



Desafios fisiológicos da reprodução de felídeos selvagens

Physiological challenges in reproduction of wild felids

N. Moreira

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

Correspondência: neimoreira@ufpr.br

Resumo

O sucesso das técnicas de reprodução assistida (ARTs) em felídeos selvagens ainda é baixo, com taxas de prenhez inferiores a 10% após o uso da inseminação artificial (IA) ou da fertilização *in vitro*/transferência de embriões (FIV/TE). Considerando-se as pequenas populações isoladas mantidas em cativeiro e as dificuldades logísticas e sanitárias relacionadas com o transporte de animais vivos, a aplicação dessas técnicas de reprodução com eficiência torna-se essencial para o manejo reprodutivo *ex situ* de felídeos. Um dos desafios a ser vencido é a variabilidade no mecanismo de ovulação entre espécies, sendo que algumas apresentam ovulações espontâneas com maior frequência. Essa variabilidade traz, como consequência, respostas também muito distintas após a aplicação de gonadotropinas exógenas para indução do desenvolvimento folicular e da ovulação. Uma alternativa para melhorar a consistência das respostas endócrino-ovarianas é a utilização de progestinas previamente ao protocolo hormonal. Novas alternativas vão surgindo para tornar os procedimentos de reprodução assistida em felídeos mais práticos e efetivos. O treinamento de equipes habilitadas para realizar tais procedimentos, nas diversas regiões, é essencial para o manejo reprodutivo das populações em cativeiro, a fim de sempre maximizar a manutenção da diversidade genética.

Palavras-chave: corpo lúteo, progestágeno, progestina, ovário, ovulação.

Abstract

The success of assisted reproduction techniques (ARTs) in wild felids is still low, with pregnancy rates below 10% after the use of AI or IVF/ET. Considering the small isolated populations kept in captivity, and logistical and sanitary difficulties related to the transport of live animals, the application of these reproduction techniques effectively becomes essential for the reproductive management of captive felid populations. One of the challenges to overcome is the variability in the mechanism of ovulation between species: some of which exhibit spontaneous ovulations more frequently. This variability also brings, as a consequence, very different responses after application of exogenous gonadotropins to induce follicular development and ovulation. One alternative for improving the consistency of endocrine-ovarian response is the use of progestins prior to the hormonal protocol. New alternatives emerge to make assisted reproduction in felids more practical and effective. Training qualified teams to perform such procedures, in different regions, is essential to the reproductive management of captive populations, always aiming to maximize the maintenance of genetic diversity.

Keywords: *corpus luteum, progestagen, progestin, ovary, ovulation.*

Introdução

A reprodução em cativeiro, especialmente das espécies de pequenos felídeos selvagens, ainda apresenta baixos resultados. Associada a essa baixa eficiência reprodutiva, dos poucos filhotes que nascem em cativeiro, ainda se observa uma alta taxa de mortalidade, especialmente nos primeiros 30 dias após o nascimento. De forma geral, os grandes felídeos (leões, tigres, leopardos e pumas) reproduzem bem de forma natural em cativeiro, o que parece estar relacionado a uma menor suscetibilidade natural ao estresse de cativeiro. Uma das hipóteses para explicar essa diferença talvez seja a posição que ocupam na cadeia alimentar, sendo que os grandes felídeos normalmente ocupam o topo da cadeia, e os pequenos e médios felídeos (ex.: jaguatirica), apesar de serem predadores, podem também eventualmente ser predados.

As informações obtidas sobre a reprodução de felídeos têm contribuído para a compreensão de alguns aspectos da fisiologia reprodutiva de mamíferos, incluindo humanos (Wildt et al., 2010), e têm sido aplicadas no manejo de gatos domésticos utilizados como modelos biomédicos e de espécies selvagens ameaçadas (Swanson, 2003; Comizzoli et al., 2009).

Porém, as técnicas de reprodução assistida (ARTs), quando aplicadas em felídeos, ainda vêm apresentando, até o momento, pouco resultado, especialmente quando se analisa o aspecto conservacionista. As



taxas de prenhez após o uso da inseminação artificial (IA) ou fertilização *in vitro*/transferência de embriões (FIV/TE) permanecem baixas (<10%; Pelican et al., 2006).

Poucos são os relatos de filhotes nascidos por meio de inseminação artificial, principalmente quando se trabalha com sêmen congelado. Registros de filhotes nascidos da produção *in vitro* (PIV) de embriões são ainda menos frequentes. Os gargalos ainda enfrentados para obter-se um maior sucesso com a aplicação das técnicas de reprodução assistida são, por exemplo, a grande variabilidade inter e intraespecífica na resposta aos protocolos de estimulação ovariana e de congelamento de sêmen.

O gato doméstico tem sido utilizado frequentemente como modelo para as espécies selvagens, como consequência das similaridades fisiológicas e comportamentais. Estudos que avaliaram a resposta ovariana de gatas domésticas a gonadotropinas exógenas foram utilizados como base para a produção de filhotes por IA ou FIV/TE em espécies selvagens (Pope et al., 2006; Swanson, 2006; Howard e Wildt, 2009).

Considerando-se as pequenas populações isoladas mantidas em cativeiro e as dificuldades logísticas e sanitárias relacionadas com o transporte de animais vivos, a aplicação de técnicas de reprodução assistida torna-se essencial para o manejo reprodutivo *ex situ* de felídeos (Pukazhenthil e Wildt, 2004; Wildt et al., 2010). Não se pode esquecer ainda dos casos que dificultam ou até mesmo impedem o acasalamento natural, como a incompatibilidade comportamental e a preferência ou não aceitação de determinados parceiros. Os casos de incompatibilidade comportamental podem resultar em agressões, produzindo graves injúrias, inclusive fatais, principalmente nas fêmeas. Muitos machos que apresentam esse comportamento agressivo anormal (“*serial killers*”) frequentemente apresentam histórico de terem sido criados “na mão” (amamentados artificialmente) e privados do desenvolvimento com animais da mesma espécie.

Para acelerar o desenvolvimento dessas técnicas de reprodução assistida (ARTs), esforços devem ser conduzidos no sentido de fomentar o aumento do número de pesquisadores que atuem com reprodução assistida de animais selvagens e realizar treinamentos, com o intuito de ampliar a rede de profissionais capacitados a realizarem tais procedimentos. A manutenção da diversidade genética das atuais populações em cativeiro dependerá fortemente dessas iniciativas, associadas a um plano geneticamente referenciado e bem conduzido de reprodução.

Mecanismo de ovulação

A maioria das espécies de felídeos estudadas até o momento não ovula, ou melhor, raramente ovula espontaneamente, sem o estímulo físico do coito (Pukazhenthil e Wildt, 2004; Wildt et al., 2010). Em consequência de um mecanismo reflexo induzido pelo coito, ocorre a liberação de ondas suficientes de hormônio luteinizante (LH) que desencadeiam a ovulação, fenômeno conhecido como ovulação induzida. Mas também não se pode esquecer de que podem ocorrer ovulações espontâneas, com uma variação na frequência que depende, por exemplo, da espécie. A forma de alojamento também influencia, com maior frequência de ovulações espontâneas para fêmeas mantidas juntas, quando comparada com a menor frequência de ovulação de fêmeas mantidas isoladas. A presença de um ou mais corpos lúteos, no momento do início do protocolo de estimulação ovariana, interfere na resposta observada no desenvolvimento folicular.

Os felídeos expressam diversos mecanismos reprodutivos entre as 37 espécies existentes, especialmente com relação à atividade ovariana (Wildt et al., 2010). O gato (*Felis catus*) é a única espécie domesticada conhecida por exibir ovulação induzida e também espontânea, por isso é utilizado como um modelo para a compreensão das nuances do controle ovariano (Stewart et al., 2012).

Observou-se que determinadas linhagens de gatos domésticos apresentam ovulações espontâneas com maior frequência, o que estabelece a hipótese de esta ser uma característica geneticamente relacionada e que pode ser herdada (Lawler et al., 1993; Gudermuth et al., 1997; Pelican et al., 2005).

Há espécies de felídeos selvagens em que já foi comprovada maior frequência de ovulações espontâneas, como o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*; Moreira et al., 2001), o leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*; Brown et al., 1995), o gato-pescador (*Prionailurus viverrinus*; Santymire, 2011) e o gato-de-patas-negras (*Felis nigripes*; Herrick, 2009).

Sensibilidade ovariana à estimulação por gonadotropinas

Em geral, o desenvolvimento folicular e a ovulação são artificialmente induzidos em felídeos com o uso de doses únicas de gonadotropina coriônica equina (eCG) e gonadotropina coriônica humana (hCG), administradas com um intervalo de 80-84h (Donoghue et al., 1992; Howard, 1999). O FSH também pode ser utilizado em substituição à eCG, porém sua meia-vida mais curta pressupõe a necessidade de mais aplicações, com o inconveniente do estresse associado à necessária contenção física para aplicação. Em grandes felídeos, a aplicação pode ser feita via equipamento de aplicação à distância (zarabatana ou similar), porém muitas vezes não se sabe se a dose correta foi realmente administrada. Por outro lado, a meia-vida mais longa do protocolo eCG/hCG (Swanson et al., 1997) pode induzir, após a resposta inicial, hiperestrogenismo (Brown et al., 1994), desenvolvimento de folículos e CLs acessórios, formação de anticorpos, retardo no transporte no oviduto



(Graham, 2000) e redução da qualidade embrionária (Roth et al., 1997). As alterações endócrinas que ocorrem em decorrência da aplicação de gonadotropinas exógenas modificam o ambiente uterino, reduzindo a sobrevivência embrionária, o que também acontece em outras espécies (Molina et al., 1991; Van der Auwera e D'Hooghe, 2001; Tavaniotou et al., 2002).

Comparando-se as taxas de sucesso após a inseminação artificial, parece que os resultados são melhores quando a gonadotropina (eCG) é aplicada em um momento em que a fêmea está apresentando baixa atividade ovariana, como é o caso das fêmeas de guepardo ou chita, que apresentam com certa frequência períodos de inatividade ovariana (Howard et al., 1997). Em fêmeas de leopardo-nebuloso, que apresentam ovulações espontâneas com maior frequência e que podem, portanto, apresentar CLs no momento do início da aplicação do protocolo, os resultados da IA são bem mais baixos (Howard et al., 1997).

A existência de corpo(s) lúteo(s) ou de folículos bem desenvolvidos no momento da aplicação de indutores hormonais de desenvolvimento folicular (eCG ou FSH) pode interferir na resposta ovariana (Pelican et al., 2008, 2010). Uma das alternativas para obter respostas ovarianas mais uniformes a protocolos hormonais é a utilização de progestinas (progestágenos sintéticos) na forma de implantes ou via oral, previamente à aplicação das gonadotropinas exógenas.

O uso de progestinas via oral, diariamente, tem resultado em uma inibição consistente e reversível da atividade ovariana em felídeos domésticos (Ballarotti et al., 2009; Stewart et al., 2010) e selvagens (Silva, 2009).

Resultados recentes, publicados por Stewart et al. (2012), indicaram que a utilização de progestina oral (altrenogest; 0,088 mg/kg) diariamente, durante 38 dias, em gatas domésticas, efetivamente inibiu a atividade folicular e aumentou a sensibilidade ovariana a gonadotropinas exógenas (eCG/hCG). Em face de um desafio por gonadotropina, as fêmeas que receberam essa progestina não apresentaram níveis hiperelevados de estrógenos fecais e sustentaram níveis normais de progesterona luteal no intervalo peri-implantação. Entretanto, também ficou aparente que a exposição prévia à progestina foi incapaz de evitar outras disfunções associadas ao uso de eCG/hCG, incluindo a formação de CLs acessórios, morfometria anormal de CLs e densidade celular luteal alterada (Stewart et al., 2012).

Considerações finais

Para enfrentar os desafios fisiológicos da reprodução de felídeos selvagens, é necessário um amplo conhecimento das particularidades que são espécie-específicas. Apesar das similaridades anatômicas e comportamentais dos membros da família Felidae, as respostas a protocolos hormonais apresentam muita variação, tanto específica como individual. A supressão da atividade ovariana por curto período pode, como em outras espécies (ex.: bovinos, equinos e ovinos), melhorar a resposta à indução do desenvolvimento folicular para o uso da IA ou da FIV/TE. A administração de esteroides exógenos com esse objetivo geralmente é realizada por meio de implantes subcutâneos ou diariamente, por via oral. A aplicação e a remoção do implante requerem contenção física e, principalmente para a remoção, também contenção farmacológica. A administração via oral, misturada ao alimento, apresenta uma série de vantagens, porém requer um controle efetivo que assegure que a fêmea ingira diariamente todo o princípio ativo administrado. Novas alternativas vão surgindo para tornar os procedimentos de reprodução assistida em felídeos mais práticos e efetivos. O treinamento de equipes habilitadas para realizar tais procedimentos nas diversas regiões é essencial para o manejo reprodutivo das populações em cativeiro, a fim de sempre maximizar a manutenção da diversidade genética.

Agradecimentos

O autor agradece à equipe da Itaipu Binacional, pelo apoio para a realização de diversos projetos conjuntos na área de reprodução de felídeos. Ao CNPq e à CAPES, pelo suporte para a realização das pesquisas.

Referências

- Ballarotti DT, Moraes W, Oliveira CA, Felipe EC, Moreira N.** Avaliação de protocolos para indução de inatividade ovariana em gatas domésticas. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.46, p.465-473, 2009.
- 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.
- Comizzoli P, Crosier AE, Songsasen N, Gunther MS, Howard JG, Wildt DE.** Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. *Reprod Domest Anim*, v.44, suppl. 2, p.47-52, 2009.
- 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.

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.

Gudermuth DF, Newton L, Daels P, Concannon P. Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. *J Reprod Fertil Suppl*, n.51, p.177-184, 1997.

Herrick JR, Bond JB, Campbell M, Levens G, Moore T, Benson K, D'Agostino J, West G, Okeson DM, Coke R, Portacio SC, Leiske K, Kreider C, Polumbo PJ, Swanson WF. Fecal endocrine profiles and ejaculate traits in black-footed cats (*Felis nigripes*) and sand cats (*Felis margarita*). *Gen Comp Endocrinol*, v.165, p.204-214, 2009.

Howard JG. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. In: Fowler ME, Miller RE (Ed.). *Zoo and wild animal medicine: current therapy IV*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. p.449-457.

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.

Howard JG, Wildt DE. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology*, v.71, p.130-148, 2009.

Lawler DF, Johnston SD, Hegstad RL, Keltner DG, Owens SF. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. *J Reprod Fertil Suppl*, n.47, p.57-61, 1993.

Molina I, Pla M, Vicente JS, Martin A, Romeu A. Induction of ovulation in rabbits with pure urinary luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin: comparison of oocyte and embryo quality. *Hum Reprod*, v.6, p.1449-1452, 1991.

Moreira N, Monteiro-Filho EL, Moraes W, Swanson WF, Graham LH, Pasquali OL, Gomes ML, 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.

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 Endocrinol*, v.144, p.110-121, 2005.

Pelican KM, Spindler RE, Pukazhenthil BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. Progestin exposure before gonadotropin stimulation improves embryo development after in vitro fertilization in the domestic cat. *Biol Reprod*, v.83, p.558-567, 2010.

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, Pukazhenthil B, Howard JG. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology*, v.66, p.37-48, 2006.

Pope CE, Gomez MC, Dresser BL. In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century. *Theriogenology*, v.66, p.59-71, 2006.

Pukazhenthil BS, Wildt DE. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing, and conserving wildlife? *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.33-46, 2004.

Roth TL, Wolfe BA, Long JA, Howard JG, Wildt DE. Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. *Biol Reprod*, 57:165-171, 1997.

Santymire RM, Brown JL, Stewart RA, Santymire RC, Wildt DE, Howard J. Reproductive gonadal steroidogenic activity in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*) assessed by fecal steroid analyses. *Anim Reprod Sci*, v.128, p.60-72, 2011.

Silva TMR. O uso de altrenogest para protocolos de reprodução assistida em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*). 2009. 96f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

Stewart RA, Pelican KM, Brown JL, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG. Oral progestin induces rapid, reversible suppression of ovarian activity in the cat. *Gen Comp Endocrinol*, v.166, p.409-416, 2010.

Stewart RA, Pelican KM, Crosier AE, Pukazhenthil BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. Oral progestin priming increases ovarian sensitivity to gonadotropin stimulation and improves luteal function in the cat. *Biol Reprod*, v.87, p.137, 2012.

Swanson WF. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, v.66, p.49-58, 2006.

Swanson WF. Research in nondomestic species: experiences in reproductive physiology research for



conservation of endangered felids. *ILAR J*, v.44, p.307-316, 2003.

Swanson WF, Wolfe BA, Brown JL, Martin-Jimenez T, Riviere JE, Roth TL, Wildt DE. Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. *Biol Reprod*, v.57, p.295-302, 1997.

Tavaniotou A, Albano C, Smitz J, Devroey P. Impact of ovarian stimulation on corpus luteum function and embryonic implantation. *J Reprod Immunol*, v.55, p.123-130, 2002.

Van der Auwera I, D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod*, v.16, p.1237-1243, 2001.

Wildt DE, Comizzoli P, Pukazhenti B, Songsasen N. Lessons from biodiversity the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.397-409, 2010.

Wildt DE, Swanson WF, Brown JL, Sliwa A, Vargas A. Felids ex situ for managed programmes, research, and species recovery. In: MacDonald DW, Loveridge A (Ed.). *Biology and conservation of wild felids*. Oxford: Oxford University Press, 2010. p.217-235.
