

Análise citogenética de oócitos de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) coletados após estimulação ovariana

Regina Célia Rodrigues da PAZ¹
Cristina Harumi ADANIA²
Valquíria Hippólito BARNABÉ³
Renato Campanarut BARNABÉ³

1 - Departamento de Ciências Básicas e Produção Animal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá-MT

2 - Associação Mata Ciliar, Jundiá-SP

3 - Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP

Correspondência para:

Regina Celia Rodrigues da Paz, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade Federal de Mato Grosso, Rua Fernando Correa da Costa s/nº – Coxipó – Cuiabá / MT, 78060-600, Fone: (65) 36158681, Fax: (65) 36158614, Celular (65) 92141266, reginacpaz@gmail.com

Recebido para publicação: 29/11/2007
Aprovado para publicação: 29/06/2009

Resumo

Este estudo representa a primeira avaliação da maturação nuclear de oócitos por análise citogenética realizada em duas espécies de felídeos brasileiros ameaçados de extinção: *L. pardalis* (n=5) e *L. tigrinus* (n=4). Os animais foram submetidos à estimulação ovariana 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. Dos 33 oócitos de jaguatirica avaliados 12% (n=4) apresentaram cromossomos condensados em seu interior e dos 11 oócitos de gato-do-mato-pequeno avaliados 36% (n=4) apresentaram cromossomos condensados em seu interior, no entanto, nenhum oócito encontrava-se em metáfase II. Avaliação morfológica dos oócitos mostrou as mesmas características encontradas em outros mamíferos. Comparando os tratamentos, não houve diferença significativa ($p>0,05$) no número total de estruturas ovarianas (folículos e corpos lúteos recentes) observadas em estimulações alternadas sucessivas, nas duas espécies estudadas. Também não houve diferença significativa em relação ao total de estruturas ovarianas encontradas em cada tratamento ($5,7\pm 1,2$ eCG/hCG; $7,9\pm 0,9$ pFSH/pLH) para *L. pardalis* e ($2,6\pm 0,7$ eCG/hCG; $2,0\pm 0,5$ pFSH/pLH) para *L. tigrinus*. Apesar das limitações deste experimento e do número reduzido de oócitos avaliados podemos sugerir que a aspiração folicular após estimulação ovariana com eCG/hCG e pFSH/pLH alternadamente resulta na recuperação de oócitos imaturos, que necessitam de cultivo em meios específicos para atingir o estágio de Metáfase II.

Palavras-chave:

Animais selvagens.
Oócitos.
Citogenética.
Reprodução.

Introdução

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

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* difere entre as espécies.²

A maioria das espécies de felídeos possui ovulação induzida. 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.³

Oócitos de gata doméstica, aspirados 25 horas após a aplicação de Gonadotropina Coriônica Humana (hCG), foram classificados como maduros, de acordo com critérios morfológicos, mas a maioria deles (60%) não tinha atingido o estágio de Metáfase II, sendo que só atingiram a maturidade nuclear após algumas horas de cultivo adicional.⁴ A maioria dos oócitos de gatas domésticas, sujeitos a condição de cultivo, atinge a fase de metáfase II dentro de 30 a 48 horas.²

Segundo Farstad⁵ a eficiência da maturação e da fertilização *in vitro* em oócitos felinos é geralmente inferior a 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.⁶ Isto demonstra que outros fatores estão envolvidos na maturação nuclear, como condições de cultivo, qualidade morfológica e influência da competência meiótica dos oócitos, condição reprodutiva da doadora e sazonalidade.⁷

Considerando-se que a manutenção da diversidade genética é dependente da reprodução, as biotécnicas da reprodução surgem como importantes ferramentas na conservação 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.⁸

Nesse sentido, a introdução de novos protocolos de estimulação ovariana, bem como a classificação, análise e 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.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições apresentadas por oócitos recuperados por aspiração folicular em fêmeas de duas espécies de felídeos neotropicais: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*, visando elucidar detalhes preliminares necessários para a aplicação de técnicas de fertilização *in vitro* nestas espécies. Para tanto foi realizado estudo do processo de maturação *in vivo*, avaliando os estágios do ciclo meiótico e o grau de maturação nuclear pela avaliação citogenética dos oócitos aspirados por vídeo-laparoscopia, após estimulação ovariana com gonadotropinas exógenas (eCG-Gonadotropina Coriônica equina/Vetecor[®] e hCG-Gonadotropina Coriônica humana /Novormon[®] e pFSH-Hormônio Folículo Estimulante suíno/Folltropin-V[®] e pLH-Hormônio Luteinizante suíno/Lutropin-V[®]).

Material e Método

Foram utilizadas cinco fêmeas de *Leopardus pardalis* (Studbook número: 240, 254, 285, 289, 290); e quatro fêmeas de *Leopardus tigrinus* (Studbook número: 134, 136, 138 e 141), alojadas na Associação Mata Ciliar (AMC), localizada em Jundiá/SP. Este experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê do Plano de Manejo para Pequenos Felinos Brasileiros em 22 de setembro de 2000, portaria nº106/1995, Termo de Cooperação Técnica nº2/2000 e Licença CITES/IBAMA nº0108862. Foi também submetido à Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo Protocolo nº109/2002, sendo aprovado na sessão do dia 05 de junho de 2002.

As fêmeas de gato-do-mato-pequeno foram colocadas no mesmo recinto para facilitar o manejo necessário as aplicações hormonais. No entanto, a partir da 4ª estimulação ovariana a fêmea 138 veio à óbito em decorrência de brigas frequentes com a fêmea 134. Devido a grande agressividade da fêmea 134 ela foi retirada do experimento. Durante o período experimental duas fêmeas de jaguatirica

(254 e 285) ficaram prenhes, impossibilitando a realização do protocolo de estimulação ovariana durante o período de gestação.

Os animais foram distribuídos em dois grupos, sendo a estimulação ovariana realizada a cada quatro meses durante dois anos, perfazendo um total de seis intervenções. Todos os animais passaram por todos os tratamentos, sendo que cada animal foi estimulado por três vezes com o mesmo protocolo.

Jaguatiricas: protocolo 1: 225UI de hCG (IM) 80h após administração de 500UI de eCG (IM), sendo a aspiração folicular por vídeo-laparoscopia, realizada após 24-28h da administração do hCG^{9,10,11,12}; protocolo 2: 50UI de FSH suíno (IM), administradas gradativamente, em três dias consecutivos (Dia 1: 20 UI e 15 UI aplicadas em intervalo de 14h, Dia 2: 10 UI, Dia 3: 5 UI, aplicados com intervalos de 24h). No dia quatro, 18h após a administração da última dose de FSH, foi aplicada uma dose de 20UI de LH suíno (IM), sendo a vídeo-laparoscopia realizada 24-28h após a administração do LH^{10,11,13}.

Gatos-do-mato-pequeno: protocolo 1: 75UI hCG (IM) 80h após administração de 100UI de eCG (IM), sendo a aspiração folicular por vídeo-laparoscopia, realizada após 24-28h da administração do hCG^{9,10,11}; protocolo 2: aplicação de 30UI de FSH suíno (IM), administradas gradativamente, em três dias consecutivos: (Dia 1: 12 UI e 9 UI aplicadas em intervalos de 14h, Dia 2: 6 UI, Dia 3: 3 UI, aplicadas com intervalos de 24h). No dia quatro, 18 horas após a administração da última dose de FSH, foi aplicada uma dose de 10UI de LH suíno (IM), sendo a vídeo-laparoscopia realizada 24-28h após a administração do LH^{10,11}.

A avaliação das estruturas ovarianas foi realizada por vídeo-laparoscopia utilizando-se fibra óptica rígida de 7mm, fonte de luz, insuflador e microcâmara (Karl Storz - H. Strattner & Cia Ltda) acoplada à televisão (Sony 24"). Após avaliação da atividade ovariana (folículos e corpos lúteos recentes), os folículos maduros (> 2mm) foram aspirados usando agulha descartável 22g

(Insyte/BD) e Meio 199 (Nutricelâ).

Os oócitos aspirados foram quantificados, avaliados em lupa e caracterizados quanto à morfologia em grau I, II e III^{2,14}: oócitos grau I, ou excelentes, apresentavam pigmentação homogênea e enegrecida do citoplasma, rodeados por células do cúmulus e zona pelúcida compacta; os oócitos grau II, ou regulares, apresentavam citoplasma ligeiramente pigmentado ou manchado com zona pelúcida e células do cúmulus envolvendo apenas parcialmente a célula e os oócitos grau III, ou degenerados, mostravam-se com formas anormais, pálidos e com ausência das células do cúmulus e zona pelúcida.

Uma amostra de 44 oócitos (jaguatirica n=33; gato-do-mato-pequeno n=11) foram submetidos a procedimentos de lavagens com solução de hialuronidase 0,4% (Sigma, H-3506) para remoção completa das células do cúmulus, imediatamente após avaliação em esteriomicroscópio.

Em seguida os oócitos foram transferidos para lâminas histológicas, recobertos com lamínulas fixadas com cola de silicone (Flexite - Alba) e submersos em solução de metanol: ácido acético glacial (3%), onde foram mantidos durante sete dias. Após esse período os oócitos foram corados com orceína acética (Sigma 0-7380) e observados ao microscópio de luz, em aumento 1000x.

Com base na análise cromossômica 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.¹⁵

Os dados foram analisados através dos testes ANOVA e Fisher's LSD utilizando-se o programa Statview¹⁶. Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e os desvios padrões das médias (média \pm desvio padrão) dos dados originais.

Resultados

As tabelas 1 e 2 mostram a média e o desvio padrão das estruturas ovarianas: folículos maduros (FM) e corpos lúteos

Tabela 1 - Média e Desvio Padrão das estruturas ovarianas: folículos maduros (FM) e corpos lúteos recentes (CLR); do número de oócitos totais (OT), do número de oócitos maduros (OM) e do número de oócitos avaliados pela análise citogenética (OAAC) e número de oócitos apresentando cromossomos condensados (OCC) após estimulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH em jaguatirica (*L. pardalis*) – Jundiá – SP – 2004

Estruturas	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH
FM e CLR	8,8±2,5	7,0 ± 2,3	4,6 ± 1,7	9,0± 1,1	4,0 ± 1,4	7,8 ± 0,9
OT	2,5±0,6	6,4±2,0	3,2±1,1	4,5±1,6	1,5±0,6	6,25±0,9
OM	1,0±0,4	2,4±1,2	2,2±1,2	3,3±1,1	1,0±0,4	3,8±0,2
OAAC	1,0±0,0	1,8±0,4	1,6±0,6	2,3±0,5	1,0±0,0	2,0±0,0
OCC	0,7±0,57	0,4±0,54	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Tabela 2 - Média e Desvio Padrão das estruturas ovarianas: folículos maduros (FM) e corpos lúteos recentes (CLR); do número de oócitos totais (OT), do número de oócitos maduros (OM) e do número de oócitos avaliados pela análise citogenética (OAAC) após estimulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH em gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) – SP – 2004

Estruturas	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH	eCG/hCG	pFSH/LH
FM e CL	2,0 ± 1,4	0,5 ± 0,3	3,0± 1,3	3,0 ± 0,6	3,0 ± 1,0	3,0 ± 1,0
OT	2,0±1,4	0,5±0,3	0,3±0,2	1,8±0,2	3,0±1,0	3,0±1,0
OM	0,75±0,5	0,5±0,3	0,0±0,0	1,0±0,4	0,5±0,5	1,5±0,5
OAAC	0,75±0,5	0,5±1,0	0,0±0,0	0,75±1,0	0,0±0,0	0,75±1,5
OCC	0,6±0,57	0,25±0,5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,25±0,5

recentes (CLR); número de oócitos totais (OT), número de oócitos maduros (OM), número de oócitos avaliados pela análise citogenética (OAAC) e número de oócitos apresentando cromossomos condensados (OCC) após estimulações alternadas com eCG/hCG e pFSH/pLH em jaguatirica (*L. pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), respectivamente.

Dos 33 oócitos de *Leopardus pardalis* utilizados, 16 foram classificados morfológicamente ao esteriomicroscópio como de grau I, 13 como de grau II e 4 como de grau III. Dos 11 oócitos de *Leopardus tigrinus* utilizados, 5 foram classificados como grau I, 4 como grau II e 2 como grau III.

Dentre os oócitos de *Leopardus pardalis* (n=33) observados ao microscópio de luz, após fixação e coloração das lâminas para análise citogenética, apenas 12% (n=4) apresentaram cromossomos condensados em seu interior (Figura 1), sendo que nenhum

deles apresentava-se em metáfase II. Dos quatro oócitos que apresentaram cromossomos condensados em seu interior, dois eram de grau I e dois eram de grau II pela classificação morfológica. Dentre os oócitos de *Leopardus tigrinus* (n=11) observados ao microscópio de luz, após fixação e coloração das lâminas para análise citogenética, apenas 36% (n=4) apresentaram cromossomos condensados em seu interior (Figura 2), sendo que nenhum deles apresentava-se em metáfase II. Dos quatro oócitos que apresentaram cromossomos condensados em seu interior, dois eram de grau I e dois eram de grau II pela classificação morfológica.

Comparando os tratamentos hormonais, não houve diferença significativa ($p>0,05$) no número total de estruturas (folículos e corpos lúteos recentes) observadas em estimulações ovarianas alternadas sucessivas, nas duas espécies estudadas. Também não houve diferença

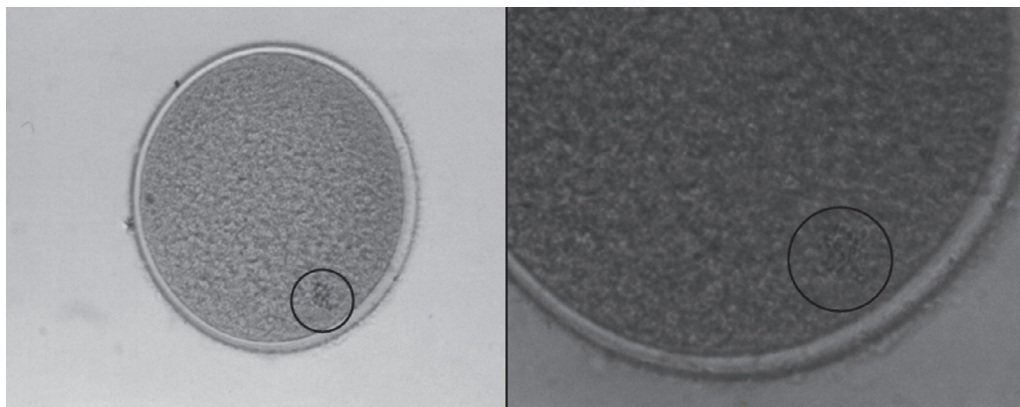


Figura 1 - Oócito grau I de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) apresentando cromossomos condensados em seu interior, em aumento 10x (à esquerda) e 1000x (à direita) - São Paulo - 2004

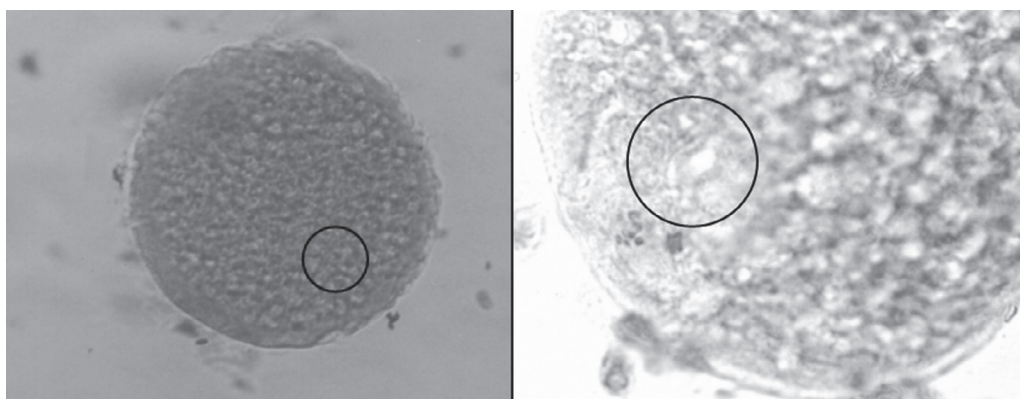


Figura 2 - Oócito grau II de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) apresentando cromossomos condensados em seu interior, em aumentos 10x (à esquerda) e 1000x (à direita) - São Paulo - 2004

significativa em relação ao total de estruturas ovarianas encontradas em cada tratamento ($5,7 \pm 1,2$ eCG/hCG; $7,9 \pm 0,9$ pFSH/pLH) para *L. pardalis* e ($2,6 \pm 0,7$ eCG/hCG; $2,0 \pm 0,5$ pFSH/pLH) para *L. tigrinus*.

Discussão

Seriam considerados oócitos maduros aqueles com configuração cromossômica em Metáfase II, como descrito por Johnston et al.¹⁵. No entanto, nenhum oócito avaliado apresentou configuração cromossômica em Metáfase II, mesmo aqueles classificados como grau I pela análise morfológica.

Alguns oócitos classificados como grau I e II apresentaram cromossomos condensados em seu interior, perfazendo um total de 12% (n=4) em jaguatirica e 36% (n=4)

em gato-do-mato-pequeno, porém não foi possível a caracterização dos estágios do ciclo meiótico pela avaliação da configuração cromossômica nestes oócitos.

Entretanto, 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.⁴ 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 Lopes¹⁷, verificou-se que apenas 11,6% dos oócitos aspirados de ovários de gatas domésticas, após 25h 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, O'Brien e Wildt², 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 cúmulo-oócito, ou seja, em critérios morfológicos, resulta em uma maturação mais consistente e fornece um indicador de maturação oocitária e capacidade de desenvolvimento.¹⁸

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 conhecidos¹⁷.

Comparando os tratamentos hormonais, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no número total de estruturas ovarianas encontradas em cada tratamento. Essas observações são similares às

encontradas em gato doméstico, no qual resposta ovariana não diminuiu após três ou quatro tratamentos com eCG/hCG, em intervalos de quatro meses¹⁹. Entretanto, repetidos tratamentos utilizando eCG/hCG, em intervalos de 2 meses, produziram uma dramática redução na resposta ovariana em gatos domésticos.^{19,20}

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 felídeos ameaçados de extinção.

Conclusão

Apesar das limitações deste experimento e do número reduzido de oócitos avaliados podemos sugerir que a aspiração folicular após estimulação ovariana com eCG/hCG e pFSH/pLH alternadamente resulta na recuperação de oócitos imaturos que necessitam de cultivo em meios específicos para atingir o estágio de Metáfase II.

Cytogenetic analyses of ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrinus (*Leopardus tigrinus*) oocytes collected after ovarian stimulation

Abstract

This study represents the first assessment of oocyte's nuclear maturation by cytogenetical analysis in two endangered Brazilian felids: *L. pardalis* (n=5) and *L. tigrinus* (n=4). Females were treated 6 times with alternating eCG/hCG and pFSH/pLH protocols using an interval of 4 months between each treatment. Ovarian follicular development and oocytes recovery were performed through laparoscopy. Recovered oocytes were submitted to the morphological and cytogenetical analysis in order to evaluate the meiotic cycle and maturation (metaphase II), respectively. In 33 ocelot's oocytes observed 12% (n=4) showed condensed chromosomes and in 11 tigrinu's oocytes observed 36% (n=4) showed condensed chromosomes. However no oocytes in metaphase II were observed. Oocytes morphological evaluation showed the same characteristics were observed in others mammals. 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 ($p > 0.05$)

Key words:
Wildlife cats.
Oocytes.
Cytogenetic.
Reproduction.

were found regarding to the number of total ovarian structures (total follicles and CL) during successive gonadotropin treatments. There were no differences ($p > 0.05$) regarding to the total number of ovarian structures in *L. pardalis* (5.7 ± 1.2 eCG/hCG and 7.9 ± 0.9 pFSH/pLH) or *L. tigrinus* (2.6 ± 0.7 eCG/hCG and 2.0 ± 0.5 pFSH/pLH). With these results we can suggest that follicular aspiration after ovarian stimulation with exogenous gonadotrophins results in immature oocytes, needing *in vitro* culture in specific mediums for metaphase II stage was observed.

Referências

- 1 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.
- 2 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. 343-356, 1989.
- 3 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.
- 4 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 of Experimental Zoology**, v. 270, p. 399-404, 1994.
- 5 FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 375-387, 2000.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 MORAES, W.; MORAIS, R.; MOREIRA, N.; LACERDA, O.; GOMES, M. L. F.; MUCCILOLO, R. G.; SWANSON, W. F. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 1997, Houston, Texas. **Proceedings...**, 1997. p. 334-335.
- 10 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.
- 11 PAZ, R. C. R.; DIAS, E. A.; ADANIA, C. H.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C. Ovarian response to repeated administration of alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrinus (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 1787-1789, 2006.
- 12 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 ocelots (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Zoo Biology**, v. 24, p. 247-260, 2005.
- 13 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, 1996.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 STATISTIC ANALYSES PROGRAM. **Statview analysis system**. Cary: ASA Institute, 2000.
- 17 LOPES, M. D. **Análise histológica, ultra-estrutural e avaliação da maturação nuclear de oócitos de gatas domésticas (*Felis catus*)**. 2002. 138 f. Tese (Livro Docência em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2002.

18 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 and Fertility**, v. 110, p. 355-360, 1997.

19 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, 1996.

20 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.