



# Técnicas de Reprodução Assistida em Felídeos Neotropicais

Nei Moreira ♦ Ronaldo Gonçalves Morato

## INTRODUÇÃO

Os mamíferos carnívoros são considerados elementos importantes na estrutura de comunidades, e o desaparecimento desses pode trazer graves conseqüências ao ambiente<sup>1</sup>. Os carnívoros, na sua maioria, utilizam grandes áreas, assumindo um papel de “indicadores ou ferramentas conservacionistas”, já que suas necessidades ecológicas podem abranger as de várias outras espécies<sup>2</sup>. Há hipóteses que sugerem que os predadores podem contribuir para a manutenção da diversidade biológica, predando espécies competitivamente dominantes<sup>3</sup>. Esse “efeito-chave” da predação baseia-se na suposição de que predadores podem manter espécies de níveis tróficos inferiores abaixo da capacidade de suporte do ambiente, reduzindo a intensidade de competição interespecífica, permitindo maior sobreposição de nicho e maior riqueza de espécies<sup>4</sup>.

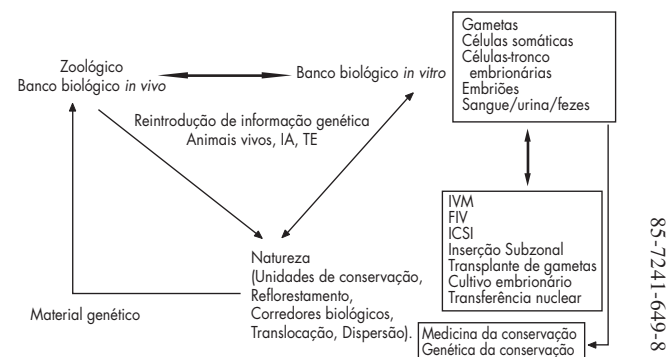
Na América Latina, os felídeos são representados por dez espécies: onça-pintada, suçuarana, jaguatirica, gato-do-mato-pequeno, gato-do-mato-grande, gato-palheiro, gato-maracajá, gato-mourisco, gato-montês-andino e guinha, mas essas duas últimas espécies não ocorrem no Brasil. Todos os felídeos estão, em diferentes graus, ameaçados de extinção em toda ou em partes de sua área natural devido, principalmente, a destruição e fragmentação de *habitat* e à caça. Esses e outros fatores podem levar ao isolamento de populações e a conseqüente diminuição da variabilidade genética, com posterior extinção local<sup>5,6</sup>.

A diminuição do intercâmbio genético, a longo prazo, leva à perda de variabilidade genética e diminuição do potencial reprodutivo, como relatado em guepardos (*Acinonyx jubatus*), leões (*Panthera leo*) e puma-da-flórida (*Puma concolor coryi*)<sup>7,8</sup>.

Uma ampla estratégia de conservação dessas espécies inclui, além da preservação de *habitat*, a criação em cativeiro, a formação de bancos de amostras biológicas e a aplicação de técnicas de reprodução assistida como ferramentas importantes no manejo de metapopulações (Fig. 77.1), garantindo a preservação de material genético *in vivo* (vida livre e cativeiro) e *in vitro* (por meio da criopreservação)<sup>9-11</sup>.

A maior parte dos pequenos felídeos em cativeiro em instituições latino-americanas tem origem conhecida, sendo provenientes da natureza ou com pais oriundos de determinada região. Não se pode dizer o mesmo da população de grandes felídeos em cativeiro na América Latina, composta por um grande número de animais de origem desconhecida ou oriundos do acasalamento de indivíduos de diferentes biomas e, possivelmente, subespécies distintas, podendo ser classificados como genéricos. Essa constatação reforça a necessidade do cuidado nos programas de acasalamento, para que sejam gerados animais com valor genético, sendo recomendado um manejo por biomas, respeitando o que se observou em termos de diferenciação histórica, ou seja, o ideal é cruzar os indivíduos com outros que venham da mesma região e do mesmo tipo de ecossistema\*.

Aspectos da reprodução de algumas espécies de felídeos neotropicais têm sido avaliados, já que o conhecimento básico da biologia da espécie, incluindo aspectos reprodutivos, é um



**FIGURA 77.1** – Integração das biotécnicas reprodutivas e do banco de amostras biológicas ao conceito de manejo de metapopulação.

IA = inseminação artificial; ICSI = injeção intracitoplasmática de espermatozoides; YVM = maturados *in vitro*; FIV = fertilização *in vitro*; TE =

\* EIZIRIK, E. Comunicação pessoal.

pré-requisito para o desenvolvimento de programas efetivos de reprodução<sup>12-18</sup>.

Em zoológicos latino-americanos, a sazonalidade parece não contribuir para a baixa taxa de reprodução ou qualidade espermática, porque não foram observadas diferenças nos parâmetros reprodutivos avaliados nas diferentes estações e a maioria dos felídeos latino-americanos não exibiu padrões circanuais pronunciados na capacidade reprodutiva, tanto fêmeas quanto machos<sup>5,15,16,19,20</sup>.

A descrição das características reprodutivas gerais, sugestões para o manejo reprodutivo (enriquecimento de recintos, protocolo para acasalamento) e avaliação reprodutiva de fêmeas de pequenos felídeos sul-americanos podem ser encontradas na literatura<sup>21-24</sup>. De modo geral, os resultados sugerem que fêmeas de jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá são poliétricas anuais com duração de ciclo estral de aproximadamente 16 a 19 dias. Fêmeas de jaguatirica, gato-do-mato-pequeno e gato-mourisco apresentam ovulação induzida, ao passo que fêmeas de gato-maracajá ovulam espontaneamente com relativa frequência.

Em pequenos felídeos, foi demonstrado que machos alojados isoladamente ou pareados apresentavam melhor qualidade de sêmen quando comparados a machos alojados em grupos, possivelmente refletindo os vários níveis de estresse sob diferentes condições sociais e de recinto.

As técnicas de reprodução assistida, como inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões podem incrementar o intercâmbio genético, principalmente entre instituições, como já demonstrado para algumas espécies de felídeos. Essas técnicas podem também contribuir para a preservação de espécies, por meio da formação de bancos de material biológico, contendo gametas e embriões provenientes de animais de vida livre e cativo. Sugere-se, ainda, que a preservação de células somáticas possa contribuir na conservação de espécies ameaçadas de extinção por meio da técnica de clonagem, no entanto, há limitações técnicas desse procedimento, assim como a comunidade científica deve debater os princípios éticos dessa nova tecnologia<sup>25</sup>.

Obviamente, a aplicação dessas técnicas está dependente da obtenção e preservação adequada das amostras biológicas, assim como do conhecimento de fisiologia reprodutiva das espécies de interesse.

Considerando o importante papel de gametas e embriões na formação de bancos de reserva genômica, torna-se premente o desenvolvimento de protocolos que permitam maior taxa de recuperação de gametas e embriões pós-descongelamento, assim como o aperfeiçoamento das técnicas de produção de embriões no intuito de aumentar a taxa de clivagem. Adicionalmente, protocolos de criopreservação de tecidos ovarianos e testiculares surgem como alternativa na obtenção de gametas de animais mortos.

## EXAME ANDROLÓGICO

Estudos recentes têm demonstrado a viabilidade de obtenção de amostras de sêmen de mamíferos da ordem Carnivora em cativo e vida livre<sup>12,14</sup>. Swanson *et al.* relataram que após realizar avaliação reprodutiva em 185 felídeos machos de oito espécies endêmicas latino-americanas, mantidos em 44 zoológicos e criadouros em 12 países latino-americanos, a maioria

(mais de 95%) dos felídeos era proveniente da natureza e poucos (menos de 20%) haviam produzido descendentes em cativeiro<sup>19</sup>. Dessa forma, tornam-se necessários maiores estudos visando aumentar o sucesso reprodutivo.

As avaliações reprodutivas devem seguir também um protocolo padrão, para permitir comparação entre indivíduos. Normalmente realiza-se a exposição manual do pênis e a avaliação da morfologia peniana, avaliação da consistência testicular, medidas do comprimento e largura testiculares para cálculo do volume testicular e um protocolo padrão de eletrojaculação<sup>26</sup>. Também amostras de sangue podem ser coletadas para análise de hormônios, como testosterona e cortisol.

O pênis deve ser avaliado com relação à presença ou ausência de espículas e quaisquer anormalidades (por exemplo, aderências, lesões). Machos de onça-pintada e suçuarana apresentam espículas arredondadas e chatas, bem espaçadas na glândula. As espículas penianas são proeminentes no gato-do-mato-pequeno, gato-do-mato-grande, gato-palheiro e gato-mourisco; mais desenvolvidas nos machos de jaguatirica e inexistentes no gato-maracajá<sup>19</sup>.

A consistência dos testículos deve ser avaliada por palpação e esses subjetivamente são classificados como duros, normais (firmes) ou flácidos. O aumento da consistência testicular pode ser indicativo de fibrose testicular, bem como a diminuição da consistência (testículos flácidos) pode ser indicativa de um início de degeneração testicular.

Paquímetros são usados para medir o comprimento e a largura de cada testículo, e esses valores são utilizados para calcular o volume testicular combinado, utilizando-se a fórmula  $V = C \times L^2 \times 0,524$ ; onde  $V$  = volume testicular ( $\text{cm}^3$ ),  $C$  = comprimento testicular (cm) e  $L$  = largura testicular (cm)<sup>27</sup>.

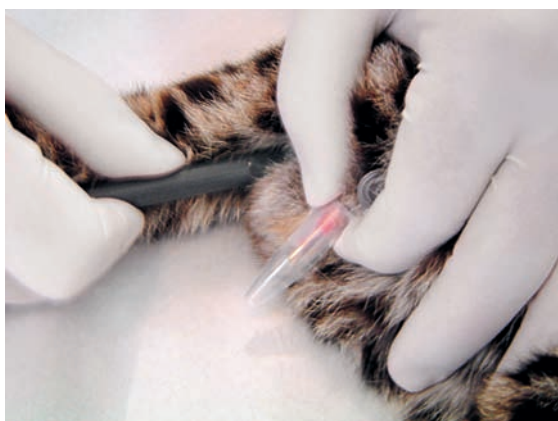
Um transdutor retal lubrificado ( $\cong 1$  a 2,3cm de diâmetro e  $\cong 13$  a 29cm de comprimento, com o tamanho dependendo da espécie) é inserido no reto, tomando-se o cuidado para que os eletrodos fiquem voltados em sentido ventral, para a adequada estimulação do plexo pélvico. Antes de iniciar os estímulos elétricos, o pênis deve ser exposto e encaixado em recipiente plástico estéril pré-aquecido (a aproximadamente 37°C) (Fig. 77.2). Um eletroestimulador é utilizado para a aplicação de 80 a 90 estímulos, com uma variação de voltagem de 2 a 6V, divididos em três séries separadas:

- *Série 1:* 30 estímulos (10 de 2V, 10 de 3V e 10 de 4V).
- *Série 2:* 30 estímulos (10 de 3V, 10 de 4V e 10 de 5V).
- *Série 3:* 20 a 30 estímulos (10 de 4V, 10 de 5V e, caso necessário, 10 de 6V).

Cada estímulo deve ter uma duração aproximada de 2 a 3s. A distensão simultânea dos membros pélvicos deve ser acompanhada durante todos os estímulos para assegurar o correto posicionamento do transdutor retal<sup>12</sup>.

O sêmen é avaliado inicialmente quanto à cor, o volume e a presença ou ausência de espermatozoides. Deve-se tomar o cuidado de utilizar um novo recipiente a cada série, para evitar a possibilidade de contaminação por urina nas amostras obtidas nas séries anteriores.

No caso da presença de espermatozoides, determinada microscopicamente (100×), avalia-se também a motilidade (0 a 100%) e a taxa de motilidade progressiva ou vigor (em uma



**FIGURA 77.2** – Coleta de sêmen em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*).

escala de 0 a 5, onde 0 = sem movimento, 1 = movimento estacionário sem progressão e 5 = progressão muito rápida). Ambos os parâmetros de motilidade são utilizados para calcular o índice de motilidade espermática [IME = % móveis + (20 × taxa de motilidade progressiva)/2] para cada ejaculado.

Para avaliação da morfologia espermática, uma alíquota de sêmen (5 a 10 μL) pode ser fixada em glutaraldeído a 0,3% (100 μL) ou solução formol salina para posterior coloração e avaliação de 200 espermatozoides por microscopia de contraste de fase (aumento de 640 a 1.000×) e determinação da porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais e pleiomórficos. Certas espécies (como onça-parda, gato-maracajá, gato-do-mato-pequeno e gato-mourisco) produzem frequentemente uma baixa proporção (menos de 40%) de espermatozoides morfologicamente normais<sup>19</sup>.

A amostra de sêmen pode ser diluída com um volume igual (1:1) de um meio de cultura (por exemplo, Ham F10, com HEPES e sem bicarbonato) aquecido (37°C), que pode ser suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os ejaculados que contêm espermatozoides de cada série da eletroejaculação são combinados para a determinação da concentração espermática por meio de contagem utilizando uma câmara de Neubauer. Os grandes felídeos possuem testículos maiores e produzem mais sêmen, porém, tendem a produzir ejaculados menos concentrados<sup>19</sup>. Os ejaculados de pequenos felídeos são mais concentrados, mas contêm um número total de espermatozoides menor. Considerando a importância das condições de cativeiro na reprodução de felídeos, foi demonstrado que machos alojados isoladamente ou pareados com uma fêmea da mesma espécie apresentam um maior número de espermatozoides por ejaculado e maiores volumes seminal e testicular do que machos alojados com outros machos<sup>19</sup>.

Os espermatozoides podem ainda ser avaliados quanto à capacidade funcional, sendo utilizados o teste de penetração em oócito heterólogo e o teste de expansão hiposmótico, que avalia a integridade da membrana espermática.

A determinação do *status* acrossomal de espermatozoides de felídeos pode ser feita por um método simples de coloração, descrito por Pope *et al.*<sup>28</sup> Além dessa coloração, pode ser utilizada a coloração tripla ou sondas fluorescentes como FITC (isotiocianato de fluoresceína), PNA (aglutinina do amendoim)

e carboxifluoresceína para avaliar a integridade da membrana acrossomal; e IP (iodeto de propídeo) ou HOEST, para avaliação da integridade da membrana espermática<sup>29,30</sup>.

## CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

O sêmen pode ser resfriado para transporte durante curto período, porém, em estudos realizados com jaguatiricas e onças, o transporte do sêmen por 2 a 3 h a temperatura ambiente foi menos deletério à integridade estrutural e funcional dos espermatozoides que seu transporte sob refrigeração<sup>30,31</sup>.

Normalmente apenas amostras com um padrão mínimo de qualidade espermática devem ser congeladas (por exemplo, nº total de espermatozoides/ejaculado  $\geq 5 \times 10^6$  espermatozoides móveis com IME  $\geq 50$ ). O ejaculado que atende a esse padrão é centrifugado (200 a 300g/10min) para remoção do fluido seminal e do meio de cultura, e o *pellet* resultante é ressuspenso em meio crioprotetor para uma concentração-alvo de 50 a 100 × 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis/mL. Existem várias opções de crioprotetores e variações na composição dos meios utilizados no congelamento<sup>32</sup>. O sêmen diluído pode ser resfriado em um refrigerador, caixa de isopor ou máquina de congelamento durante 30min a 5°C. O sêmen, depois de resfriado, pode ser congelado por um dos quatro métodos:

- Em *pellets* por meio de endentações em gelo seco.
- Congelamento em palhetas em uma taxa controlada (-40°C/min) sobre vapor de nitrogênio líquido<sup>33</sup>.
- Utilizando uma máquina de congelamento (Fig. 77.3,A).
- Diretamente no *dry shipper*\* (Fig. 77.3,B).



**FIGURA 77.3** – (A) Máquina para congelamento de sêmen. (B) Congelamento de sêmen usando o *dry shipper*.

\* SPINDLER, MORATO. Comunicação pessoal.

As palhetas ou *pellets* congelados devem ser devidamente acondicionados, identificados e armazenados em botijões de nitrogênio líquido. No entanto, os melhores métodos de criopreservação de sêmen nas várias espécies de felídeos ainda estão por ser estabelecidos, haja vista a variabilidade interespecífica encontrada.

## ESTIMULAÇÃO OVARIANA

As gonadotropinas exógenas utilizadas para estimular o desenvolvimento folicular e induzir a ovulação em gatas domésticas são também efetivas em espécies selvagens. Infelizmente, além da variabilidade individual na resposta ovariana universalmente observada após a administração de hormônios gonadotrópicos, há imensas diferenças espécie-específicas na sensibilidade, de tal forma que a determinação da dose ótima não é simplesmente uma questão de extrapolação<sup>34</sup>.

Todas as sete das oito espécies de pequenos felídeos encontrados na América Latina (jaguaritica, gato-maracajá, gato-do-mato-pequeno, gato-do-mato-grande, gato-palheiro, guinha, gato-montês-andino) estão classificadas na linhagem da jaguaritica, com base na taxonomia e em análise genética molecular<sup>35</sup>. Resultados de cinco dessas espécies sugerem que a relativa insensibilidade a gonadotropinas exógenas seja uma característica conservada na linhagem da jaguaritica. Essas espécies requerem doses de gonadotropinas que são 50 a 400% maiores com base no peso corporal que aquelas usadas em gatas domésticas ou outros felídeos (Tabela 77.1)<sup>36-42</sup>. Essa propensão genética contra a hiperestimulação ovariana também pode ser refletida no tamanho médio da ninhada (de 1 a 2 filhotes), tipicamente observado nessas espécies<sup>36</sup>.

## INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Vários protocolos, contendo gonadotropinas para estimular a atividade ovariana e a ovulação, têm sido avaliados para a inseminação artificial (IA) e para a obtenção de oócitos. A administração de ECG (gonadotropina coriônica equina) ou FSH (hormônio foliculo-estimulante) é efetiva para induzir o desenvolvimento folicular, enquanto a utilização de HCG (gonadotropina coriônica humana) ou LH (hormônio luteinizante) induz

a ovulação<sup>43,44</sup>. Uma única injeção de ECG é suficiente para induzir desenvolvimento folicular em felídeos, devido à sua longa meia-vida biológica (aproximadamente 120h), ao passo que o FSH deve ser administrado em uma série de injeções diárias devido à sua curta persistência na circulação<sup>45</sup>. Há uma diferença marcante entre os felídeos na resposta ovariana às dosagens de gonadotropinas<sup>46</sup>. Por exemplo, a jaguaritica requer 500UI de ECG (cinco vezes a dose do leopardo-nebuloso) para apresentar uma atividade folicular ovariana similar<sup>45,47</sup>.

A inseminação artificial laparoscópica (intra-uterina) tem apresentado melhores resultados que a não cirúrgica (vaginal ou transcervical), talvez devido ao fato da própria anestesia comprometer o transporte espermático e a laparoscopia permitir a deposição do sêmen no corno uterino próximo ao local da fertilização (oviduto)<sup>7,37,46</sup>.

Considerando apenas as espécies latino-americanas, a inseminação artificial com sêmen fresco ou congelado teve sucesso (produziu descendentes) em suçuarana, jaguaritica e gato-do-mato-pequeno<sup>39,41,48</sup>. No caso de sêmen fresco, a centrifugação e remoção do plasma seminal são necessárias para diminuir o risco da transmissão de infecções bacterianas e aumentar as taxas de prenhez<sup>37,46,49</sup>.

Como a anestesia compromete a ovulação em felídeos, o ideal é que a IA seja realizada após a ovulação ter iniciado. Entretanto, o tempo de ovulação difere entre as espécies<sup>46</sup>.

## Criopreservação de Parênquima Testicular e Transplante de Espermatogônias

O transplante de espermatogônias é a remoção de células-tronco de um doador e sua transferência para um receptor, até o presente momento heterólogo, aonde elas irão se desenvolver e formar espermatozoides maduros com características genéticas do doador. Essa técnica foi desenvolvida em 1994, por Brinster e colaboradores, e tem proporcionado enormes possibilidades para o estudo tanto da biologia da células-tronco quanto do processo espermatogênico em si e das interações entre células de Sertoli – células germinativas, além de pesquisas em potencial no campo da agricultura, da preservação de espécies e medicina reprodutiva<sup>49-52</sup>.

**TABELA 77.1**

**Sensibilidade Ovariana Comparada de Felídeos Latino-americanos a Gonadotropinas Exógenas<sup>36</sup>**

ESPÉCIE	PESO CORPORAL (kg)	DOSE <sup>A</sup> ECG/HCG	DOSE ECG/PC (UI/kg)	Nº DE FÊMEAS TRATADAS	RESPOSTA OVARIANA <sup>B</sup>	TAMANHO DA NINHADA
Gato doméstico	3,5	100/75	29	30	9,4	4
Guepardo	35	200/100	6	18	10,7	4
Leopardo-nebuloso	15	100/75	7	5	10,8	3
Jaguaritica	9	400/200	44	28	9,7	1
Gato-maracajá	3	200/150	67	4	8,7	1
Gato-do-mato-pequeno	1,7	200/150	118	11	10,3	2
Gato-do-mato-grande	3,8	200/150	53	14	15,2	2
Gato-palheiro	2,9	100/75	35	2	14	2

Referências:<sup>37,42</sup> e Swanson, dados não publicados.

<sup>A</sup>Dose (UI) de gonadotropina coriônica equina (ECG)/gonadotropina coriônica humana (HCG).

<sup>B</sup>Número médio de estruturas ovarianas (foliculos e Cl) por fêmea tratada com a dose listada.

PC = peso corporal.

Além disso, outro avanço muito importante conseguido por meio da técnica do transplante de espermatogônias foi o sucesso do transplante de células germinativas criopreservadas e cultivadas em camundongos<sup>53,54</sup>. Assim, com o congelamento e armazenamento de células germinativas, poderá ser possível preservar indefinidamente linhagens de células espermatogênicas de espécies em extinção. Dessa forma, as espermatogônias-tronco poderiam ser consideradas “imortais”<sup>53</sup>.

### Coleta de Oócitos e Fertilização *in Vitro*

Oócitos têm sido obtidos de fêmeas mantidas em cativeiro, por laparoscopia, após tratamento hormonal<sup>55</sup>. Tem sido observada variação nos resultados dos protocolos de indução da atividade ovariana assim como nos procedimentos de fertilização *in vitro*. De forma geral, existem poucas informações acerca do sucesso de criopreservação de oócitos de mamíferos carnívoros, e essa é considerada uma importante técnica na preservação de gametas fêmeas obtidos de animais mortos<sup>56</sup>.

Embriões oriundos de fertilização *in vitro* foram produzidos em onça-pintada, suçuarana, jaguatirica, gato-do-mato-pequeno, gato-do-mato-grande e gato mourisco usando sêmen fresco ou descongelado<sup>57-60</sup>.

Embora os primeiros filhotes de felinos tenham sido produzidos a partir de oócitos maturados *in vivo*, após aspiração folicular de fêmeas tratadas com gonadotropinas, muitos dos trabalhos recentes na produção de embriões *in vitro* têm sido feitos a partir de oócitos maturados *in vitro* (IVM), utilizando a gata doméstica como animal modelo. A competência para maximizar a produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos maturados *in vitro* é essencial para que essa técnica tenha maior relevância para a conservação de felídeos ameaçados<sup>61</sup>.

### Criopreservação de Parênquima Ovariano, Oócitos e Manipulação de Folículos Pré-antrais

A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) é uma biotécnica que surgiu como uma via alternativa para o desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas, tais como a fertilização *in vitro* (FIV), a clonagem e a transgênese. A MOIFOPA compreende três fases: o resgate de folículos pré-antrais, a conservação desses (resfriamento e criopreservação) e o cultivo *in vitro* até o estágio de maturação folicular, pertencendo ao grupo de biotécnicas fundamentais ligadas à reprodução, que se encontram em franco desenvolvimento<sup>62</sup>.

Os oócitos inclusos em folículos pré-antrais podem ser congelados *in situ*, isto é, no interior do próprio tecido ovariano ou após isolamento<sup>63,64</sup>. Pesquisadores têm concentrado seus esforços para a criopreservação de folículos pré-antrais *in situ*. Esses estudos têm demonstrado, por análise histológica, que folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano após a congelação e descongelação apresentam-se morfológicamente normais<sup>65</sup>. Dessa forma, o tecido ovariano congelado, contendo os folículos pré-antrais, pode ser utilizado posteriormente para transplantes.

### Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

A partir da FIV, embriões têm sido produzidos em algumas espécies de felídeos selvagens, mas a taxa de fertilização/clivagem geralmente é mais baixa que a obtida no gato doméstico<sup>66-69</sup>. Um estudo realizado demonstrou que a redução ou a falha na fertilização geralmente era consequência da baixa qualidade espermática, incluindo motilidade. A baixa qualidade seminal é uma característica constante de várias espécies de felídeos selvagens e é um fator limitante para a aplicação de rotina com sucesso da IA e FIV para programas de manejo e conservação<sup>70,71</sup>.

A fertilização assistida por micromanipulação, especificamente a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), revolucionou o tratamento de pacientes que não engravidavam pela baixa qualidade espermática dos maridos e agora é um procedimento padrão na maioria das clínicas de fertilidade humana. As taxas de fertilização e clivagem após a ICSI são similares às daquelas de pacientes submetidas à FIV com sêmen normal<sup>72</sup>.

A ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) pode ser aplicada com sucesso em felídeos e tem sido sugerido que essa técnica efetivamente acrescentará aos resultados de outras biotécnicas que estão sendo desenvolvidas para aumentar a reprodução de felídeos ameaçados<sup>73</sup>.

### Criopreservação e Transferência de Embriões

A fertilização *in vitro* foi bem sucedida em pelo menos um terço das espécies de felídeos selvagens e houve o nascimento de filhotes após a transferência de embriões de gato-do-deserto-indiano (*Felis sylvestris ornata*) para gata doméstica e após transferência co-específica de embriões de tigre (*Panthera tigris*). A gata doméstica não é apenas um modelo valioso para o desenvolvimento de técnicas *in vitro*, mas também pode ser útil como receptora de embriões de várias espécies de pequenos felídeos selvagens.

Foi também relatado sucesso na transferência de embriões congelados-descongelados na jaguatirica<sup>59</sup>.

Um resumo de referências documentando a aplicação da ciência da reprodução em felídeos latino-americanos pode ser observado na Tabela 77.2<sup>14-16,20,22-24,36,39,41,45,58,59,70,73-86</sup>.

### Transferência Nuclear

O sucesso da transferência de um núcleo de uma célula doadora para um oócito anucleado foi reportado em ovelha, camundongo, vaca, cabra, porca e gata<sup>87-92</sup>. Entretanto, a clonagem pode não ser imediatamente aplicável a outras espécies de mamíferos se houver limitação de conhecimento quanto ao processo reprodutivo da espécie de interesse ou obstáculos espécie-específicos. Adicionalmente, o sucesso atual da clonagem está na ordem de 0,1 a 5%, o que significa que são necessárias entre 20 a 1.000 transferências nucleares para a obtenção de um único indivíduo<sup>93</sup>.

Tais limitações podem ser agravadas se considerarmos o difícil acesso a amostras de animais selvagens. Por outro lado, caminhos alternativos podem auxiliar o desenvolvimento dessa técnica, supostamente capaz de auxiliar na manutenção da diversidade genética de espécies ameaçadas de extinção<sup>94</sup>.

85-7241-649-8

TABELA 77.2

Aplicação da Ciência da Reprodução em Felídeos Latino-americanos. Adaptado de Swanson e Brown, 2004<sup>36</sup>

ESPÉCIE	ANÁLISE ENDÓCRINA	COLETA DE SÊMEN	CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOÍDES	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	FERTILIZAÇÃO IN VITRO	CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES
Onça-pintada	+14,20,74,76	+14,20,41,58,75,77,78	+41,75,78	-	+58	-	-
Suuarana	+70,74,75,79	+70,75,77,79,82	+75	+80,82	+81	-	-
Jaguatirica	+15,16,24,39,45,59,75,83	+16,39,45,75,77,83,84	+45,75	+39,45	+59,84	+59,84	+59
Gato-maracajá	+15,16,24,39,75,83,85	+16,39,45,77,83	+75	+39	-	-	-
Gato-do-mato-pequeno	+39,74,75,82	+16,39,75,77,83	+75	+39	+84	+84	+*
Gato-do-mato-grande	+75,86	+75,77	+75	+*	+*	+*	-
Gato-palheiro	+75	+75,77	+75	-	-	-	-
Gato-montês-andino	-	-	-	-	-	-	-
Guinha (kodkod)	-	-	-	-	-	-	-
Jaguarundi	+22,24,74,75	+75,77	+75	+*	+73	-	-

\*Swanson, não publicado.  
+ = presença; - = ausência.

Por exemplo, pequenos felídeos atropelados são comumente encontrados nas rodovias do Brasil. Caso houvesse um programa integrado, fragmentos de ovários e tecidos somáticos poderiam ser coletados e encaminhados a laboratórios de referência. Tais laboratórios poderiam criopreservar os fragmentos ovarianos e cultivar as células somáticas, materiais necessários para a transferência nuclear. Em um futuro próximo, com maior conhecimento dos aspectos reprodutivos das espécies de interesse e aperfeiçoamento da técnica de clonagem, seria possível obter animais viáveis que contribuiriam efetivamente nos programas de conservação (ver Fig. 77.1).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria das espécies de felídeos selvagens reproduz em cativeiro, porém, genética inadequada e incompatibilidade comportamental freqüentemente ocorrem. A aplicação da IA e FIV/TE, em conjunto com a criopreservação de gametas e embriões, permitirá um manejo reprodutivo mais eficiente de populações cativas de algumas espécies. Com o desenvolvimento posterior, o intercâmbio de gametas e embriões entre animais em cativeiro e vida livre será possível, permitindo a incorporação de material genético em programas de conservação.

A capacidade para utilizar a reprodução assistida para a conservação prática da fauna selvagem requer pesquisa básica para cada espécie. O estudo dos mecanismos reprodutivos básicos é a chave para compreender os processos fisiológicos que eventualmente permitem que as técnicas de reprodução artificial tornem-se rotina. De forma geral, o uso dessas técnicas representa um poderoso recurso de conservação, especialmente se planos de manejo regionais, nacionais ou mesmo globais possam ser desenvolvidos e implementados.

## Referências Bibliográficas

1. TERBORGH, J. Maintenance of diversity on tropical forests. *Biotropica*, v. 24, p. 283-292, 1992.
2. NOSS, R. F.; QUIGLEY, M. G.; HORNOCKER, T. et al. Conservation biology and carnivore conservation in the Rocky Mountains. *Conserv. Biol.*, v. 10, p. 949-963, 1996.
3. PAINE, R. T. Food web complexity and species diversity. *Am. Natural.*, v. 100, p. 65-75, 1966.
4. BEGON, M. J. L.; HARPER, C. R.; TOWNSEND, I. *Ecology: individuals, populations and communities*. 2. ed. Blackwell: Oxford, 1990.
5. NOWELL, K.; JACKSON, P. *Wild Cats: status survey and conservation action plan*. Gland: IUCN/SSC Cat Specialist Group, 1996. 382p.
6. OLIVEIRA, T. G. *Neotropical Cats: ecology and conservation*. São Luís: Edufma, 1994. 222p.
7. WILDT, D. E.; BUSH, M.; GOODROWE, K. L. et al. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature*, v. 329, p. 328-331, 1987.
8. ROELKE, M. E.; MARTERSON, J. S., O'BRIEN, S. J. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Current Biol*, v. 3, p. 340-350, 1993.
9. SOULÉ, M. E. Conservation tactics for a constant crisis. *Science*, v. 253, p. 744-749, 1991.
10. MEDELLIN, R.; REDFORD, K.; HOWARD, Q. et al. *The Jaguar in the New Millennium*. Cidade do México: Unam, WCS, 2002.

11. MORATO, R. G.; BARNABE, R. C. Potential of reproductive techniques for jaguar conservation. In: MEDELLIN, R. et al. *El Jaguar en el Nuevo Milenio: una evaluación de su estado, detección de prioridades y recomendaciones para la conservación de los jaguares en América*. Cidade do México: Unam, WCS, 2002.
12. HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER M. E. *Zoo and Wild Animal Medicine: current therapy*. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p. 390-399.
13. BARONE, M. A.; ROELKE, M. E.; HOWARD, J. G. et al. Reproductive characteristics of male Florida panthers: comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American zoos. *J. Mammal*, v. 75, p. 150-62, 1994.
14. MORATO, R. G.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C. et al. Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction*, v. 122, p. 745-751, 2001.
15. MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAES, W. et al. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. *Zoo Biol.*, v. 20, p. 103-116, 2001.
16. MORAIS, R. N.; MUCCILOLO, R. G.; GOMES, M. L. F. et al. Seasonal analysis of seminal characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology*, v. 57, p. 2027-2041, 2002.
17. WILDT, D. E.; BUSH, M. Reproductive physiology studies in zoological species: concerns and strategies. *Zoo Biol.*, v. 3, p. 363-372, 1984.
18. WILDT, D. E.; BROWN, J. L.; BUSH, M. et al. Reproductive status of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in North American zoos: the benefits of physiological surveys for strategic planning. *Zoo Biol.*, v. 12, p. 45-80, 1993.
19. SWANSON, W. F.; JOHNSON, W. E.; CAMBRE, R. C. et al. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. *Zoo Biol.*, v. 22, p. 421-441, 2003.
20. MORATO R. G.; VERRESCHI, I. T. N.; GUIMARÃES, M. A. B. V. et al. Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). *Theriogenology*, v. 61, p. 1273-1281, 2004.
21. MOREIRA, N. Reproduction in small female felids. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. Ames: Iowa State University Press, 2001. cap. 27, p. 301-308.
22. BERBARE, P. E. B. *Avaliação Longitudinal das Concentrações de Esteróides Fecais em Fêmeas de Gato-mourisco (Herpailurus yagouaroundi, Lacépède, 1809)*. São Paulo, 2004, 110p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
23. BROUSSET, D. M.; GALINDO, F.; VALDEZ, R. et al. Behavior and fecal cortisol as noninvasive indicators for the assessment of welfare in captive small Mexican felines. XXXIV INTERNATIONAL CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF APPLIED ETHOLOGY, 2000. Florianópolis. p. 118. In: *Proceedings of the XXXIV International Congress of the International Society of Applied Ethology*, 2000.
24. BROUSSET, D. M. *Efecto del Enriquecimiento Ambiental sobre el Bienestar de Tres Especies de Felinos Mexicanos en Peligro de Extinción (Ocelote, Margay y Jaguarundi) Mantenido en Cautiverio*. México, 2003. Tese (Doutorado) – Ciências Veterinárias, Universidad Nacional Autónoma de México.
25. HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; PRATHER, R. S. Wildlife conservation and reproductive cloning. *Reproduction*, v. 127, p. 317-324, 2004.
26. WILDT, D. E.; BUSH, M.; HOWARD, J. G. et al. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol. Reprod.*, v. 29, p. 1019-1025, 1983.
27. WILDT, D. E.; BUSH, M.; O'BRIEN, S. J. *Training Manual: reproduction, genetics and veterinary medicine*. Front Royal: Center for New Opportunities in Animal Health Sciences (NOAHS), Conservation and Research Center, National Zoo, Smithsonian Institution, 1993.
28. POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.
29. TALBOT, P.; CHACON, R. S. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.*, v. 215, p. 201-208, 1981.
30. QUEIROZ, V. S. *Estudo do Efeito das Condições de Manipulação do Sêmen de Jaguatiricas (Leopardus pardalis, Linnaeus, 1758) sobre a Capacitação e a Integridade Morfológica e Funcional dos Espermatozoides*. São Paulo, 2003, 130p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
31. MORATO, R. G.; WILDT, D. E.; SPINDLER, R. E. Effects of medium-term storage of cat sperm prior to cryopreservation. *Theriogenology*, v. 57, p. 349, 2003.
32. PLATZ, C.; WILDT, D. E.; SEAGER, S. Pregnancies in the domestic cat using artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v. 52, p. 279-282, 1978.
33. WOOD, T. C.; SWANSON, W. F.; DAVIS, R. M. et al. Functionality of sperm from normo- vs. teratospermic domestic cats cryopreserved in pellets or straw containers. *Theriogenology*, v. 39, p. 342, 1993.
34. HOWARD, J. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. *Zoo Wildlife Medicine: current therapy*, Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. v. 4., cap. 61, p. 449-457.
35. JOHNSON, W. E.; SLATTERY, J. P.; EIZIRIK, E. et al. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Mol. Ecol.*, v. 12, suppl. 1, p. S79-S94, 1999.
36. SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *Anim. Reproduct. Sci.*, v. 82-83, p. 21-34, 2004.
37. HOWARD, J. G.; BARONE M. A.; DONOGHUE, A. M. et al. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J. Reprod. Fertil.*, v. 96, p. 175-186, 1992.
38. HOWARD, J. G.; ROTH, T. L.; BYERS, A. P. et al. 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.
39. MORAES, W.; MORAIS, R. N.; MOREIRA N. et al. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). In: CONGRESS OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1997. *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*, 1997, p. 334-335.
40. SUNQUIST, M.; SUNQUIST, F. *Wild Cats of the world*. Chicago: The University of Chicago Press, 2002.
41. SWANSON, W. F.; ROTH, T. L.; BLUMER, E. et al. Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Panthera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology*, v. 45, p. 241, 1996. (Abstract).
42. SWANSON, W. F.; PAZ, R. C. R.; MORAIS, R. N. et al. 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).
43. MOORE, H. D. M.; BONNEY, R. C.; JONES, D. M. Successful induced ovulation and artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). *Vet. Rec.*, v. 108, p. 282-283, 1981.

44. WILDT, D. E.; PLATZ, C. P.; SEAGER, S. W. J. et al. Induction of ovarian activity in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol. Reprod.*, v. 24, p. 217-222, 1981.
45. SWANSON, W. F.; HOWARD, J. G.; ROTH, T. L. et al. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *J. Reprod. Fertil.*, v. 106, p. 87-94, 1996.
46. HOWARD, J. G. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. In: FOWLER, M. E. *Zoo and Wild Animal Medicine: current therapy*. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999. p. 449-457.
47. HOWARD, J. G.; BYERS, A. P.; BROWN, J. L. et al. Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Zoo Biol.*, v. 15, p. 55-69, 1996.
48. BARONE, M. A.; WILDT, D. E.; BYERS, A. P. et al. Gonadotropin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). *J. Reprod. Fertil.*, v. 101, p. 103-108, 1994.
49. BRINSTER, R. L.; AVARBOCK, M. R. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 91, p. 11303-11307, 1994.
50. BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 91, p. 11298-11302, 1994.
51. HAUSLER, C. L.; RUSSELL, L. D. Prospects for spermatogonial transplantation in livestock and endangered species. In: GAGNON, C. *The Male Gamete: from basic science to clinical applications*. Vienna: Cache River Press, v. 2, p. 37-45, 1999.
52. MEACHEM, S.; VON SCHÖNFELDT, V.; SCHLATT, S. Spermatogonia: stem cell with a great perspective. *Reproduction*, v. 121, p. 825-834, 2001.
53. AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, C. J.; BRINSTER, R. L. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Med.*, v. 2, p. 693-696, 1996.
54. NAGANO, M.; BRINSTER, R. L. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. *APMIS*, v. 106, p. 47-57, 1998.
55. PAZ, R. C. R. *Biotechnologias da Reprodução Utilizadas como Ferramentas Auxiliares no Manejo e Conservação de Duas Espécies de Felinos Selvagens: Leopardus pardalis e Leopardus tigrinus*. São Paulo, 2004, 148p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
56. SILVA, A. R.; MORATO, R. G.; SILVA, L. D. M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *An. Reprod. Sci.*, p. 159-175, 2004.
57. MILLER, A. M.; ROELKE, M. E.; GOODROWE, K. L. et al. Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (*Felis concolor*). *J. Reprod. Fertil.*, v. 88, p. 249-258, 1990.
58. MORATO, R. G.; CRICHTON, E. G.; PAZ, R. C. R. et al. Ovarian stimulation and successful in vitro fertilization in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*, v. 53, p. 339, 2000.
59. SWANSON, W. F. Reproductive biotechnology and conservation of the forgotten felids – the small cats. In: I INTERNATIONAL SYMPOSIUM IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY FOR CONSERVATION AND GENETIC MANAGEMENT OF WILDLIFE, 2001. Omaha. *Proceedings of the I International Symposium in Assisted Reproductive Technology for Conservation and Genetic Management of Wildlife*, 2001, p. 100-120.
60. SWANSON, W. F.; PAZ, R. C. R.; MORAIS, R. N. et al. 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.
61. POPE, C. E. In vitro fertilization and embryo transfer in felids. *Methods Mol. Biol.*, v. 254, p. 227-244, 2004.
62. FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C. J.; VAN DEN HURK, et al. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology*, v. 40, p. 789-799, 1993.
63. BAHADUR, G.; STTELE, S. J. Ovarian tissue cryopreservation for patients. *Hum. Reprod.*, v. 11, p. 2215-2216, 1996.
64. JEWGENOW, K.; PENFOLD, L. M.; MEYER, H. H. D. et al. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J. Reprod. Fert.*, v. 112, p. 39-47, 1998.
65. HOVATTA, O.; SILYE, R.; KRAUSZ, T. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum. Reprod.*, v. 11, p. 1268-1272, 1996.
66. GOODROWE, K. L.; MILLER, A. M.; WILDT, D. E. In vitro fertilization of gonadotrophin-stimulated Leopard Cat (*Felis bengalensis*) follicular oocytes. *J. Exp. Zool.*, v. 252, p. 89-95, 1989.
67. MILLER, A. M.; ROELKE, M. E.; GOODROWE, K. L. et al. Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (*Felis concolor*). *J. Reprod. Fertil.*, v. 88, p. 249-258, 1990.
68. DONOGHUE, A. M.; HOWARD, J. G.; BYERS, A. P. et al. Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization in vitro in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol. Reprod.*, v. 46, p. 1047-1056, 1992.
69. POPE, C. E.; KELLER, G. L.; DRESSER, B. L. In vitro fertilization in domestic and nondomestic cats including sequences of early nuclear events, in vitro development, cryopreservation and successful intra and interspecies embryo transfer. *J. Reprod. Fertil.*, v. 47, suppl., p. 189-201, 1993.
70. WILDT, D. E.; PHILLIPS, L. G.; SIMMONS, L. G. et al. A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard, and puma. *Biol. Reprod.*, v. 38, p. 245-255, 1988.
71. WILDT, D. E.; MONFORT, S. L.; DONOGHUE, A. M. et al. Embryogenesis in conservation biology – or how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*, v. 37, p. 161-184, 1992.
72. VAN STEIRTEGHEM, A. C.; NAGY, Z.; JORIS, H. et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, v. 8, p. 1061-1066, 1993.
73. POPE, C. E.; JOHNSON, C. A.; MCRAE, M. A. et al. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 53, p. 221-236, 1998.
74. NOGUEIRA, G. P.; SILVA, J. C. R. Plasma cortisol levels in captive wild felines after chemical restraint. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 30, p. 1359-1361, 1997.
75. SWANSON, W. F.; JOHNSON, W. E.; CAMBRE, R. C. et al. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. *Zoo Biol.*, v. 22, p. 421-441, 2003.
76. WILDT, D. E.; PLATZ, C. C.; CHAKRABORTY, P. K. et al. Oestrous and ovarian activity in a female jaguar (*Panthera onca*). *J. Reprod. Fertil.*, v. 56, p. 555-558, 1979.
77. HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. *Zoo and Wild Animal Medicine: current therapy*. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 390-399.
78. PAZ, R. C. R.; ZUGE, R. M.; MORATO, R. G. et al. Penetration assay of frozen jaguar (*Panthera onca*) sperm in heterologous oocytes. *Theriogenology*, v. 57, p. 588, 2002. (Abstract)
79. BARONE, M. A.; ROELKE, M. E.; HOWARD, J. G. et al. Reproductive characteristics of male Florida panthers comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American zoos. *J. Mammal.*, v. 75, p. 150-162, 1994.
80. BARONE, M. A.; WILDT, D. E.; BYERS, A. P. et al. Gonadotropin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). *J. Reprod. Fertil.*, v. 101, p. 103-108, 1994.
81. MILLER, A. M.; ROELKE, M. E.; GOODROWE, K. L. et al. Oocyte recovery, maturation and fertilization in vitro in the puma (*Felis concolor*). *J. Reprod. Fertil.*, v. 88, p. 249-258, 1990.



82. MOORE, H. D. M.; BONNEY, R. C.; JONES, D. M. Induction of estrus and successful artificial insemination in the cougar, *Felis concolor*. *Vet. Rec.*, v. 108, p. 282-283, 1981.
83. MORAIS, R. N.; MUCCILOLO, R. G.; GOMES, M. L. F. et al. Adrenal activity assessed by fecal corticoids and male reproductive traits in three South American felid species. In: CONGRESS OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1997. Houston. *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*, 1997, p. 220-223.
84. SWANSON, W. F. The role of science and reproductive biotechnology in establishing and managing the Brazilian ocelot population in US and Brazilian zoos. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE AMERICAN ZOO & AQUARIUM ASSOCIATION, 2002. Fort Worth. *Annual Conference Proceedings of the American Zoo & Aquarium Association*, 2002, p. 75-78.
85. MOREIRA, N.; BROWN, J. L.; MORAES, W. et al. Effects of captive conditions on reproductive cyclicity, adrenocortical activity and behavior in female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). In: II INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES: CONSERVATION & GENETIC MANAGEMENT WILDLIFE, 2002. Omaha. *Proceedings of the II International Symposium on Assisted Reproductive Technologies: conservation & genetic management wildlife*, 2002. p. 85-89.
86. CARLSTEAD, K.; BROWN, J. L.; MONFORT, S. L. et al. Urinary monitoring of adrenal responses to psychological stressors in domestic and nondomestic felids. *Zoo Biol.*, v. 11, p. 165-176, 1992.
87. WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v. 385, p. 810-813, 1997.
88. WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C.; ZUCCOTTI, M. et al. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cells nuclei. *Nature*, v. 394, p. 369-374, 1998.
89. KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y. et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, v. 282, p. 2095-2098, 1998.
90. BAGUISI, A.; BEHBOOD, E.; MELICAN, D. T. et al. Production of goats by somatic nuclear transfer. *Nature Biotechnol.*, v. 17, p. 456-461, 1999.
91. POLEJAEVA, I. A.; CHEN, S. H.; VAUGHT, T. D. et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, v. 407, p. 86-90, 2000.
92. SHIN, T.; KRAEMER, D.; PRYOR, J. et al. A cat cloned by nuclear transfer. *Nature*, v. 415, p. 859, 2002.
93. WAKAYAMA, T.; YANAMAGIMACHI, R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol. Reprod. Develop.*, v. 58, p. 376-383, 2001.
94. WELLS, D. N. Cloning for animal conservation. *Cloning*, v. 2, p. 152-155, 2000.