REGINA CELIA RODRIGUES DA PAZ

Biotecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*

FMVZ - 023385

São Paulo

2004

REGINA CELIA RODRIGUES DA PAZ

Biotecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe

São Paulo

2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

T.1396
FMVZ

Paz, Regina Celia Rodrigues da
Biotecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus* / Regina Celia Rodrigues da Paz. - São Paulo : R. C. R. Paz, 2004.
148 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe.

1. Animais selvagens. 2. Radioimunoensaio 3. Citogenética. 4. ELISA. 5. Microscopia eletrônica. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê/	Leia-se
10	1	5	167 f.	148 f.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê/	Leia-se
12	1	5	167 f.	148 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de dois protocolos de superovulação em felinos neotropicais. Aspiração folicular por vídeo-laparoscopia, recuperação e maturação de oócitos *in vitro*. Microscopia eletrônica e citogenética dos oócitos maduros e maturados *in vitro*", Protocolo nº 109/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. Renato Campanarut Barnabé, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 05/06/2002.

(We certify that the Research "Evaluation of super ovulation protocols in wildlife cats. Follicular aspiration and *in vitro* oocyte maturation. Electronic microscopy and cytogenetic" protocol number 109/2002, under the responsability of Prof.Dr. Renato Campanarut Barnabé, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 06/05/2002 meeting.

São Paulo, 05 de junho de 2002

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-900 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fone/Fax: (011) 3032-2224 / 3091-7671 / 3091-7676

ASSOCIAÇÃO MATA CILIAR

Jundiaí, 22 de Setembro de 2000

Ilma. Sra.
Regina Célia Rpdrigues da Paz
Pós-graduanda (Doutorado)
Depto. de Reprodução Animal

Vimos, por meio deste, comunicar que o projeto de sua autoria "Avaliação de dois protocolos de superovulação em pequenos felinos neotropicais. ultra-sonografia, aspiração folicular por vídeo laparoscopia e maturação de oócitos *in vitro*. Análise ultra-estrutural e caracterização citogenética de oócitos imaturos e maturados" foi submetido e aprovado pelo comitê do Plano de Manejo para Pequenos Felinos Brasileiros (Portaria 106 de 26 de dezembro/1995 – IBAMA).

Sendo o que no cabe para o momento, colocamo-nos à disposição para quaisquer informações,

Atenciosamente,

Cristina Harumi Adania
Presidente do comitê
Plano de Manejo Pequenos Felinos Brasileiros

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PAZ, Regina Célia Rodrigues da Paz

Título: Biotecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis e Leopardus tigrinus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____Instituição:_____
Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____
Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____
Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____
Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____
Assinatura:_____Julgamento:_____

Ao Eduardo, noivo e querido companheiro de todas as horas.

Aos meus pais José Maria e Celi pelo grande apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Renato Camapanarut Barnabe**, exemplo profissional e pessoal, é com grande respeito e admiração que agradeço a oportunidade, confiança e orientação.

À **Profa. Dra. Valquíria Hyppólito Barnabe** pela concessão do material utilizado, durante as vídeo-laparoscopias, na sede da Associação Mata Ciliar – AMC, Jundiaí/SP e pela disponibilização do Laboratório de Andrologia.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Visintin** pelo empréstimo da bomba de aspiração folicular utilizada durante os experimentos I e II, na sede da Associação Mata Ciliar – AMC, Jundiaí/SP.

A **Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira** pela disponibilização dos canis destinados a Obstetrícia no Hospital Veterinário da FMVZ/USP, tornando desta maneira possível a realização do projeto piloto com gatos domésticos, modelo experimental para felinos selvagens.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira** pela disponibilização do Laboratório de Dosagens Hormonais para realização das análises hormonais.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães** pela disponibilidade, colaboração e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini** pela grande colaboração na realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

A **Profa. Dra. Maria Denise Lopes** (UNESP/Botucatu) pela colaboração na realização da análise citogenética dos oócitos.

A todos os **Professores da Universidade de São Paulo**, que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

Ao pós-graduando **Eduardo Antunes Dias**, noivo e amigo, pela grande colaboração neste trabalho, me auxiliando no projeto piloto, em todas as cirurgias e em todas as contenções para administração de hormônios para superovulação dos animais na Associação Mata Ciliar – AMC, Jundiaí/SP.

As pós-graduandas **Karina da Silva Cavalcanti, Paola A. A. Góes** e ao "argentino" **Gonzalo Torres Jimenez**, pela grande colaboração durante a realização do experimento piloto.

A pós-graduanda **Cláudia do Nascimento** (Berimbau) e ao Médico Veterinário **Adauto Luis Veloso Nunes**, do Zoológico de Sorocaba pela grande ajuda realizando a anestesia dos animais submetidos à cirurgia.

Ao pós-graduando **Rogério L. Zacariotti** pelas belíssimas fotos aqui apresentadas e pela confecção do vídeo das cirurgias.

Aos funcionários da FMVZ/USP: **Marcílio Nichi, Erika Cristiane G. Felippe** e **Shirley Meire da Silva** e ao funcionário do ICB/USP: **Gaspar Ferreira de Lima** pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A **Cristina Harumi Adania, Jorge Bélix de Campos** e **Cláudia Yuni Hashimoto** da Associação Mata Ciliar, pelo magnífico trabalho junto ao Centro para Conservação de Felinos Neotropicais e por estarem sempre à disposição, pelo apoio e dedicação para realização deste trabalho.

A todos os **Biólogos, Veterinários, Estudantes e Voluntários**, que passaram pela Associação Mata Ciliar durante o período deste experimento, por todo carinho, apoio e amizade.

Ao ex-funcionário da AMC, o "**Beto**", pelos auxílios prestados no dia-a-dia junto ao manejo dos animais.

Aos **Colegas da Pós-graduação**, principalmente aqueles que se dedicam ao estudo reprodutivo de animais silvestres, pela amizade, convívio e companheirismo.

A **FAPESP** pela bolsa de doutorado, pelo auxílio à pesquisa e pela bolsa de capacitação técnica concedida a Médica Veterinária Maíra Calderaro Ferreira, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

Ao Médico Veterinário **Otávio Borges Maia** da Coordenação Geral de Fauna do IBAMA/Brasília pela competência e determinação no fornecimento da Licença CITES para a exportação das amostras de soro para os EUA.

Ao **Dr. Willian F. Swanson** pela oportunidade, confiança em meu trabalho e orientação junto à pesquisa de anticorpos anti-munoglobulinas exógenas realizada no Laboratório de Endocrinologia do CREW/Cincinnati Zoo & Botanical Garden/USA.

A **Helen Bateman**, Pesquisadora Associada do CREW, pela grande ajuda e colaboração durante o processamento das amostras no Laboratório de Endocrinologia do CREW/Cincinnati Zoo & Botanical Garden/USA.

A **Janice Martenson** e **Allison Wilkerson**, Laboratory of Genetic Diversity, National Cancer Institute/USA, pelo apoio logístico.

A todos os pesquisadores, estagiários, funcionários e voluntários do Cincinnati Zoo & Botanical Garden/USA pela calorosa recepção e amizade. Meus agradecimentos especiais a **Dra. Terri Roth**.

Agradecer todo mundo... Tarefa difícil. Muita coisa acontece, muita gente se envolve, afinal foram quatro anos de trabalho! Então, caso eu tenha esquecido de alguém, me perdoe, mas fica aqui registrado o meu muito obrigado a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste projeto.

RESUMO

PAZ, R. C. R. **Biotecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens:** *Leopardus pardalis e Leopardus tigrinus*. [Reproduction biotechnologies as an important tool in the management and conservation of wild cats: *Leopardus pardalis* and *Leopardus tigrinus*.] 148 f. 2004. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Este estudo representa a primeira avaliação ovariana, imunológica e hormonal realizada em duas espécies de felinos brasileiros ameaçados: *L. pardalis* (n=5) e *L. tigrinus* (n=4), antes e após 4 a 6 tratamentos alternados com as gonadotrofinas exógenas eCG/hCG e pFSH/pLH. Os animais foram submetidos a superovulação alternada com eCG-hCG e pFSH-pLH a cada quatro meses pelo período de dois anos, perfazendo um total de 6 intervenções. Os oócitos foram recuperados por vídeo laparoscopia, caracterizados quanto à morfologia e utilizados para determinação dos estágios do ciclo meiótico por análise citogenética e maturação pela caracterização de metáfase II. Avaliação ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão e varredura foi realizada para caracterização da morfologia dos oócitos. Antes e após cada intervenção sangue foi colhido e utilizado em análises hormonais séricas (progesterona e estradiol) por RIE e pesquisa de anticorpos para gonadotrofinas exógenas por ELISA. Comparando os tratamentos, não houve diferença significativa ($p>0,05$) no número total de estruturas ovarianas observadas em superovulações alternadas sucessivas, nas duas espécies estudadas. Também não houve diferença significativa em relação ao total de estruturas ovarianas encontradas em cada tratamento (5,7±1,2 eCG/hCG; 7,9±0,9 pFSH/pLH) para *L. pardalis* e (eCG/hCG 2,6±0,7; pFSH/pLH 2,0±0,5) para *L. tigrinus*. Embora *L. pardalis* tenham apresentado maior número de estruturas

ovarianas por estimulação que *L. tigrinus* ($p<0,05$), a porcentagem de oócitos maduros em relação aos oócitos totais não diferiu, indicando que a metodologia utilizada foi eficiente. *L. pardalis* apresentaram maior número de oócitos totais e maduros nos tratamentos com pFSH/pLH ($p<0,05$), sendo que em *L. tigrinus* ambos tratamentos se comportaram de maneira semelhante ($p>0,05$). Não foi possível a caracterização dos estágios do ciclo meiótico pela avaliação da configuração cromossômica nos oócitos, sendo que nenhum oócito apresentou-se em metáfase II. Ultraestruturalmente os oócitos apresentaram características semelhantes aos observados em mamíferos de maneira geral. Dosagens hormonais séricas demonstraram um aumento de estradiol após as superovulações. Elevações de progesterona foram observadas em alguns momentos pré e pós superovulações. Embora alguns animais tenham demonstrado desenvolvimento de títulos para imunoglobulinas anti-gonadotrofinas exógenas, essa resposta imune humoral não parece interferir com a indução da atividade ovariana produzida pela superovulação, já que os animais responderam bem aos tratamentos alternados. Com estes resultados podemos concluir que essas espécies podem ser manejadas intensivamente usando tratamentos alternados com gonadotrofinas exógenas para procedimentos de reprodução assistida sem comprometer a resposta ovariana a esses hormônios.

Palavras-chave: Animais selvagens. Radioimunoensaio. Citogenética. ELISA. Microscopia eletrônica.

ABSTRACT

PAZ, R. C. R. **Reproductive biotechnology as an important tool in the management and conservation of wild cats:** *Leopardus pardalis* and *Leopardus tigrinus*. [Biotecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis e Leopardus tigrinus*]. 2004. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

This study represents the first assessment of ovarian, immunological and hormonal responses of two endangered Brazilian felids: *L. pardalis* (n=5*)* and *L. tigrinus* (n=4), treated with two exogenous gonadotropin regimens eCG/hCG and pFSH/pLH. Females were treated with four to six times alternating eCG/hCG and pFSH/pLH protocols using an interval of four months between each treatment. Ovarian follicular development and oocytes recovery were performed through laparoscopy. Recovered oocytes were submitted to the cytogenetical analysis and to the electron microscopy in order to evaluate the maturation (metaphase II) and the morphological and ultrastructural status, respectively. Blood samples were collected before each treatment and during the laparoscopy in order to measure progesterone and estradiol by RIA and to evaluate the immunological response to the exogenous gonadotropins by ELISA. Our results suggest that *L. pardalis* and *L. tigrinus* do not show a decrease ($p>0.05$) in ovarian response after repeated and alternate exposure to different gonadotropin treatments. In both *L. pardalis* and *L. tigrinus*, no differences were found regarding to the number of total ovarian structures ($p>0.05$) during successive gonadotropin treatments. When comparing the eCG/hCG and the pFSH/pLH treatments, there were no differences ($p>0.05$) regarding to the total number of ovarian structures in *L. pardalis* (5.7 ± 1.2 and 7.9 ± 0.9, respectively) or *L. tigrinus* (2.6 ± 0.7 and 2.0 ± 0.5, respectively). Despite the fact that the *L. pardalis* showed a

higher number of follicles and CLs per stimulation ($p<0.05$) when compared to the *L. tigrinus*, no differences were found when analyzing the percentage of mature oocytes ($p>0.05$). Within species, both gonadotropin regimens were equally effective ($p>0.05$) to induce the follicular growth. No decreases ($p>0.05$) on the total number of ovarian structures and on the oocyte maturation percentages were observed between the sequential stimulations, but. *L. pardalis* showed a higher number of mature and total oocytes when treated with pFSH/pLH ($p<0.05$). *L. Tigrinus* didn't show any differences regarding to the number of total and mature oocytes ($p>0.05$) when comparing both gonadotropin regimens. No oocytes in metaphase II were observed in the cytogenetic analyses. Oocytes histological evaluation showed that morphological characteristics were the same observed in others mammals. Hormonal analyses showed increased estradiol levels after superovulations. Higher levels of progesterone were observed before and after superovulations. Although some of these cats do demonstrate the development of anti-gonadotropin immunoglobulin titers, these humoral immune responses do not appear to interfere with gonadotropin-induced ovarian stimulation. In this study, animals treated repeatedly with alternating regimens of eCG/hCG and pFSH/pLH showed no decrease in total ovarian structures after four to six successive treatments. These findings are potentially valuable for the ongoing efforts to develop and apply assisted reproductive technologies to the management and conservation of endangered felid populations.

Key words: Wildlife animals. Radioimunoassay. Cytogenetic. ELISA. Electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspiração folicular por vídeo-laparoscopia em Jaguatirica e detalhe do sistema de aspiração folicular, AMC/ Jundiaí/SP, 2004..... 56

Figura 2 - Confecção de lâminas para posterior avaliação citogenética dos oócitos, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 57

Figura 3 - Lavadora de placas e leitora de microplacas Dynex MRX com impressora, Cincinnati/Ohio/USA, 2004..... 62

Figura 4 - Contador Autogama Cobra e pipetagem da curva padrão usando conjuntos comerciais de fase sólida, LDH/São Paulo, 2004..... 64

Figura 5 - Média e Erro Padrão das estruturas ovarianas (Folículos Maduros e Corpos Lúteos recentes) observadas em jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 69

Figura 6 - Média e Erro Padrão do número de oócitos maduros recuperados em cada tratamento, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 70

Figura 7 - Média e Erro Padrão do número de oócitos totais recuperados em cada tratamento, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 71

Figura 8 - Porcentagem de oócitos maduros recuperados de jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 72

Figura 9 - Oócito grau I apresentando cromossomos corados em seu interior em aumentos 10 e 1000x, São Paulo, 2004 73

Figura 10 - Oócitos grau I, II e III em corte semi-fino corados com azul de toluidina 2%..... 75

Figura 11 - Eletromicrografias de oócitos grau I em corte ultra-fino..... 76

Figura 12 - Eletromicrografias de oócitos grau II em corte ultra-fino..... 77

Figura 13 - Eletromicrografias de oócitos grau III em corte ultra-fino..... 78

Figura 14 - Eletromicrografias de oócito grau I em Microscopia Eletrônica de Varredura..... 79

Figura 15 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progesterona, em jaguatiricas, utilizando a matriz depletada, São Paulo, 2004..... 82

Figura 16 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estradiol, em jaguatiricas, utilizando a matriz depletada, São Paulo, 2004..... 82

Figura 17 - Média e Erro Padrão das estruturas ovarianas (Folículos Maduros e Corpos Lúteos recentes) observadas em gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 85

Figura 18 - Média e Erro Padrão do número de oócitos maduros recuperados em cada tratamento, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 86

Figura 19 - Média e Erro Padrão do número de oócitos totais recuperados em cada tratamento, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 87

Figura 20 - Porcentagem de oócitos maduros recuperados de gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 88

Figura 21 - Oócito grau II apresentando cromossomos corados em seu interior em aumentos 10x e 1000x, São Paulo, 2004..... 89

Figura 22 - Oócitos grau I e II em corte semi-fino corado com azul de toluidina 2%..... 91

Figura 23 - Eletromicrografias de oócitos grau I em corte ultra-fino..... 92

Figura 24 - Eletromicrografias de oócitos grau II em corte ultra-fino..... 93

Figura 25 - Eletromicrografias de oócito grau I em Microscopia Eletrônica de Varredura..... 94

Figura 26 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progesterona, em gatos-do-mato-pequeno, utilizando a matriz depletada, São Paulo, 2004..... 97

Figura 27 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estradiol, em gatos-do-mato-pequeno, utilizando a matriz depletada, São Paulo, 2004..... 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e Erro Padrão de estruturas ovarianas (Folículos Maduros e Corpos Lúteos recentes) observadas em jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 69

Tabela 2 - Média e Erro Padrão do número de oócitos maduros recuperados de jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 70

Tabela 3 - Média e Erro Padrão do número de oócitos totais recuperados de jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 71

Tabela 4 - Proporção de oócitos maduros em relação ao total de oócitos recuperados de jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 72

Tabela 5 - Média e Erro Padrão de estruturas ovarianas (Folículos Maduros e Corpos Lúteos recentes) observadas em gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 85

Tabela 6 - Média e Erro Padrão de oócitos maduros recuperados de gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 86

Tabela 7 - Média e Erro Padrão de oócitos totais recuperados de gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004..... 87

Tabela 8 - Proporção de oócitos maduros em relação ao total de oócitos recuperados de gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004. 88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Atividade de Ligação (ELISA) para gonadotrofinas exógenas (eCG/hCG/pFSH/pLH) em soro de jaguatiricas que receberam tratamento alternado com eCG/hCG e pFSH/pLH, Cincinnati / Ohio / USA, 2004..... 80

Quadro 2 - Concentrações séricas de estradiol (pg/ml) e progesterona (ng/ml) em jaguatiricas que receberam tratamento alternado com eCG/hCG e pFSH/pLH, São Paulo, 2004.....…..... 83

Quadro 3 - Atividade de Ligação (ELISA) para gonadotrofinas exógenas (eCG/hCG/pFSH/pLH) em soro de gatos-do-mato-pequeno que receberam tratamento alternado com eCG/hCG e pFSH/pLH, Cincinnati / Ohio / USA, 2004..... 95

Quadro 4 - Concentrações séricas de estradiol (pg/ml) e progesterona (ng/ml) em gatos-do-mato-pequeno que receberam tratamento alternado com eCG/hCG e pFSH/pLH, São Paulo,2004..... 98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

eCG	Gonadotrofina Coriônica eqüina
hCG	Gonadotrofina Coriônica humana
pFSH	Hormônio Folículo Estimulante suíno
pLH	Hormônio Luteinizante suíno
AMC	Associação Mata Ciliar
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
LDH	Laboratório de Dosagens Hormonais
USP	Universidade de São Paulo
CREW	Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife
LP	*Leopardus pardalis*
LT	*Leopardus tigrinus*
CL	Corpo Lúteo
E_2	Estradiol
P_4	Progesterona
nd	Amostra não colhida
IA	Inseminação Artificial
FIV	Fertilização *in vitro*
RIE	Radioimunoensaio

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**.....21
2 **OBJETIVOS**.....25
3 **REVISÃO DA LITERATURA**.....27
3.1 CICLO ESTRAL E SAZONALIDADE.....28
3.2 REPRODUÇÃO ASSISTIDA.....33
3.3 MATURAÇÃO NUCLEAR.....39
3.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....41
3.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-GONADOTROFINAS.....44
4 **MATERIAL E MÉTODO**.....46
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... 47
4.2 ANIMAIS.....49
4.3 PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO.....51
4.4 CONTENÇÃO QUÍMICA.....54
4.5 ASPIRAÇÃO FOLICULAR..... 55
4.6 CITOGENÉTICA DOS OÓCITOS..... .57
4.7 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS OÓCITOS.....58
4.8 DOSAGENS DE ANTICORPOS POR ELISA.....60
4.9 DOSAGENS HORMONAIS POR RADIOIMUNOENSAIO.....63
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....65
5 **RESULTADOS**.....67
5.1 **EXPERIMENTO I - JAGUATIRICA (*Leopardus pardalis*)**.....68
5.1.1 **Análise dos Protocolos de Superovulação**.....69
5.1.2 **Análise dos Oócitos Recuperados**.....70
5.1.3 **Análise Citogenética dos Oócitos**.....73
4.1.4 **Análise Ultraestrutural dos Oócitos**.....74
5.1.5 **Dosagens de Anticorpos por ELISA**.....80
5.1.6 **Dosagens Hormonais por RIE**.....81
5.2 **EXPERIMENTO II – GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*)**....84
5.2.1 **Análise dos Protocolos de Superovulação**.....85
5.2.2 **Análise dos Oócitos Recuperados**.....86
5.2.3 **Análise Citogenética dos Oócitos**.....89

5.2.4 **Análise Ultraestrutural dos Oócitos**.....90
5.2.5 **Dosagens de Anticorpos por ELISA**.....95
5.2.6 **Dosagens Hormonais por RIE**.....96
6 **DISCUSSÃO**.....99
6.1 PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO.....100
6.2 MATURAÇÃO NUCLEAR DOS OÓCITOS.....104
6.3 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS OÓCITOS.....107
6.4 DOSAGENS DE ANTICORPOS POR ELISA.....111
6.5 DOSAGENS HORMONAIS POR RIE 114
7 **CONCLUSÕES**.....117
REFERÊNCIAS.....120
APÊNDICE.....134
ANEXOS.....143

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, ocorrem seis espécies de pequenos felinos: gato mourisco *(Herpailurus yagouarondi)*, jaguatirica *(Leopardus pardalis)*, gato-do-mato-pequeno *(Leopardus tigrinus)*, gato-maracajá *(Leopardus wiedii)*, gato-do-mato-grande *(Oncifelis geoffroyi)* e gato palheiro *(Oncifelis colocolo*) (WILSON; REEDER, 1992).

Até o presente momento todas as espécies que integram o gênero Leopardus (*Leopardus pardalis mitis, Leopardus tigrinus* e *Leopardus wiidie)* encontram-se na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e no Apêndice I do Conservation International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna (CITES). No entanto, apenas o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus)* está listado na International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) classificado como NT - *Near Threatened*, o que significa vulnerável no momento, porém com grande chance de se tornar ameaçado em um futuro próximo.

A principal ameaça de extinção para essas espécies é a perda constante e fragmentação de habitats, determinando o desaparecimento local e isolamento de populações.

A formação de ilhas de mata impedem a troca de informações genéticas podendo ocasionar a diminuição da variabilidade genética das populações envolvidas.

Métodos alternativos de manejo têm sido estudados no sentido de minimizar a diminuição da variabilidade genética das populações, no entanto, a reprodução natural de animais silvestres em cativeiro encontra inúmeras dificuldades.

Vários fatores interferem na reprodução natural desses animais em cativeiro. Dentre eles, destacam-se: recintos inadequados, estresse, doenças infecciosas e/ou parasitárias, deficiências nutricionais, alterações genéticas e comportamentais (MELLEN, 1991).

Considerando-se que a manutenção da diversidade genética é dependente da reprodução, as biotecnologias da reprodução surgem como importantes ferramentas na preservação de espécies ameaçadas de extinção, frente à necessidade de se desenvolver métodos que aumentem a fertilidade desses animais, bem como técnicas que visem a reprodução por meio de métodos artificiais (HOWARD, 1993).

Segundo a Organização Mundial de Zoológicos (IUDZG) e o Grupo de Especialistas de Manejo em Cativeiro da União Internacional para a Conservação da Natureza (CBSG/IUCN, 1993), são muitos os benefícios que a aplicação das técnicas de reprodução assistida podem trazer para o manejo conservacionista, tais como:

1. Simplificar a troca de material genético entre animais de dois ou mais zoológicos, participantes do programa de manejo, assim como, entre animais em cativeiro e em vida livre. O transporte de sêmen/embriões é mais econômico e diminui os riscos de transferência de animais e de transmissão de doenças;
2. Permitir a reprodução em animais com deficiências reprodutivas físicas ou comportamentais. Isto é muito importante quando os animais envolvidos representam linhas genéticas que não podem ser perdidas;

3. Possibilitar rápido crescimento populacional, que assume real importância se somente uma pequena população fundadora está disponível em espécies em risco de extinção;
4. Auxiliar a correção da relação macho : fêmea. Por exemplo, embriões de determinado sexo podem ser transplantados;
5. Regular o número de filhotes por indivíduo;
6. Possibilitar a formação de banco de gametas e embriões para cada espécie de interesse.

Nesse sentido, a introdução de novos protocolos de superovulação, a validação de conjuntos diagnósticos comerciais para dosagem de hormônios reprodutivos em felinos selvagens; bem como a classificação, a análise ultra-estrutural e a caracterização citogenética de oócitos aspirados por vídeo laparoscopia, fornecerão subsídios necessários para o estabelecimento de uma estratégia de manejo reprodutivo, visando à conservação dessas espécies.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Avaliar a eficácia do uso alternado de dois protocolos de superovulação (eCG/hCG e pFSH/pLH), em duas diferentes espécies de pequenos felinos neotropicais: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*, pela caracterização e contagem de folículos e corpos lúteos por vídeo-laparoscopia e recuperação de oócitos por aspiração folicular.
2. Caracterizar os estágios do ciclo meiótico e o grau de maturação oocitária pela avaliação citogenética dos oócitos obtidos.
3. Caracterizar ultra-estruturalmente os oócitos obtidos e seu grau de maturação por microscopia eletrônica de transmissão e varredura.
4. Detectar uma possível produção de imunoglobulinas neutralizadoras de gonadotrofinas exógenas, utilizando a técnica ELISA, após os tratamentos com eCG, hCG, pFSH e pLH.
5. Validar os conjuntos diagnósticos comerciais DPC (Coat-A-Count - Diagnostic Products Corporation/USA), em fase sólida, para dosagem de progesterona e DSL (Diagnostic System Laboratories INC/USA), em fase líquida, para dosagem de estradiol, em soro de *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus.*

3 REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

Serão abordados na revisão da literatura aspectos relacionados aos seguintes temas: ciclo estral e sazonalidade, reprodução assistida, maturação nuclear, análise ultraestrutural e produção de anticorpos anti-gonadotrofinas. Cada tema será abordado em separado visando facilitar a leitura.

3.1 CICLO ESTRAL E SAZONALIDADE

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é o maior dos pequenos felinos da América do Sul e juntamente com o gato maracajá (*Leopardus wiidie*) e o gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) integram o gênero *Leopardus* (WILSON; REEDER, 1992).

Este gênero caracteriza-se geneticamente por possuir 18 pares de cromossomos, um par a menos que os demais felinos, devido a fusões de material genético (ROBINSON, 1974) e pertence à família *Felidae*, que é composta por 37 espécies adaptadas a diversos habitats (BROWN; WILDT, 1997).

A grande quantidade de espécies e sua ampla distribuição geográfica determinam inúmeras particularidades para cada espécie, principalmente sob os aspectos reprodutivos desta família.

A sazonalidade reprodutiva é um dos fatores mais variáveis entre as espécies. Habitantes de regiões cuja latitude é alta, como os tigres (*Panthera tigris*) apresentam uma estação bem definida para nascimentos de seus filhotes, entre

verão e outono (SEAL et al., 1985). Espécies tropicais podem apresentar maiores concentrações de nascimentos durante determinadas épocas do ano, mas normalmente são capazes de reproduzir durante o ano todo (EWER, 1975).

Em gatos domésticos (*Felis catus*), o fenômeno da estacionalidade está intimamente ligado ao fotoperíodo (JOHNSTON et al.,1996; SHILLE et al., 1979; TSUTSUI; STABENFELDT, 1993), porém em felinos selvagens, este fator também está relacionado à maior ou menor oferta de alimento durante as estações do ano (EWER, 1975).

Outro aspecto que parece variar entre as diferentes espécies de felinos é o mecanismo de ovulação. Estudos que utilizaram dosagens hormonais séricas ou plasmáticas confirmaram que alguns felinos selvagens como tigresas (*Panthera tigris*) (SEAL et al., 1985), leopardo das neves (*Panthera uncia*) (SCHIMIDT et al., 1993), onças pintadas (*Panthera onca*) (WILDT et al., 1979) e pumas (*Puma concolor*) (BONNEY et al., 1981), possuem mecanismos de ovulação reflexa ou induzida, assim como a gata doméstica (JOHNSTON et al., 1996; SHILLE et al., 1979).

No entanto, fêmeas de leopardo (*Panthera pardus*), apresentaram os dois mecanismos de ovulação em duas diferentes situações. Quando mantidas isoladas, mostraram perfil hormonal típico de ovuladoras reflexas, porém, quando alojadas em duplas de fêmeas, ovularam, provavelmente estimuladas pelo contato físico entre elas (SCHIMIDT et al., 1988).

Leoas (*Panthera leo*) isoladas dos machos mostraram um padrão distinto dos demais felinos relatados. Schimidt et al. (1979) comprovaram, por dosagens hormonais séricas e visualização do corpo lúteo, que esta espécie apresenta ovulação espontânea com freqüência superior a outros felinos descritos.

Felinos do gênero *Leopardus* são poliéstricos e podem ciclar durante o ano todo (MORAIS et al., 1996; MOREIRA et al., 2001), sendo o gato maracajá (*Leopardus wiedii*) o único no gênero a apresentar ovulações espontâneas (MOREIRA et al., 2001).

Sob análises evolutivas, o processo de ovulação induzida ou espontânea pode estar relacionado com o grau de sociabilidade das espécies, entre outros fatores. Desta forma, felinos que possuem hábito solitário, evolutivamente necessitariam de um período de estro mais longo e oócitos viáveis por mais tempo, a fim de que a ovulação ocorresse após o encontro entre os casais na natureza (EWER, 1975).

A detecção de progestinas fecais e estradiol em gatos domésticos e felinos selvagens como: gato leopardo (*Felis bengalensis*), guepardo (*Acinonyx jubatus*), pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) e leopardo das neves (*Panthera uncia*) através da extração e dosagem hormonal a partir das fezes foi realizada com sucesso por Brown et al. (1994). Da mesma maneira esta metodologia vem sendo amplamente utilizada para monitorar a função ovariana de felídeos selvagens em cativeiro (BERBERE, 2004; FURTADO, 2003; GRAHAM et al.,1995; MORAIS et al., 1996; MOREIRA et al., 2001).

Morais et al. (1996) avaliaram a função ovariana de pequenos felinos neotropicais (*L. pardalis, L. wiedii, L. tigrina*) mantidos em zoológicos brasileiros, pela análise de hormônios fecais, pelo período de 14 meses. Concentrações de estradiol fecal se mostraram altas em jaguatirica (*L. pardalis)* (131,6 $\pm$ 4,5 ng/g), intermediárias em maracajá *(L. wiedii*) (101,7 $\pm$ 3,7 ng/g) e baixas em gato do mato pequeno *(L. tigrina)* (59,0 $\pm$ 2,0 ng/g) ($p < 0,05$). Segundo os mesmos autores, baseado no intervalo entre os picos de estradiol, o ciclo estral não diferiu entre as

espécies (Maracajá: 19,5 ± 2,1 dias; Jaguatirica: 16,5 ± 1,5 dias; Gato do mato pequeno: 15,8 ± 1,5 dias). Jaguatiricas apresentaram aumento da concentração de estradiol fecal durante a primavera/verão, maracajás apresentaram diminuição nas concentrações de estradiol fecal durante o outono/inverno e gatos do mato pequeno apresentaram diminuição do estradiol fecal durante o inverno/primavera. Segundo os autores existe influencia sazonal na atividade reprodutiva de cada espécie, no entanto, os efeitos dos parâmetros avaliados foram modestos.

Moreira et al., 2001 caracterizaram o ciclo estral de felinos do gênero *Leopardus* através da extração e dosagem de hormônios fecais de animais mantidos em cativeiro no Brasil. Neste estudo a duração do ciclo estral para jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) foi de 18,4±1,6 dias; de 16,7±1,3 dias para gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) e 17,6±1,5 dias para maracajás (*Leopardus wiedii*). Análise das progestinas fecais combinadas com avaliações laparoscópicas dos ovários confirmaram que jaguatiricas e gatos do mato pequeno não ovulam espontaneamente, ao contrário dos maracajás onde fase luteal foi observada sem cópula.

Neste contexto, métodos não invasivos, como a utilização de fezes para quantificação hormonal e determinação do perfil dos hormônios sexuais estão cada vez mais sendo utilizados em animais silvestres.

Segundo Tebet (1999) o ciclo estral de jaguatiricas caracterizou-se pela presença de picos recorrentes de estradiol sérico associados a níveis relativamente baixos de progesterona sérica (<2,61ng/ml), comprovando a característica poliéstrica da espécie, similar ao já observado para outras espécies como gatos domésticos (SHILLE et al., 1979; TSUITSUI;STABENFELD, 1993; VERHAGE et al., 1976), tigres (SEAL et al., 1985) e guepardos (BROWN et al., 1996).

Fêmeas de jaguatirica que ovularam e não foram fecundadas apresentaram um período de aumento das concentrações séricas de progesterona e inibição do estro (TEBET, 1999), denominado de pseudogestação ou diestro, semelhante a gatas domésticas (FELDMAN;NELSON, 1996) e leopardos (SCHMIDT et al., 1988).

Por outro lado, alguns autores relatam que situações estressantes podem levar a um rápido aumento de progesterona sérica. Em estudo realizado em cervo dama (*Dama dama*) houve um aumento expressivo na concentração sérica de progesterona após a administração de ACTH (ASHER et al., 1989). Também houve um aumento nas concentrações séricas de progesterona após a contenção de leoas (*Panthera leo*) com implante contraceptivo (BERTSCHINGER et al., 2002), evidenciando a participação da glândula adrenal na síntese de progesterona após situações estressantes.

3.2 REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Biotecnologias reprodutivas desenvolvidas para animais domésticos estão sendo gradualmente aplicadas em animais de zoológico (DRESSER et al., 1986). Vários estudos demonstram que terapias hormonais podem induzir a ovulação e/ou superovulação em felinos selvagens (POPE, 2000).

A indução artificial da ovulação e a superovulação são componentes importantes para a aplicação de técnicas de reprodução assistida (FELDMAN; NELSON, 1996), já que a maioria dos felinos tem a ovulação induzida pelo coito ou por estímulos artificiais semelhantes (HAMNER et al., 1970).

Terapias hormonais em felinos incluem a utilização de hCG para induzir a ovulação (DRESSER et al., 1982; WILDT; SEAGER, 1978) e associações entre eCG ou pFSH e hCG ou pLH para indução de desenvolvimento folicular múltiplo e indução da ovulação, respectivamente (BARONE et al., 1994; CRINCHTON et al., 2000a, 2000b, 2003; DONOGHUE et al., 1990,1993; HOWARD et al., 1992,1996; MOORE et al., 1981; MORAES et al., 1997; MORATO et al., 2000; POPE et al., 1989; SWANSON et al., 1996a;).

Inúmeras tentativas de inseminação artificial, após tratamento hormonal, têm sido realizadas, ainda com limitações, em diferentes espécies de felinos selvagens como: puma (*Puma concolor*) (MOORE et al., 1981); leopardo (*Panthera pardus saxicolor*) (DRESSER et al., 1982); guepardo (*Acinonyx jubatus*) (HOWARD et al., 1992); tigre (*Panthera tigris altaica*) (DONOGHUE et al., 1993); jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (SWANSON et al., 1996a) e gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus)* (MORAES et al., 1997).

Em 1981, a Sociedade de Zoológicos de Londres relatou o nascimento do 1° felino selvagem reproduzido por meio da indução artificial da ovulação e inseminação artificial intra-uterina por laparotomia (MOORE et al., 1981). A indução da ovulação foi conseguida usando-se Gonadotrofina Sérica de Égua Prenhe (PMSG) e Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) em três pumas (*Felis concolor*). Dois animais foram inseminados resultando em apenas uma concepção e nascimento.

Em 1982, o Cincinnatti Wildlife Research Federation obteve sucesso na 1° Inseminação artificial não cirúrgica em felino selvagem, inseminando um leopardo (*Panthera pardus saxicolor*) pela deposição de sêmen no útero através da vagina (DRESSER et al., 1982). Apesar do leopardo apresentar ciclo estral normal, a ovulação foi induzida com hCG. Houve concepção e gestação normal, mas o filhote morreu durante o parto.

Howard et al. (1992) induziram a atividade ovariana em sete fêmeas de guepardo (*Acinonyx jubatus*) utilizando PMSG e hCG. Inseminação artificial intra-uterina por vídeo laparoscopia foi realizada em seis animais, sendo que em apenas um houve concepção e gestação normal. Um filhote nasceu após 95 dias de gestação apresentando tamanho e peso normais, porém após 18 horas a fêmea matou o filhote.

Donoghue et al. (1993) relataram o nascimento do primeiro filhote de tigre (*Panthera tigris altaica*) do Programa SSP (Siberian Tiger Species Survival Plan), após inseminação artificial intrauterina por vídeo laparoscopia em fêmeas sincronizadas com eCG e hCG. Este resultado demonstrou, pela primeira vez, a importância da utilização da reprodução assistida, na produção de indivíduos

geneticamente viáveis à população, a partir de cruzamentos recomendados por um programa de manejo.

Swanson et al. (1996) utilizaram sêmen congelado na inseminação artificial intrauterina por vídeo laparoscopia em jaguatiricas (*Felis pardalis*) sincronizadas com diferentes dosagens de eCG e hCG. Foram utilizadas oito fêmeas, porém houve apenas uma concepção e gestação normal.

Moraes et al. (1997) sincronizaram fêmeas de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) com diferentes dosagens de eCG e hCG, sendo que de quatro fêmeas inseminadas apenas uma ficou prenhe.

Da mesma maneira, tentativas de aplicação da FIV (fertilização *in vitro)* em felinos selvagens mantidos em cativeiro, após aspiração folicular por vídeo laparoscopia têm sido realizadas.

Donoghue et al. (1990) relataram o nascimento dos primeiros filhotes de tigre (*Panthera tigris*) nascidos por FIV, onde embriões de excelente qualidade, contendo duas a quatro células, foram transferidos cirurgicamente para os ovidutos de duas fêmeas. Apenas uma fêmea ficou prenhe, sendo que três filhotes nasceram 107 dias após a transferência.

A técnica de transferência nuclear já foi aplicada em gatos domésticos, onde o núcleo de células somáticas transferidas para oócitos enucleados resultou em blastocisto (KITIYANANT et al., 2003). Isto indica que no futuro, citoplasma de oócito de gata doméstica poderá ser utilizado para desenvolver o núcleo de células somáticas de outras espécies, principalmente espécies de felinos selvagens ameaçadas, como realizado em oócitos de bovinos (DOMINKO et al., 1999).

A técnica de aspiração folicular por via laparoscópica deve ser precedida por tratamentos hormonais para indução da atividade ovariana. O uso da combinação

eCG/hCG tem sido utilizada com sucesso em tigres (*Panthera tigris*) (DONOGHUE et al., 1990; 1993), guepardos (*Acinonyx jubatus*) (HOWARD et al., 1992), pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) (HOWARD et al., 1996), pumas (*Puma concolor*) (BARONE et al., 1994; MOORE et al., 1981), jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) (MORAES et al., 1997; SWANSON et al., 1996a) e gatos-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) (MORAES et al., 1997); enquanto que a combinação pFSH e pLH tem sido utilizada com sucesso em leopardo do deserto indiano (*Felis sylvestris ornata*) (POPE et al., 1989), tigres (CRICHTON et al., 2000; 2000a; 2003) e onças pintadas (MORATO et al., 2000).

Estudos com felinos selvagens tem preconizado o uso da associação eCG/hCG, principalmente para evitar o estresse associado às múltiplas injeções de pFSH (ROTH et al., 1997). No entanto, existem relatos de que a utilização de eCG/hCG para posterior realização de inseminação artificial possa comprometer o transporte na tuba uterina, a fertilização e a implantação de embriões (GRAHAM et al., 2000). A utilização de FSH/LH suíno determinou número equivalente de oócitos comparado ao protocolo estabelecido de eCG/hCG em tigres (*Panthera tigris*), demonstrando que o possível estresse originado das aplicações diárias não influenciaram a resposta ovariana (CRICHTON et al., 2000a).

Entretanto, um protocolo de reprodução assistida que dá bons resultados para uma espécie pode não funcionar para outra, mesmo entre espécies da mesma família e gênero, em decorrência das especificidades fisiológicas naturais (WILDT et al., 1992).

Após várias tentativas, os métodos reprodutivos artificiais, quando utilizados em animais selvagens, têm ainda apresentado pouco sucesso. Vários fatores podem

influenciar a resposta ovariana aos tratamentos hormonais, quais sejam: dose hormonal, idade, estado nutricional e estação do ano (HODGES, 1996).

Swanson et al. (1995) sugerem que um dos maiores problemas está relacionado à administração de gonadotrofinas exógenas, repetidas vezes, em curtos intervalos de tempo, o que determina a diminuição da estimulação ovariana mediada imunologicamente. Intervalos de 6 meses entre tratamentos tem sido indicados para limitar a produção de imunoglobulinas neutralizadoras das gonadotrofinas (DONOGHUE et al., 1990; HOWARD et al., 1992; SWANSON et al., 1996a).

Outro fator importante que influencia a fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário é a dose de gonadotrofinas exógenas utilizada para estimulação da atividade ovariana (DONOGHUE et al., 1993). Espécies de tamanho e peso semelhantes podem requerer doses variáveis, possivelmente por algumas serem menos sensíveis as gonadotrofinas exógenas (ROTH et al., 1997; SWANSON et al., 1996a).

Outro aspecto importante refere-se ao estado nutricional dos animais. Em estudo realizado por Swanson et al. (2002) em jaguatiricas e gatos-do-mato-pequeno no Brasil, a suplementação da dieta com vitaminas e minerais aumentou a qualidade dos oócitos e seu índice de fertilização.

Repetidos tratamentos podem resultar em menor quantidade de oócitos e maior número de gametas imaturos (POPE, 2000). O intervalo entre a dose de LH ou hCG e a recuperação do oócito pode determinar o estado de maturação deste. De forma geral, os oócitos pré-ovulatórios são colhidos 24-26h após o tratamento com LH ou hCG (GOODROWE et al., 1988; POPE et al., 1993). Mesmo assim, os

oócitos classificados como maturos, ao esteriomicroscópio, podem não ter completado a maturação meiótica (GJORRET et al., 2000).

Entretanto, pesquisas utilizando as biotecnologias da reprodução em felinos selvagens vêm crescendo ultimamente devido a sua importância como ferramenta na conservação de espécies ameaçadas (SILVA et al., 2004; WILDT; ROTH, 1997).

3.3 MATURAÇÃO NUCLEAR

Oócitos in vivo geralmente cessam seu crescimento na fase de prófase I da meiose, durante a vida fetal. Durante a vida reprodutiva, grupos de oócitos são removidos dessa reserva e iniciam o seu crescimento. Próximo à fase de desenvolvimento completo, os oócitos adquirem capacidade para reiniciar a meiose. Seguindo o reinicio da meiose, ocorre a quebra da membrana nuclear e os cromossomos evoluem da fase de metáfase I para telófase I. O término da primeira divisão meiótica é caracterizado pela extrusão do 1º corpúsculo polar e formação do oócito secundário. A segunda divisão meiótica se inicia rapidamente e os oócitos atingem a metáfase II, antes da ovulação, na maioria das espécies animais (CHA; CHIAN, 1998).

A maturação dos oócitos é definida como reinício e término da 1º divisão meiótica, do estágio de vesícula germinal até metáfase II, com correspondente maturação citoplasmática, necessária para a fertilização e desenvolvimento embrionário (CHA; CHIAN, 1998).

Embora os mecanismos responsáveis pelo reinício da meiose pareçam semelhantes nos mamíferos, o tempo necessário para os oócitos atingirem a fase de metáfase II *in vitro* diferem entre as espécies (JOHNSTON et al., 1989).

A maioria das espécies de felinos possuem ovulação induzida, mecanismo desenvolvido para evitar a perda de oócitos. Após o início do estro e na expectativa da cobertura que estimula a ovulação, o oócito intrafolicular da gata deve ser capaz de permanecer biologicamente competente por um período imprevisível. Aparentemente, os oócitos são mantidos nos folículos num estado “pré-ovulatório”,

por um período mais longo do que o observado nas espécies de ovulação espontânea (DONOGHUE et al., 1992).

Oócitos de gata doméstica, aspirados 25 horas após a aplicação de hCG, foram classificados como maduros, de acordo com critérios morfológicos, mas a maioria deles (60%) não tinha atingido o estágio da Metáfase II, sendo que só atingiram a maturidade nuclear após algumas horas de cultivo adicional (BYERS et al., 1994).

A maioria dos oócitos de gatas domésticas, sujeitos a condições de cultura, atingiram a fase de metáfase II dentro de 30 a 48 horas (JOHNSTON et al., 1989).

Observações têm indicado que os oócitos adquirem capacidade para atingir a fase de metafase I quando assumem 80% de seu tamanho total, mas são incapazes de evoluir para metáfase II, até atingirem seu crescimento final (MOOR; GANDOLFI, 1987).

Segundo Farstad (2000) a eficiência da maturação e da fertilização *in vitro* em oócitos felinos são geralmente inferiores aos de outras espécies. Somente 50 a 60% de oócitos cultivados *in vitro* atingem a maturação nuclear, menos de 57% destes são fertilizados e apenas 30% dos oócitos fertilizados se desenvolvem em blastocistos (FREISTEDT et al., 2001; WOOD et al., 1997). Isto demonstra que outros fatores estão envolvidos na maturação nuclear como condições de cultivo, qualidade morfológica dos oócitos, influência da competência meiótica dos oócitos, status reprodutivo da doadora e sazonalidade (KARJA et al., 2002).

3.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Muitos estudos tem abordado a fertilização e os estágios embrionários em gatos domésticos *in vivo* (DRESSER et al., 1987; ROTH et al., 1994) e *in vitro* (DONOGHUE et al., 1992; GOODROWE et al., 1988; POPE et al., 1993, 1997; ROTH et al., 1994) e também em tigres (DONOGHUE et al., 1990). No entanto, estes estudos sempre são realizados utilizando esteriomicroscópio ou microscópio de luz para avaliar a qualidade do complexo cumulus-oócito e embriões.

Em trabalho realizado por Gjorret et al. (2002), oócitos de tigre (*Phantera tigris*), recuperados por aspiração folicular, após tratamento hormonal com FSH/LH suíno, foram avaliados esterioscopicamente e morfologicamente por microscopia eletrônica de transmissão, após maturação *in vitro*, e classificados como:

1. Oócitos Núcleo I – caracterizado por núcleo central, vesículas germinais e ondulações no envelope nuclear;

2. Oócitos Núcleo II – caracterizado por núcleo periférico, maior quantidade de vesículas e ondulações no envelope nuclear;

3. Oócito Partido – núcleo irregular, com ondulações em contato com retículo endoplasmático rugoso, maior número de gotas lipídicas de vários tamanhos e mitocôndrias distribuídas por todo ooplasma;

4. Oócitos em Metáfase I – ausência de envelope nuclear com cromossomos condensados localizados em uma área esférica livre de organelas;

5. Oócitos em Metáfase II – caracterizado pela presença de cromossomos condensados, ordenados na placa metafásica, e migração de mitocôndrias para região central.

Jewgenow e Stolte (1996) compararam as características ultra-estruturais de ovários de gatas domésticas e selvagens e descreveram as mesmas caraterísticas ultra-estruturais entre gatas, fêmeas de tigres (*Panthera tigris)* e pumas (*Felis concolor*), ou seja, zona pelúcida com ≅ 10μm de espessura estavam presentes nos folículos primários, com protusões citoplasmáticas dos oócitos e microvilosidades do oolema no interior da zona. Na região periférica do citoplasma, complexo de golgi e grânulos corticais maduros e imaturos estavam presentes. Áreas concêntricas de retículo endoplasmático foram evidenciadas e ribossomos livres, mitocôndrias e vesículas de diferentes tamanhos apareciam distribuídos aleatoriamente.

A maturação nuclear dos oócitos bovinos tem sido estudada pela análise ultra-estrutural e demonstrado que a configuração da metáfase ocorre em áreas específicas do ooplasma, caracterizadas por uma densidade aumentada (HYTTEL et al., 1987).

O ooplasma de oócitos imaturos de bovinos é caracterizado por uma grande quantidade de vesículas, grupos de mitocôndrias localizadas na periferia do citoplasma, grânulos corticais, complexos de Golgi e cisternas bem desenvolvidas de retículo endoplasmático liso (HYTTEL et al., 1989).

De acordo com os trabalhos de Hyttel (1997), em bovinos, no estágio final de maturação oocitária, são observados aumento no estoque de lipídeos, redução no complexo de golgi e alinhamento dos grânulos corticais, formando um plano estrutural para o bloqueio da polispermia.

No entanto, Sirad e Blondin (1996), preconizam que o método mais óbvio para diferenciar o oócito competente é a morfologia das células do cumulus. As células do cumulus são uma subpopulação das células da granulosa com função de providenciar nutrientes para os oócitos durante a fase de crescimento.

As características das células do cumulus associadas a óocitos bovinos maturados *in vivo* e *in vitro* mostraram aparência arredondada ou oval, com projeções citoplasmáticas geralmente separadas da zona pelúcida e do oolema (FAMILIARI et al., 1998).

3.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-GONADOTROFINAS

Protocolos utilizados em felinos selvagens foram inicialmente desenvolvidos e testados em gatos domésticos (GOODROWE; WILDT, 1987; ROTH et al., 1997). Hormônios Coriônicos, semelhantes as Gonadotrofinas Coriônicas eqüinas (eCG) e Gonadotrofinas Coriônicas humanas (hCG) são freqüentemente usados devido a longa meia-vida na circulação (24-48h), produzindo boa resposta ovariana com uma única aplicação. Outros hormônios utilizados são o Hormônio Folículo Estimulante suíno (pFSH) e o Hormônio Luteinizante suíno (pLH), que caracterizam-se como Gonadotrofinas com meia vida curta (~2h), que tem a desvantagem de requerer múltiplas aplicações para produzir uma boa resposta ovariana (CRICHTON et al., 2003; DRESSER et al., 1988; POPE et al., 2000; WILDT et al., 1981).

Todos os protocolos de superovulação utilizados em felinos requerem injeções intramusculares de gonadotrofinas exógenas, que são constituídas por grandes complexos de glicoproteínas.

Swanson et al. (1995) sugerem que um dos maiores problemas relacionados à administração de gonadotrofinas exógenas, repetidas vezes, em curtos intervalos de tempo, seja a diminuição da estimulação ovariana mediada imunologicamente. Regimes que utilizam gonadotrofinas exógenas, repetidas vezes, tem sido associados com a produção de imunoglobulinas neutralizadoras, o que determinaria a não resposta ovariana aos protocolos de superovulação. Segundo os mesmos autores, gatos domésticos estimulados repetidamente com eCG-hCG, em curtos intervalos (44-50 dias), demonstraram uma significante diminuição no desenvolvimento folicular e maturidade dos oócitos, aspirados dos folículos.

Dados obtidos por ELISA indicaram que a quantitativa e qualitativa deteriorização da foliculogênese pode ter ocorrido em conseqüência da interferência imunológica com a bioatividade do eCG, hCG ou ambos. Conseqüências como estas foram descritas em gatos domésticos (SWANSON et al., 1995; SWANSON et al., 1996b), cabras (ROY et al., 1999), vacas (JAINUDEEN et al., 1966), coelhos (GREENWALD et al., 1970; MAURER et al., 1968) e primatas não humanos (BAVISTER et al., 1986; OTTOBRE et al., 1985; WOLF et al., 1989).

Dessa forma, novos protocolos de superovulação, com intervalos mais prolongados, devem ser introduzidos com o intuito de minimizar uma possível diminuição da resposta ovariana, mediada imunologicamente, como a utilização de FSH/LH suíno (MORATO et al., 2000). Entretanto, devido à afinidade variável das imunoglobulinas a diferentes gonadotrofinas exógenas (MAURER et al., 1968; SWANSON et al., 1995), talvez seja possível limitar sua interferência com o regime alternado de gonadotrofinas em tratamentos seqüenciais.

4 MATERIAL E MÉTODO

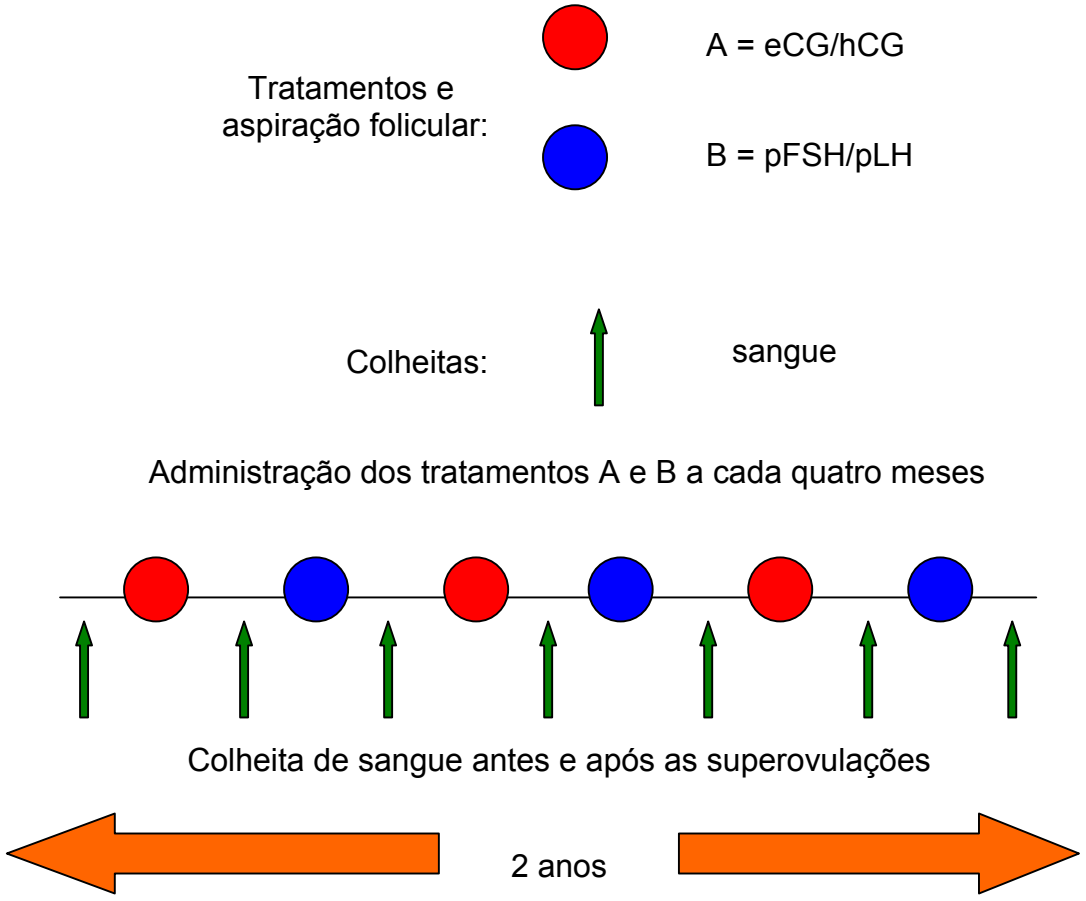
4. MATERIAL E MÉTODO

A seguir serão descritos os materiais e os métodos utilizados nos experimentos I e II.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

EXPERIMENTO I - Jaguatiricas

Animais : 5 *Leopardus pardalis*.



EXPERIMENTO II - GATO DO MATO PEQUENO

Animais : 4 *Leopardus tigrinus*.

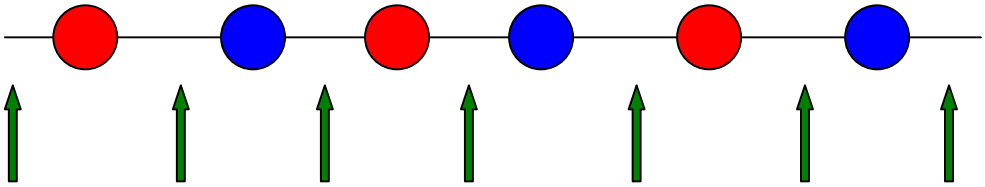
Tratamentos e aspiração folicular:

A = eCG/hCG

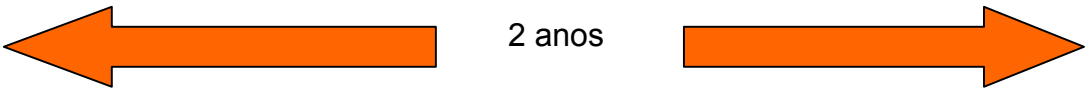
B = pFSH/pLH

Colheitas: sangue

Administração dos tratamentos A e B a cada quatro meses



Colheita de sangue antes e após as superovulações.



4.2 ANIMAIS

Foram utilizadas cinco fêmeas de jaguatirica (*Leopardus pardalis*), identificadas segundo o Plano de Manejo para Pequenos Felinos Neotropicais/AMC pelo número de Studbook: LP240, LP254, LP285, LP289 e LP290, para realização do experimento I. Durante o período experimental as fêmeas de jaguatirica foram mantidas com machos da mesma espécie em recintos separados para cada casal. Os recintos continham área externa com boa insolação, troncos, vegetação rasteira e arbustos. O cambiamento era de cimento, contendo em seu interior recipiente para água e uma caixa de madeira com capim. Durante o período de superovulação as fêmeas eram mantidas no cambiamento, separadas dos machos. Nessas ocasiões as fêmeas eram alimentadas no cambiamento e a comida colocada diretamente no chão por entre as grades de proteção.

Para o experimento II foram utilizadas quatro fêmeas de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*), identificadas segundo o Plano de Manejo para Pequenos Felinos Neotropicais/AMC pelo número de studbook: LT134, LT136, LT138 e LT141. As fêmeas de gato-do-mato-pequeno foram mantidas juntas no mesmo recinto de cimento, sem vegetação rasteira ou arbustiva, porém com troncos e casinha de madeira suspensa. O cambiamento também era de cimento, porém sem caixa de madeira com capim. Para estes animais a comida era colocada no chão do recinto por entre as grades de proteção.

A alimentação dos animais era basicamente composta por pescoço de frango, sendo que periodicamente eram oferecidos camundongos e ratos de descarte provenientes dos biotérios da Universidade de São Paulo (Instituto de

Biociências, Instituto de Ciências Biomédicas e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) e suplemento vitamínico e mineral (Aminomix Pet; Vetnil, SP, Brazil). Água era fornecida a vontade.

Todos os animais permaneceram na Sede da Associação Mata Ciliar em Jundiaí/SP, durante todo o experimento.

A partir da 4° superovulação, a fêmea de gato do mato pequeno LT138 foi retirada do experimento, por problemas de agressão por parte dos outros animais do recinto, vindo à óbito posteriormente.

A fêmea de gato do mato pequeno LT134 só pode ser superovulada a partir de março de 2002, ou seja, a partir da 3° superovulação do grupo experimental, e a fêmea de jaguatirica LP254 só pode ser superovulada a partir de setembro de 2001, ou seja, a partir da 2º superovulação do grupo experimental, por motivos não relacionados ao experimento.

Neste mesmo período, duas fêmeas de jaguatirica ficaram prenhes, impossibilitando a realização do protocolo de superovulação por uma vez no animal LP254 e impossibilitando a colheita de oócitos em duas ocasiões na fêmea LP285.

4.3 PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO

As fêmeas utilizadas no experimento I (jaguatiricas) e as fêmeas utilizadas no experimento II (gatos-do-mato-pequeno), foram divididas em dois grupos, sendo a superovulação realizada a cada quatro meses pelo período de dois anos, perfazendo um total de seis intervenções. Todos os animais passaram por todos os tratamentos, sendo que cada animal foi superovulado por três vezes com o mesmo protocolo.

Foram utilizados dois protocolos de superovulação, sendo que cada espécie recebeu dosagem específica de: eCG (Gonadotrofina Coriônica equina-Novormon®) e hCG (Gonadotrofina Coriônica humana-Vetecor®) e pFSH (Hormônio Folículo Estimulante-Folltropin-V®) e pLH (Hormônio Luteinizante-Lutropin-V®).

Para administração dos hormônios, os animais foram contidos fisicamente utilizando-se puçás e/ou jaulas de contenção.

EXPERIMENTO I

Leopardus pardalis

Grupo 1:

Aplicação de 225UI hCG (IM) oitenta horas após administração de 500 UI de eCG (IM), sendo a aspiração folicular por vídeo laparoscopia, realizada após 24-28 horas da administração do hCG (MORAES et al.,1997; SWANSON et al., 1996a).

Grupo 2:

Aplicação de 50UI de FSH suíno, administrados gradativamente, em três dias consecutivos (Dia 1: 20 UI e 15 UI aplicadas em intervalo de 14 horas, Dia 2: 10 UI, Dia 3: 5 UI, aplicados com intervalos de 24 horas). No dia quatro, 18 horas após a administração da última dose de FSH, foi aplicada uma dose de 20UI de LH suíno, sendo a vídeo-laparoscopia realizada 24-28 horas após a administração do LH (MORATO et al., 2000).

EXPERIMENTO II

Leopardus tigrinus

Grupo 1:

Aplicação de 75UI hCG (IM) oitenta horas após administração de 100 UI de eCG (IM), sendo a aspiração folicular por vídeo laparoscopia, realizada após 24-28 horas da administração do hCG (MORAES et al.,1997; SWANSON et al., 1996a).

Grupo 2:

Aplicação de 30UI de FSH suíno, administrados gradativamente, em três dias consecutivos: (Dia 1: 12 UI e 9 UI aplicadas em intervalos de 14 horas, Dia 2: 6 UI, Dia 3: 3 UI, aplicados com intervalos de 24 horas). No dia quatro, 18 horas após a administração da última dose de FSH, foi aplicada uma dose de 10UI de LH suíno, sendo a vídeo-laparoscopia realizada 24-28 horas após a administração do LH.

4.4 CONTENÇÃO QUÍMICA

Para contenção química dos animais foi utilizada associação Cloridrato de Ketamina (Ketamin S(+) 50mg/ml - Cristália S.A.) e Cloridrato de Xilazina (Anasedan 2% - Agribrands do Brasil) na dose, 12 e 1mg/kg para jaguatiricas e 10 e 2mg/kg para gatos-do-mato-pequeno, respectivamente.

Todos os animais permaneciam em jejum pelo período de 12 a 24h antes do início do procedimento. O peso dos animais foi estimado durante inspeção prévia, sendo a injeção da associação dos fármacos Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina feita diretamente pela via intramuscular em uma única aplicação, com auxílio de caixa de prensa ou puçá.

Após obtenção de analgesia e relaxamento muscular, avaliados pelo decúbito esternal e perda dos movimentos, os animais eram levados para a Clínica Veterinária da Associação Mata Ciliar e imediatamente pesados.

Nas ocasiões onde os procedimentos eram rápidos, como para colheitas de sangue, apenas esta associação de fármacos era administrada. Nas ocasiões em que eram realizadas as vídeo-laparoscopias, os animais eram entubados e mantidos durante todo o procedimento em anestesia inalatória utilizando-se Isoflurano (Isoflurine - Cristália S.A).

Para todas as ocasiões, a equipe contava com um anestesista que monitorava as funções vitais (freqüência respiratória, freqüência cardíaca, saturação de oxigênio e temperatura) a cada 20 minutos, sendo os dados armazenados em ficha padrão. Dessa forma, foi garantida a segurança da equipe e o bem estar dos animais durante todo o procedimento.

4.5 ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Aspiração folicular foi realizada por vídeo laparoscopia utilizando-se fibra óptica rígida 7mm, fonte de luz, insuflador e microcâmara (Karl Storz - H. Strattner & Cia Ltda), acoplado à televisão (Sony 24”).

Após tricotomia e assepsia local do abdômen, agulha de Verres foi inserida na cavidade abdominal, quadrante inferior direito, 4 a 8 cm lateral à linha média, para estabelecimento de pneumoperitônio, utilizando insuflador com CO_2.

Posteriormente foi realizada uma pequena incisão (1cm), com bisturi, 2 a 4cm cranialmente ao umbigo, para a colocação de trocater descartável de 10mm (Endopath Ethicon), o qual foi inserido a 30° de acordo com o plano longitudinal do animal. A fibra óptica rígida foi então inserida no trocater e acoplada a microcâmara ligada a televisão.

Atividade ovariana foi avaliada e os folículos ovarianos aspirados usando uma agulha descartável 22g (Insyte/BD) inserida em um cilindro de silicone (Digisond/Sanobiol nº4) conectado em tubo coletor plástico de 15ml (Falcon). Para aspiração dos oócitos foi utilizado Meio 199 (Nutricel®) (Figura 1).

Após aspiração dos oócitos, o pneumoperitônio foi desfeito pela remoção do laparoscópio e evacuação do gás lentamente pela câmara aberta. A incisão foi suturada com fio absorvível (Catgut 3-0) e a pele foi fechada utilizando-se cola (Vetbond 3M).

Cada animal recebeu uma dose de Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge) 24.000 UI/kg e uma dose de Tramal (Cloridrato de Tramadol - Carlo Erba S.A.) 1mg/kg.

Os oócitos aspirados foram quantificados, avaliados em lupa e caracterizados quanto à morfologia em grau I, II e III, de acordo com os padrões estabelecidos por Goodrowe et al. (1988) e Johnston et al. (1989).

Os oócitos classificados como grau I, ou excelentes, apresentavam pigmentação homogênea e enegrecida do citoplasma, rodeados por células do cúmulus e zona pelúcida compacta; os oócitos de grau II, ou regulares, apresentavam citoplasma ligeiramente pigmentado ou manchado com zona pelúcida e células do cumulus envolvendo apenas parcialmente a célula e os oócitos de grau III, ou degenerados, mostravam-se com formas anormais, pálidos e com ausência das células do cumulus e zona pelúcida.

Figura 1 - Aspiração folicular por vídeo-laparoscopia em jaguatirica (à esquerda), detalhe do sistema de aspiração folicular (à direita), AMC/Jundiaí/SP, 2004

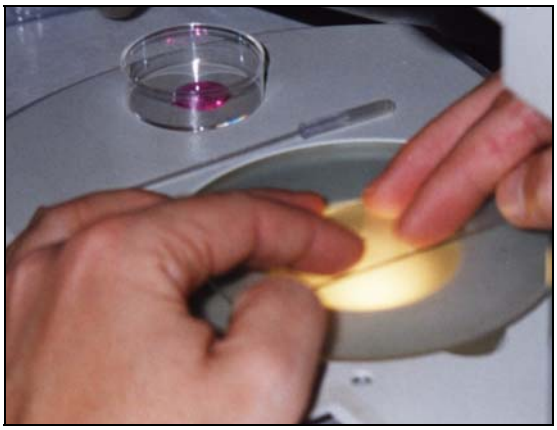
4.6 CITOGENÉTICA DOS OÓCITOS

Uma amostra de oócitos foi submetida a procedimentos de lavagens com solução de hialuronidase 0,4% (Sigma, H-3506) para remoção completa das células do cumulus, imediatamente após avaliação em esteriomicroscópio.

Em seguida os oócitos foram transferidos para lâminas histológicas, recobertos com lamínulas fixadas com cola de silicone (Flexite - Alba), como mostra a figura 2, e submersos em solução de metanol : ácido acético glacial (3%). Após esse procedimento foram levados ao Laboratório de Andrologia – FMVZ/USP e mantidos durante sete dias nesta solução.

Após sete dias os oócitos foram corados com orceína acética (Sigma 0-7380) e observados ao microscópio de luz, em aumento 1000x.

Com base na análise cromossomal cada célula foi classificada. Os estágios do ciclo meiótico foram avaliados como índice de maturação oocitária. Foram considerados oócitos maduros aqueles que apresentaram configuração cromossômica em metáfase II (JOHNSTON et al., 1991).



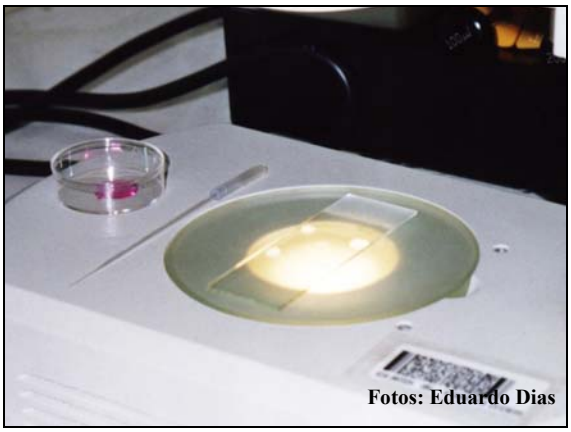


Figura 2 - Confecção de lâminas para posterior avaliação citogenética dos oócitos, AMC/Jundiaí/SP, 2004

4.7 ANALISE ULTRAESTRUTURAL DOS OÓCITOS

Uma amostra dos oócitos foi fixada em glutaraldeído 2% tampão fosfato (0,2M pH 7,2 a 7,4) e mantida sob refrigeração (5°C) até o momento das análises.

4.7.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para microscopia eletrônica de transmissão os oócitos foram preparados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia – FMVZ/USP e as secções semi-finas, ultra-finas e as eletromicrografias realizadas no Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/USP.

Inicialmente, os oócitos foram lavados três vezes, durante 5 minutos, em solução salina 0,9% para retirada do glutaraldeído. Imediatamente após a lavagem cada oócito foi embebido individualmente em agarose 2% derretida. Após resfriamento a temperatura ambiente por 2 horas, a agarose foi cortada em blocos de aproximadamente $2mm^3$, contendo um oócito/bloco. Tetróxido de Òsmio a 1% foi então adicionado e o material permaneceu em geladeira por 24 horas.

Após esse período mais 3 lavagens em solução salina 0,9% durante 5 minutos foram realizadas, Uranila foi adicionada e o material permaneceu por mais 24 horas em geladeira.

A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona (30% a 100%) e a embebição foi realizada em séries decrescentes de acetona e resina (3:1; 1:1;

1:3) até resina pura, onde permaneceram em estufa a 37ºC por 1 hora. A Inclusão foi realizada com a colocação dos oócitos em cápsulas, as quais foram preenchidas com resina Spurr e deixadas na estufa a 60°C por 3 dias para solidificação.

Para observação dos oócitos em microscopia de luz convencional, secções semi-finas de 2μm de espessura foram realizadas em ultra-micrótomo e colocadas em lâminas para microscopia, as quais foram coradas com azul de toluidina a 2%. Para a análise ultra-estrutural, foram realizadas secções ultra-finas (80nm de espessura), colhidas em telas de cobre de 200 mesh, coradas com acetato de uranila 0,5% e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL CX-II 100).

4.7.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para microscopia eletrônica de varredura os oócitos foram preparados no Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/USP e eletromicrografados na Faculdade de Odontologia da USP.

Inicialmente, Tetróxido de Ósmio a 0,5% foi adicionado e o material foi desidratado em séries crescentes de álcool (7,5% a 100%).

A secagem das peças foi realizada em aparelho de ponto crítico (CPD 030) utilizando-se o dióxido de carbono líquido e a montagem em base metálica com cola de prata. A cobertura das peças foi feita com ouro em aparelho SCD 040.

As eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura ZEISS Modelo LEO 430 I.

4.8 DOSAGEM DE ANTICORPOS POR ELISA

Sangue foi obtido 15 a 30 dias antes e após o período de superovulação dos animais experimentais, por punção venosa, imediatamente após a imobilização química dos mesmos. Para controle negativo, sangue de jaguatirica macho (n=2) e gato-do-mato-pequeno macho (n=4) foi colhido de animais também pertencentes à Associação Mata Ciliar, Jundiaí/SP. Para controle comparativo, sangue de gatas domésticas nunca estimuladas (n=1) e hiper-imunizadas com gonadotrofinas exógenas (n=1) foi colhido de animais pertencentes ao CREW/Cincinnati Zoo and Botanical Garden/USA. Em seguida o sangue foi centrifugado para separação do soro, o qual foi recolhido, identificado e armazenado em freezer (-20°C) até o momento das análises.

Detecção de imunoglobulinas neutralizadoras de gonadotrofinas exógenas por ELISA foram realizadas em triplicata segundo Bavister et al. (1986) e Swanson et al. (1995), com algumas modificações, no Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife – CREW, Cincinnati Zoo and Botanical Garden, Cincinnati, Ohio, USA.

Para realização do ensaio eCG (Sigma-G4877), hCG (Sigma-C1063), pFSH (Vetrepharm) e pLH (Vetrepharm) foram diluídos em Tampão Bicarbonato (Sigma 5761 - 0,06 M; pH 9,6) até atingir a concentração de 10ng de proteína/μl. Alíquotas (50μl) das respectivas soluções de gonadotrofinas foram pipetadas em 96 poços (500ng proteína/poço) das microplacas (Immulon I; Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA), as quais foram seladas e incubadas overnight a 4ºC.

Após esse período, as placas foram lavadas 5 vezes com 0,01 Mol PBS, contendo 0,1% Tween 20 (Sigma P-1379 - PBS-Tw) em lavadora automática (Figura 3) e posteriormente secadas em papel toalha. As amostras de soro foram diluídas (1:100) com PBS-Tw e alíquotas (100μl) foram adicionadas em cada poço em triplicata.

As microplacas foram então incubadas por 1 hora a temperatura ambiente (22ºC) e posteriormente lavadas 5 vezes com PBS-Tw. Conjugado-Peroxidase, rabbit anti-cat igG (Rockland Laboratories, Gilberstville, PA), foi adicionada (100μl/poço; diluição 1:2000 em PBS-Tw) em cada poço e as microplacas incubadas por 30 minutos a 39ºC.

Após esse período, as microplacas foram lavadas e 100μl de solução de o-phenylenediamine-OPD (Sigma P-4664; 1mg OPD/ml em tampão citrato 0,05 mol e 0,05%H_2O_2) foi adicionado em cada poço. As placas foram então incubadas no escuro por 15 a 40 minutos a 22ºC e a densidade óptica (OD) foi mensurada até 492nm, usando leitora automática de microplacas (Dynex MRX) (Figura 3).

A densidade óptica de cada poço em cada placa foi mensurada iniciando-se aos 15 minutos de incubação e a cada 15 minutos até os valores das amostras controle se igualarem ao valor pré-determinado de corte (OD = 0,80). Em cada placa foi incluído soro proveniente de cada grupo de tratamento, substrato, soro controle e enzima conjugada. Soro de gatas hiper-imunizadas foram utilizadas como controle cinético positivo para os ensaios de eCG, hCG e pLH e soro de fêmea de gato-do-mato-pequeno tratada com gonadotrofinas foi utilizado como controle nos ensaios de pFSH. Para acessar a ligação de gonadotrofinas exógenas às amostras individuais de soro, a média dos valores OD (±DP) foi determinada a partir das triplicadas de cada amostra de soro. Valores OD das amostras maiores que a média + 3DP de

amostras controle negativo (gato-do-mato-pequeno macho ou jaguatirica macho) foram consideradas positivas (+) para a presença de imunoglobulinas ligadas a gonadotrofinas.

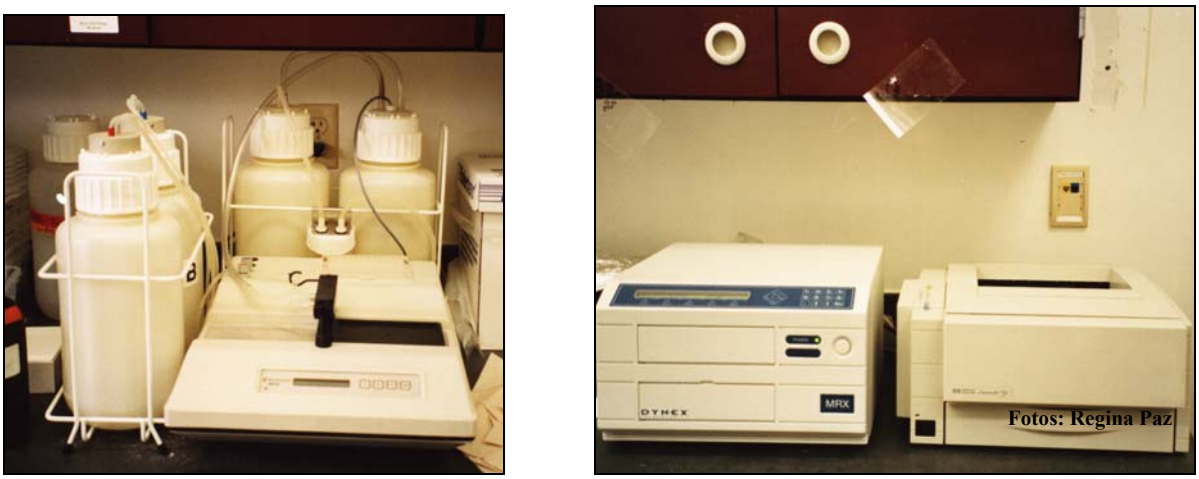


Figura 3 – Lavadora de placas (à esquerda) e leitora de microplacas Dynex MRX com impressora (à direita), Cincinnati/Ohio/USA, 2004

4.9 DOSAGENS HORMONAIS POR RADIOIMUNOENSAIO

Sangue foi obtido 15 a 30 dias antes e após o período de superovulação, por punção venosa, imediatamente após a imobilização química dos animais. Em seguida foi centrifugado para separação do soro, o qual foi recolhido, identificado e armazenado em freezer (-20°C) até o momento das análises.

Foram realizadas análises hormonais para determinação dos níveis séricos de progesterona e estradiol em duplicata pela técnica de radioimunoensaio (RIE) no Laboratório de Dosagens Hormonais – LDH/VRA/FMVZ/USP.

Para progesterona foi utilizado conjunto diagnóstico comercial Coat-A-Count DPC - Diagnostic Products Corporation/USA, em fase sólida e para estradiol foi utilizado conjunto diagnóstico comercial DSL - Diagnostic System Laboratories INC/USA, em fase líquida. Os procedimentos utilizados para as dosagens hormonais foram os mesmos especificados pelo fabricante, sendo que este conjunto diagnóstico utiliza como elemento traçador o hormônio marcado com ^{125}I. A radioatividade foi medida por contador automático (Autogama Cobra Packard) para determinação da curva padrão e dosagens do ensaio (Figura 4).

O controle de qualidade dos ensaios de RIE, foi realizado através da análise dos coeficientes de variação intra e inter-ensaio, sendo que no LDH índices aceitáveis não devem ultrapassar 10%.

A validação dos conjuntos diagnósticos comerciais para uso em soro de fêmeas de jaguatirica e gato-do-mato-pequeno foi realizada de acordo com o método de paralelismo utilizando matriz depletada. Esse método demonstra se os hormônios da espécie estudada interagiram com o anticorpo do conjunto diagnóstico

de forma similar ao hormônio usado como padrão. Para tanto, foi realizada a depleção hormonal de um *pool* de amostras com uma solução de carvão-dextran (DARBRE et al., 1983; REDDEL et al., 1984). A essa matriz depletada adicionamos valores conhecidos do hormônio padrão, com diluições que se aproximavam dos pontos da curva do conjunto diagnóstico. Com essa diluição construímos uma curva correlacionando estes valores.

Figura 4 - Contador Autogama Cobra (à esquerda) e pipetagem da curva padrão usando conjuntos comerciais de fase sólida (à direita), LDH/São Paulo, 2004

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através dos programas SAS System for Windows (SAS user's guide, Cary, USA, 1995) e Statview (SAS Institute Inc., Cary, USA, 2000).

Através do aplicativo Guided Data Analisys, as variáveis foram testadas quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformadas (logarítmo na base 10 - $Log_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Caso os dados obedecessem às premissas, era realizada a análise de variância paramétrica (PROC GLM / Teste Tukey de médias).

Para descrição dos resultados, foram empregados os erros padrões das médias e as médias (média $\pm$ erro padrão) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária à transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvesse transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta. Caso o p se encontrasse entre 0,05 e 0,1 considerou-se uma tendência estatística de efeito das variáveis classificatórias.

As variáveis resposta estruturas ovarianas (Folículos maduros e corpos lúteos recentes), número de oócitos maduros e número de oócitos totais não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-los. Estas variáveis foram então analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

A proporção de oócitos aspirados classificados como maduros foi calculada para cada tratamento em cada espécie (Statview). Os dados foram submetidos à transformação ARCSIN antes das análises estatísticas. A variação no número de estruturas ovarianas e as porcentagens de oócitos maturos em cada tratamento foram acessadas usando ANOVA com as diferenças entre tratamentos determinada por Fisher's LSD (Statview). Test t de Student e teste de χ^2 (Qui quadrado) foram usados para acessar diferenças na resposta ovariana e proporção de amostras de soro positivo a gonadotrofinas exógenas, respectivamente, entre jaguatiricas e tigrinas (Statview). A proporção de amostras de soro positivo para gonadotrofinas exógenas durante os dois primeiros tratamentos versus o último tratamento também foi acessado usando teste de χ^2 (Qui quadrado). O efeito do título de anticorpos no número de estruturas ovarianas e a porcentagem de oócitos maduros foi avaliada para cada gonadotrofina individualmente usando test t de Student. Especificamente, o efeito de títulos positivo e negativo para eCG e pFSH no número total de estruturas ovarianas em cada tratamento sucessivo e títulos positivo e negativo para hCG e pLH na maturação dos oócitos foi analisada.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO I - JAGUATIRICA (*Leopardus pardalis*)

5. RESULTADOS

5.1.1 Análise dos Protocolos de Superovulação

Tabela 1 - Média e Erro Padrão das estruturas ovarianas (Folículos Maduros e Corpos Lúteos recentes) observadas em jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC / Jundiaí / SP, 2004

Animais	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH
LP 254	-	4	3	-	0	8
LP 285	15	4	1	9	-	-
LP 240	3	4	10	8	4	7
LP 289	10	16	7	12	6	10
LP 290	7	7	2	7	6	6
M±EP	**8,8±2,5**	**7,0 ± 2,3**	**4,6 ± 1,7**	**9,0± 1,1**	**4,0 ± 1,4**	**7,8 ± 0,9**

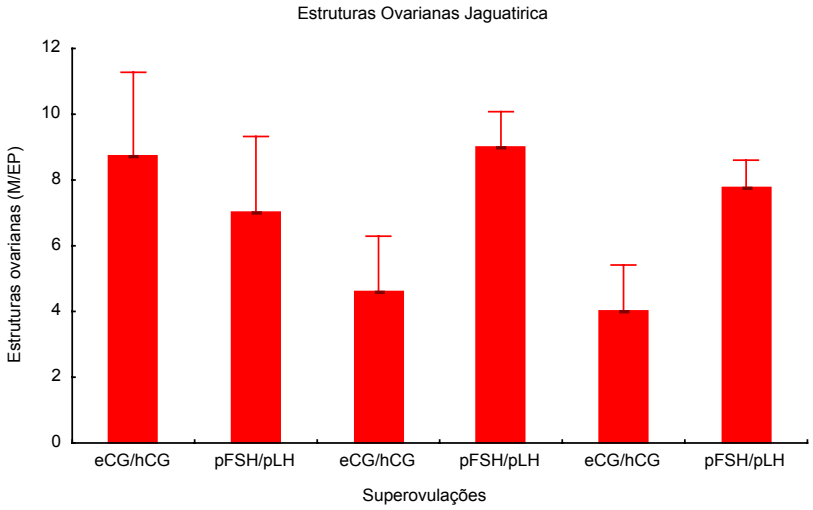
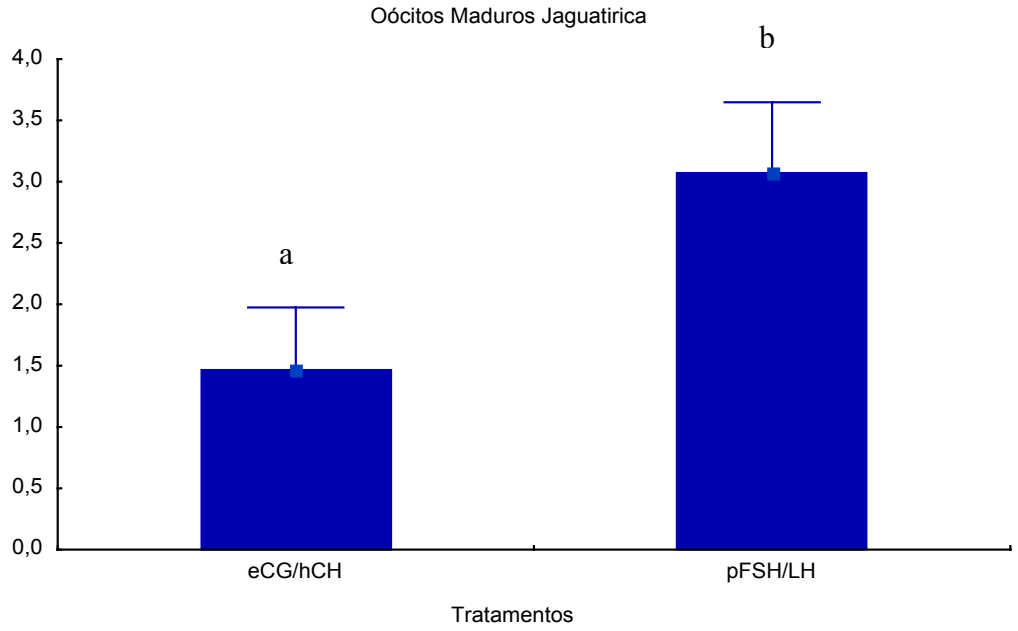


Figura 5 - Média e Erro Padrão das estruturas ovarianas (Folículos Maduros e Corpos Lúteos recentes) observadas em jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC / Jundiaí / SP, 2004

5.1.2 Análise dos Oócitos Recuperados

Tabela 2 - Média e Erro Padrão do número de oócitos maduros recuperados de jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH
LP 254	-	1	0	-	0	4
LP 285	0	1	0	4	-	-
LP 240	1	3	7	5	1	4
LP 289	2	7	2	4	2	4
LP 290	1	0	2	0	1	3
M±EP	**1,0±0,4**	**2,4±1,2**	**2,2±1,2**	**3,3±1,1**	**1,0±0,4**	**3,8±0,2**

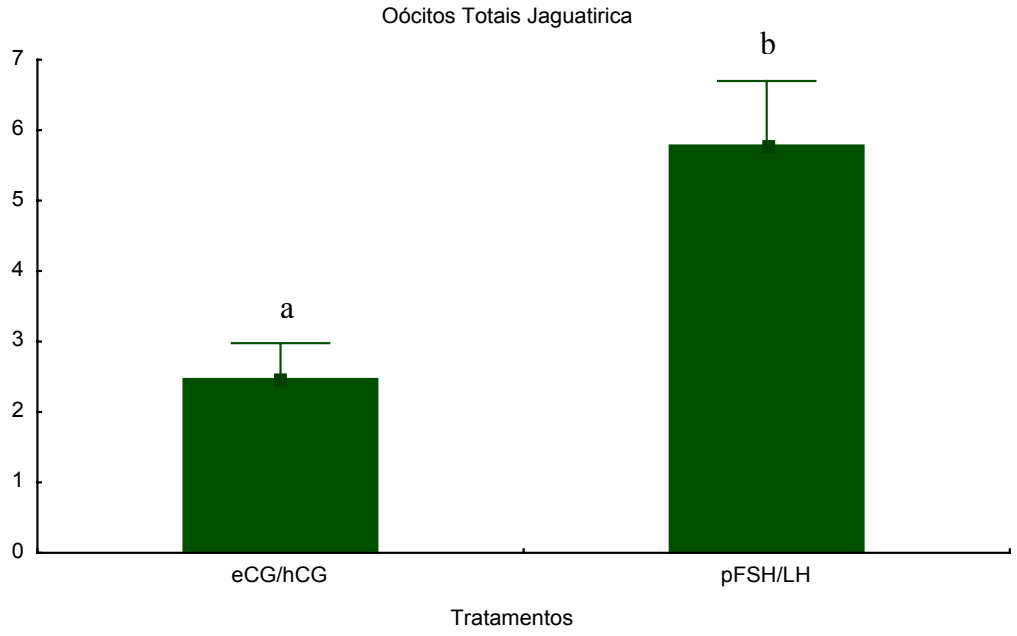


a e b significativamente diferentes (p>0,05).

Figura 6– Média e Erro Padrão do número de oócitos maduros recuperados em cada tratamento, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Tabela 3 - Média e Erro Padrão do número de oócitos totais recuperados de jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH
LP 254	-	7	1	-	0	5
LP 285	3	4	1	8	-	-
LP 240	2	4	7	5	1	5
LP 289	4	14	3	5	2	9
LP 290	1	3	4	0	3	6
M±EP	**2,5±0,6**	**6,4±2,0**	**3,2±1,1**	**4,5±1,6**	**1,5±0,6**	**6,25±0,9**



a e b significativamente diferentes (p>0,05).

Figura 7 – Média e Erro Padrão do número de oócitos totais recuperados em cada tratamento, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Tabela 4 - Proporção de oócitos maduros em relação ao total de oócitos recuperados de jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	**eCG/hCG**	**pFSH/LH**	**eCG/hCG**	**pFSH/LH**	**eCG/hCG**	**pFSH/LH**
LP 254	-	1/7	0/1	-	0/0	4/5
LP 285	0/3	1/4	0/1	4/8	-	-
LP 240	1/2	3/4	7/7	5/5	1/1	4/5
LP 289	2/4	7/14	2/3	4/5	2/2	4/9
LP 290	1/1	0/3	2/4	0/0	1/3	3/6
Proporção (%)	**4/10 (40%)**	**12/32 (37,5%)**	**11/16 (68,7%)**	**13/18 (72,2%)**	**4/6 (66,6%)**	**15/25 (60%)**

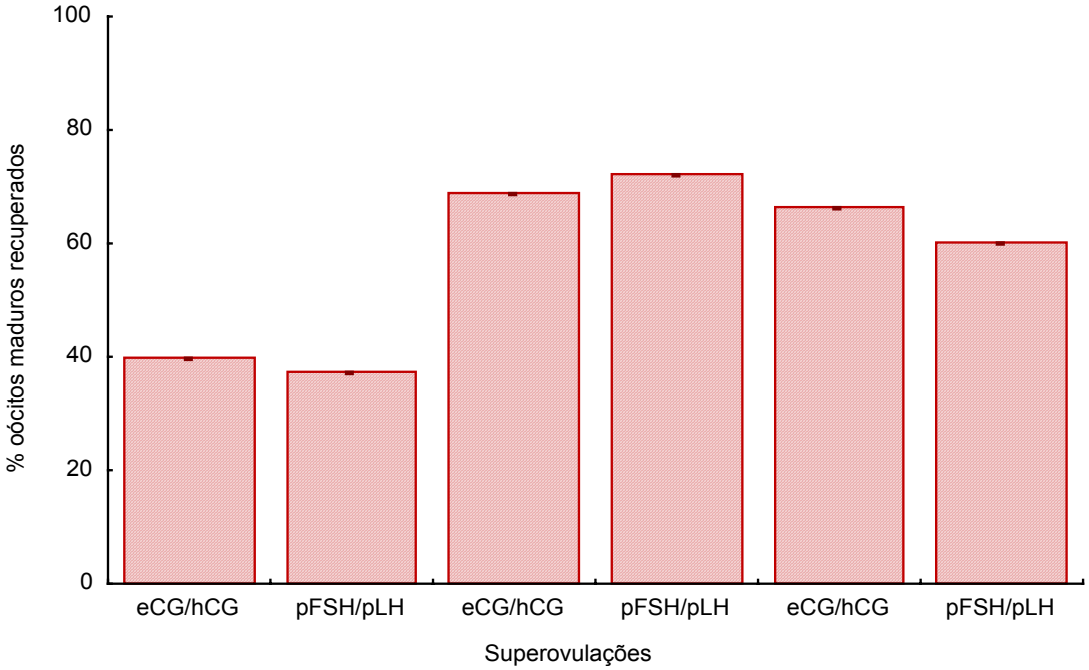


Figura 8 - Porcentagem de oócitos maduros recuperados de jaguatiricas, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC / Jundiaí / SP, 2004

5.1.3 Análise Citogenética dos Oócitos

Um total de 52 oócitos provenientes de folículos maduros (>2mm) foram utilizados para avaliação citogenética.

Os oócitos utilizados foram classificados como grau I, II ou III, sendo que dos 52 oócitos utilizados, 20 foram classificados como de grau I, 26 como de grau II e 6 como de grau III.

Durante o procedimento 37% dos oócitos não puderam ser observados, sendo que dos 19 oócitos não observados 16 se perderam durante o período de fixação e 3 foram danificados durante a confecção das lâminas, impossibilitando sua leitura. Dos 19 oócitos não observados 4 eram de grau I, 13 de grau II e 2 de grau III.

Dentre os oócitos observados ao microscópio de luz, após fixação e coloração das lâminas, apenas 12% apresentaram cromossomos corados em seu interior (Figura 9), sendo que nenhum deles apresentava-se metáfase II. Dos 4 oócitos que apresentaram cromossomos corados em seu interior, 2 eram de grau I e 2 eram de grau II.

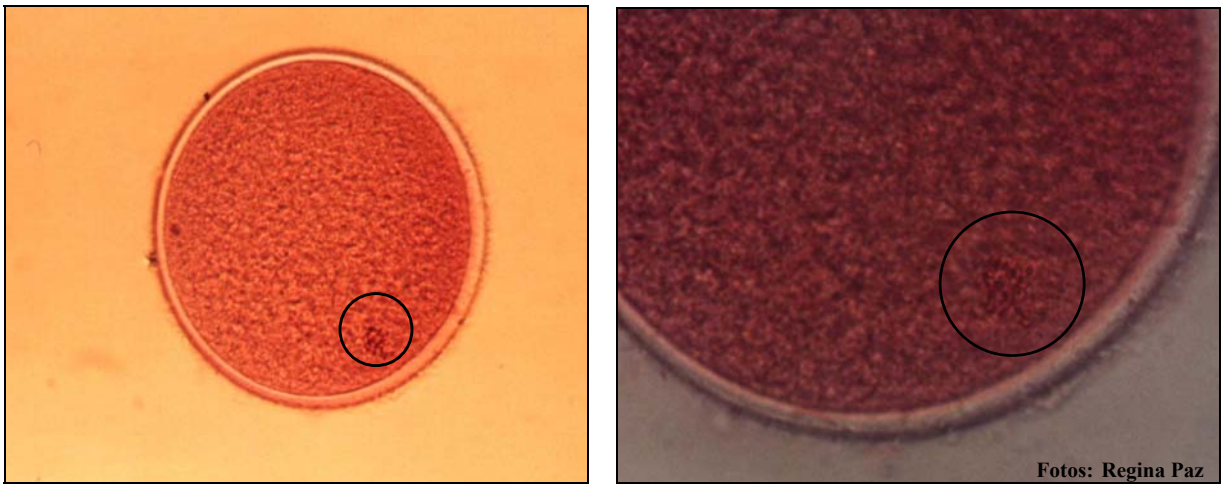


Figura 9 – Oócito grau I apresentando cromossomos corados em seu interior, em aumentos 10x (à esquerda) e 1000x (à direita), São Paulo, 2004

5.1.4 Análise Ultraestrututal dos Oócitos

Um total de 54 oócitos provenientes de folículos maduros foi dividido e utilizado para microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Todos os oócitos foram previamente classificados morfologicamente com auxílio de esteriomicroscópio, sendo 39 classificados como grau I, 7 como grau II e 8 como grau III.

A análise ultra-estrutural dos oócitos foi realizada por meio da descrição do material fotodocumentado. Oócitos grau I, II e III foram descritos de acordo com a análise histológica dos cortes semi-finos e ultraestrutural dos cortes ultra-finos. Microscopia eletrônica de varredura foi realizada apenas nos oócitos grau I.

1. Oócitos grau I: em cortes semi-finos foram caracterizados por apresentar citoplasma homogêneo e zona pelúcida compacta rodeada por células do cumulus. Em cortes ultra-finos foram caracterizados por apresentar núcleo irregular contendo heterocromatina dispersa e envelope nuclear formando grandes ondulações. Mitocôndrias, grânulos corticais e vesículas contendo material lipoproteico, encontravam-se distribuídas por todo o citoplasma e também ao redor do núcleo. Gotas de lipídios de vários tamanhos foram encontradas neste estágio. Na microscopia eletrônica de varredura apenas um oócito foi fotografado apresentando-se parcialmente desnudo (Figuras 10a; 11a,b,c,d; 14a,b).

2. Oócitos estágio II: em cortes semi-finos foram caracterizados por apresentar citoplasma não homogêneo com zona pelúcida e células do cumulus envolvendo apenas parcialmente a célula. Em cortes ultra-finos foram caracterizados por apresentar núcleo periférico com pequenas ondulações no envelope nuclear. Pequenas áreas de heterocromatina puderam ser vistas próximas ao envelope nuclear. Numerosas projeções das células do cumulus penetrando na zona pelúcida

puderam ser observadas. Neste estágio havia grande concentração de gotas lipídicas, grânulos corticais e vesículas dispersas por todo o citoplasma (Figuras 10b; 12a,b,c,d).

3. Oócitos estágio III: em cortes semi-finos foram caracterizados por apresentar formas anormais e/ou ausência das células do cumulus e zona pelúcida. Em cortes ultra-finos foram caracterizados por apresentar núcleo central sem ondulações no envelope nuclear. Neste estágio foram observadas vesículas, além de gotas lipídicas e grânulos corticais distribuídos por todo o citoplasma (Figuras 10c; 13a,b,c).

A figura 10 mostra fotos em microscópio de luz de oócitos grau I (a), II (b) e III (c), em cortes semi-finos corados com azul de toluidina 2%, as figuras 11 a 13 mostram fotos em microscópio eletrônico de transmissão de oócitos grau I, II e III, em cortes ultra-finos e a figura 14 mostra fotos de oócito grau I (a,b) em microscópio eletrônico de varredura.

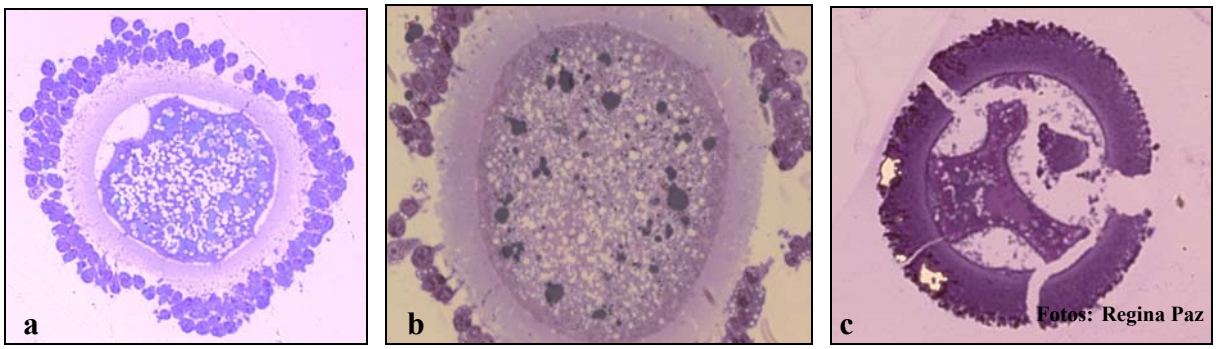


Figura 10 - Oócitos grau I, II e III em corte semi-fino corado com azul de toluidina 2%:
a - Oócito grau I: Citoplasma homogêneo e zona pelúcida compacta rodeada por células do cumulus - 10x.
b - Oócito grau II: Citoplasma homogêneo com pontos de pigmentação, zona pelúcida íntegra, porém com células do cumulus envolvendo apenas parcialmente a célula - 20x.
c - Oócito grau III ou degenerado: Citoplasma heterogêneo, zona pelúcida rompida sem a presença de células do cumulus – 10x.

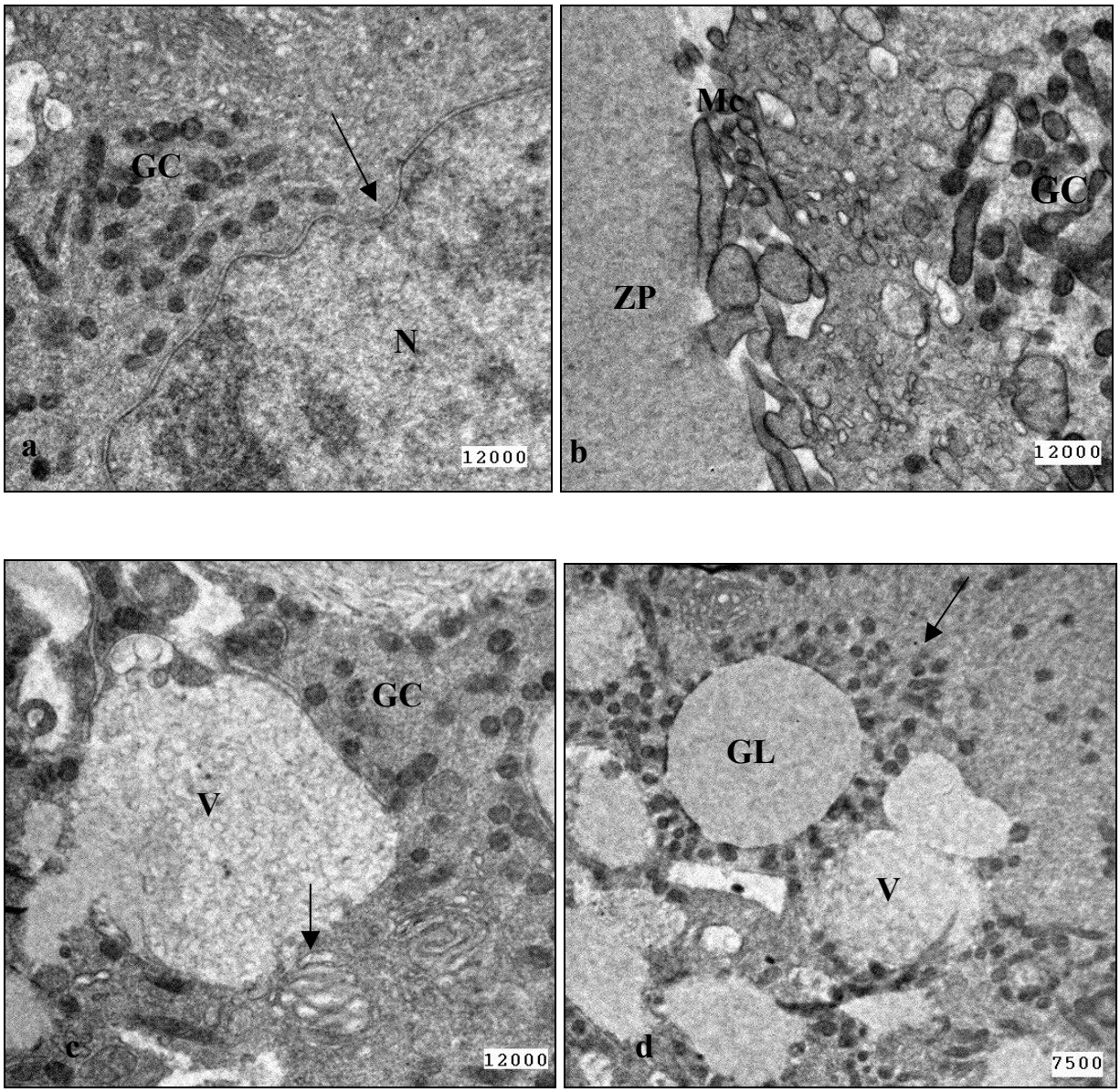


Figura 11 - Eletromicrografias de oócitos grau I em corte ultra-fino:
a - Núcleo (N), Envelope Nuclear (seta), Grânulos Corticais (GC);
b - Zona Pelúcida (ZP), Microvilosidades (Mc), Grânulos Corticais (GC);
c - Mitocôndria (seta), Grânulos Corticais (GC), Vesícula c/ material lipoprotéico (V);
d - Gota Lipídica (GL), Grânulos Corticais (seta); Vesícula c/ material lipoproteico (V).

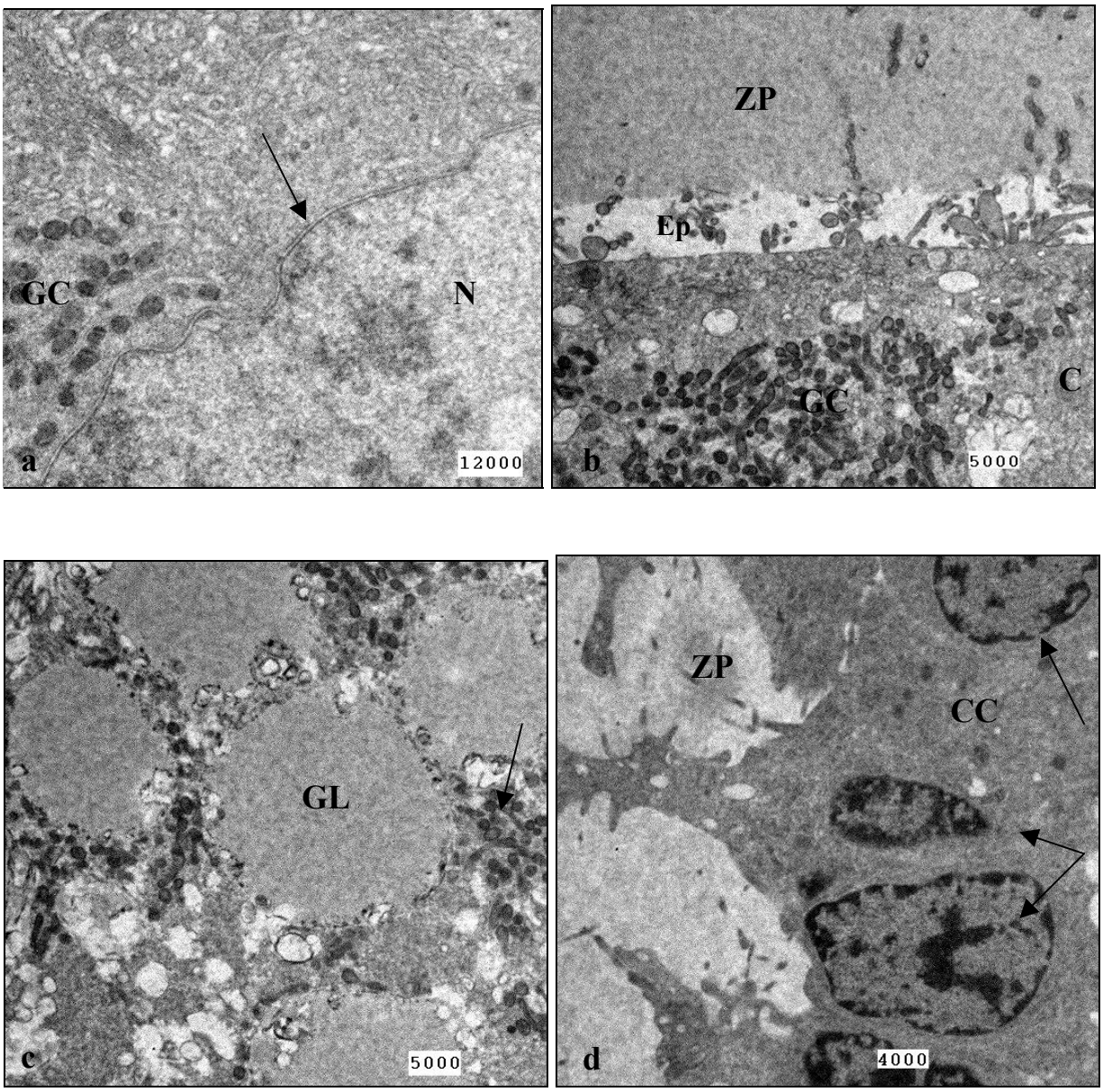


Figura 12 - Eletromicrografias de oócitos grau II em corte ultra-fino:
a - Núcleo (N), Envelope Nuclear (seta), Grânulos Corticais (GC);
b - Zona Pelúcida (ZP), Espaço Perivitelínico (Ep), Citoplasma (C), Grânulos Corticais (GC);
c - Gotas Lipídicas (GL), Grânulos Corticais (seta);
d - Células do Cumulus (CC), Núcleos das Células do Cumulus (setas), Zona Pelúcida (ZP).

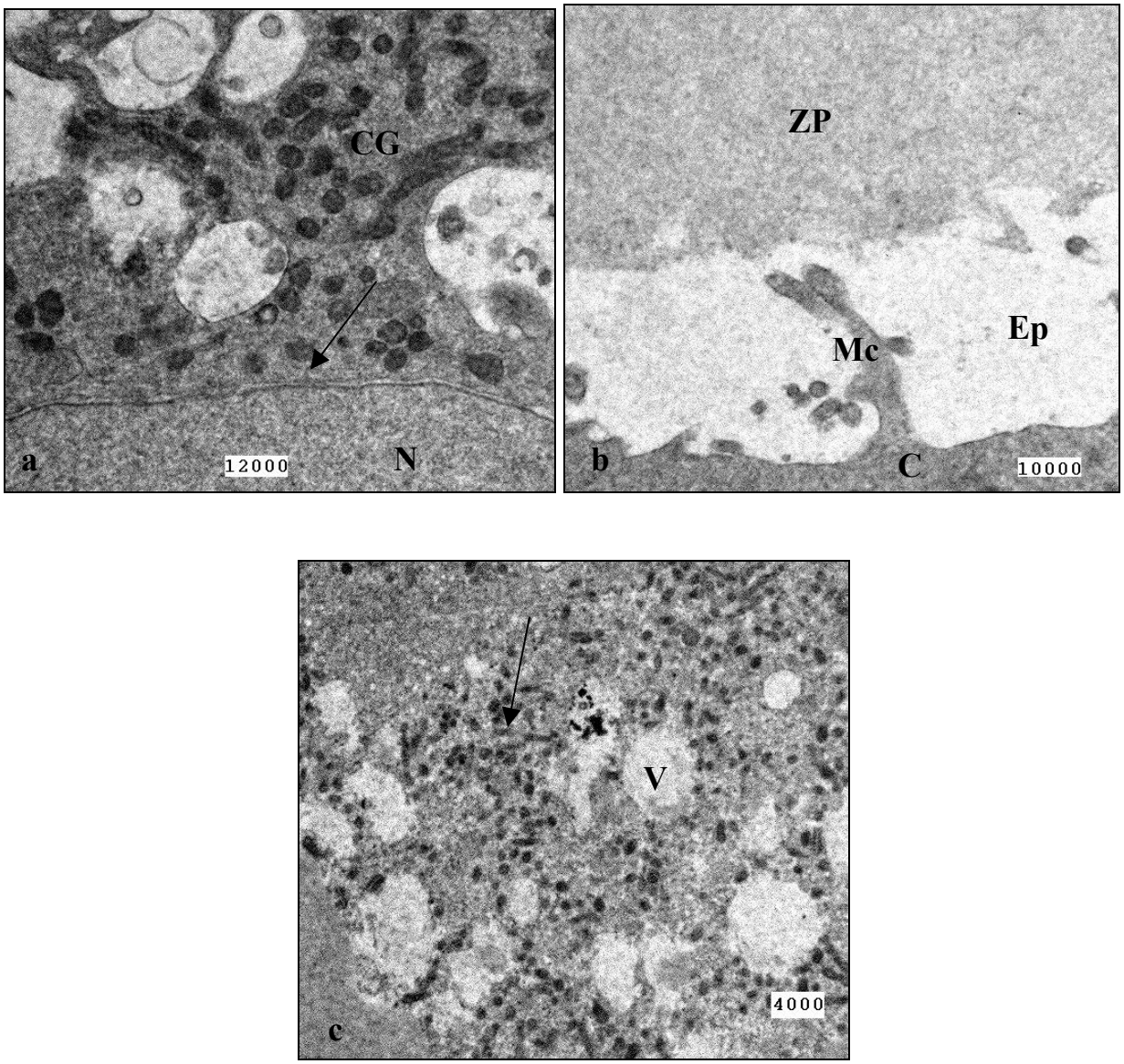


Figura 13 - Eletromicrografias de oócitos grau III em corte ultra-fino:
a - Núcleo (N), Envelope Nuclear (seta), Grânulos Corticais (GC);
b - Zona Pelúcida (ZP), Citoplasma (C), Microvilosidades (Mc), Espaço Perivitelínico (Ep);
c - Grânulos Corticais (seta), Vesículas com material lipoprotéico (V).

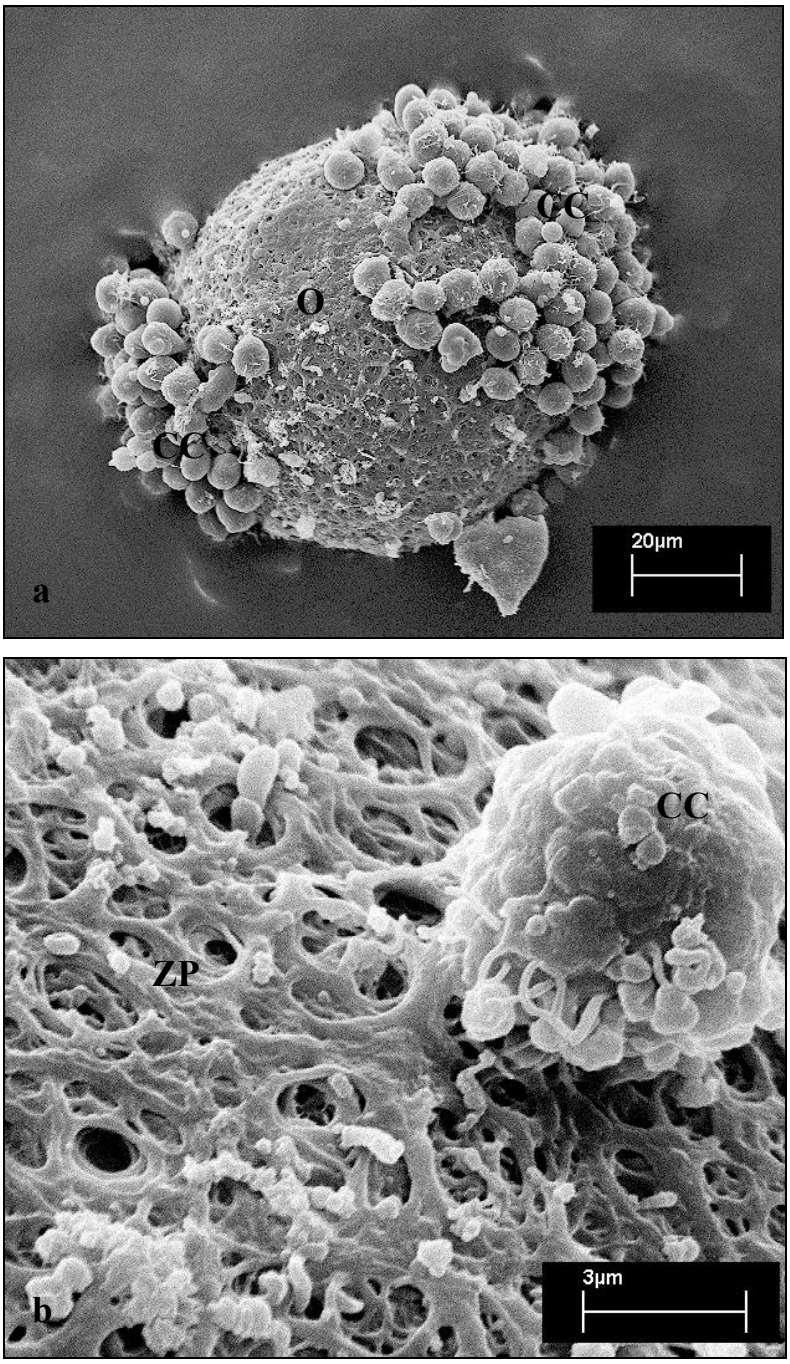


Figura 14 - Eletromicrografias de oócito grau I em Microscopia de Varredura:
a - Oócito (O) parcialmente desnudo, com as extremidades repletas de Células do Cúmulus (CC) presas à zona pelúcida;
b - Parte da superfície desnuda do oócito onde podem ser visualizadas a Zona Pelúcida (ZP), formando verdadeiras cavidades e uma Célula do Cumulus (CC) presa à superfície celular.

5.1.5 Dosagens de Anticorpos por ELISA

A densidade óptica (OD) para machos de jaguatirica (+3SD) para eCG, hCG, pFSH e pLH foi de 0.546, 0.524, 0.509 e 0.602, respectivamente. Coeficientes Intra-ensaio para eCG, hCG, pFSH e pLH foram de 0.066, 0.052, 0.045 e 0.115; e coeficientes inter-ensaio para eCG, hCG, pFSH e pLH foram de 0.043, 0.057, 0.036 e 0.046, respectivamente.

Anteriormente a este estudo, duas jaguatiricas (LP240 e LP290) haviam recebido tratamento com eCG/hCG uma a duas vezes, no entanto, além desses dois animais uma outra fêmea (LP289) apresentou títulos anti-gonadotrofinas antes de receberem o tratamento proposto neste experimento (Quadro 1).

	eCG					hCG					pFSH					pLH				
Treat. group	LP 285	LP 240	LP 290	LP 289	LP 254	LP 285	LP 240	LP 290	LP 289	LP 254	LP 285	LP 240	LP 290	LP 289	LP 254	LP 285	LP 240	LP 290	LP 289	LP 254
Pre	-	+	-	+	nd	-	+	-	-	nd	-	+	-	+	nd	-	+	+	+	nd
1º treat.	+	+	-	+	nd	-	+	-	-	nd	+	+	+	+	nd	-	+	+	+	nd
Pre	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
2º treat.	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Pre	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
3ºtreat.	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Pre	-	-	+	+	nd	-	+	-	-	nd	-	+	+	+	nd	+	+	+	+	nd
4º treat.	-	+	+	+	nd	-	-	-	-	nd	-	+	+	+	nd	+	+	+	+	nd
Pre	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
5ºtreat.	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Pre	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
6º treat.	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Pos	+	-	+	+	nd	+	-	+	+	nd	+	-	+	+		+	-	+	+	nd

[a]Valores de Absorbância das amostras de soro (+3SD) de jaguatirica macho foram classificadas como positivo (+) ou negativo (-), respectivamente.

Quadro 1 - Atividade de Ligação (ELISA) para gonadotrofinas exógenas (eCG/hCG/pFSH/pLH) em soro de jaguatiricas que receberam tratamento alternado com eCG/hCG and pFSH/pLH[a], Cincinnati / Ohio / USA, 2004.

5.1.6 Dosagens Hormonais por RIE

Para o controle de qualidade foram utilizados pontos de concentração baixa e pontos de concentração alta dos hormônios mensurados. Para a progesterona o coeficiente Intra-ensaio baixo foi de 2,58% e alto foi de 6,36%, já o coeficiente Inter-ensaio baixo foi de 5,55% e alto foi de 0,67%. Para o estradiol o coeficiente Intra-ensaio baixo foi de 0,69% e alto foi de 4,15%, sendo o coeficiente Inter-ensaio baixo de 1,40% e alto de 3,00%.

A sensibilidade mínima detectada foi de 0,004 ng/ml para progesterona e de 0,14 pg/ml para estradiol. A concentração sérica de estradiol encontrada neste experimento variou de 4,94 a 151,00 pg/ml e a concentração sérica de progesterona variou de 0,15 a 37,22 ng/ml.

A validação dos conjuntos diagnósticos comerciais utilizados foi realizada utilizando-se a curva de paralelismo, sendo que para haver paralelismo o coeficiente de correlação (r) deve ficar próximo a 1 segundo Graham (2001) e nunca inferior a 0,95 segundo o LDH/FMVZ/USP. Paralelismo foi encontrado entre as curvas de diluição de progesterona na matriz depletada e a curva do conjunto comercial DPC (Coat-A-Count - Diagnostic Products Corporation/USA), com r=0,96 (Figura 15) e entre as curvas de diluição de estradiol na matriz depletada e a curva do conjunto comercial DSL (Diagnostic System Laboratories INC/USA), com r=0,98 (Figura 16).

O quadro 2 mostra os resultados das dosagens hormonais séricas de estradiol (pg/ml) e progesterona (ng/ml) nos momentos pré (15 a 30 dias antes da superovulação) e pós superovulação (dia da vídeo-laparoscopia).

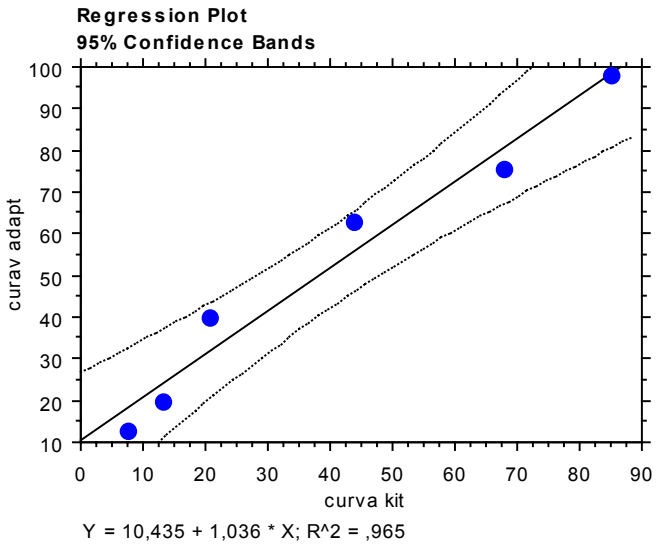


Figura 15 - Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progesterona, em jaguatiricas, utilizando a matriz depletada, São Paulo, 2004

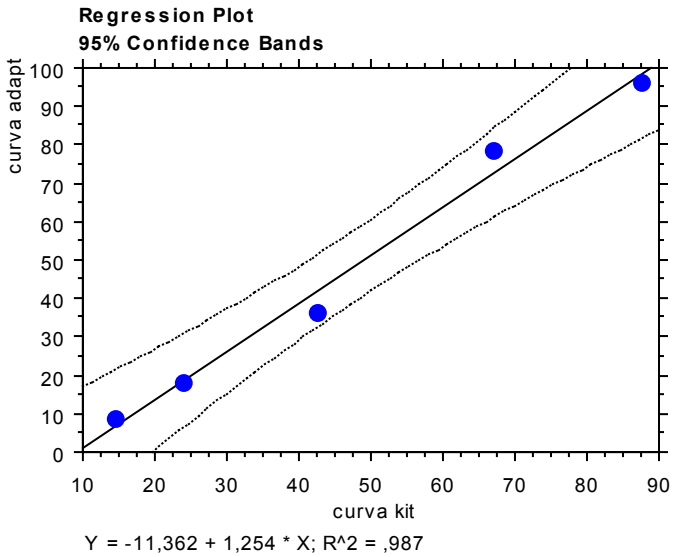
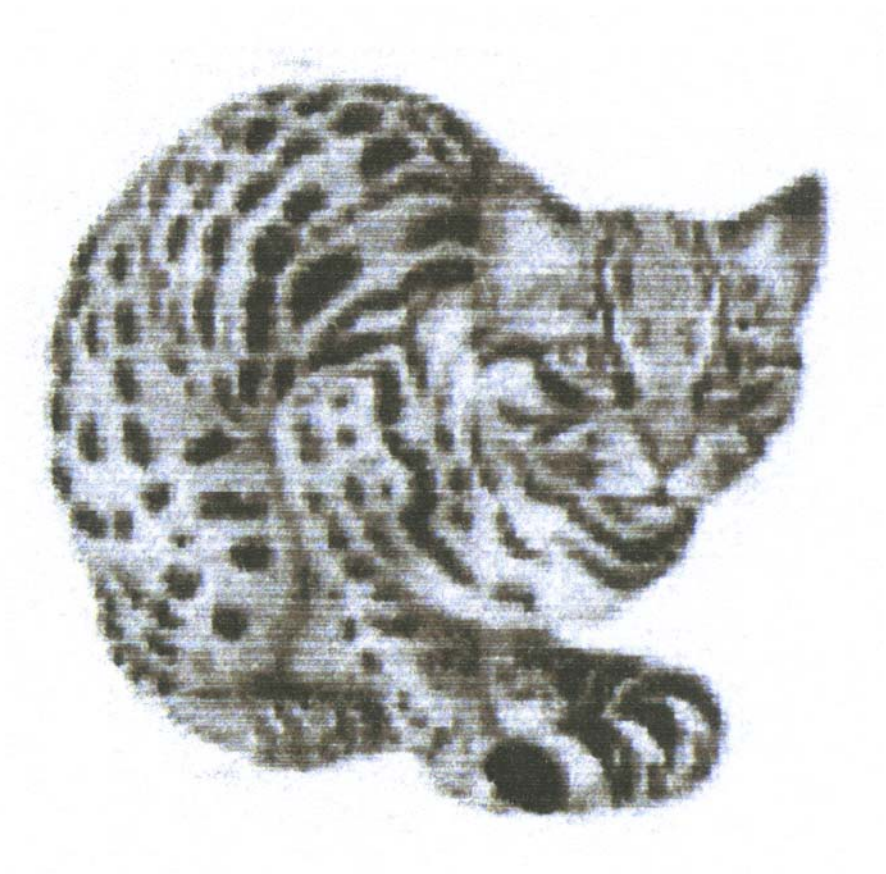


Figura 16 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estradiol, em jaguatiricas, utilizando a matriz depletada, São Paulo, 2004

Tratamentos	LP 285		LP 240		LP 290		LP 298		LP 254	
	E_2 (pg/ml)	P_4 (ng/ml)	E_2 (pg/ml)	P_4 (ng/ml)	E_2 (pg/ml)	P_4 (ng/ml)	E_2 (pg/ml)	P_4 (ng/ml)	E_2 (pg/ml)	P_4 (ng/ml)
Pré-eCG/hCG	27,55	1,17	27,57	0,31	39,12	0,74	34,96	0,87	nd	nd
1º Cirurgia	97,31	0,26	151,00	8,51	151,00	1,09	151,00	1,43	nd	nd
Pré-pFSH/LH	46,68	1,26	72,02	0,86	43,102	0,83	37,48	0,35	40,89	0,42
2º Cirurgia	118,79	0,47	151,00	2,69	34,24	2,32	151,00	2,21	120,30	0,26
Pré-eCG/hCG	27,57	0,63	31,32	16,54	39,54	0,50	18,84	0,42	45,02	0,89
3º Cirurgia	117,92	6,28	151,00	7,67	53,49	1,09	127,1	0,89	25,26	1,31
Pré-pFSH/LH	12,66	0,41	25,79	0,33	9,58	0,44	4,94	0,82	nd	nd
4º Cirurgia	47,74	1,04	138,38	1,46	35,2	0,86	58,60	1,08	nd	nd
Pré-eCG/hCG	49,79	14,49	58,85	0,24	71,66	0,78	61,47	1,15	16,01	0,17
5º Cirurgia	115,60	37,22	142,76	1,69	120,62	1,09	151,00	1,15	20,62	0,69
Pré-pFSH/LH	37,88	28,39	54,61	6,37	118,33	1,25	56,27	0,52	26,33	0,58
6º Cirurgia	97,67	19,72	107,26	1,99	97,68	1,76	151,00	4,48	146,61	1,09
Pós Cirurgia	26,39	0,16	41,91	8,42	43,28	0,79	22,15	0,18	nd	nd

Quadro 2 - Concentrações Séricas de estradiol (pg/ml) e progesterona (ng/ml) em jaguatiricas que receberam tratamento alternado com eCG/hCG e pFSH/pLH, São Paulo, 2004



EXPERIMENTO II – GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*)

5. RESULTADOS

5.2.1 Análise dos Protocolos de Superovulação

Tabela 5 – Média e Erro Padrão das estruturas ovarianas (Folículos Maduros e Corpos Lúteos recentes) observadas em gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH
LT 136	0	0	0	2	4	2
LT 141	2	1	6	4	2	4
LT 138	0	1	2	4	-	-
LT 134	6	0	4	2	-	-
M±EP	**2,0 ± 1,4**	**0,5 ± 0,3**	**3,0± 1,3**	**3,0 ± 0,6**	**3,0 ± 1,0**	**3,0 ± 1,0**

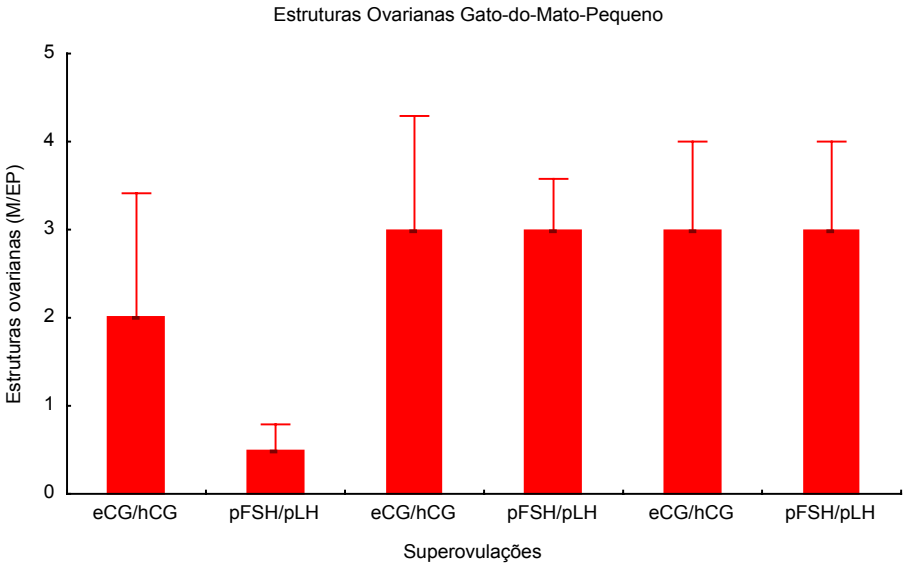


Figura 17 - Média e Erro Padrão das estruturas ovarianas (Folículos Maduros e Corpos Lúteos recentes) observadas em gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC, Jundiaí/SP, 2004

5.2.2 Análise dos Oócitos Recuperados

Tabela 6 - Média e Erro Padrão de oócitos maduros recuperados de gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH
LT 136	0	0	0	1	0	2
LT 141	1	1	0	2	1	1
LT 138	0	1	0	1	-	-
LT 134	2	0	0	0	-	-
M±EP	**0,75±0,5**	**0,5±0,3**	**0,0±0,0**	**1,0±0,4**	**0,5±0,5**	**1,5±0,5**

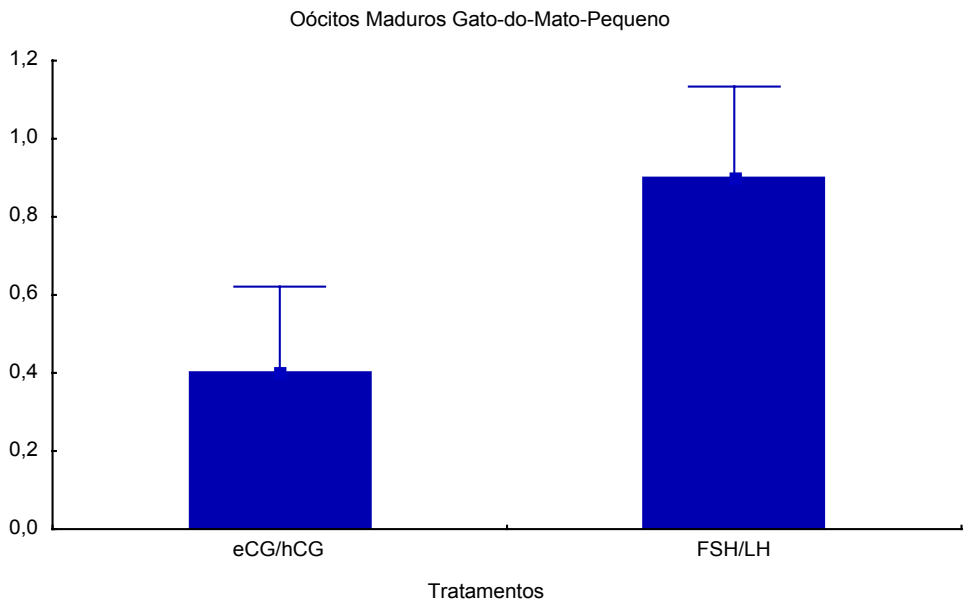


Figura 18 - Média e Erro Padrão do número de oócitos maduros recuperados em cada tratamento, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Tabela 7 - Média e Erro Padrão de oócitos totais recuperados de gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH
LT 136	0	0	0	2	4	2
LT 141	2	1	0	2	2	4
LT 138	0	1	0	2	-	-
LT 134	6	0	1	1	-	-
M±EP	**2,0±1,4**	**0,5±0,3**	**0,3±0,2**	**1,8±0,2**	**3,0±1,0**	**3,0±1,0**

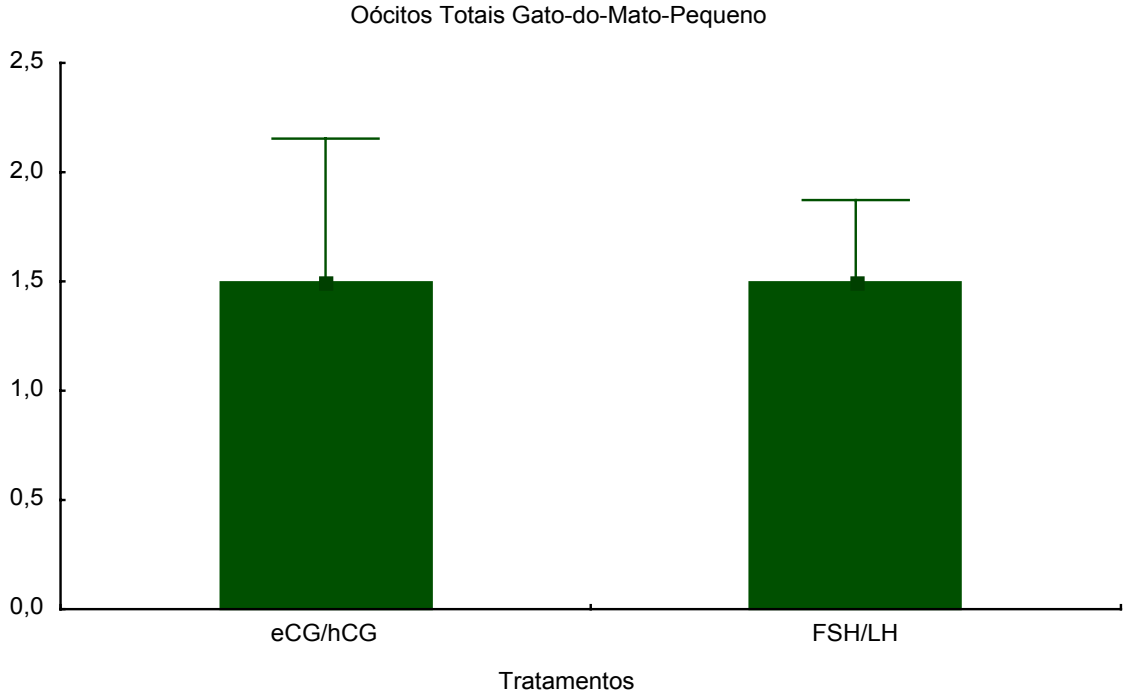


Figura 19- Média e Erro Padrão do número de oócitos totais recuperados em cada tratamento, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Tabela 8 - Proporção de oócitos maduros em relação ao total de oócitos recuperados de gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH
LT 136	0/0	0/0	0/0	1/2	0/4	2/2
LT 141	1/2	1/1	0/0	2/2	1/2	1/4
LT 138	0/0	1/1	0/0	1/2	-	-
LT 134	2/6	0/0	0/1	0/1	-	-
Proporção (%)	**3/8 (37,5%)**	**2/2 (100%)**	**0/1 (0%)**	**4/7 (57,1%)**	**1/6 (16,7%)**	**3/6 (50%)**

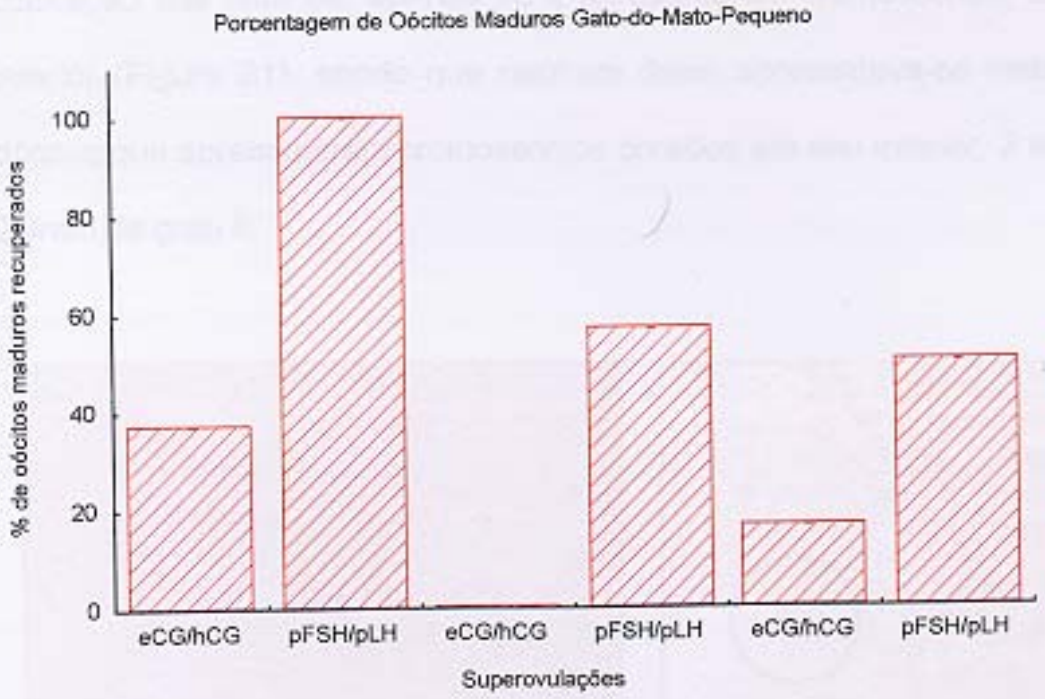


Figura 20- Porcentagem de oócitos maduros recuperados de gatos-do-mato-pequeno, após superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC, Jundiaí/SP, 2004

5.2.3 Análise Citogenética dos Oócitos

Um total de 15 oócitos provenientes de folículos maduros (>2mm) foi utilizado para avaliação citogenética.

Os oócitos utilizados foram classificados como grau I, II ou III, sendo que dos 15 oócitos utilizados, 6 foram classificados como grau I, 6 como grau II e 3 como grau III.

Durante o procedimento, 27% dos oócitos não puderam ser observados, sendo que dos 4 oócitos não observados 3 se perderam durante o período de fixação e 1 foi danificado durante a confecção da lâmina, impossibilitando sua leitura. Dos 4 oócitos não observados 1 era de grau I, 2 de grau II e 1 de grau III.

Dentre os oócitos observados ao microscópio de luz, após fixação e coloração das lâminas, apenas 26% apresentaram cromossomos corados em seu interior (Figura 21), sendo que nenhum deles apresentava-se metáfase II. Dos 4 oócitos que apresentaram cromossomos corados em seu interior, 2 eram de grau I e 2 eram de grau II.

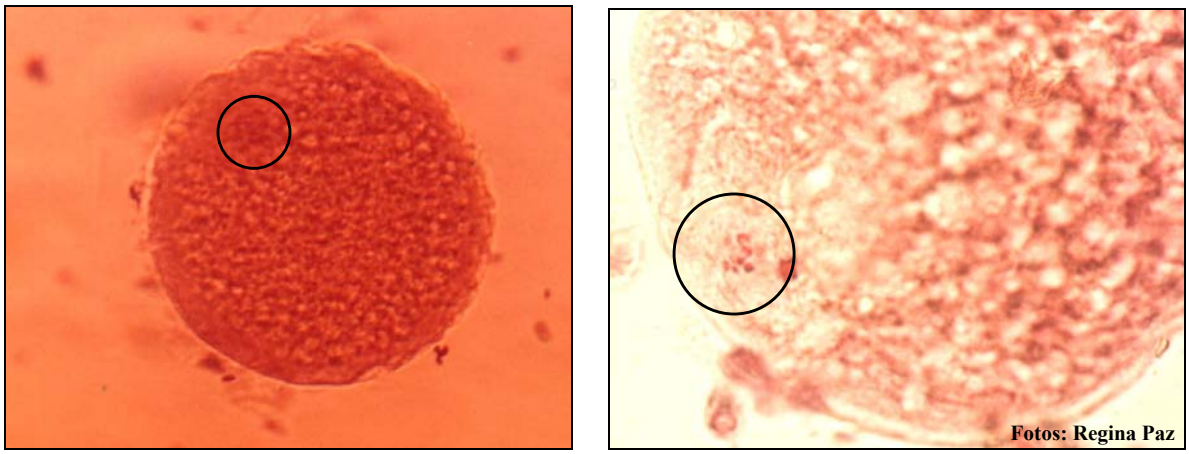


Figura 21 - Oócito grau II apresentando cromossomos corados em seu interior, em aumento 10x (à esquerda) e 1000x (à direita), São Paulo, 2004

5.2.4 Análise Ultraestrututal dos Oócitos

Um total de 15 oócitos provenientes de folículos maduros foi dividido e utilizado para microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Todos os oócitos foram previamente classificados morfologicamente com auxílio de esteriomicroscópio, sendo 7 classificados como grau I, 6 como grau II e 2 como grau III.

A análise ultra-estrutural dos oócitos foi realizada por meio da descrição do material fotodocumentado. Oócitos grau I e II foram descritos de acordo com a análise histológica dos cortes semi-finos e ultraestrutural dos cortes ultra-finos. Microscopia eletrônica de varredura foi realizada apenas nos oócitos grau I. Os oócitos grau III se perderam durante a manipulação, não podendo, portanto, ser avaliados.

1. Oócitos grau I: em cortes semi-finos foram caracterizados por apresentar citoplasma homogêneo, com grande quantidade de gotas lipídicas e zona pelúcida compacta rodeada por células do cumulus. Em cortes ultra-finos foram caracterizados por apresentar núcleo regular contendo heterocromatina dispersa. Mitocôndrias e grânulos corticais encontravam-se distribuídos por todo o citoplasma e também ao redor do núcleo. Grandes gotas de lipídios foram encontradas neste estágio. Na microscopia eletrônica de varredura apenas um oócito foi fotografado apresentando-se parcialmente desnudo (Figuras 22a; 23a,b,c; 25a,b,c,d,).

2. Oócitos estágio II: Em cortes semi-finos foram caracterizados por apresentar citoplasma com pontos de pigmentação, zona pelúcida íntegra e células do cumulus envolvendo apenas parcialmente a célula. Em cortes ultra-finos nenhum núcleo foi visualizado. Junções entre as células do cumulus e a zona pelúcida

puderam ser observadas. Neste estágio havia grande concentração de gotas lipídicas e grânulos corticais dispersos por todo o citoplasma (Figuras 22b; 24a,b,c).

3. Oócitos estágio III: Não foram caracterizados

A figura 22 mostra fotos em microscópio de luz de oócitos grau I (a) e II (b), em cortes semi-finos corados com azul de toluidina 2%, as figuras 23 e 24 mostram fotos em microscópio eletrônico de transmissão de oócitos grau I e II, em cortes ultra-finos e a figura 25 mostra fotos de oócito grau I (a,b,c,d) em microscópio eletrônico de varredura.

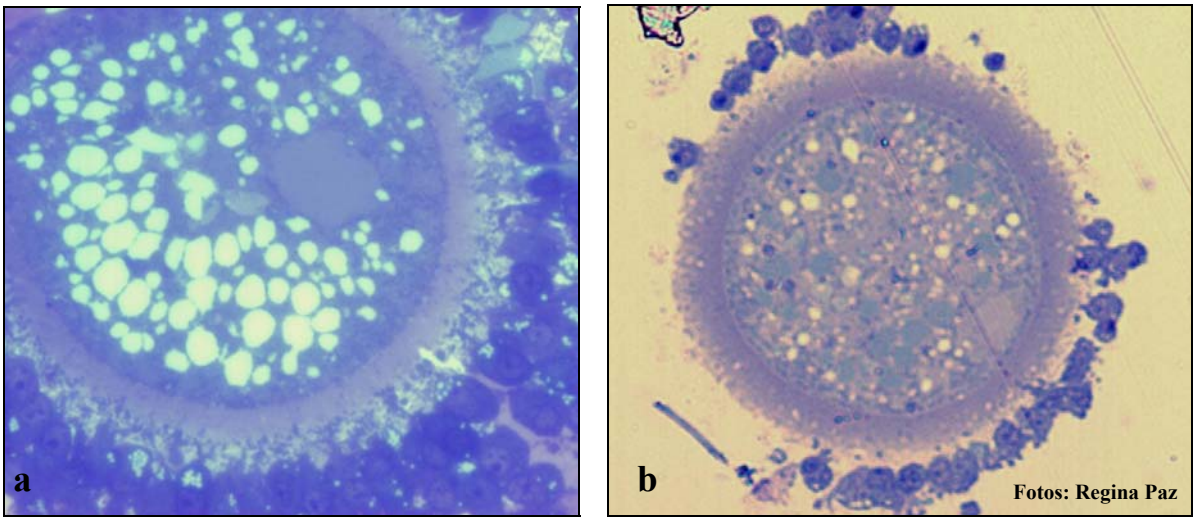


Figura 22 - Fotomicrografia de oócitos grau I eII em corte semi-fino corado com azul de toluidina:
a - Oócito grau I: Citoplasma homogêneo, com grande quantidade de gotas lipídicas e zona pelúcida compacta rodeada por células do cumulus - 40x.
b - Oócito grau II: Citoplasma homogêneo com pontos de pigmentação, zona pelúcida íntegra, porém com células do cumulus envolvendo apenas parcialmente a célula - 10x.

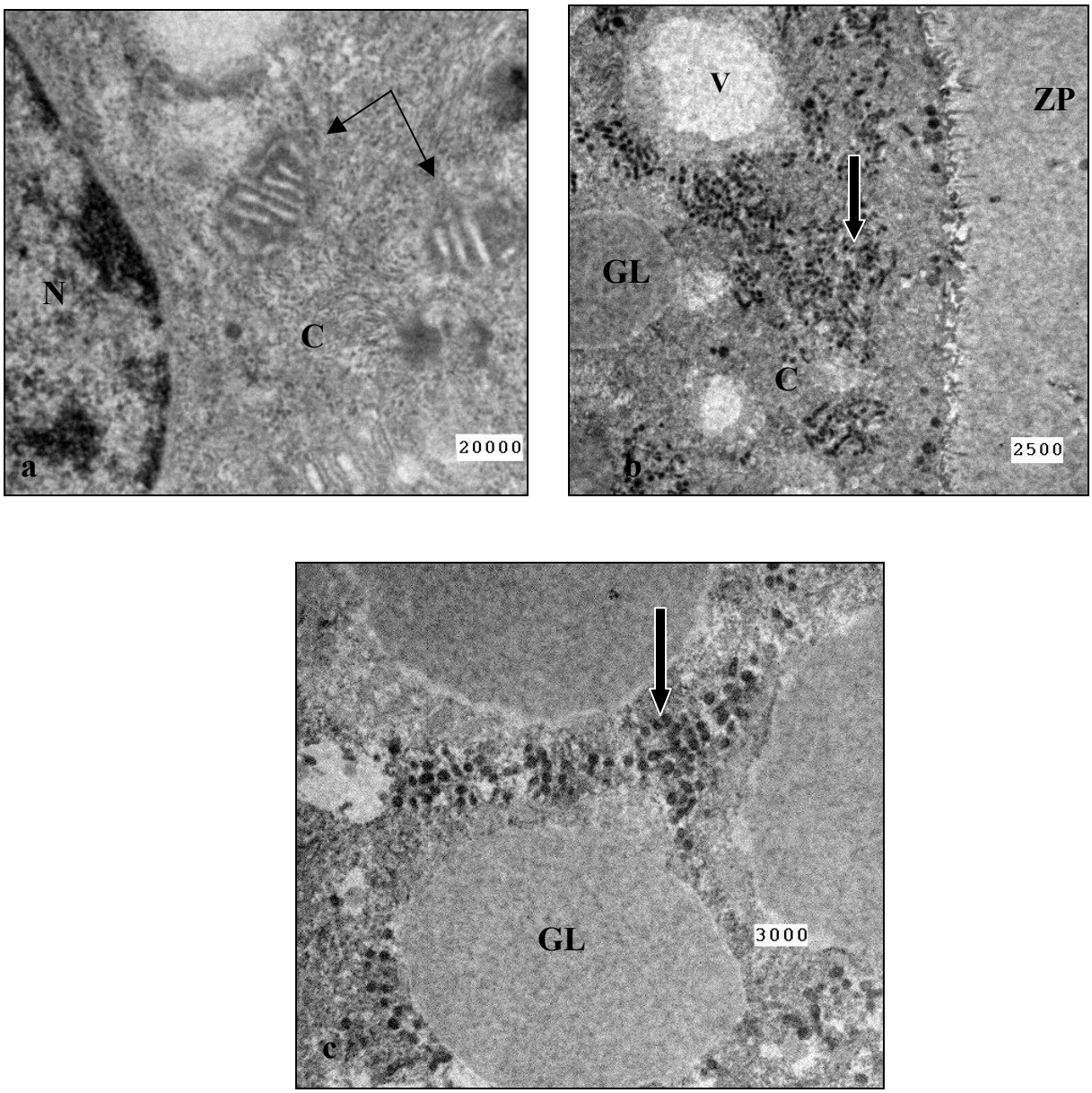


Figura 23 - Eletromicrografias de oócitos grau I em corte ultra-fino:
a - Núcleo (N), Citoplasma (C), Mitocôndrias (setas);
b- Zona Pelúcida (ZP), Citoplasma (C), Grânulos Corticais (seta), Vesículas com material lipoproteico (V); Gotas Lipídicas (GL);
c - Gotas Lipídicas (GL), Grânulos Corticais (seta).

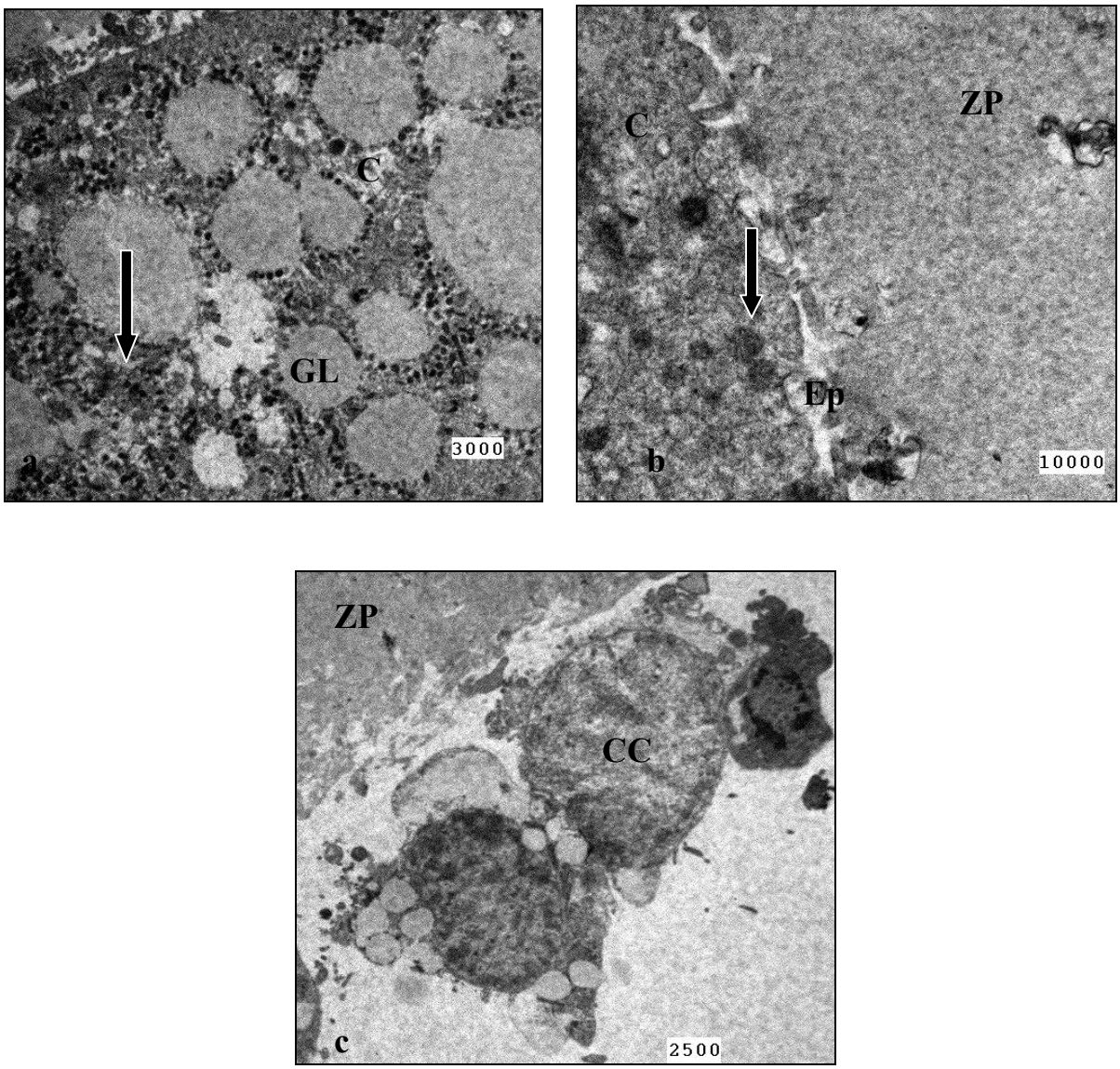


Figura 24 - Eletromicrografias de oócitos grau II em corte ultra-fino:
a - Citoplasma (C), Gotas Lipídicas (GL), Grânulos Corticais (CG);
b- Zona Pelúcida (ZP), Citoplasma (C), Espaço Perivitelínico (Ep), Grânulos Corticais (seta);
c - Zona Pelúcida (ZP), Células do Cumulus (CC).

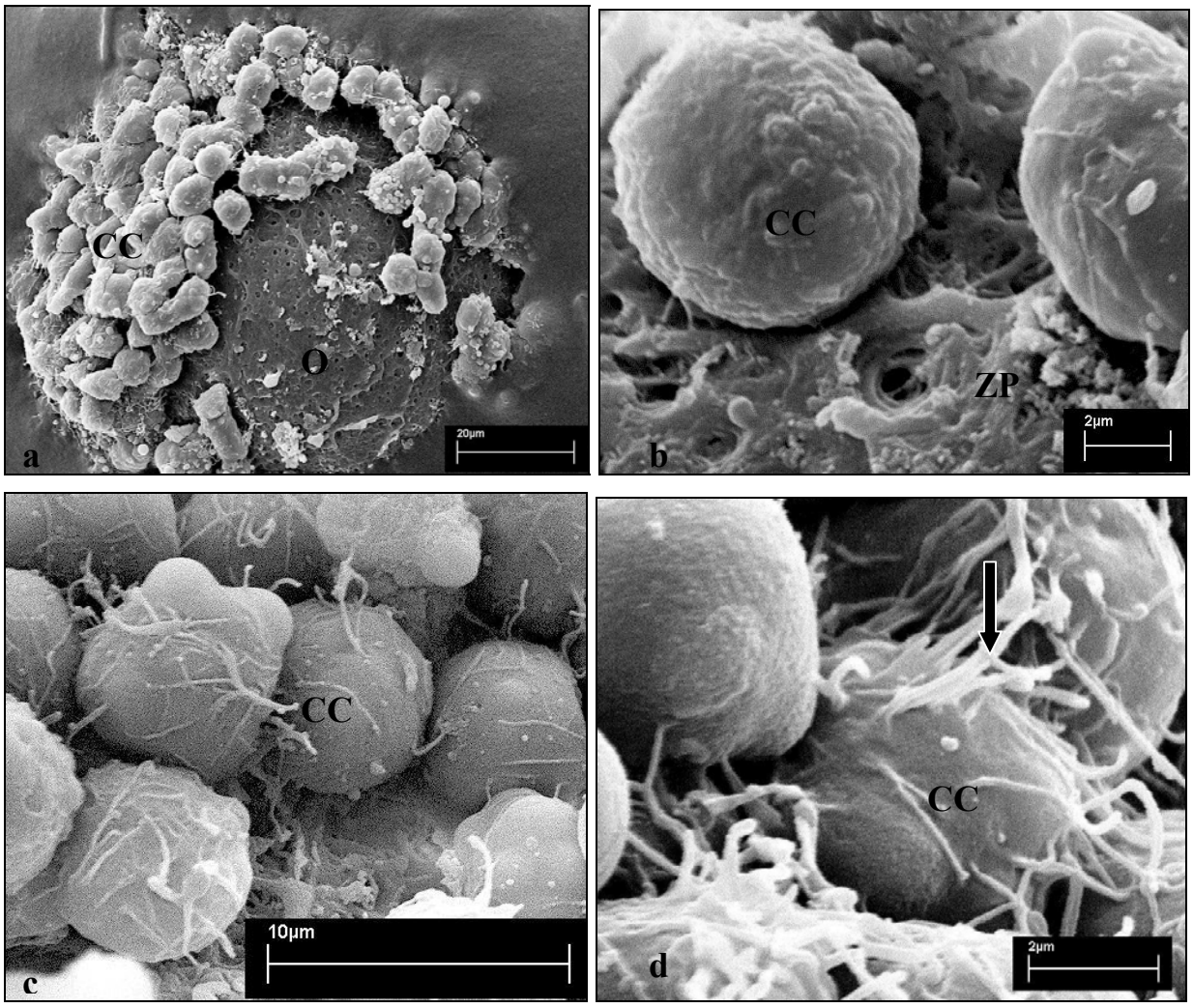


Figura 25 - Eletromicrografias de oócito grau I em Microscopia de Varredura:
a - Oócito parcialmente desnudo (O), Células do Cumulus (CC);
b - Parte da superfície desnuda do oócito onde pode ser visualizada a Zona Pelúcida (ZP) formando cavidades e algumas Células do Cumulus (CC) presas à superfície celular;
c - Células do Cumulus (CC) rodeando o oócito;
d - Células do Cumulus (CC) e Microvilosidades Filiformes (seta).

5.2.5 Dosagens de Anticorpos por ELISA

A densidade óptica (OD) para machos de gato do mato pequeno (+3SD) para eCG, hCG, pFSH e pLH foi de 0.883, 0.707, 1.035 e 0.959, respectivamente. Coeficientes Intra-ensaio para eCG, hCG, pFSH e pLH foram de 0.071, 0.033, 0.017 e 0.048; e coeficientes inter-ensaio para eCG, hCG, pFSH e pLH foram de 0.043, 0.057, 0.036 e 0.046, respectivamente.

Anteriormente a este estudo, uma fêmea de gato do mato pequeno (LT134) havia recebido tratamento com eCG/hCG uma vez, no entanto, este animal não apresentou títulos anti-gonadotrofinas antes do início do experimento. Apenas uma fêmea (LT138) apresentou título anti-eCG antes do tratamento hormonal (Quadro 3).

	eCG				hCG				pFSH				PLH			
Treat. Group	LT 136	LT 141	LT 138	LT 134	LT 136	LT 141	LT 138	LT 134	LT 136	LT 141	LT 138	LT 134	LT 136	LT 141	LT 138	LT 134
Pre	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1º treat.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pre	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2º treat.	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Pre	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
3º treat.	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Pre	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
4º treat.	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Pre	-	-	nd	-	-	-	nd	+	-	-	nd	+	+	+	nd	+
5º treat.	+	+	nd	nd	-	+	nd	nd	-	-	nd	nd	+	+	nd	nd
Pre	+	+	nd	nd	-	+	nd	nd	-	-	nd	nd	+	+	nd	nd
6º treat.	+	+	nd	nd	-	+	nd	nd	-	-	nd	nd	+	+	nd	nd
Pos	+	-	nd	nd	-	+	nd	nd	-	+	nd	nd	+	+	nd	nd

[a]Valores de Absorbância das amostras de soro (+3SD) de gato-do-mato-pequeno macho foram classificadas como positivo (+) ou negativo (-), respectivamente.

Quadro 3 – Atividade de Ligação (ELISA) para gonadotrofinas exógenas (eCG/hCG/pFSH/pLH) em soro de gatos-do-mato-pequeno que receberam tratamento alternado com eCG/hCG and pFSH/pLH[a], Cincinnati/Ohio/USA, 2004

5.2.6 Dosagens Hormonais por RIE

Para o controle de qualidade foram utilizados pontos de concentração baixa e pontos de concentração alta dos hormônios mensurados. Para progesterona o coeficiente Intra-ensaio baixo foi de 2,58% e alto foi de 6,36%, já o coeficiente Inter-ensaio baixo para progesterona foi de 5,55% e alto foi de 0,67%. Para estradiol o coeficiente Intra-ensaio baixo foi de 0,69% e alto foi de 4,15%, sendo que coeficiente Inter-ensaio baixo de 1,40% e alto de 3,00%.

A sensibilidade mínima detectada foi de 0,004 ng/ml para progesterona e de 0,14 pg/ml para estradiol. A concentração sérica de estradiol encontrada neste experimento variou de 11,73 a 147,31 pg/ml e a concentração sérica de progesterona variou de 0,06 a 34,09 ng/ml.

A validação dos conjuntos diagnósticos comerciais utilizados foi realizada utilizando-se a curva de paralelismo, sendo que para haver paralelismo o coeficiente de correlação (r) deve ficar próximo a 1 segundo Graham (2001) e nunca inferior a 0,95 segundo o LDH/FMVZ/USP. Paralelismo foi encontrado entre as curvas de diluição de progesterona na matriz depletada e a curva do conjunto comercial DPC (Coat-A-Count - Diagnostic Products Corporation/USA), com r=0,99 (Figura 26) e entre as curvas de diluição de estradiol na matriz depletada e a curva do conjunto comercial DSL (Diagnostic System Laboratories INC/USA), com r=0,99 (Figura 27).

O quadro 4 mostra os resultados das dosagens hormonais séricas de estradiol (pg/ml) e progesterona (ng/ml) nos momentos pré (15 a 30 dias antes da superovulação) e pós superovulação (dia da vídeo-laparoscopia).

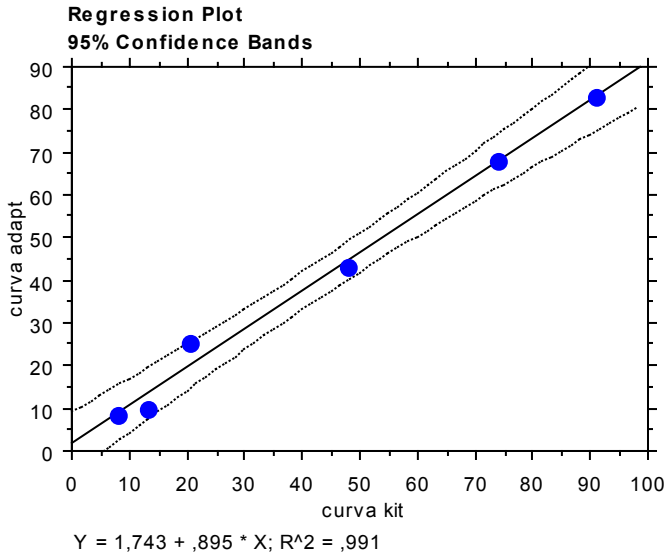


Figura 26 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para progesterona, em gatos-do-mato-pequeno, utilizando a matriz depletada, São Paulo, 2004

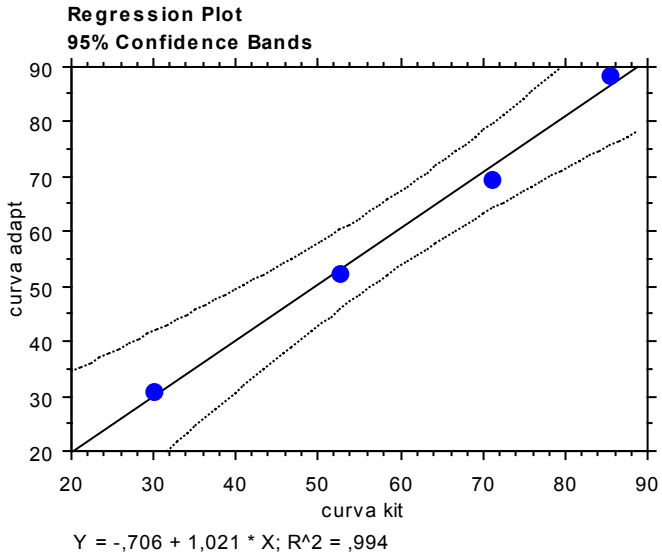


Figura 27 – Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para estradiol, em gatos-do-mato-pequeno, utilizando a matriz depletada, São Paulo, 2004

Tratamentos	LT 136		LT 141		LT 138		LT 134	
	E_2 (pg/ml)	P_4 (ng/ml)	E_2 (pg/ml)	P_4 (ng/ml)	E_2 (pg/ml)	P_4 (ng/ml)	E_2 (pg/ml)	P_4 (ng/ml)
Pré-eCG/hCG	45,77	0,31	68,05	0,06	37,35	0,47	17,70	1,29
1º Cirurgia	110,81	7,93	102,03	9,93	3,85	3,01	144,65	2,36
Pré-pFSH/LH	57,34	1,73	47,96	3,19	92,68	1,18	11,73	0,30
2º Cirurgia	48,73	1,31	65,79	0,48	30,12	34,09	54,67	16,29
Pré-eCG/hCG	23,92	1,79	18,87	2,13	17,49	0,78	84,69	33,86
3º Cirurgia	89,66	1,09	116,13	2,39	41,84	1,74	42,62	2,24
Pré-pFSH/LH	24,66	0,99	13,39	2,66	25,72	0,83	44,32	1,36
4º Cirurgia	57,85	1,42	15,41	5,73	18,97	27,06	34,16	0,22
Pré-eCG/hCG	47,44	2,41	21,79	1,25	nd	nd	57,58	0,45
5º Cirurgia	48,57	0,56	37,82	3,57	nd	nd	nd	nd
Pré-pFSH/LH	38,48	0,39	45,95	0,83	nd	nd	nd	nd
6º Cirurgia	39,26	0,10	147,31	0,55	nd	nd	nd	nd
Pós Cirurgia	39,18	2,05	36,33	0,88	nd	nd	nd	nd

Quadro 4 - Concentrações Séricas de estradiol (pg/ml) e progesterona (ng/ml) em gatos-do-mato-pequeno que receberam tratamento alternado com eCG/hCG e pFSH/pLH, São Paulo, 2004

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO

Esse estudo representa a primeira avaliação ovariana, imunológica e hormonal realizada em duas espécies de felinos neotropicais do gênero Leopardus: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*, antes e após tratamentos alternados com as gonadotrofinas exógenas eCG/hCG e pFSH/pLH.

Essas constatações são potencialmente valiosas junto aos esforços em desenvolver e aplicar as técnicas de reprodução assistida no manejo e conservação de populações de felinos ameaçados de extinção.

Neste estudo, fêmeas de jaguatirica e gato-do-mato-pequeno, tratadas repetidamente em regimes alternados com gonadotrofinas exógenas (eCG/hCG e pFSH/pLH), não mostraram decréscimo no número total de estruturas ovarianas (Folículos Maduros e Corpos Lúteos) ou na porcentagem de oócitos maduros, após quatro a seis tratamentos sucessivos.

Essas observações são similares às encontradas em gatos domésticos, no qual resposta ovariana não diminuiu após três ou quatro tratamentos com eCG/hCG, em intervalos de quatro meses (SWANSON et al., 1996b). Entretanto, repetidos tratamentos utilizando eCG/hCG, em intervalos de 2 meses, produziram uma dramática redução na resposta ovariana em gatos domésticos (SWANSON et al., 1995; SWANSON et al, 1996 b).

Da mesma maneira, em outras espécies de felinos selvagens como leopardo das neves (*Panthera uncia*), pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*), jaguatirica *(Leopardus pardalis)*, gato palheiro *(Oncifelis colocolo*) e gato de pallas (*Otocolobus manul*), tratamentos com eCG/hCG em intervalos de seis a doze meses foram adequados para prevenir o declínio da resposta ovariana (SWANSON et al., 1999).

Em recente estudo realizado em tigres (CRICHTON et al., 2003), foi demonstrado que três tratamentos com pFSH/pLH, em intervalos de três meses entre eles, não produziram decréscimo no desenvolvimento folicular ovariano.

A resposta ovariana observada neste estudo foi similar a estudos prévios usando doses variadas de eCG/hCG em jaguatiricas e gatos-do-mato-pequeno para procedimentos de FIV e IA, respectivamente (MORAES et al., 1997; SWANSON et al., 1996 a; SWANSON et al., 2002).

De maneira geral, este estudo aponta duas estratégias para a manutenção da resposta ovariana com repetidos tratamentos, utilizando gonadotrofinas exógenas: intervalo de tempo prolongado entre tratamentos seqüenciais ou uso de diferentes gonadotrofinas exógenas em tratamentos alternados.

Comparando os tratamentos, não houve diferença significativa ($p>0,05$) no número total de estruturas ovarianas observadas em superovulações alternadas sucessivas, nas duas espécies estudadas. Também não houve diferença significativa em relação ao total de estruturas ovarianas encontradas em cada tratamento (5,7±1,2 eCG/hCG; 7,9±0,9 pFSH/pLH) para jaguatiricas e (2,6±0,7 eCG/hCG; 2,0±0,5 pFSH/pLH) para tigrinas.

No presente estudo, foi demonstrado que o tratamento usando pFSH/pLH produziu resposta ovariana comparável para as mesmas espécies utilizando tratamentos com os hormônios eCG/hCG. Em tigres, esses dois regimes de

gonadotrofinas exógenas também produziram níveis equivalentes de estimulação ovariana (CRICHTON et al., 2003; DONOGHUE et al., 1990).

A porcentagem de oócitos classificados como maduros em relação ao total de oócitos recuperados não diferiu ($p>0,05$) ao longo das superovulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH, variando de 40 a 60% em jaguatiricas e de 37,5 a 100% em gatos-do-mato-pequeno, o que nos permite concluir que a metodologia utilizada foi eficiente.

No entanto, em superovulações realizadas utilizando-se os hormônios pFSH/pLH em jaguatiricas, um maior número de oócitos totais e oócitos maduros ($p<0,05$) foi recuperado quando comparado ao tratamento utilizando-se os hormônios eCG/hCG. Em gatos-do-mato-pequeno ambos tratamentos se comportaram de maneira semelhante com relação ao número de oócitos totais, sendo que podemos sugerir uma tendência a maior recuperação de oócitos maduros ($p=0,06$) após os tratamentos com os hormônios pFSH/pLH.

Jaguatiricas e gatos-do-mato-pequeno, bem como outros pequenos felinos, possuem diferente sensibilidade a gonadotrofinas exógenas, muitas vezes requerendo altas dosagens por quilo de peso vivo para gerar crescimento de múltiplos folículos e/ou ovulações (HOWARD, 1999; MORAES et al., 1997; ROTH et al., 1997; SWANSON et al., 1996a).

As dosagens de gonadotrofinas usadas produziram mais estruturas ovarianas em jaguatiricas do que em gatos-do-mato-pequeno ($p<0,0001$). Apesar das dosagens utilizadas terem sido diferentes para as duas espécies, podemos sugerir a existência de diferente sensibilidade a gonadotrofinas exógenas em jaguatiricas e gatos-do-mato-pequeno.

O número médio de filhotes de jaguatirica é de 1,4 (1-4) e o número médio de filhotes de gatos-do-mato-pequeno é de 1,1 (1-4) (OLIVEIRA; CASSARO, 1999). Com base nessas informações podemos assumir que as dosagens hormonais utilizadas em fêmeas de gato-do-mato-pequeno apresentaram resposta ovulatória esperada para realização de Inseminação Artificial, onde foram observados em média 2 a 3 folículos maduros e até 2 CL. Em jaguatiricas as dosagens hormonais, determinaram resposta ovulatória ideal para realização da FIV, onde alguns animais apresentaram até 10 folículos após um único tratamento e em média 1 a 6 CL. Sendo assim, as dosagens de gonadotrofinas exógenas utilizadas determinaram uma indução ovariana em fêmeas de gato-do-mato-pequeno e uma superovulação em fêmeas de jaguatiricas.

6.2 MATURAÇÃO NUCLEAR

Nosso objetivo nesta parte da pesquisa foi explorar as condições apresentadas por oócitos recuperados por aspiração folicular, em fêmeas de duas espécies de felinos neotropicais: *Leopardus pardalis e Leopardus tigrinus*, visando elucidar detalhes preliminares necessários para a aplicação de técnicas de fertilização *in vitro* nestas espécies.

Para atingir esse objetivo, optamos pelo estudo do processo de maturação *in vivo*, avaliando o grau de maturação nuclear de oócitos aspirados após estimulação hormonal com diferentes gonadotrofinas exógenas: eCG/hCG e pFSH/pLH.

Seriam considerados oócitos maduros aqueles com configuração cromossômica em Metáfase II, como descrito por Johnston et al. (1991). No entanto, nos experimentos I e II realizados em jaguatiricas e gatos-do-mato-pequeno, respectivamente, nenhum oócito avaliado apresentou configuração cromossômica em Metáfase II, mesmo naqueles classificados como grau I.

Isto pode ter acontecido devido à perda considerável de oócitos que ocorreu durante o transporte dos mesmos do local onde os animais estavam alojados (AMC, Jundiaí/SP) até o local de leitura das lâminas (VRA/USP/SP). As perdas no transporte dos oócitos foram de 31% para jaguatiricas e 20% para gatos-do-mato-pequeno. Essa perda se deu em decorrência dos oócitos estarem presos entre lâmina e lamínula, porém submersos em solução de metanol : ácido acético glacial, o que facilitou o deslocamento dos mesmos das lâminas impossibilitando dessa forma sua avaliação.

Alguns oócitos classificados como grau I e II apresentaram cromossomos corados em seu interior, perfazendo um total de 12% em jaguatiricas e 26% em gatos-do-mato-pequeno, porém não foi possível a caracterização dos estágios do ciclo meiótico pela avaliação da configuração cromossômica nestes oócitos.

No entanto, a avaliação da configuração cromossômica dos oócitos obtidos, ou seja, a não caracterização de Metáfase II em oócitos maduros recém aspirados, está de acordo com as constatações feitas por BYERS et al. (1994) em gatas domésticas, onde a maioria dos oócitos aspirados e classificados como maduros, de acordo com critérios morfológicos, ainda não haviam atingido o estágio de Metáfase II.

Em estudo realizado por Lopes (2002), verificou-se que apenas 11,6% dos oócitos aspirados de ovários de gatas domésticas, após 25 horas da aplicação de hCG, apresentaram-se em Metáfase II. Isto indica que as taxas de fertilização *in vitro*, realizadas com oócitos provenientes de fêmeas superovuladas, podem ser baixas se os oócitos não forem previamente cultivados por um período adicional.

Segundo Johnston et al. (1989) a maioria dos oócitos de gatas domésticas só atingem a fase de Metáfase II dentro de 30 a 48 horas de cultivo adicional.

A maioria dos oócitos classificados como grau I, que teriam maior capacidade de se desenvolver *in vitro* se origina de folículos maiores que 2mm diâmetro, sendo que a classificação e separação de oócitos baseada na aparência do complexo cumulus-oócito, ou seja, em critérios morfológicos, resulta em uma maturação mais consistente e fornece um indicador de maturação oocitária e capacidade de desenvolvimento (WOOD;WILDT,1997).

Em várias espécies, a capacidade de reiniciar a meiose é afetada pelo tamanho dos folículos e tamanho dos oócitos, entretanto, há poucos relatos de

maturação oocitária em gatos, usando oócitos de diâmetros conhecidos (LOPES, 2002).

Diante dos resultados encontrados podemos assumir que a aspiração folicular após estimulação ovariana com gonadotrofinas exógenas, independente dos hormônios utilizados, eCG/hCG ou pFSH/pLH, resulta na recuperação de oócitos em estágios iniciais, que necessitam de sistemas de cultivos diferentes e específicos para atingir o estágio de Metáfase II.

Nesse sentido, mais pesquisas tornam-se necessárias para a obtenção de maiores taxas de maturação oocitária e com isso maiores taxas de fertilização, viabilizando assim a utilização da reprodução assistida como uma ferramenta auxiliar no manejo e conservação de felinos ameaçados de extinção.

6.3 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Estudos ultraestruturais tem sido realizados em oócitos de animais domésticos como bovinos (ASSEY et al., 1994; HYTTEL et al., 1986; VAN WEZEL; ROGERS, 1996) e ovinos (BRAND; JONES, 1973; CRAN et al., 1980). Entretanto, pouca informação sobre os aspectos ultraestruturais de oócitos felinos tem sido descrita na literatura. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi descrever os aspectos morfológicos e ultraestruturais de oócitos recuperados por aspiração folicular em duas espécies de felinos neotropicais: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus,* após superovulação.

Nossos resultados mostram que a estrutura biológica dos oócitos segue o mesmo padrão encontrado em gatas domésticas (LOPES, 2002) e em mamíferos de maneira geral (GARTNER; HIATT, 1999). Este dado vem confirmar o estudo realizado por Jewgenow e Stolte (1996), onde os autores concluem que a morfologia dos oócitos felinos é semelhante à da maioria das espécies de mamíferos.

Tanto em jaguatiricas como em gatos-do-mato-pequeno, os oócitos classificados como grau I foram caracterizados por apresentar núcleo irregular contendo heterocromatina dispersa e envelope nuclear formando grandes ondulações, como descrito por Gjorret et al. (2002), em tigres. Mitocôndrias e grânulos corticais encontravam-se distribuídos por todo o citoplasma e também ao redor do núcleo. Gotas de lipídios de vários tamanhos foram encontradas neste estágio. Oócitos grau II foram caracterizados por apresentar núcleo periférico com pequenas ondulações no envelope nuclear. Pequenas áreas de heterocromatina

puderam ser vistas próximas ao envelope nuclear. Junções entre as células do cumulus e a zona pelúcida puderam ser observadas. Neste estágio havia grande concentração de gotas lipídicas e grânulos corticais dispersos por todo o citoplasma. Os oócitos grau III foram caracterizados apenas em jaguatiricas e apresentaram núcleo central sem ondulações no envelope nuclear. O espaço perivitelino encontrava-se pouco desenvolvido, e a superfície dos oócitos continha inúmeros microvilos voltados para o interior da zona pelúcida.

Não foi observado núcleo irregular com ondulações em contato com retículo endoplasmático rugoso, como descrito por Gjorret et al. (2002) em oócitos de tigre (*Phantera tigris*) recuperados por aspiração folicular, após tratamento hormonal com FSH/LH suíno. Também não foram observados oócitos em Metáfase I ou Metáfase II.

Oócitos em Metáfase I e II foram descritos ultraestruturalmente por Gjorret et al. (2002), em oócitos de tigre, apenas após sua maturação *in vitro*. Oócitos em Metáfase I foram caracterizados pela ausência de envelope nuclear com cromossomos condensados localizados em uma área esférica livre de organelas; Oócitos Metáfase II foram caracterizados pela presença de cromossomos condensados, ordenados na placa metafásica, com a migração de mitocôndrias para região central.

Os resultados ultra-estruturais demonstram que independentemente do tratamento utilizado para superovulação, eCG/hCG ou pFSH/pLH, os oócitos grau I e II mostraram-se semelhantes nas espécies estudadas, seguindo o mesmo padrão encontrado em gatas domésticas (LOPES, 2002). Esse resultado também demonstra que a aspiração folicular, método utilizado neste estudo, não alterou a morfologia dos oócitos.

Dentre as estruturas presentes no citoplasma dos oócitos, além do núcleo, encontramos mitocôndrias, gotas lipídicas, grânulos corticais e vesículas com material lipoproteico.

As mitocondrias são organelas arredondadas ou alongadas caracterizadas pela presença de um envoltório formado por duas membranas. A membrana externa apresenta-se lisa enquanto que a membrana interna envia prolongamentos ou invaginações para o seu interior. As mitocôndrias tem funções variadas: participam da respiração aeróbica, da beta oxidação dos lipídios, da síntese dos esteróides e do catabolismo de aminoácidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997).

As gotas lipídicas são formações arredondadas, homogêneas, de coloração cinza clara, normalmente não delimitadas por membrana e consideradas como depósitos de energia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997).

Os grânulos corticais contém proteases, mucopolissacarídeos e peroxidases. São encontrados nos oócitos de mamíferos em geral, e contribuem físico-quimicamente como barreira para a poliespermia. Nos oócitos maduros são encontrados próximos a membrana plasmática, local onde promovem a reação cortical através da liberação de substâncias que impedem a polispermia (SHAPIRO et al., 1989).

As vesículas são formações de morfologia e tamanho extremamente variáveis, envoltas por uma membrana em cujo interior apresentam material lipoprotéico. Não contém enzimas que participam no metabolismo celular, portanto, não são consideradas como organelas (JUNQUEIRA; SALLES, 1975).

Entre as estruturas mencionadas encontra-se o componente não particulado do citoplasma, chamado citossol, que possui aspecto viscoso, rico em proteínas e de aspecto relativamente uniforme (JUNQUEIRA, SALLES, 1975).

A comunicação celular entre as células do cumulus e o oócito tem sido demonstrada em muitas espécies. Essa comunicação é medida por projeções das células do cumulus que atravessam a zona pelúcida. Essas projeções citoplasmáticas são importantes na passagem de nutrientes e substâncias químicas, que regulam a maturação oocitária (DE LOOS et al., 1991). Nos bovinos, uma diminuição das gap-junctions é observada durante o reinício da meiose, mas as conexões são funcionais até o estágio de Metáfase II (FAMILIARI et al., 1998).

6.4 DOSAGENS DE ANTICORPOS POR ELISA

Neste estudo, a resposta imune humoral foi acessada para cada tratamento com gonadotrofinas usando a técnica ELISA previamente validada em gatos domésticos e não domésticos (SWANSON et al., 1995; SWANSON et al., 1996b SWANSON et al., 1999).

Embora alguns animais tenham demonstrado desenvolvimento de títulos para imunoglobulinas anti-gonadotrofinas exógenas, essa resposta imune humoral não parece interferir com a indução da atividade ovariana produzida pela superovulação.

Os resultados de ELISA indicaram que amostras de soro dos animais estudados mostraram um aumento na porcentagem de títulos de anticorpos positivos de acordo com os sucessivos tratamentos, sendo que jaguatiricas apresentaram maior número de amostras positivas em relação a gatos-do-mato-pequeno. Essas constatações sugerem que o sistema imune de cada espécie reconhece as gonadotrofinas exógenas como proteínas estranhas e desenvolvem resposta imune adequada com produção de anticorpos, como previamente observado em gatos domésticos (SWANSON et al., 1995).

Porém, esses resultados contrastam com os resultados encontrados em tigres (CRICHTON et al., 2003), no qual repetidos tratamentos com pFSH/pLH aparentemente não induzem produção de imunoglobulinas anti-gonadotrofinas.

Entretanto esta variabilidade na resposta imune pode ser atribuída a imuno-variância individual quanto ao reconhecimento de antígenos e também a possível

reação-cruzada de anticorpos a diferentes gonadotrofinas (SWANSON et al., 1995; SWANSON et al., 1996b).

Quatro animais (três jaguatiricas e um gato-do-mato-pequeno) apresentaram títulos positivos antes do primeiro tratamento com gonadotrofinas exógenas. Duas das jaguatiricas (LP240 e LP290) já haviam sido expostas a tratamentos com eCG/hCG, um a dois anos antes do início do experimento, possivelmente gerando títulos persistentes de anticorpos, os quais foram detectados neste estudo. A fêmea de gato-do-mato-pequeno (LT138) apresentou resultado positivo transitório na primeira coleta de sangue, antes do início das superovulações, sendo que na coleta posterior este animal apresentou resultado negativo. A terceira jaguatirica (LP289), entretanto, apresentou títulos persistentes a três gonadotrofinas (eCG/pFSH/pLH), apesar de nunca ter sido superovulada previamente. Devido ao fato de nenhuma imunoglobulina anti-hCG ter sido detectada no ELISA, é provável que tenham ocorrido ligações de imunoglobulinas não-específicas, as quais foram responsáveis pelos títulos positivos observados. No entanto, não há explicação definitiva para a atividade de ligação do soro desta fêmea.

O fato mais interessante observado neste estudo foi que a presença de títulos positivos de anticorpos, em jaguatiricas e gatos-do-mato-pequeno, não afetou a resposta ovariana dos animais. Por exemplo, animais com títulos anti-eCG positivos não mostraram diminuição no número de Folículos Maduros e Corpos Lúteos recentes quando tratados com eCG/hCG. Esses resultados são similares aos encontrados em Wallabies (*Macaropus Rufogriseus*), onde títulos de imunoglobulinas anti-pFSH e pLH não afetaram a resposta ovariana induzida por gonadotrofinas exógenas (MAGAREY et al., 2003), porém contrastantes com os dados encontrados para gatos domésticos (SWANSON et al.,1995; SWANSON et al., 1996b).

Essas constatações podem indicar que esses anticorpos, em jaguatiricas e gatos-do-mato-pequeno, não são capazes de neutralizar gonadotrofinas circulantes ou que sua ligação *in vivo* não elimina sua atividade biológica (LOUVET et al., 1974). Outra explicação seria devido ao fato de termos acessado a presença de títulos positivos mínimos, utilizando a diluição 1:100, sendo que a atividade em concentrações absolutas de imunoglobulinas talvez tenha sido inadequada para atenuar a estimulação de gonadotrofinas *in vivo.*

Um dos aspectos positivos ao uso de tratamentos alternados com gonadotrofinas exógenas pode ser a redução na resposta imune humoral e prevenção de elevações pronunciadas de títulos de imunoglobulinas.

Fêmeas com títulos positivos para pFSH produziram mais estruturas ovarianas em ambos tratamentos (pFSH/pLH e eCG/hCG), do que em fêmeas com títulos negativos para pFSH. Uma possível explicação seria que títulos de anticorpos anti-pFSH não neutralizariam pFSH circulante, como foi sugerido para anticorpos anti-eCG. Outra explicação plausível seria que os títulos alcançados seriam muito baixos para serem efetivos *in vivo*, especialmente quando repetidas doses de pFSH são administradas em injeções diárias.

O aparente aumento da resposta ovariana em animais com títulos positivos anti-pFSH pode ser atribuído a uma única fêmea (LP289), a mesma que apresentou títulos pré-existentes e persistentes anti-pFSH, porém produção de múltiplos folículos ovarianos em cada tratamento com pFSH/pLH. No entanto, excluindo esta fêmea das análises estatísticas, não houve diferença significativa no número de estruturas ovarianas entre animais com títulos positivos ou negativos para pFSH.

6.5 DOSAGENS HORMONAIS RIE

As análises hormonais séricas foram representadas pelo conjunto de amostras colhidas em intervalos de 15 a 30 dias pré-tratamento hormonal e no dia da vídeo-laparoscopia, ou seja, amostras pontuais e com animais sob efeito anestésico.

A fase de crescimento folicular em gatas domésticas é caracterizada por apresentar aumentos gradativos na concentração sérica de estradiol que variaram entre 20 a 70 pg/ml, do primeiro ao último dia do estro, sendo que picos de estradiol superiores a 70 pg/ml foram observados algumas vezes (JOHNSTON, 2001).

O estro em jaguatiricas foi caracterizado por apresentar concentrações séricas de estradiol que variaram entre 59,84 a 305,77 pg/ml acompanhadas de concentrações séricas de progesterona que variaram entre 0,11 a 2,61ng/ml (TEBET, 1999). Em fêmeas de jaguatiricas, avaliadas após superovulação com dosagens mais baixas de eCG/hCG, as concentrações séricas de estradiol variaram entre 115,9 a 513,6 pg/ml e as concentrações séricas de progesterona variaram entre 2,5 a 5,1 ng/ml, acompanhadas de boa resposta ovulatória avaliada por vídeo-laparoscopia (MORAES et al., 1997).

Em gatos-do-mato-pequeno superovulados com a mesma dosagem de eCG/hCG (n=2), as concentrações séricas de estradiol foram de 60,1 e 121,0 pg/ml e as concentrações séricas de progesterona foram de 3,7 e 13,6 ng/ml, acompanhadas de resposta ovulatória semelhante a encontrada neste experimento (MORAES et al., 1997).

Graham et al. (2000) demonstraram que estimulação ovariana utilizando gonadotrofinas exógenas em gatas domésticas resultou em padrão anormal de

estrógenos fecais, com concentrações mais altas e persistentes quando comparadas com as de animais no estro. Folículos acessórios e corpos lúteos secundários tem sido documentados em gatas estimuladas, causando um ambiente endócrino anormal.

As concentrações séricas de estradiol encontradas em jaguatiricas neste experimento variaram entre 4,94 a 151,00 pg/ml e as concentrações séricas de progesterona variaram de 0,15 a 37,22 ng/ml. Da mesma maneira, concentrações séricas de estradiol em gatos-do-mato-pequeno variaram entre 11,73 a 147,31 pg/ml e concentrações séricas de progesterona variaram entre 0,06 a 34,09 ng/ml. A sensibilidade mínima detectada foi de 0,004 ng/ml para progesterona e de 0,14 pg/ml para estradiol.

Níveis de progesterona elevados, encontrados em animais não prenhes, não interferiram na resposta ovariana após as superovulações.

Superovulações realizadas com gonadotrofinas exógenas não afetaram a gestação do animal LP 285. No entanto, Johnston (2001) sugere que a presença atividade estral em fêmeas de gatos domésticos gestantes pode causar abortos com relativa freqüência.

Os níveis de progesterona elevados, encontrados em gatos-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), parecem ser decorrentes do estresse gerado pelas contenções necessárias para realização das superovulações e colheitas de material, onde um estímulo estressante desencadearia uma produção elevada de progesterona pela adrenal. Por serem animais menores e por estarem alojados em recintos com grande quantidade de galhos e casinha de madeira suspensa, as fêmeas escalavam as grades pelos galhos em direção a casa suspensa, o que dificultava a contenção física, que por vezes era demorada e causa de estresse aos animais. Em estudo

realizado por Bertschinger et al. (2002) houve aumento nas concentrações séricas de progesterona em leoas com implantes contraceptivos, após contenção. Em estudo realizado em fêmeas de cervos dama, inteiras e vasectomizadas, estimulação com ACTH também levou a um aumento nas concentrações séricas de progesterona (ASHER et al., 1989).

Foi verificado paralelismo entre a curva padrão do conjunto diagnóstico e a curva obtida a partir do *pool* de soro das fêmeas de jaguatirica e gato-do-mato-pequeno para progesterona e estradiol, validando o uso dos conjuntos diagnósticos comerciais utilizados, DPC (Coat-A-Count - Diagnostic Products Corporation/USA) e DSL (Diagnostic System Laboratories INC/USA), respectivamente.

7 CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. Jaguatiricas e gatos-do-mato-pequeno tratados quatro a seis vezes, em intervalos de quatro meses, com tratamentos alternados utilizando gonadotrofinas exógenas (eCG/hCG e pFSH/pLH) não mostraram redução na resposta ovariana (Folículos Maduros e Corpos Lúteos recentes) ou proporção de oócitos maduros em relação aos oócitos totais recuperados.

2. O tratamento pFSH/pLH foi mais eficiente quando comparado ao tratamento eCG/hCG, em jaguatiricas, por determinar a recuperação de maior quantidade de oócitos totais e maduros. Ambos os tratamentos pFSH/pLH e eCG/hCG comportaram-se de maneira semelhante em gatos-do-mato-pequeno.

3. Oócitos aspirados e classificados como grau I apresentaram-se em estágios iniciais de desenvolvimento, segundo análise citogenética e ultra-estrutural, sugerindo que necessitam de tempo adicional de cultivo *in vitro* para atingirem a maturação.

4. Jaguatiricas e gatos-do-mato-pequeno produziram títulos de imunoglobulinas anti-gonadotrofinas, porém esses anticorpos parecem não exercer efeito adverso na resposta ovariana, possivelmente devido aos níveis baixos de títulos encontrados, limitados pela reação cruzada de gonadotrofinas ou limitados pela capacidade neutralizante *in vivo.*

5. O conjunto diagnóstico comercial DPC (Coat-A-Count Diagnostic Products Corporation/USA), em fase sólida, para dosagem de progesterona e o conjunto diagnóstico comercial DSL (Diagnostic System Laboratories INC/USA), em fase líquida, para dosagem de estradiol, foram validados para utilização em soro de *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*.

6. Estes dados sugerem que essas espécies podem ser manejadas intensivamente usando tratamentos alternados com gonadotrofinas exógenas para procedimentos de reprodução assistida sem comprometer a resposta ovariana a esses hormônios.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ASHER, G. W.; PETERSON, A. J.; DUGANZICH, D. Adrenal and ovarian sources of progesterone secretion in young female fallow deer, *Dama dama*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 667-675, 1989.

ASSEY, R. J.; HYTTEL, P.; KANUYA, N. Oocyte structure in dominant and subordinate follicles in zebu cattle (*Bos indicus*). **Anatomical Embryology**, v. 190, p. 461-468, 1994.

BARONE, M. A.; WILDT, C. E.; BYERS, A. P. Gonadotropin dose and timing of anesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 103-108, 1994.

BAVISTER, B. D.; DEES, C.; SCHULTZ, R. D. Refractoriness of rhesus monkey to repeated ovarian stimulation by exogenous gonadotropins is caused by nonprecipitating antibodies. **American Journal of Reproduction Immunology**, v. 11, n. 11, p. 16, 1986.

BERBARE, P.E.B. **Avaliação longitudinal das concentrações de esteróides fecais em fêmeas de gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*, Lacépède, 1809).** 2004. 111f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BERTSCHINGER, H. J.; TRIGG, T. E.; JÖCHLE, W.; HUMAN, A. Induction of contraception in some African wild carnivores by dowregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue desnorelin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 41-52, 2002. Suplemento.

BONNEY, R. C.; MOORE, H. D. M.; JONES, D. M. Plasma concentrations of oestradiol-17β and progesterone, and laparoscopic observations of the ovary in the puma (Felis concolor) during oestrus, pseudopregnancy and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 63, p. 523-532, 1981.

BRAND, A.; JONG, W. H. R. Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tertiary follicle population during the oestrus cycle in sheep. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 33, p. 431-439, 1973.

BROW, J. L.; WASSER, S. K.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H. Comparative aspects of steroids hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasive in feces. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 776-786, 1994.

BROWN,J. L.; WILDT, D. E. Assessing reproductive status in wild felids by noninvasive faecal steroid monitoring. **International Zoo Yearbook**, v. 35, p. 171-191, 1997.

BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; WIELEBNOWSKI, N.; GOODROWE, K. L., GRAHAM, L. H.; WELLS, S.; HOWARD, J.G. Reproductive activity in captivity female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 337-346, 1996.

BYERS, A. P.; DONOGHUE, A. M.; ROTH, T. L.; WILDT, D. E. Oocyte nuclear maturation at the time of oocyte aspiration is dependent of “in vitro” fertilization potential in the domestic cat**. Journal Experimental Zoology**, v. 270, p. 399-404, 1994.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction**, v. 4, n. 2, p. 103-120, 1998.

CITES (Conservation International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna). **Listed species database**. Disponível em: <www.cites.org/eng/notifs/2003/041apdf>. Acesso em: 10 jul. 2004.

CRAN, D. G.; MOOR, R. M.; HAY, M. F. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 125-132, 1980.

CRICHTON, E. C.; ARMSTRONG, D. L.; GRAHAM, L. H.; BEDOW, E.; MILLER, A.; GJORRET, J. O.; HYTTEL, P.; LOSKUTOFF, N. M. The efficacy of porcine gonadotrophins for repeated stimulation of ovarian activity for in vitro embryo production in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 25, p. 257, 2000. Supplemento.

CRICHTON, E. G.; ARMSTRONG, D. L.; VATJA, G.; POPE, C. E.; LOSKUTOFF, N. M. Development competence in vitro of embryos produce from siberian tigers (*Panthera tigris altaica*) cryopreserved by controlled rate freezing versus vitrification. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 328, 2000a.

CRICHTON, E. G.; BEDOWN, E.; MILLER-LINDHOLM, A. K.; BALDWIN, D. M.; ARMSTRONG, D. L.; GRAHAM, L. H.; FORD, J. J.; GJORRET, J. O.; HYTTEL, P.; POPE, C. E.; VAJTA, G.; LOSKUTOFF, N. M. Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrievel and in vitro embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris*). **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 105-113, 2003.

DARBRE, P.; YATES, J.; CURTIS, S.; KING, R.J. B. Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. **Cancer Research**, v. 43, p. 349-354, 1983.

DE LOOS, F.; KASTRAP, P.; VANMAURIK, P.; VANBENEDEN, T. H.; KRUIP, T. A. M. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, p. 255-259, 1991.

DOMINKO, T. ; MITALIPOVA, M.; HALEY, B.; BEYHAM, Z.; MEMILLI, E.; McKUSICK, B. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryo produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1496-1502, 1999.

DONOGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; ARMSTRONG, D. L.; SIMMONS, L. E.; WILDT, D. E. Birth of a siberian tiger cub (*Panthera Tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, n. 2, p.185-189, 1993.

DONOGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; ARMSTRONG, D. L.;TILSON, R. S.; WOLF, P.; PETRINI, K.; SIMMONS, L. G.; GROSS, T.; WILDT, E. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 33-44, 1990.

DONOGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; MUNSON, L.; BROWN, J. L. WILDT, D. E. Influence of gonadotrophin treatment interval on follicular maturation in vitro fertilization, circulating steroid concentration and subsequent luteal function in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 972-980, 1992.

DRESSER, B. L.; KRAMER, L.; REECE, B.; RUSSELL, P. T. Induction of ovulation and successful artificial insemination in a persian leopard *(Panthera pardus saxicolor*). **Zoo Biology**, v. 1, p. 55-57, 1982.

DRESSER, B. L.; SEHLHORST, C. S.; KELLER, G.; KRAMER, L. M.; REECE, R. W. Artificial insemination and embryo transfer in the felidae. In: SYMPOSIUM FOR WORLD CONSERVATIONS STRATEGIES FOR TIGERS, 1986, Cincinnati. **Proceedings…** Cincinnati:[s.n.] 1986. p.4-18.

DRESSER, B. L.; SEHLORST, C. S.; WACHS, K. B.; KELLER, G. L.; GELWICKS, E. J.; TURNER, J. L. Hormonal stimulation and embryo collection in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 28, p. 915-927, 1987.

DRESSER, B. L.; GELWICKS, E. J.; WACHS, K. B.; KELLER, G. L. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. **Journal Experimental Zoology**, v. 246, p. 180-186, 1988.

EWER, R. F. The evolution of mating system in the felidae. In: EATON, R. L. The world's cats: biology, behavior and management of reproduction. London: Unimark Publishing, 1975. p. 11-20.

FAMILIARI, G. VERLENGIA, C. NOTTOLA, S. A.; TRIPOLI, A.; HYTTEL, P. MACCHIARELLI, G. MOTTA, P. M. Ultrastructureal features of bovine cumulus-corona cells surrounding oocytes, zigotes and early embryos. **Reproduction Fertility and Development**, v. 10, p. 515-26, 1998.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 375-387, 2000.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 2 ed Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p.529-46.

FREISTEDT, P.; STOJKOVIC, M.; WOLF, E. Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effect of season and ovarian status. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 9-13, 2001.

FURTADO, P. V. **Estudo da função reprodutiva em fêmeas de onça-pintada (*Panthera onça* LINNAEUS, 1758) mantidas em cativeiro por meio da extração e quantificação de esteróides fecais.** 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GARTNER, L. P; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. 525 p.

GJORRET, J. O.; CRICHTON, E. G.; LOSKUTOFF, N. M.; ARMSTRONG, D. L.; HYTTEL, P. Oocyte maturation fertilization and early embrionic development in vitro in the siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). **Theriogenology**, v. 53, p. 334, 2000.

GJORRET, J. O.; CRICHTON, E. G.; LOSKUTOFF, N. M.; ARMSTRONG, D. L.; HYTTEL, P. Ultrastructure of oocyte maturation, fertilization, and early embryo development in vitro in the siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 79-88, 2002.

GOODROWE, K. L.; WALL, R. J.; O'BRIEN, S. J.; SCHMIDT, P. M., WILDT, D. E. Development competence of domestic cat follicular oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 335-372, 1988.

GOODROWE; K. L.; WILDT,D. E. Ovarian response to human chorionic gonadotropin or gonadotropin releasing hormone in cats in natural or induced estrus. **Theriogenology**, n. 27, p. 811-817, 1987.

GRAHAM, L. H. **Non invasive monitoring of reproductive hormones in zoo and wildlife species.** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, 2001. 18 p. Apostila.

GRAHAM, L. H.; GOODROWE, K. L.; RAESIDE, K. I.; LIPTRAP, R. M. Noninvasive monitoring of ovarian function in several felid species by measurement of fecal estradiol-17β and progestins. **Zoo Biology**, v. 14, p. 223-37, 1995.

GRAHAM, L. H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. **Theriogenology**, v. 54, p. 1117-1131, 2000.

GREENWALD, G. S. Development of ovulatory refractoriness in the rabbit to cyclic injections of human chorionic gonadotropin. **Fertility Sterility**, v. 21, p. 163-168,1970.

HAMNER, C. E.; JENNINGS, L. SOJKA, N. J. Cat (*Felis catus*) spermatozoa require capacitation. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 23, p. 477-480, 1970.

HODGES, J. K. Determining and manipulating female reproductive parameters. In: KLEIMAN, D. G.; ALLEN, M. E.; THOMPSON, K. V.; LUMPKIN, S. Wild mammals in captivity: principles and techniques. Chicago: University of Chicago Press, 1996. p. 418-28.

HOWARD J. G. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. In: Fowler M. E. ; Miller R. E. (ed.). **Zoo & wild animal medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. v. 4, p.449-457.

HOWARD, J. G. ; DONOGHUE, A. M.; BARONE, M. A.;DOODROWE, K. L.; BLUMER, E. S.; SNODGRASS, K.; STARNES, D.; TUCKER, M.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, n. 4, p. 288-300, 1992.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. **Zoo & wild animal medicine current therapy**. 3. ed. Philadelphia : Saunders, 1993. p. 390-399.

HOWARD, J. G.; BARONE, M. A.; DONOGHUE, A. M.; WILDT, D. E. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopy inseminated domestic cats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 175-186, 1992.

HOWARD, J. G.; BYERS, A. P.; BROWN, J. L.; BARRET, S. J.; EVANS, M. Z.; SCHWARTZ, R. J.; WILDT, D. E. Successfull ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). **Zoo Biology**, v. 15, p. 55-70, 1996.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth capacitation and fenal maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

HYTTEL, P.; GREVE, T. CALLESEN, H. Ultrastructure aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal Reproduction and Fertility**, p. 35-47, 1989. Supplementum 38.

HYTTEL, P.; XU, K. P.; SMITH, S.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. **Anatomical Embryology**, v. 176, p. 35-40, 1987.

HYTTEL, P; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructure features of preovulatory oocyutes maturation in superovulated cattle. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 76, p. 645-656, 1986.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). **Lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção, 2003**. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/sbt/fauna/index.cfm>. Acesso em: 10 jun. 2004.

IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources). **Red list categories and criterie.** Species Survival Commission – Cat Specialist Group, 2001. (Version 3.1). Disponível em: <www.iucn.org>. Acesso em: 10 jun. 2004.

IUDZG/CBSG (International Union Zoological and Botanical Garden/International Specialist Group for Nature Conservation). The word zoo conservation strategy: the role of the zoos and aquaria of the world in global conservation. Chicago: Zoological Society, 1993. 76 p.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E.; GOLLNICK, P. D. MOUSTAFFA, L. A. Anti-gonadotropins in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum injections. **American Journal of Veterinarian Research**, v. 21, p. 669-675,1966.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations**. Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 183-93, 1996.

JOHNSTON, L. A.; DONOGHUE, A. M.; O'BRIEN, S. J.; WILDT, D. E. Rescue and maturation in vitro of follicular collected from nondomestic felid species. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 898-906, 1991.

JOHNSTON, S. D., KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. p. 396-405.

JOHNSTON, L. A.; O'BRIEN, S. J.; WILDT, D. E. In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. **Gamete Research**, v. 24, n. 3, p. 343-56, 1989.
JOHNSTON, S. D., ROOT, M. V.; OLSON, P. N. S. Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 261-74, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 12-15.

JUNQUEIRA, L. C. U.; SALLES, L. M. M. **Ultra-estrutura e função celular**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1975. 299 p.

KARJA, N. W. K.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; FAHRUDIN, M.; SUZUKI, T. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. **Theriogenology**, v. 57, p. 2289-2298, 2002.

KITIYANANT, Y.; SAIKHUN, J.; PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 59, p. 1775-1786, 2003.

LOPES, M. D. **Análise histological, ultra-estrutural e avaliação da maturação nuclear de oócitos de gatas domésticas (*Felis catus*).** 2002. 138 f. Tese (Livre Docência em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo, 2002.

LOUVET, J. P.; ROSS, G. T.; BIRKEN, S.; CANFIELD, R. E. Absence of neutralizing effect of antisera to the unique structural region of human chorionic gonadotropin**. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** v. 39, p. 1155-1158, 1974.

MAGAREY, G. M.; RODGER, J. C.; BUIST, J. M.; MATE, K. E. Effects of repeated superovulation and surgical oocyte collection on ovarian response and natural breeding ability of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). **Reproduction,** v. 125, p. 701-707, 2003.

MAURER, R. R.; HUNT, W. L.; FOOTE, R. H. Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotropins in Dutch-belted rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 15, p. 93-103, 1968.

MELLEN, J. D. Factors influencing reproductive sucess in small captive exotic felids (Felis spp): a multiple regression analysis. **Zoo Biology**, v. 10, n. 2, p. 95-110, 1991.

MOOR, R. M.; GANDOLFI, F. Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 55-69, 1987. Supplementum 34.

MOORE, H. D. M.; BONNEY, R. C.; JONES, D. M. Successful induced ovulation and artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). **Veterinarian Records**, v. 108, p. 282-283, 1981.

MORAES, W.; MORAIS, R.; MOREIRA, N.; LACERDA, O.; GOMES, M.L.F.; MUCCIOLO, R. G.; SWANSON, W. F. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). In: AMERICAN ASSOCIATIAN OF ZOO VETERINARIANS CONGRESS, 1997, **Proceedings…** American Associatian of Zoo Veterinarians, 1997. p. 334-335.

MORAIS, R. N.; MOREIRA, W.; MUCCIOLO, R. G.; LACERDA, O.; GOMES, M. L. F.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; BROWN, J. L. Testicular and ovarian function in south american small felids assessed by fecal steroids. In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1996, **Proceedings…** American Associatian of Zoo Veterinarians, 1996.

MORATO, R. G.; CRICHTON, E. G.; PAZ, R. C. R; ZUGE, R. M.; MOURA, C. A.; NUNES, A. L. V.; TEIXEIRA, R. H.; PORTO-NETO, L. R.; MAHLMEISTER, P.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; CORRÊA, S. H. R.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; ARMSTRONG, D. L.; LOSKUTOFF, N. M. Ovarian stimulation and successful in vitro fertilization in the jaguar (*Panthera onca*). **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p.334, 2000.

MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; PASQUALI, O. L.; GOMES, M. L. F.; MORAIS, R. N.; WILDT, D. E.; BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the Leopardus Genus. **Zoo Biology**, v. 20, p. 103-116, 2001.

OLIVEIRA, T. G.; CASSARO, K. **Guia de identificação dos felinos brasileiros**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 1999. p. 17-27.

OTTOBRE, J.; STOUFFER, R. L. Antibody production in rhesus monkeys following prolonged administration of human chorionic gonadotropin. **Fertility and Sterility**, v. 43, p. 122-128, 1985.

POPE, C. E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 163-74, 2000.

POPE, C. E.; GELWICKS, E. J.; WACHS, K. B.; KELLER, G. L.; DRESSER, B. L. In vitro fertilization in domestic and nondomestic cats including sequences of earlynuclear events, in vitro development, cryopreservation and successful intra and interspecies embryo transfer. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 189-201, 1993. Supplemento.

POPE, C.E.; GELWICKS, E.J.; WACHS, K.B.; KELLER, G.L.; MALUSKA, E.J.; DRESSER, B.L. Successsful interspecies transfer of embryos from the indian desert cat (Felis silvestris) to the domestic cat (Felis catus) following in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v.40, p.61, 1989. Supplementum 40.

POPE, C. E.; McaRAE, M. A.; PLAIR, B. L.; KELLER, G. L.; DRESSER, B.L. *In vitro* and in vivo development of embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of cat oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 51, p. 69-82, 1997. Supplement.

REDDEL, R. R. MURPHY, L. C.; SUTHERLAND, E. L. Factors affecting the sensitivity of T-47 human breast cancer cell to tamoxifen. **Cancer Research**, v. 44, p. 2398-2405, 1984.

ROBINSON, R. Citogenetics of the Felidae. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE WORD'S CATS, 3.,1974, Washington. **Proceedings…**Washington: University of Washington, 1974. p. 63-68.

ROTH, T. L.; ARMSTRONG, D. L.; BARRIE, M. T.; WILDT, D. E Seasonal effects on ovarian responsiveness to exogenous gonadotrophins and sucessful artificial insemination in the snow leopard (*Panthera uncia uncia*). **Reproduction Fertility and Development,** v. 9, p. 285-295, 1997.

ROTH, T. L.; SWANSON, W. F.; WILDT, D. E. Development competence of domestic cat embryo fertilized in vivo versus in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 441-451, 1994.

ROY, F.; MAUREL, M. C.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E. P.; LANIER, I.; POBEL, T.; DELETANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 805-813, 1999.

SAS INSTITUTE. **Statview analisys system**. Cary, 2000.

SCHMIDT, A. M.; NADAL, L. A.; SCHMITH, M. J.; BEAMER, N. B. Serum concentrations of oestradiol and progesterone during the normal oestrus cycle and early pregancy in the lion (*Panthera leo*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 267-272, 1979.

SCHMITH, A. M.; HESS, D. L.; SCHMITH, M. J.; SMITH, R. C.; LEWIS, C. R. Serum concentration of oestradiol and progesterone, and sexual behavior during the normal oestrus cycle in the leopard (*Panthera pardus*). **Journal Reproduction and Fertility,** v. 82, p. 43-49, 1988.

SCHMITH, A. M.; HESS, D. L.; SCHMITH, M. J.; LEWIS, C. R. Serum concentration of oestradiol and progesterone and frequency os sexual behavior during the normal oestrous cycle in the snow leopard (*Panthera uncia*). **Journal Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 91-95, 1993.

SEAL, U. S.; PLOTKA, E. D.; SMITH, J. D.; WRIGHT, F. H.; REINDL, N. J.; TAYLOR, R. S.; SEAL, M. F. Immunoreactive luteinizing hormone, estradiol, progesterone, testosterone and androstenedione levels during the breeding season and anestrus in siberian tigers. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 361-368, 1985.

SHAPIRO, B. M.; SOMERS, C.; WEIDMAN, P. J. Extracellular remodeling during fertilization. In: SCHATTEN, H.; SCHATTEN, G. (Ed). **Cell biology of fertilization**. San Diego: Academic Press, 1989. p. 251-276.

SHILLE, V. M.; LUNDSTROM, K. E.; STABENFELDT, G. H. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17β concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 953-963, 1979.

SILVA, A. S.; MORATO, R. G.; SILVA, L. D. M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 159-175, 2004.

SIRARD, M. A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 417-426, 1996.

STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS user's guide**: statistic. Versão 5. Cary: SAS, 1995.

SWANSON, W. F.; HOROHOV, D. W.; GODKE, R. A. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 35-41, 1995.

SWANSON, W. F.; HOWARD, J. G.; DAVIDSON, J. L.; BROTT, E. M. Humoral immune responses of endangered felids and mustelids to multiple treatments with exogenous gonadotropins for assisted reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 193, 1999.

SWANSON, W. F.; HOWARD, J. G.; ROTH, T. L.; BROWN, J. L.; ALVARADO, T.; BURTON, M.; STARNES, D.; WILDT, D. E. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 87-94, 1996a.

SWANSON, W. F.; PAZ, R. C. R.; MORAIS, R. N.; GOMES, M. L. F.; MORAES, W.; ADANIA, C. H. 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.

SWANSON, F. W.; ROTH, T. L.; GRAHAM, K.; HOROHOV, D. W.; GODKE, R. A. Kinetics of the humoral response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. **American Journal Veterinarian Research**, v. 57, p. 302-307, 1996b.

TEBET, J. M. **Aspectos clínicos e fisiológicos do ciclo estral da jaguatirica (*Leopardus pardalis*, L.1758).** 1999. 102 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo,1999.

TSUITSUI, T. STABENFELDT, G. H. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 29-35, 1993. Supplementum 47.

VAN WEZEL, I.; RODGERS, R. J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1003-1011, 1996.

VERHAGE, H. G.; BEAMER, N. B.; BRENNER, R. M. Plasma levels of estradiol and progesterone in the cat during polyestrus, pregnancy and pseudopregancy. **Biology of Reproduction**, v. 14, p. 579-585, 1976.

WILDT, D. E.; CHAN, S. Y. W.; SEAGER, S. W. J.; CHAKRABORTY, P. K. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behaviour in the cat. I. Relationships during the coitus induced luteal phase and the estrous period without mating. **Biology of Reproduction**, v. 25, p. 15-28, 1981.

WILDT, D. E.; ROTH, T. L. Assisted reproduction for managing and conservating threatened felids. **International Zoo Yearbook**, v. 35, p. 164-172, 1997.

WILDT, D. E.; PLATZ, C. C.; CHAKRABORTY, P. K.; SEAGER, S. W. J. Oestrous and ovarian activity in a female jaguar (*Panthera onca*). **Journal Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 555-8, 1979.

WILDT, D. E.; MONFORT, S. L.; DONOGHUE, A .M.; JOHNSTON, L. A .; HOWARD, J. Embryogenesis in conservation biology or how to make an endangered species embryo. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 161-184, 1992.

WILDT, D. E.; PLATZ, C. C.; SEAGER, S. W. J.; BUSH, M. Induction of ovarian activity in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 217-222, 1981.

WILDT, D. E.; SEAGER, S. W. J. Ovarian response in the estrual cat receiving varying dosages of hCG. **Hormones Research**, v. 9, p. 144-150, 1978.

WILSON, D. E., REEDER, D. M. Mammals species of the word: a taxonomic and geografic reference. Washington: Smithsoniam Instituition, 1992. 291 p.

WOLF,D. P.; VANDEVOORT, C. A.; MEYER-HASS, G. R.; ZELINSKI-WOOTEN, M. B.; HESS, D. L.; BAUGHMAN, W. L.; STOUFFER, R. L. In vitro fertilization and embryo transfer in the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, n. 41, p. 335-346, 1989.

WOOD, T. C.; WILDT, D. E. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 110, p. 355-360, 1997.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Diâmetro dos ovidutos e ovários de jaguatiricas superovuladas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	Colheitas	Protocolos	Oviduto Dir. (mm)	Oviduto Esq. (mm)	Ovário Dir. (mm)	Ovário Esq. (mm)
LP 254	1°	-	-	-	-	-
LP 254	2°	pFSH/LH	2	2	6	8
LP 254	3°	eCG/hCG	4	2	12	10
LP 254	4°	• Prenhe	-	-	-	-
LP 254	5°	eCG/hCG	4	6	10	8
LP 254	6°	pFSH/LH	4	4	8	8
LP 240	1°	eCG/hCG	4	4	10	8
LP 240	2°	pFSH/LH	4	4	10	12
LP 240	3°	eCG/hCG	4	4	10	10
LP 240	4°	pFSH/LH	4	6	10	8
LP 240	5°	eCG/hCG	4	4	8	8
LP 240	6°	pFSH/LH	6	6	8	10
LP 285	1°	eCG/hCG	4	4	10	10
LP 285	2°	pFSH/LH	4	2	10	16
LP 285	3°	eCG/hCG	2	4	10	10
LP 285	4°	pFSH/LH	4	4	12	10
LP 285	5°	Prenhe	4	24	10	12
LP 285	6°	Prenhe	4	30	12	10
LP 289	1°	eCG/hCG	2	2	12	12
LP 289	2°	pFSH/LH	2	2	16	15
LP 289	3°	eCG/hCG	4	4	10	10
LP 289	4°	pFSH/LH	4	4	10	10
LP 289	5°	eCG/hCG	4	4	12	12
LP 289	6°	pFSH/LH	2	2	8	6
LP 290	1°	eCG/hCG	2	2	10	10
LP 290	2°	pFSH/LH	4	4	10	10
LP 290	3°	eCG/hCG	3	2	8	12
LP 290	4°	pFSH/LH	4	4	8	8
LP 290	5°	eCG/hCG	4	4	8	8
LP 290	6°	pFSH/LH	6	4	12	8

- Não avaliada pela vídeo laparoscopia.

APÊNDICE B - Número de folículos e corpos lúteos recentes de jaguatiricas superovuladas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	Colheitas	Protocolos	Folículos Ov. Dir. (< 2mm)	Folículos Ov. Esq. (< 2 mm)	Folículos Ov. Dir (> 2mm)	Folículos Ov. Esq. (> 2 mm)	C. Lúteos Ov. Dir. (> 2 mm)	C. Lúteos Ov. Esq. (> 2 mm)
LP 254	1°	-	-	-	-	-	-	-
LP 254	2°	pFSH/LH	1	2	2	2	0	0
LP 254	3°	eCG/hCG	2	1	1	0	2	0
LP 254	4°	• Prenhe	-	-	-	-	-	-
LP 254	5°	eCG/hCG	2	2	0	0	0	0
LP 254	6°	pFSH/LH	0	2	5	3	0	0
LP 240	1°	eCG/hCG	9	4	0	2	0	1
LP 240	2°	pFSH/LH	1	3	1	3	0	0
LP 240	3°	eCG/hCG	0	3	3	5	0	2
LP 240	4°	pFSH/LH	0	0	5	2	0	1
LP 240	5°	eCG/hCG	1	1	2	0	2	0
LP 240	6°	pFSH/LH	2	1	3	2	1	1
LP 285	1°	eCG/hCG	0	0	7	2	2	4
LP 285	2°	pFSH/LH	9	1	0	4	0	0
LP 285	3°	eCG/hCG	4	0	0	1	0	0
LP 285	4°	pFSH/LH	2	2	5	3	0	1
LP 285	5°	Prenhe	6	1	2	5	0	8mm
LP 285	6°	Prenhe	-	-	-	-	-	8mm
LP 289	1°	eCG/hCG	0	0	8	1	0	1
LP 289	2°	pFSH/LH	0	0	6	10	0	0
LP 289	3°	eCG/hCG	0	0	5	1	0	1
LP 289	4°	pFSH/LH	0	0	6	6	0	0
LP 289	5°	eCG/hCG	0	0	0	1	3	2
LP 289	6°	pFSH/LH	1	4	4	6	0	0
LP 290	1°	eCG/hCG	0	0	3	4	0	0
LP 290	2°	pFSH/LH	3	2	1	6	0	0
LP 290	3°	eCG/hCG	2	5	2	0	0	0
LP 290	4°	pFSH/LH	0	0	1	3	1	2
LP 290	5°	eCG/hCG	1	4	2	3	0	1
LP 290	6°	pFSH/LH	2	2	3	3	0	0

APÊNDICE C - Número de oócitos totais, grau I, II e III de jaguatiricas superovuladas com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC / Jundiaí / SP, 2004

Animais	Colheitas	Protocolos	Oócitos Coletados	Oócitos Grau I	Oócitos Grau II	Oócitos Grau III
LP 254	1°	-	-	-	-	-
LP 254	2°	pFSH/LH	7	1	5	1
LP 254	3°	eCG/hCG	1	0	0	1
LP 254	4°	Prenhe	-	-	-	-
LP 254	5°	eCG/hCG	0	0	0	0
LP 254	6°	pFSH/LH	5	4	1	0
LP 240	1°	eCG/hCG	2	1	0	1
LP 240	2°	pFSH/LH	4	3	1	0
LP 240	3°	eCG/hCG	7	7	0	0
LP 240	4°	pFSH/LH	5	5	0	0
LP 240	5°	eCG/hCG	1	1	0	0
LP 240	6°	pFSH/LH	5	4	0	1
LP 285	1°	eCG/hCG	3	0	0	3
LP 285	2°	pFSH/LH	4	1	2	1
LP 285	3°	eCG/hCG	1	0	1	0
LP 285	4°	pFSH/LH	8	4	4	0
LP 285	5°	Prenhe	-	-	-	-
LP 285	6°	Prenhe	-	-	-	-
LP 289	1°	eCG/hCG	4	2	1	1
LP 289	2°	pFSH/LH	14	7	4	3
LP 289	3°	eCG/hCG	3	2	1	0
LP 289	4°	pFSH/LH	5	4	1	0
LP 289	5°	eCG/hCG	2	2	0	0
LP 289	6°	pFSH/LH	9	4	4	1
LP 290	1°	eCG/hCG	1	1	0	0
LP 290	2°	pFSH/LH	3	0	3	0
LP 290	3°	eCG/hCG	4	2	2	0
LP 290	4°	pFSH/LH	0	0	0	0
LP 290	5°	eCG/hCG	3	1	1	1
LP 290	6°	pFSH/LH	6	3	2	1

APÊNDICE D - Diâmetro de ovidutos e ovários de gatos-do-mato-pequeno superovulados com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	Colheitas	Protocolos	Oviduto Dir. (mm)	Oviduto Esq. (mm)	Ovário Dir. (mm)	Ovário Esq. (mm)
LT 136	1°	eCG/hCG	2	2	4	4
LT 136	2°	pFSH/LH	2	2	4	4
LT 136	3°	eCG/hCG	1	2	4	4
LT 136	4°	pFSH/LH	4	4	6	6
LT 136	5°	eCG/hCG	2	2	6	8
LT 136	6°	pFSH/LH	2	2	8	6
LT 141	1°	eCG/hCG	4	4	8	8
LT 141	2°	pFSH/LH	2	2	6	8
LT 141	3°	eCG/hCG	2	3	6	8
LT 141	4°	pFSH/LH	4	4	6	8
LT 141	5°	eCG/hCG	2	2	6	6
LT 141	6°	pFSH/LH	2	2	6	6
LT 138	1°	eCG/hCG	2	2	4	4
LT 138	2°	pFSH/LH	2	2	8	6
LT 138	3°	eCG/hCG	2	2	6	6
LT 138	4°	pFSH/LH	2	4	8	6
LT 134	1°	eCG/hCG	4	4	8	8
LT 134	2°	pFSH/LH	4	4	4	6
LT 134	3°	eCG/hCG	2	4	6	6
LT 134	4°	pFSH/LH	2	2	6	8

APÊNDICE E - Número de folículos de gatos-do-mato-pequeno superovulados com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	Colheitas	Protocolos	Folículos Ov. Direito < 2 mm	Folículos Ov. Esqu. < 2 mm	Folículos Ov. Direito > 2 mm	Folículo Ov. Esqu. > 2 mm
LT 136	1°	eCG/hCG	3	1	0	0
LT 136	2°	pFSH/LH	1	4	0	0
LT 136	3°	eCG/hCG	5	3	0	0
LT 136	4°	pFSH/LH	7	5	1	1
LT 136	5°	eCG/hCG	1	6	3	1
LT 136	6°	pFSH/LH	4	2	0	2
LT 141	1°	eCG/hCG	5	6	1	1
LT 141	2°	pFSH/LH	5	8	0	1
LT 141	3°	eCG/hCG	3	1	2	2
LT 141	4°	pFSH/LH	2	1	3	1
LT 141	5°	eCG/hCG	3	1	0	2
LT 141	6°	pFSH/LH	0	3	1	2
LT 138	1°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 138	2°	pFSH/LH	5	0	1	0
LT 138	3°	eCG/hCG	1	4	2	0
LT 138	4°	pFSH/LH	3	4	1	1
LT 134	1°	eCG/hCG	7	3	3	3
LT 134	2°	pFSH/LH	3	1	0	0
LT 134	3°	eCG/hCG	0	2	2	0
LT 134	4°	pFSH/LH	8	4	0	2

APÊNDICE F - Número de corpos lúteos e cistos ovarianos de gatos-do-mato-pequeno superovulados com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	Colheitas	Protocolos	Corpos Lúteos Ovário Dir.	Corpos Lúteos Ovário Esq.	Cistos Ovário Dir.	Cistos Ovário Esq.
LT 136	1°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 136	2°	pFSH/LH	0	0	0	0
LT 136	3°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 136	4°	pFSH/LH	0	0	0	0
LT 136	5°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 136	6°	pFSH/LH	0	0	1	1
LT 141	1°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 141	2°	pFSH/LH	0	0	0	0
LT 141	3°	eCG/hCG	0	2	0	0
LT 141	4°	pFSH/LH	0	0	0	0
LT 141	5°	eCG/hCG	0	0	1	0
LT 141	6°	pFSH/LH	0	1	2	0
LT 138	1°	eCG/hCG	0	0	0	1
LT 138	2°	pFSH/LH	0	0	2	1
LT 138	3°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 138	4°	pFSH/LH	2	0	2	0
LT 134	1°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 134	2°	pFSH/LH	0	0	0	0
LT 134	3°	eCG/hCG	0	2	2	0
LT 134	4°	pFSH/LH	0	0	0	0

Obs: Todos os cistos ovarianos observados eram menores que 2mm.

APÊNDICE G - Número de oócitos totais, grau I, II e III de gatos-do-mato-pequeno submetidos a superovulação com eCG/hCG e pFSH/pLH, AMC/Jundiaí/SP, 2004

Animais	Colheitas	Protocolos	Oócitos Coletados	Oócitos Grau I	Oócitos Grau II	Oócitos Grau III
LT 136	1°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 136	2°	pFSH/LH	0	0	0	0
LT 136	3°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 136	4°	pFSH/LH	2	1	1	0
LT 136	5°	eCG/hCG	4	0	2	2
LT 136	6°	pFSH/LH	2	2	0	0
LT 141	1°	eCG/hCG	2	1	1	0
LT 141	2°	pFSH/LH	1	1	0	0
LT 141	3°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 141	4°	pFSH/LH	2	2	0	0
LT 141	5°	eCG/hCG	2	1	1	0
LT 141	6°	pFSH/LH	4	1	2	1
LT 138	1°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 138	2°	pFSH/LH	1	1	0	0
LT 138	3°	eCG/hCG	0	0	0	0
LT 138	4°	pFSH/LH	2	1	1	0
LT 134	1°	eCG/hCG	6	2	2	2
LT 134	2°	pFSH/LH	0	0	0	0
LT 134	3°	eCG/hCG	1	0	1	0
LT 134	4°	pFSH/LH	1	0	1	0

APÊNDICE H - Publicações e apresentações envolvendo este trabalho

1. Paper submetido para publicação:
   Paz, R. C. R.; Swanson, W. F.; Dias, E. A.; Adania C. H.; Barnabe V. H.; Barnabe R. C. Ovarian and immunological responses to alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus Pardalis*) and tigrina (*Leopardus Tigrinus*). Enviado para **Zoo Biology**.

2. Resumos aceitos para apresentação em Congressos Internacionais:
   Paz, R. C. R.; Dias, E. A.; Adania, C. H.; Barnabe, V. H.; Barnabe, R. C. Repeated superovulation following administration of alternating exogenous gonadotropins regimens in the ocelots (*Felis pardalis*) and tigrinus (*Felis tigrinus*). Aceito para apresentação no **5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction (ISCFR)**, a realizar-se em Embu / SP / Brasil, em agosto de 2004.

   Paz, R. C. R.; Swanson, W. F.; Dias, E. A.; Adania, C. H.; Barnabé, V. H.; Barnabé, R. C. Ovarian and immunological responses to alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). Aceito para apresentação no **15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)**, a realizar-se em Porto Seguro / BA / Brasil, em agosto de 2004.

3. Resumos apresentados em Congressos Nacionais:
   Paz, R. C. R.; Lopes, M. D.; Dias, E. A.; Barnabe, R. C. Avaliação da maturação nuclear de oócitos de gatas domésticas *(Felis catus*). **Suplemento da Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 520, XVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Beberibe / CE, 2003.

   Paz, R. C. R.; Dias, E. A.; Adania, C. H.; Felippe, E. C. G.; Oliveira, C. A. Acompanhamento reprodutivo de jaguatirica *(Leopardus pardalis*) por ultrassonografia, colpocitologia esfoliativa e mensuração hormonal sérica por radioimunoensaio. **Anais do XXVII Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil – SZB**, Bauru / SP, 2003.

   Paz, R. C. R.; Dias, E. A.; Cavalcanti, A. K. S.; Jimenez, G. T.; Góes, P. A. A.; Barnabe, R. C. Superovulação, aspiração follicular por vídeo-laparoscopia e colpocitologia em gatas domésticas (*Felis catus*), modelo experimental para felinos silvestres. **Anais do IV Congresso e IX Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens - ABRAVAS 2002**, p. 84, Vitória / ES, 2002.

ANEXOS

ANEXO A - Portaria nº 106 do IBAMA, de 26 de dezembro de 1995, que instituiu o Grupo de Trabalho para Pequenos Felinos Brasileiros

CIAL Nº 249 SEXTA-FEIRA, 29 DEZ 1995

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

PORTARIA Nº 106, DE 26 DE DEZEMBRO DE 1995

O PRESIDENTE DO INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, no uso das atribuições previstas no art. 24 da Estrutura Regimental anexa ao Decreto nº 78, de 05 de abril de 1991, e no art. 83, inciso XIV do Regimento Interno, aprovado pela Portaria Ministerial nº 445/89-GM. de 16 de agosto de 1989, e tendo em vista as disposições da Lei 5197, de 3 de janeiro de 1967, e o que consta do Processo nº 02001.001596/94-06, resolve:

Art. 1º - Criar o Grupo de Trabalho Especial para pequenos Felinos Brasileiros - GTPF, com as seguintes atribuições :

a) Estruturação de um comitê permanente para a preservação das espécies de pequenos felinos brasileiros;

b) Coordenação de todas as atividades pertinentes às espécies de pequenos felinos;

c) Estabelecimento de estratégias para estudo, manejo e proteção das espécies de pequenos felinos, buscando recursos para implementá-las.

Art.2º - O Grupo de que trata o art.1º será composto dos técnicos abaixo indicados. sob a coordenação de Cristina Harumi Adania:

a) Cristina Harumi Adania - Associação Mata Ciliar/Coordenadoria Fauna -SP

b) Fábio Moreira da Costa - Parque Zoológico Municipal de Guarulhos - SP

c) Jacinta Matilde Anjos Hermínio - Associação Mata Ciliar/Coordenadoria de Educação ambiental - SP

d) Wanderlei de Moraes - Itaipú Binacional - Jussara Maria Tebet-Parque Zoológico Municipal de Uberaba - MG

e) Peter Crawshaw Jr. - IBAMA/Projeto Grandes Carnívoros -PR

f) Maria de Lourdes de Oliveira de ANDRADE Figueira-IBAMA/Superintendência Estadual em São Paulo

g) Ângela Maria Branco Espuny - Divisão de Fauna/DEPAVE/SVMA/PMSP

h) Luiz Octavio Marcondes Machado - UNICAMP/Departamento de Zoologia-SP

Art.3º - Esta Portaria entrará em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário, especialmente a Portaria nºº 1220/94-P, DE 22 DE JULHO DE 1994.

MANOEL MAGALHÃES DE MELLO NETTO

ANEXO B - Termo de Cooperação Técnica nº 2/2000 entre IBAMA/CENAP e AMC, de 31 de julho de 2000

(SICON - 31/07/2000)

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA PARA CONSERVAÇÃO DE PREDADORES NATURAIS

EXTRATO DE TERMO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA Nº 2/2000

ESPÉCIE: Termo de Cooperação Técnica que entre si celebram o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, através do Centro Nacional de Pesquisa para a Conservação de Predadores Naturais - CENAP e a Associação Mata Ciliar/SP.
OBJETO: O presente Termo de Cooperação Técnica tem por objeto o estabelecimento de ações conjuntas para o desenvolvimento de atividades de pesquisas científicas com felinos neotropicais no Projeto Centro Brasileiro para a Conservação de Felinos Neotropicais.
CRÉDITO: Sem ônus para o CENAP/SP.
VIGÊNCIA : 24 (vinte e quatro) meses, contados da data de publicação no Diário Oficial da União, podendo ser renovado por igual período, havendo interêsse das partes, mediante termo aditivo.
DA ASSINATURA: Iperó/SP, 28 de Julho de 2000.
PELO CENAP/SP: PETER GRANSDEN CRAWSHAW JÚNIOR - Gerente do CENAP/IBAMA
PELA ASSOCIAÇÃO MATA CILIAR: JORGE BELLIX DE CAMPOS - Representante

(Of. El. nº 155/2000)

ANEXO C - Declaração para Importação/Exportação do Serviço de Pesca e Vida Selvagem USA, de 29 de outubro de 2003

USFWS Form 3-177
(Revised 10/17/2000)
O.M.B. No. 1018-0012
Expiration Date: 10/31/2003

U.S. FISH AND WILDLIFE SERVICE

Page 1 of 1

DECLARATION FOR IMPORTATION OR EXPORTATION OF FISH OR WILDLIFE

Please Type or Print Legibly

1. Date of Import/Export: (mm/dd/yyyy) 10/29/2003
2. I/E License Number:
3. Indicate One: ☒ Import ☐ Export
4. Port of Clearance: AT
5. Purpose Code: S
6. Customs Entry Number:
7. Name of Carrier: DELTA
8. Air Way Bill or Bill of lading Number:
   Master:
   House:
9. Transportation Code: P
   License State
10. Bonded Location for Inspection: NA
11. Number of Cartons Containing Wildlife: NA 2
12. Package Markings Containing Wildlife: NA

13. (indicate one) (complete name / address / phone number)
☒ U.S. Importer of Record
☐ U.S. Exporter
NIH, NCI-Frederick, Lab. of Genomic Diversity
Bldg. 560, Rm. 21-105
Frederick, MD 21702 USA
Phone 301/846-1299

14a. Foreign Supplier / Receiver :
(complete name / address / phone number)
Dr. Regina Paz, Faculty of Veterinary Medicine and Zoology
Department of Animal Reproduction, University of Sao Paulo,
Rua Orlando, Marques de Paiva #87, Cidade Universitaria
Sao Paulo, SP, Brazil
fax (11) 30917412; ph. (11) 30917898
14b. BR

15. Customs Broker, Shipping Agent or Freight Forwarder:
Phone Number / Fax Number: Contact Name:

Species Code (Official Use)	16a. Scientific Name / 16b. Common Name	17a. Foreign CITES Permit Number / 17b. U.S. CITES Permit Number	18a. Description Code / 18b. Source	19a. Quantity / Unit / 19b. Total Monetary Value	20. Country of Origin of Animal
	Leopardus tigrinus Tigrina	0108862BR 02US694126/9	SPE F	48 / NO $0	BR
	Leopardus pardalis Ocelot	0108862BR 02US694126/9	SPE F	72 $0	BR

Knowingly making a false staement in a Declaration for Importation or Exportation of Fish or Wildlife may subject the declarant to the penalty provided by 18 U.S.C 1001 and 16 U.S.C. 3372(d)

21. I certify under penalty of perjury that the infamation furnished is true and correct:
Signature Date
AJP WILKERSON
Type or Print Name

U.S. FISH & WILDLIFE SERVICES
CLEARED
Inspector Signature

ANEXO D - Permissão de Importação de amostras de soro de mamíferos ameaçados - CITES/USA

FORM 3-201A (1/97)

CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA

IMPORT PERMIT

Page 1 of 5

1. Original Permit/Certificate No. 02US694126/9

2. Valid until 12/08/2003

. Permittee (name and address, country)
NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH
NATIONAL CANCER INSTITUTE AT FREDERICK
LABORATORY OF GENOMIC DIVERSITY
BUILDING 560, ROOM 21-105
FREDERICK, MD 21702
U.S.A.

4. Consignee (name and address, country)
DR. REGINA PAZ
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE + ZOOLOGY
DEPARTMENT OF ANIMAL REPRODUCTION
UNIVERSITY OF SAO PAULO
RUA ORLANDO MARQUEZ DE PAIVA 87 CIDADE UNIVERSITARIA
SAO PAULO, SP, BRAZIL

. Special Conditions
- MUST COMPLY WITH ATTACHED GENERAL AND SPECIAL PERMIT CONDITIONS.
- U.S. ENDANDERED AND THREATENED SPECIES [50 CFR 17.22 AND 50 CFR 17.32].
- PERMIT MAY BE COPIED FOR MULTIPLE SHIPMENTS; PERMITTEE TO RETAIN ORIGINAL.
- PERMITTEE MUST COMPLETE BLOCKS 4, 11, 12 AND SHIPMENT #:_____, PRIOR TO EACH SHIPMENT.
- PERMITTEE MUST COMPLETE INFORMATION ON INVENTORY SHEET AND ATTACH COMPLETED INVENTORY SHEET TO FOREIGN CITES EXPORT PERMIT AND WILDLIFE DECLARATION FORM (3-177).
- THIS REPLACES AND AMENDS 02US694126/9 ISSUED 10/31/2002.

-May not be used for commercial purposes. -For live animals, only valid if the transport conditions comply with the CITES Guidelines for Transport of Live Animals or, in the case of air transport, with IATA Live Animals Regulations.

5a. Purpose of Transaction: S

5b. Security No: 459266541

6. U.S. Management Authority
DIVISION OF MANAGEMENT AUTHORITY
U.S. FISH AND WILDLIFE SERVICE
DEPARTMENT OF THE INTERIOR
WASHINGTON, D.C. 20240
UNITED STATES OF AMERICA

Management Authority
US9266841

12/09/2002
Issuing Date — United States Management Authority

AUTHORITY: Endangered Species Act of 1973 (16 USC 1531 et. seq.)

7/8. Common Name and Scientific name (genus and species) of Animal or Plant	9. Description of Part or Derivative, including identifying marks or numbers (age/sex if live)	10. Appendix No. and Source
A. Common Name MAMMALS ALL MAMMALS Scientific Name	9. IMPORT: BLOOD, SERUM, & OTHER TISSUE SAMPLES AS DESCRIBED ON ATTACHED INVENTORY SHEET.	10. 1 F 11. Quantity (including units) NO 12. Country of Origin
B. Common Name MAMMALS ALL MAMMALS Scientific Name	9. IMPORT: BLOOD, SERUM, & OTHER TISSUE SAMPLES AS DESCRIBED ON ATTACHED INVENTORY SHEET.	10. 1 W 11. Quantity (including units) NO 12. Country of Origin
C. Common Name Scientific Name	9.	10. 11. Quantity (including units) 12. Country of Origin
D. Common Name Scientific Name	9.	10. 11. Quantity (including units) 12. Country of Origin
E. Common Name Scientific Name	9.	10. 11. Quantity (including units) 12. Country of Origin

Specimen(s) will not be used for primarily commercial purposes. The recipient has suitable facilities to house and care for the specimen(s).

ANEXO E - Permissão de Exportação de amostras de soro de *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus* - CITES/Brasil

CITES

CONVENÇÃO SOBRE O COMÉRCIO INTERNACIONAL DE ESPÉCIES DA FLORA E FAUNA SELVAGENS EM PERIGO DE EXTINÇÃO

1 - LICENÇA Nº / PERMIT Nº: 0108862 BR

Nº DE PÁGINA/PAGE Nº:

2 - VÁLIDO ATÉ / VALID UNTIL: 21/04/2004

IMPORTAÇÃO / IMPORTATION	X	EXPORTAÇÃO / EXPORTATION		REEXPORTAÇÃO / RE-EXPORTATION		OUTROS / OTHER

3 - EXPORTADOR / REEXPORTADOR / (NOME, ENDEREÇO) / EXPORTER / RE-EXPORTER / NAME / ADRESS)
USP FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA
Av. Orlando de Paiva 87 - Cidade
Universitaria - São Paulo - BRASIL
05508900 BR

4 - IMPORTADOR / (NOME, ENDEREÇO) / IMPORTER (NAME, ADRESS)
National Institutes of Health, Laboratory of Genomic Diversity
Building 560, ROOM 21-105
Frederick MD - Maryland USA
21702 US

5 - PAÍS DE DESTINO / COUNTRY OF DESTINATION: UNITED STATES OF AMERICA

5A - OBJETIVO OPERAÇÃO / PURPOSE: S

5B - OBSERVAÇÃO / OBSERVATION: BR9131528

SELO / STAMP

AUTORIDADE ADMINISTRATIVA EMITENTE / ISSUING MANAGEMENT AUTHORITY

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
SAIN L4 NORTE - CEP: 70800-200 - BRASÍLIA - DF - BRASIL

M M A

LOCAL / PLACE: Brasília

DATA EMISSÃO / ISSUING DATE: 24/10/2003

ASSINATURA / SIGNATURE

For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport of Live Animals or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations.

7 - CONDIÇÕES ESPECIAIS / SPECIAL CONDITIONS: NOT NECESSARY ENDORSEMENT IN THE ITEM 17

8 - ITEM	9 - ESPÉCIE (NOME CIENTÍFICO) / SPECIES (SCIENTIFIC NAMES)	10 - NOME COMUM / COMMON NAME	11 - APÊNDICE Nº ORIGEM / APPENDIX Nº SOURCE	12 - DESCRIÇÃO / DESCRIPTION MARKS OF NUMBERS, AGE / SEX IF LIVE	13 - QUANTIDADE / QUANTITY
	Leopardus pardalis	OCELOT	I O	MATERIAL BIOLÓGICO	72 SAMP
	Leopardus tigrinus	Tigrina	I O	MATERIAL BIOLÓGICO	4 SAMP

United States Fish & Wildlife Service
CANCELLED

014386

14 - RE-EXPORTATION

COUNTRY OF ORIGIN	Nº PERMIT	DATE	COUNTRY OF LAST RE-EXPORT	CERT. Nº	DATE	Nº OF THE OPERATION (D) DATE OF AQUISITION (P)

15 - ORIGEM DOS ESPÉCIMENS / SOURCE OF SPECIMENS
A - Planta reproduzida artificialmente / Artificially propagated plant
C - Animal reproduzido em cativeiro / Animal bred in captivity
D - Espécimen do Apêndice I reproduzido em cativeiro ou artificialmente com fins comerciais – (Art. VII, 4)
Appendix I specimen captivity bred or artificially propagated for commercial purposes – (Art. VII, 4)
F - Animal nascido em cativeiro – F1 / Animal born in captivity – F1
O - Espécimen Pré-Convenção / Pre-Convention Specimen
R - Espécimen de Criadouro / Specimen from a ranching operation
U - Origem desconhecida / Source unknow
W - Silvestre / Wild

16 - OBJETIVO DA OPERAÇÃO / PURPOSE OF TRADE
B - Criação em cativeiro ou reprodução artificial / Breeding in captivity or artificial propagation
E - Educativo / Educational
G - Jardins Botânicos / Botanical Gardens
H - Troféu de caça / Hunting trophies
M - Pesquisa biomédica / Bio-medical research
N - In ou reintrodução ao meio silvestre / In or reintroduction into the wild
P - Objeto pessoal / Personal
Q - Circos e exposições itinerantes / Circuses and traveling exhibitions
S - Científico / Scientific
T - Comercial / Commercial
Z - Zoológicos / Zoos

17 - EXPORTAÇÃO E REEXPORTAÇÃO - ENDOSSO / EXPORT AND REEXPORT ENDORSEMENT

18 - IMPORTAÇÃO - ENDOSSO / IMPORT ENDORSEMENT