanço significativo nesta área, ainda são necessárias pesquisas que permitam definir outros componentes essenciais aos meios de cultivo (Herrick et al., 2007). Pope et al. (2006) obtiveram melhores resultados no desenvolvimento de blastocistos com o uso de 25ng/mL de EGF (fator de crescimento epidermal) e 100ng/mL de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina - 1) nos meios de cultivo.

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

Criopreservação e refrigeração de sêmen

A técnica de inativação ovariana e posterior IA com sêmen criopreservado oferece vantagens que devem ser consideradas. Apesar de a inseminação com sêmen fresco resultar em melhores resultados do que com sêmen criopreservado (Swanson, 2006), nem sempre é possível realizá-la devido às dificuldades logísticas inerentes à colheita de sêmen e imediata inseminação. Já a inseminação com sêmen criopreservado pode ser mais facilmente planejada, uma vez que elimina a etapa de coleta prévia à realização da IA. Outra vantagem da inseminação com sêmen criopreservado é a facilidade de intercâmbio de material genético entre instituições, o que é essencial para a conservação *ex situ*. A possibilidade de intercâmbio de sêmen criopreservado é extremamente vantajosa atualmente devido às crescentes dificuldades de intercâmbio de animais entre instituições em razão de barreiras sanitárias e leis ambientais (Wildt e Roth, 1997; Swanson e Brown, 2004; Swanson, 2006; Andrabi e Maxwell, 2007).

Sabe-se, porém, que a criopreservação de sêmen afeta negativamente a funcionalidade espermática (Baudi et al., 2007; Fickel et al., 2007). Para minimizar os efeitos indesejáveis das baixas temperaturas sobre os espermatozoides, trabalhos como o de Baudi et al. (2007) e Fickel et al. (2007) recomendaram adaptar os protocolos de espécies domésticas para espécies silvestres. Para que se consiga manter a integridade espermática após a descongelação, é necessário investimento em pesquisa, especialmente na área de criobiologia, que envolve composição e permeabilidade de membrana, transição de fases dos componentes líquidos da estrutura interna dos espermatozoides, crioprotetores, resposta espermática ao estresse hipo e hiperosmótico e monitoramento microscópico da formação de cristais de gelo intra e extracelular (Luvoni, 2006; Fickel et al., 2007).

Fickel et al. (2007) consideraram importante investir no aprimoramento de protocolos de criopreservação que deram certo em animais domésticos e que possam ser utilizados em animais silvestres. Algumas propostas de trabalho incluem pesquisas para o aperfeiçoamento de crioprotetores, da curva de congelamento e meios de cultivo, e a melhoria das técnicas de sexagem de espermatozoides. Nas últimas duas décadas, foram publicados diversos trabalhos sobre criopreservação e descongelamento de espermatozoides em felídeos silvestres, buscando manter a viabilidade celular. Porém, nenhum protocolo utilizado conseguiu manter as taxas de viabilidade do ejaculado pós-descongelamento tão elevadas quanto as geralmente obtidas em animais domésticos (Donoghue et al., 1993; Swanson e Brown, 2004; Swanson et al., 2006). Isso se dá provavelmente por características próprias dos espermatozoides dos felídeos (ex.: alto índice de teratospermia) e pela utilização de protocolos ainda não adequados.

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

Criopreservação e refrigeração de embriões, ovário, oócitos e testículos

A criopreservação de embriões de felídeos silvestres é uma realidade, mas ainda não se apresenta como uma técnica de uso rotineiro. Isso certamente ocorrerá quando as técnicas de cultivo e congelamento de embriões *in vitro* estiverem mais avançadas. Poucos trabalhos realizados com felídeos silvestres conseguiram desenvolvimento de embriões viáveis ou aptos à transferência ou inovulação para as receptoras a partir de embriões criopreservados (Gómez et al., 2003). As espécies de felídeos silvestres que foram reproduzidas pela transferência de embriões após criopreservação até o momento foram o gato-silvestre-africano (*Felis silvestris*) e o caracal (*Caracal caracal*; Pope, 2000), e a jaguatirica (Swanson, 2001; Swanson et al., 2002). Apesar de essas técnicas não apresentarem muita dificuldade em termos de procedimentos, dificilmente se obtêm filhotes. Isso se dá principalmente em razão das falhas na sincronização hormonal das receptoras e da dificuldade em se estabelecer um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento dos embriões (Swanson e Brown, 2004; Pelican et al., 2008).

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

Naoi et al. (2007) sugerem que a refrigeração e posterior fertilização de oócitos só são eficientes quando o ovário é armazenado a 4°C por um período máximo de seis horas após a retirada do órgão. Já Wolfe e Wildt (1996) demonstraram que ovários armazenados a 4°C por até 72 horas são capazes de fornecer oócitos que chegam à metáfase II depois de submetidos à maturação. Os autores também demonstraram que apenas oócitos armazenados por um período máximo de 24 horas produzem blastocistos depois de fertilizados. Portanto, a refrigeração de ovários pode ser utilizada para preservar oócitos de fêmeas que acabaram de morrer ou de fêmeas que, por alguma razão clínica, tiveram que ser submetidas à ovário-histerectomia (ou ovariectomia).

Até o momento, há poucos relatos de criopreservação bem-sucedida de oócitos de felídeos (Murakami et al., 2004), e as informações sobre essa técnica são ainda escassas. Murakami et al. (2004) conduziram um experimento a fim de testar o tempo ideal de incubação de blastocistos em uma solução de sacarose durante a diluição de crioprotetores para obter uma taxa maior de sobrevivência e desenvolvimento de oócitos de gatas domésticas. Porém, o desenvolvimento desses oócitos até o estágio de mórula e posterior blastocisto somente foi verificado quando a incubação em sacarose não ultrapassou 0,5 minuto. Isso indica a necessidade, por exemplo, de protocolos que reduzam o efeito tóxico da sacarose sobre os oócitos de felídeos. Em relação à criopreservação de tecidos testiculares, apesar de esta técnica apresentar sucesso com algumas espécies de roedores, ainda não existem relatos de trabalhos que obtiveram esse tecido de felídeos viável após sua criopreservação (Pukazhenthii et al., 2006).

Espermatozoides epididimários e testiculares

Quando se lida com espécies ameaçadas de extinção, todo espécime é considerado de alto valor para a diversidade genética populacional, e não há dúvidas de que a reprodução assistida pode ser uma ferramenta muito útil nas políticas de conservação da fauna, já que possibilita que se obtenha o máximo aproveitamento genético de cada indivíduo. Segundo Swanson (2006), recomenda-se utilizar todos os indivíduos machos geneticamente saudáveis nos programas de reprodução em cativeiro de espécies em perigo de extinção, aumentando, dessa forma, a diversidade genética intrapopulacional. Outras publicações (Yanagimachi, 1998; Hewitson et al., 2002; Said et al., 2003) descreveram a retirada de espermatozoides diretamente do testículo e do epidídimo e sua utilização na ICSI. Com essa técnica, é possível a produção de embriões de diferentes espécies de mamíferos. Há relatos de nascimentos de filhotes em trabalhos desenvolvidos com o camundongo (*Mus musculus*), com a utilização de espermátides e espermatócitos secundários para fecundação (Yanagimachi, 1998), de trabalhos realizados com macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), cujos oócitos foram fertilizados com espermátides e espermatozoides testiculares (Hewitson et al., 2002), e com rato, cujos oócitos foram fertilizados apenas com cabeças de espermatozoides testiculares e epididimários (Said et al., 2003). Com felídeos, o trabalho pioneiro de Comizzoli et al. (2006) mostrou a possibilidade de fertilização e o potencial de desenvolvimento de embriões formados pela injeção de espermatozoides testiculares em oócitos de gatas domésticas maturados *in vitro*.

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

Uso de animais soropositivos

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o herpesvírus felino - 1 (FHV-1) são responsáveis por afecções reprodutivas e abortos em gatas domésticas (Kustritz, 2006). A contaminação horizontal de fêmeas por

meio de inseminação artificial com sêmen fresco de machos contaminados por FIV pode ocorrer com uma alta frequência (Jordan et al., 1998). Em relação ao sêmen criopreservado, alguns autores mencionam que a chance de transmissão horizontal de FIV (Jordan et al., 1996) e FHV-1 (Swanson et al., 2006) é reduzida quando da inseminação artificial. Seis fêmeas de gato doméstico inseminadas com sêmen criopreservado contaminado com FIV não foram infectadas no trabalho desenvolvido por Jordan et al. (1996), e, do mesmo modo, não houve a detecção por PCR do vírus da FHV-1 no sêmen de quatro machos de gato de Pallas (*Octobalus manul*) positivos para o herpesvírus felino, segundo Swanson et al. (2006). Apesar de não terem sido confirmadas até o momento a transmissão horizontal ou a vertical pela utilização de sêmen previamente criopreservado para IA e FIV, essa hipótese não pode ser desconsiderada. Dessa maneira, o uso de animais soropositivos para doenças virais deve, a princípio, ser rejeitado. Alguns pesquisadores buscam a criação de técnicas seguras de tratamento do sêmen para torná-lo livre de agentes infecciosos e possibilitar o uso de machos portadores de viroses em programas de reprodução *ex situ* (Naida Loskutoff, 2008, Zoological Society of Omaha, Omaha, EUA; informação verbal).

Considerações finais

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

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

Referências bibliográficas

- Accorsi PA, Carloni E, Valsecchi P, Viggiani R, Gamberoni M, Tamanini C, Seren E.** Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen Comp Endocrinol*, v.155, p.398-402, 2008.
- Andrabi SMH, Maxwell WMC.** A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.223-243, 2007.
- Ballarotti DT.** Avaliação de protocolos para indução de inatividade ovariana em gatas domésticas. 2005. 65f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2005.
- Baudi DLK, Jewgenow K, Pukazhenthil BS, Spencoski KM, Santos AS, Reghelin ALS, Candido MV, Javorouski ML, Müller G, Morais RN.** Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*, v.69, p.204-211, 2007.
- Blottner S, Jewgenow K.** Moderate seasonality in testis function of domestic cat. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.536-540, 2007.
- Brown JL.** Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology*, v.66, p.25-33, 2006.
- Brown JL.** Female reproductive cycles of wild female felids. *Anim Reprod Sci*, v.124, p.155-162, 2011.
- Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH.** Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids measured noninvasively in feces. *Biol Reprod*, v.51, p.776-786, 1994.
- Brown JL, Wildt DE, Graham LH, Byers AP, Collins L, Barrett S, Howard JG.** Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. *Biol Reprod*, v.53, p.93-102, 1995.
- Carlstead K, Shepherdson DJ.** Effects of environmental enrichment on reproduction. *Zoo Biol*, v.13, p.447-458, 1994.
- Comizzoli P, Wildt DE, Pukazhenthil BS.** In vitro development of domestic cat embryos following intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p. 1659-1663, 2006.
- Comizzoli P, Wildt DE, Pukazhenthil BS.** Overcoming poor in vitro nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season. *Reproduction*, v.126, p.809-816, 2003.
- Crichton EG, Bedows E, Miller-Lindholm AK, Baldwin DM, Armstrong DL, Graham LH, Ford JJ, Gjørret JO, Hyttel P, Pope CE, Vajta G, Loskutoff NM.** Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and in vitro embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). *Biol Reprod*, v.68, p.105-113, 2003.

- Donoghue AM, Johnston LA, Armstrong DL, Simmons LG, Wildt DE.** Birth of a Siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination. *J Zoo Wildl Med*, v.24, p.185-189, 1993.
- Fickel J, Wagener A, Ludwig A.** Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J Wildl Res*, v.53, p.81-89, 2007.
- Fieni F, Martal J, Marnet PG, Siliart B, Guittot F.** Clinical, biological and hormonal study of mid-pregnancy termination in cats with aglepristone. *Theriogenology*, v.66, p.1721-1728, 2006.
- Georgiev P, Bostedt H, Goericke-Pesch S, Dimitrov M, Petkov P, Stojanthev K, Tsoneva V, Wehrend A.** Induction of abortion with aglepristone in cats on day 45 and 46 after mating. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.161-167, 2010.
- Goericke-Pesch S, Georgiev P, Wehrend A.** Prevention of pregnancy in cats using aglepristone on days 5 and 6 after mating. *Theriogenology*, v.74, p.304-310, 2010.. 2010.
- Gómez MC, Jenkins JA, Giraldo A, Harris RF, King A, Dresser BL, Pope CE.** Nuclear transfer of synchronized African wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol Reprod*, v.69, p.1032-1041, 2003.
- Graham LH.** Non-invasive monitoring of Reprod in zoo and wildlife species. *Ann Rev Biomed Sci*, v.6, p.91-98, 2004.
- Harris RF, Gomez MC, Leibo SP, Pope CE.** In vitro development of domestic cat embryos after in vitro fertilization of oocytes with spermatozoa stored for various intervals at 4°C. *Theriogenology*, v.57, p. 365, 2002. Abstract.
- Herrick JR, Bond JB, Magarey GM, Bateman HL, Krisher RL, Dunford AS, Swanson WF.** Toward a feline optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of in vitro fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown in vivo. *Biol Reprod*, v.76, p.858-870, 2007.
- Hewitson L, Martinovich C, Simerly C, Takahashi D, Schatten G.** Rhesus offspring produced by intracytoplasmic injection of testicular sperm and elongated spermatids. *Fertil Steril*, v.77, p.794-801, 2002.
- Howard JG, Barone MA, Donoghue AM, Wildt DE.** The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J Reprod Fertil*, v.96, p.175-86, 1992.
- Howard JG, Roth TL, Byers AP, Swanson WF, Wildt DE.** Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Biol Reprod*, v.56, p.1059-1068, 1997.
- Jordan HL, Howard JG, Bucci JG, Butterworth JL, English R, Kennedy-Stoskopf S, Tompkins MB, Tompkins WA.** Horizontal transmission of feline immunodeficiency virus with semen from seropositive cats. *J Reprod Immunol*, v.41, p.341-357, 1998.
- Jordan HL, Howard JG, Sellon RK, Wildt DE, Tompkins WA, Kennedy-Stoskopf S.** Transmission of feline immunodeficiency virus in domestic cats via artificial insemination. *J Virol*, v. 70, p.8224-8228, 1996.
- Kustritz MVR.** Clinical management of pregnancy in cats. *Theriogenology*, v.66, p.145-150, 2006.
- Lacerda-Neto JC, Barbosa JC, Lunardi LO, Silva AAMR, Genaro G.** Effects of surgical stress on the secretion of luteinizing hormone, testosterone and cortisol in the domestic cat (*Felis catus*). *Ciênc Anim Bras*, v.5, p.211-214, 2004.
- Luvoni GC.** Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, v.66, p.101-111, 2006.
- Moberg GP.** Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. In: Moberg GP, Mench JA (Ed.). *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000. p.1-22.
- Moraes W, Morais RN, Moreira N, Lacerda O, Gomes MLF, Mucciolo RG, Swanson WF.** Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). In: American Association of Zoo Veterinarians Annual Meeting, 1997, Houston, TX. *Proceedings...* Houston, TX: AAZV, 1997. p.334-336. Abstract.
- Morato RG, Crichton EG, Paz RCR, Zuge RM, Moura CA, Nunes ALV, Teixeira RH, Porto-Lacerda-Neto LR, Mahlmeister P, Guimarães MABV, Corrêa SHR, Barnabe VH, Barnabe RC, Armstrong DL, Loskutoff, NM.** Ovarian stimulation and successful in vitro fertilization in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*, v.53, p.339, 2000. Abstract.
- Moreira N, Monteiro-Filho ELA, Moraes W, Swanson WF, Graham LH, Pasquali OL, Gomes MLF, Morais RN, Wildt DE, Brown JL.** Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. *Zoo Biol*, v.20, p.103-116, 2001.
- Munson L.** Contraception in felids. *Theriogenology*, v.66, p.126-134, 2006.
- Murakami M, Otoi T, Karja NWK, Wongsrikeao P, Agung B, Suzuki T.** Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. *Cryobiology*, v.48, p.341-348, 2004.
- Naoi H, Otoi T, Shimamura T, Karja NW, Agung B, Shimizu R, Taniguchi M, Nagai T.** Developmental competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24h. *J Reprod Dev*, v.53, p.271-277, 2007.

- Paz RCR, Swanson WF, Dias EA, Adania CH, Barnabe VH, Barnabe RC.** Ovarian and immunological responses to alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Zoo Biol*, v.24, p.247-260, 2005.
- Pelican KM, Brown JL, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG.** Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. *Gen Comp Endocrin*, v.144, p. 110-121, 2005.
- Pelican KM, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG.** Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. *Domest Anim Endocrinol*, v.34, p.160-175, 2008.
- Pelican KM, Wildt DE, Pukazhenti B, Howard J.** Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology*, v.66, p.37-48, 2006.
- Pope CE.** Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*, v.53, p.163-174, 2000.
- Pope CE, Gómez MC, Dresser BL.** In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century. *Theriogenology*, v.66, p.59-71, 2006.
- Pope CE, Johnson CA, McRae MA, Keller GL, Dresser BL.** Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.53, p. 221-236, 1998.
- Pukazhenti B, Comizzoli P, Travis AJ, Wildt DE.** Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reprod Fertil*, v.18, p.77-90, 2006.
- Roth TL, Armstrong DL, Barrie MT, Wildt DE.** Seasonal effects on ovarian responsiveness to exogenous gonadotrophins and successful artificial insemination in the snow leopard (*Uncia uncia*). *Biol Fertil Dev*, v.9, p.285-295, 1997.
- Said S, Han MS, Niwa K.** Development of rat oocytes following intracytoplasmic injection of sperm heads isolated from testicular and epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v.60, p.359-369, 2003.
- Spindler RE, Crichton EG, Agca Y, Loskutoff NM, Critser J, Gardner DK, Wildt DE.** Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions. *Theriogenology*, v.66, p.82-92, 2006.
- Spindler RE, Wildt DE.** Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biol Reprod*, v.61, p.188-194, 1999.
- Swanson WF.** Application of assisted Reprod for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, v.66, p.49-58, 2006.
- Swanson WF.** Reproductive biotechnology and conservation of the forgotten felids - the small cats. In: International Symposium on Assisted Reproductive Technologies: Conservation & Genetic Management Wildlife, 1, 2001, Omaha, NE. *Proceedings...* Omaha, NE: Henry Dooly Zoo, 2001. p.100-120.
- Swanson WF.** The need to breed: The role of reproductive sciences in small cat conservation. *J Reprod Dev*, v.53, p.271-277, 2007.
- 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, Maggs DJ, Clarke HE, Newell AE, Bond JB, Bateman HL, Kennedy-Stoskopf S.** Assessment of viral presence in semen and reproductive function of frozen-thawed spermatozoa from Palla's cat (*Otocolobus manul*) infected with feline herpesvirus. *J Zoo Wildl Med*, v.37, p.336-346, 2006.
- Swanson WF, Paz RCR, Morais RN, Gomes MLF, Moraes W, Adania CH.** Influence of species and diet on efficiency of in vitro fertilization in two endangered Brazilian felids - the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*, v.57, p.593, 2002. Abstract.
- Tsutsui T.** Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.122-125, 2006
- 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, 2000.
- Wildt DE, Panko WB, Seager SWJ.** Effect of prostaglandin F2 α on endocrine-ovarian function in the domestic cat. *Prostaglandins*, v.18, p.883-892, 1979.
- Wildt DE, Roth TL.** Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. *Int Zoo Yrbk*, v.35, p.164-172, 1997.417.
- Wolfe BA, Wildt DE.** Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. *J Reprod Fertil*, v.106, p.135-141, 1996.
- Yanagimachi R.** Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. *Hum Reprod*, v.13, p.87-98, 1998.