

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

USO DO ACETATO DE DESLORELINA COMO CONTRACEPTIVO EM
GATOS DOMÉSTICOS

CAMILA LOUISE ACKERMANN

BOTUCATU – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

USO DO ACETATO DE DESLORELINA COMO CONTRACEPTIVO EM
GATOS DOMÉSTICOS

CAMILA LOUISE ACKERMANN

Dissertação apresentada junto ao
programa de pós-graduação em Medicina
Veterinária (Área de concentração:
Reprodução Animal) para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes

BOTUCATU – SP

2012

Nome do autor: Camila Louise Ackermann

Título: Uso do acetato de deslorelina como contraceptivo em gatos domésticos

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a.Dr^a. Maria Denise Lopes

Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

Membro

Departamento de Reprodução Animal

USP – São Paulo

Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 20 de janeiro de 2011.

DEDICATÓRIA

“A minha obsessão por gatos
Diverte os amigos,
Os inimigos,
Os psicólogos,
Creio que diverte também até os próprios gatos.”
Adaptado de Mario Quintana

“No matter how high
I’ll think of you all time!”

Aos animais experimentais,
Dedico.

“Nós te exaltamos Senhor, nós te exaltamos
e louvamos o teu nome, narramos as tuas
maravilhas!”

“De mil experiências que fazemos, no máximo conseguimos traduzir uma em palavras,
e mesmo assim de forma fortuita e sem o merecido cuidado. Entre todas as experiências
mudas, permanecem ocultas aquelas que, imperceptivelmente, dão às nossas vidas a sua
forma, o seu colorido e a sua melodia.”

Amadeu Inácio de Almeida Prado

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por todas as graças concedidas, pela força, coragem, FÉ e pelo maior ensinamento de todos, o amor. Meu coração é para Ti, Senhor. E aos meus **anjos** da guarda, por me levarem em suas mãos para que meus pés não tropeçassem em pedra alguma, pela companhia, proteção e principalmente por me mostrarem que a vida não é tão séria assim.

À minha família em especial minha mãe, **Selma Ackermann** pelo exemplo de vida, por me apoiar e me aturar, pela educação, amor incondicional e por sempre acreditar no meu potencial! Te amo muito! À minha **Erika Ackermann**, e à minha sobrinha **Amanda Ackermann**. *Sister is a sacred companion, loyal and loving, protective and supportive. She is a confidante, a keeper of secrets, a maker of memories a weaver of dreams. Sister is a very best friend.* Obrigada!

Ao **Eduardo Trevisol**, pelo amor, dedicação, carinho, companheirismo, amizade e apoio durante esses todo o mestrado. Pela ajuda na estatística, conselhos, momentos de distração e por me apoiar mesmo nos sonhos loucos, muito obrigada!

Aos meus animais de estimação, **Phoebe, Ursa, Tiquinho, Prupru e Feiosa**, e todos os animais que passaram pelo gatil, por demonstrarem todos os dias o que é amor incondicional. “*Queria ser tão bom quanto meus animais pensam que eu sou!*”.

À **Caroline Destro**, muito obrigada pela amizade e por tantas conversas, risadas e pela ajuda com o gatil! Conte sempre comigo parceira!

Aos amigos **Rodrigo Volpato e Nicole Ruas**, por toda a ajuda no projeto, principalmente nas eletroejaculações, quando eu já era proprietária demais para segurar os gatos! Muito obrigada por tudo!

À Prof^a. **M^a Denise Lopes**, pela orientação e conselhos, por ser tão divertida e por confiar no meu trabalho. Muito obrigada!

À Prof^a. **Lúcia D. M. da Silva e Ticiane P. F. Silva**, minhas eternas chefinhas, e aos **amigos do LRC**. Muito obrigada pela base científica, grande parte do que sei aprendi com vocês e apesar de distantes fisicamente estamos ligadas pelo pensamento.

Aos amigos **Tatiana Rascado, Carlos Renato Guaitolini, Ana Augusta Derussi** e tantos outros que de alguma forma ajudaram a realizar este projeto, pela valorosa contribuição neste trabalho, muito obrigada.

Ao **Fabrizio Grandi** e à Prof^a. **Noeme S. Rocha** pela ajuda na leitura e interpretação das lâminas de histologia, muito obrigada!

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal, em especial à Prof^a. **Eunice Oba**, pelas dosagens hormonais e pelas conversas divertidas nos fins de tarde; à Prof^a. **Fernanda da Cruz Ladim Alvarenga** e ao Prof. **Frederico Ozanan Papa**, por permitirem a utilização do material laboratorial e por todos os ensinamentos durante o mestrado.

Aos amigos feitos durante este período: **Leandro Rodello, Renata C. Uiliani, Priscilla Mitie, Carolina Moraes, Adriana Klein, Annelise Grether, Leda Pereira, Rosiara Rosário, Aline Camargos, Marilda Tafarel, Lygia Francelino, Adriana Aguiar, Lúcia Izique**, entre tantos outros. Obrigada!

Aos Tebas: **Carlos Maximiliano, Milena Ribeiro, Lucas Vieira, Natasha Wanderley, Yu Huang, Maria Luiza Pinheiro, Pedro Accioly, Marina Esmeraldo, David Loyola, Talitta Bezerra, Myrella Machado, Mateus Filho, Raul Galhardi e Roberto São Thiago**. Obrigada por me mostrarem todos os dias que na união dos corações encontramos a verdadeira amizade. *I'm talking about true friendship!*

Aos amigos da UECE, em especial às “Marias”: **Ádila Teixeira, Aline Mesquita e Juliana Castelo Branco; Henna Roberta, Débora Castelo Branco, Annelise Alves** e outros tantos. Muito obrigada, pela amizade e carinho mesmo estando longe.

À **Peptech Animal Health** pela concessão dos implantes subcutâneos da Deslorelina (Suprelorin[®]).

À **Pfizer** pela concessão das vacinas.

À **FAPESP** pela concessão da bolsa durante o mestrado.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Nomes comerciais, formulação, via de administração, dose e potencia relativa de alguns agonistas do GnRH. Botucatu, 2012.	13
TABELA 2: Porcentagem de células superficiais observadas na citologia vaginal, concentração plasmática e fase do ciclo estral de cada fêmea no momento da aplicação do implante de acetato de deslorelina. Botucatu, 2012.	26
TABELA 3: Média $\pm$ desvio padrão da concentração plasmática de P4 após ovulação espontânea (antes do tratamento contraceptivo), após ovulação induzida pelo tratamento contraceptivo, após ovulação induzida pelo tratamento com gonadotrofinas exógenas. Botucatu, 2012.	32
TABELA 4: Média $\pm$ desvio padrão da concentração plasmática basal de P4 antes e depois do tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina. Botucatu, 2012.	32
TABELA 5: Média e desvio padrão do tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD), volume testicular esquerdo (VTE) e volume testicular total (VTT) observados nos animais A, B, C, D e E , obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.	51
TABELA 6: Média e desvio padrão dos parâmetros seminais relativos à cinética espermática observados nos animais A, B, C, D e E , obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.	51
TABELA 7: Média e desvio padrão da concentração espermática, porcentagem de espermatozóides com morfologia normal, porcentagem de espermatozóides íntegros e volume seminal observados nos animais A, B, C, D e E , obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.	52
TABELA 8: Média e desvio padrão da porcentagem (%) de alterações espermáticas, observadas nos animais A, B, C, D e E , nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.	88
TABELA 9: Média e desvio padrão da porcentagem (%) de acrossoma espermáticos normais e anormais (ausente, destacado, vesiculado e edemaciado) observadas nos animais A, B, C, D e E , nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.	88
TABELA 10: Tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD) e volume testicular esquerdo (VTE) do Animal A , obtidos nas avaliações	89

andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

TABELA 11: Tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD) e volume testicular esquerdo (VTE) do Animal **B**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012. **89**

TABELA 12: Tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD) e volume testicular esquerdo (VTE) do Animal **C**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012. **90**

TABELA 13: Tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD) e volume testicular esquerdo (VTE) do Animal **D**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012. **90**

TABELA 14: Tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD) e volume testicular esquerdo (VTE) do Animal **E**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012. **91**

TABELA 15: Parâmetros seminais relativos à cinética espermática, volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais (EN) e íntegros (IE) do Animal **A** obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012. **92**

TABELA 16: Parâmetros seminais relativos à cinética espermática, volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais (EN) e íntegros (IE) do Animal **B** obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012. **93**

TABELA 17: Parâmetros seminais relativos à cinética espermática, volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais (EN) e íntegros (IE) do Animal **C** obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012. **94**

TABELA 18: Parâmetros seminais relativos à cinética espermática, volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais (EN) e íntegros (IE) do Animal **D** obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012. **95**

TABELA 19: Parâmetros seminais relativos à cinética espermática, volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais (EN) e íntegros (IE) do Animal **E** obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012. **96**

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Protocolo de estímulos elétricos aplicados para a coleta de sêmen dos animais experimentais. Botucatu, 2012.	47
QUADRO 2: As variáveis analisadas pelo sistema HTR–IVOS-10. Botucatu, 2012.	47
QUADRO 3: Avaliações andrológicas realizadas durante o período experimental e suas siglas.	50
QUADRO 4: Valores do setup estabelecido para a avaliação do sêmen do gato doméstico no sistema HTR–IVOS-10. Botucatu, 2012.	86
QUADRO 5: Composição das soluções estoque e de trabalho das sondas fluorescentes utilizadas para a avaliação da integridade de membrana plasmática. Botucatu, 2012.	86
QUADRO 6: Composição do tampão gelatina utilizado na diluição para dosagem de metabólitos fecais de testosterona. Botucatu, 2012.	87

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** **A:** Introdução da escova citológica para realização da citologia vaginal para acompanhamento do ciclo estral. **B:** Lâmina de citologia vaginal, com predomínio de células superficiais, característica de fase de estro. Botucatu, 2012 **25**
- FIGURA 2:** Ovariosalpingohisterectomia realizada em uma gata doméstica previamente submetida a tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina. Botucatu, 2012. **27**
- FIGURA 3:** **A:** Região em destaque: local de aplicação do implante de deslorelina (Suprelorin® 4,7mg) nos animais experimentais. **B:** Aplicação do implante de deslorelina (Suprelorin® 4,7mg) nos animais experimentais. Botucatu, 2012. **28**
- FIGURA 4:** Agulha para aplicação subcutânea do implante de deslorelina (Suprelorin® 4,7mg) (seta preta). Botucatu, 2012 **28**
- FIGURA 5:** Local da aplicação do contraceptivo da gata **G**, com sinais de piodermatite. **28**
- FIGURA 6:** Perfil hormonal de Progesterona sérica 3 semanas antes do tratamento (-3 a -1) e durante o tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (0 a 14) até o dia da ovariosalpingohisterectomia (16) de fêmeas que estavam em diestro no início do tratamento contraceptivo. Botucatu, 2012. **29**
- FIGURA 7:** Perfil hormonal de Progesterona sérica 3 semanas antes do tratamento (-3 a -1) e durante o tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (0 a 14) até o dia da ovariosalpingohisterectomia (16) de fêmeas que estavam em interestros no início do tratamento contraceptivo. Botucatu, 2012. **29**
- FIGURA 8:** Média $\pm$ erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) das 10 fêmeas avaliadas, três semanas (-3, a -1) e durante o tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (0 a 14) até o dia da ovariosalpingohisterectomia (16). Botucatu, 2012. **30**
- FIGURA 9:** **A:** Retirada de um implante (seta preta) de acetato de deslorelina. **B:** Implantes de deslorelina íntegros, retirados após 3 meses de tratamento. Botucatu, 2012. **31**
- FIGURA 10:** CL (seta preta) de uma gata tratada previamente com acetato de deslorelina e após indução do estro e ovulação com eCG e hCG. Botucatu, 2012. **31**
- FIGURA 11:** **A:** Oócitos (seta branca), embriões de duas células (seta preta) e embrião de quatro células (seta azul) recuperados de uma gata previamente tratada com acetato de deslorelina, após indução de estro e ovulação com eCG e hCG. **B:** Oócito viável corado bisbenzimidaz (Hoechst 33342) e Iodeto de Propídeo (Sigma-Aldrich). Botucatu, 2012. **33**

FIGURA 12: Aumento mamário observado na fêmea G. Botucatu, 2012.	34
FIGURA 13: Corpo lúteo maduro, após indução de estro e ovulação com gonadotrofinas exógenas em gatas domésticas previamente tratadas com acetato de deslorelina (aumento de 100x). Botucatu, 2012.	34
FIGURA 14: Folículo de Graaf (oócito – seta preta) após indução de estro e ovulação com gonadotrofinas exógenas em gata doméstica previamente tratada com acetato de deslorelina (aumento de 50x). Botucatu, 2012.	34
FIGURA 15: Presença de glândula endometrial cística (seta preta) em tuba uterina da gata J após indução de estro e ovulação com gonadotrofinas exógenas em gatas domésticas previamente tratadas com acetato de deslorelina (aumento de 100x). Botucatu, 2012.	35
FIGURA 16: Presença de hemorragia entre as glândulas endometriais em tuba uterina de gata doméstica após indução de estro e ovulação com gonadotrofinas exógenas em gatas domésticas previamente tratadas com acetato de deslorelina (aumento de 200x). Botucatu, 2012.	35
FIGURA 17: Aspecto histológico do oviduto da gata B após indução de estro e ovulação com gonadotrofinas exógenas em gatas domésticas previamente tratadas com acetato de deslorelina (aumento de 50x). Botucatu, 2012	35
FIGURA 18: Gatil experimental do Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu. Botucatu, 2012.	45
FIGURA 19: A: Aferição do volume testicular, através de paquímetro, durante avaliação andrológica. B: Verificação do aspecto e grau de espículas durante avaliação andrológica. Botucatu, 2012.	46
FIGURA 20: Concentração de testosterona plasmática dos gatos A, B, C, D e E, obtidos durante as avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.	52
FIGURA 21: Média da concentração de testosterona plasmática e metabólitos de testosterona nas fezes dos gatos A, B, C, D e E, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.	53
FIGURA 22: Média da concentração de metabólitos andrógenos fecais dos gatos A, B, C, D e E, obtidos antes do tratamento (D -30 a D-2) até o final do período experimental (D3 a D154). Botucatu, 2012.	53
FIGURA 23: Túbulo seminífero atrofico, com células necróticas (seta preta) no gato C, 90 dias após início do tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (aumento 400x). Botucatu, 2012.	56

- FIGURA 24:** Túbulos seminíferos atroficos (seta preta) e com espermatogênese (seta azul) no gato **E**, 90 dias após inicio do tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (aumento 100x). Botucatu, 2012. **56**
- FIGURA 25:** Epidídimo com conteúdo no lúmen, gato **C**, 90 dias após inicio do tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (aumento 400x). Botucatu, 2012. **56**
- FIGURA 26:** Túbulo seminífero com espermatogênese completa no gato **A**, 60 dias após termino do tratamento com acetato de deslorelina (aumento 400x). Botucatu, 2012. **57**
- FIGURA 27:** Lúmen epididimário repleto de conteúdo espermático (seta preta) no gato **E**, 60 dias após termino do tratamento com acetato de deslorelina (aumento 100x). Botucatu, 2012. **57**

SUMÁRIO

Dedicatória	i
Epígrafe.....	ii
Agradecimentos.....	iii-iv
Lista de tabelas.....	v-vi
Lista de quadros.....	vii
Lista de figuras.....	viii-x
Resumo	1-2
Abstract	3-4
1. Introdução.....	5-7
2. Revisão de literatura.....	8
2.1 Contracepção.....	9
2.2 Estratégias reprodutivas.....	10-11
2.3 Hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e seus análogos.....	11-15
2.4 Análogos do GnRH na contracepção de felídeos fêmeas.....	15-18
2.5 Análogos do GnRH na contracepção de felídeos machos.....	18-20
3. Objetivos.....	21-22
4. Capítulo 1: Uso do acetato de deslorelina na contracepção de gatas domésticas.....	23-43
5. Capítulo 2: Uso do acetato de deslorelina na contracepção de gatos domésticos.....	44-67
6. Conclusões.....	68-69
7. Referência bibliográfica.....	70-84
8. Anexos 1.....	86-87
9. Anexos 2.....	88-96
10. Trabalho científico.....	97-107

ACKERMANN, C.L. Uso do acetato de deslorelina como contraceptivo em gatos domésticos. Botucatu, 2012. 121p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do acetato de deslorelina como contraceptivo em felinos domésticos. Foram utilizados 15 gatos domésticos (10 fêmeas e 5 machos). As fêmeas foram acompanhadas através de citologias vaginais (CV), observação do comportamento sexual a cada 72 horas e dosagem de progesterona plasmática a cada 7 dias. Quando em interestro/diestro as gatas foram submetidas à associação anestésica e um implante de acetato de deslorelina (Suprelorin® Peptech Animal Health Pty Limited, Austrália; 4,7 mg/animal) foi aplicado, permanecendo por 90 dias depois. Dez dias após a retirada do implante o estro e a ovulação foram induzidos com eCG e Hcg; três dias após as fêmeas foram submetidas à ovariossalpingohisterectomia. As tubas uterinas e útero foram lavados e o líquido recuperado foi observado para identificação e contagem de possíveis oócitos. Os oócitos foram isolados e corados para avaliação da viabilidade, os corpos lúteos quantificados e o cálculo da taxa de recuperação oocitária foi realizado. Os ovários e útero foram avaliados quanto à histologia. Alterações histológicas foram descritas e as concentrações plasmáticas de progesterona foram submetidas a teste de normalidade e posteriormente submetidas ao Teste de Kolmogorov-Smirnov. Os demais resultados estão descritos em forma de média e desvio padrão. Os machos foram submetidos a duas avaliações andrológicas (M1 e M2) sempre precedidas de anestesia geral, imediatamente após a M2, um implante de acetato de deslorelina (Suprelorin® Peptech Animal Health Pty Limited, Austrália; 4,7 mg/animal) foi aplicado em cada gato. Após o início do tratamento foram realizadas mais três avaliações andrológicas (M3, M4 e M5) com intervalo de 30 dias. Após a M5, os implantes foram retirados e uma hemi orquiectomia realizada. Mais duas avaliações andrológicas (M6 e M7) com intervalo de 30 dias foram realizadas, e em M7 foi retirado o testículo remanescente. Os testículos foram encaminhados para avaliação histológica. Os dados foram descritos em forma de média e desvio padrão. Quatro fêmeas apresentaram CV e comportamento característicos de estro após a aplicação do implante. Após estimulação ovariana inicial,

todas as fêmeas apresentaram CV característica de interestro/diestro durante os 90 dias de tratamento contraceptivo. Todas as gatas responderam ao protocolo de indução e 100% das fêmeas ovularam, sendo quantificados em média $13,1 \pm 5,5$ CL. Foram recuperados em média $8,1 \pm 5,5$ oócitos por gata e a taxa de recuperação oocitária foi $56,76\% \pm 25,42$. Todos os oócitos recuperados apresentavam-se viáveis. Não foram observados efeitos adversos ou alterações histológicas provenientes do tratamento contraceptivo. Os machos apresentaram plano anestésico e analgesia adequada em todas as avaliações andrológicas. Todos os animais ejacularam em M1 e M2. Em M3 foi observado diminuição na média de todos os parâmetros avaliados. Em M4, tanto a média dos parâmetros da genitália externa quanto dos parâmetros cinéticos avaliados apresentaram média menor que as obtidas em M3. Em M5 apenas o grau das espículas penianas diminuiu e dos parâmetros seminais, a LIN, a concentração espermática, o volume seminal e o percentual de espermatozóides íntegros diminuíram. A concentração de testosterona plasmática foi 0,16 ng/mL. Os exames histológicos revelaram uma marcada atrofia do epitélio germinativo e diminuição do diâmetro tubular nos testículos retirados. Em M6, houve aumento na média de todos os parâmetros avaliados na genitália externa e no sêmen, a concentração de testosterona plasmática foi 3,50 ng/mL. Em M7 a média do tamanho do pênis e das espículas penianas aumentou, porém, do VTE diminuiu. Foi observada uma diminuição na MT, MP, ALH, bem como do volume seminal, concentração e integridade espermática. A concentração de testosterona plasmática foi 70,50 ng/mL. Nas avaliações histológicas do testículo remanescente foi observado que a maioria dos túbulos seminíferos estava revestida por epitélio germinativo completo e o lúmen possuía maior quantidade de espermatozóides. Através destes resultados concluiu-se que o acetato de deslorelina pode ser utilizado como contraceptivo reversível em felinos domésticos.

Palavras-chave: acetato de deslorelina, contracepção reversível, gato doméstico.

ACKERMANN, C.L. Use of deslorelin acetate as a contraceptive in domestic cats. Botucatu, 2012. 121p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

ABSTRACT

This study aimed evaluate the deslorelin acetate effects as a contraceptive in domestic felids. Fifteen domestic cats (10 females and 5 males) were used. The females were evaluated through vaginal cytology (VC) and sexual behavior every 72 hours, and progesterone plasmatic concentration every 7 days. When in interestrous/diestrous the queens were submitted to an anesthetic protocol and receive one deslorelin acetate implant (Suprelorin[®] Peptech Animal Health Pty Limited, Australia; 4.7 mg/animal), remaining in treatment for 90 days. Ten days after the implant removal the estrous and ovulation were induced with eCG and hCG; three days after, all females were submitted to surgical castration. The oviducts and uterus were washed and the recovered liquid was observed for oocytes identification and count. The recovered oocytes were isolated and stained for viability evaluation, the corpus luteum were quantified and the oocyte recovery rate was calculated. Histologic evaluation was carried out in the ovary and uterus. The histologic evaluations were described and progesterone plasmatic concentration were submitted to Kolmogorov-Smirnov test. The remaining results were described as mean and standard deviation. Males were submitted to two andrological evaluations (M1 and M2), always preceded by anesthetic protocol. Immediately after M2, every cat receives one deslorelin acetate implant (Suprelorin[®] Peptech Animal Health Pty Limited, Australia; 4.7 mg/animal). After contraceptive treatment beginning, three andrological evaluations were conducted (M3, M4, and M5) with 30 days interval. After M5, the implants were removed and a hemiorchiectomy was performed. Other two andrological evaluations were performed (M6 and M7) with 30 days interval and at M7 the remaining testicle were removed. The testicles were submitted to histological evaluation. Data were described as mean and standard deviation. Four females presented VC and estrous sexual behavior after implant administration. After initial ovarian stimulation all females presented interestrous/diestrous VC during the treatment. All queens responded to the induction protocol and 100% ovulated and 13.1 ± 5.5 CL were counted. In mean 8.1 ± 5.5 oocytes per queen were recovered and oocyte recovery rate was 56.76 ± 25.42 all oocytes were viable. Adverse effects and histological changes from the contraceptive treatment were not observed. All males presented proper anesthetic and analgesic parameters in all andrological evaluations. All animals ejaculated at M1 and M2. Average decrease was obtained in all evaluated parameters at M3 and M4, except sperm concentration in M4. At M5 only de penile spines, LIN, sperm concentration, seminal volume and intact spermatozoa percentage had values lower than M4. Plasmatic testosterone concentration was 0.16ng/mL. Histological examinations revealed a marked atrophy of the germinal epithelium and

decreased tubule diameter in the testicles removed. At M6 it was an increase in the average of all measured parameters of the external genitalia and semen, the concentration of plasma testosterone was 3.50 ng/mL. At M7 the average penis size and penile spines increased however VTE decreased. Plasmatic testosterone concentration was 70.50 ng/mL. Histological examinations revealed that most of the seminiferous tubules were completely covered with germinal epithelium and the lumen had higher sperm count at the remainig testicles. Though these results we concluded that deslorelin acetate suppresses can be used as a reversible contraceptive in domestic cats.

Key word: deslorelin acetate, reversible contraception, domestic cat.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Os felinos pertencem a uma das famílias de mamíferos mais apreciadas pelo homem, seja pela sua beleza ou pela imponência dos grandes felinos, como os maiores predadores terrestres. A distribuição geográfica natural destes carnívoros é ampla e estende-se por quase todos os biótipos do planeta, com exceção da Austrália e Antártica, onde apenas o gato doméstico está presente (SILVA & ADANIA, 2006).

Estes animais receberam maior atenção nas últimas décadas devido à susceptibilidade às mudanças ambientais, perda e fragmentação de *habitat* e a perseguição humana (COMIZZOLI et al., 2008). Existem 37 espécies de felinos, quase todas estão citadas no Apêndice II da Convenção Internacional de Comércio de espécies ameaçadas da Fauna e Flora silvestre (CITES), com exceção do gato doméstico (*Felis silvestres catus*) (CITES, 2010).

A necessidade de práticas contraceptivas em animais selvagens pode parecer paradoxal: populações saudáveis, muitas vezes, requererem manejos reprodutivos cuidadosos para a manutenção da diversidade genética (AZA, 2008).

Em várias espécies felinas há a necessidade de contracepção para prevenir superpopulações. Apesar da ovariosalpingohisterectomia (OSH) ou ovariectomia (OV) serem os métodos de escolha para a maioria dos gatos domésticos, o manejo reprodutivo de espécies em risco de extinção requer métodos contraceptivos seguros e reversíveis (MUNSON, 2006).

O controle populacional de animais nativos e exóticos é justificado pela degradação ambiental, competição e predação dos animais de vida livre, potencial disseminação de patógenos infecciosos e a possibilidade de populações próximas de áreas urbanas (COOPER & LARSEN, 2006), além da prevenção de superpopulações de animais em cativeiro (ASA & PORTON, 1991; BERTSCHINGER et al., 2008; SEAGER et al., 1984). O controle do tamanho populacional constitui-se em um problema contemporâneo, grande e difícil.

Desta maneira, a contracepção é crucial tanto para o manejo de felinos, mantidos em cativeiro ou em vida livre (LOOPER, 2001; BERTSCHINGER et al., 2008), como para os gatos domésticos.

Os contraceptivos reversíveis disponíveis no mercado, apesar de eficientes, estão associados a efeitos colaterais sérios (LOOPER et al., 2001). Atualmente, experimentos têm sido conduzidos testando vários agentes contraceptivos, porém é possível que um

protocolo ou um fármaco seguro não seja obtido, visto que o contraceptivo ideal deve ser seguro, eficaz e reversível (NETTLES, 1997).

Entre os métodos contraceptivos reversíveis já utilizados em felinos estão os andrógenos (ASA & PORTON, 1991), progestágenos (LOOPER et.al., 2001), melatonina (GIMENEZ et al., 2009) e agonistas do GnRH (MUNSON et. al., 2001).

Os agonistas do GnRH são descritos como alternativa ao uso de progestágenos, que normalmente são associados a efeitos adversos, como crescimento do endométrio e da glândula mamária (KUTZLER & WOOD, 2006). Desta forma, a utilização dos agonistas do GnRH surge como opção nas práticas contraceptivas.

REVISÃO DE LITERATURA

2. Revisão de literatura

2.1. Contracepção

Contracepção, em seu sentido mais amplo, significa a prevenção do nascimento de filhotes, mantendo-se o potencial de fertilização (MUNSON, 2006). Apesar dessa definição, métodos irreversíveis, como as gonadectomias, também são considerados por alguns autores como métodos contraceptivos (ASA & PORTON, 1999; JOHNSTON et al., 2001; HOWE, 2006; JEWGENOW et al., 2006).

A contracepção auxilia no controle da escolha de casais, permitindo a manutenção de grupos familiares e sociais, que ocorrem naturalmente em vida livre. As pesquisas acerca de métodos de controle populacional realizadas em zoológicos e aquários são diretamente aplicáveis ao manejo de populações de vida livre em parques e reservas ao redor do mundo (AZA, 2008). Em lugares como a África, o manejo populacional é essencial, já que espécies como os leões (*Panthera leo*) se reproduzem rapidamente quando não manejadas, levando à depleção das espécies predadas por eles (BERTSCHINGER et al., 2008).

Métodos para o controle da fertilidade dos felinos estão disponíveis na literatura. O centro de pesquisa de programas e base de dados de contracepção de animais selvagens *AZA Wildlife Contraception Center Research Program and Database* monitora e indica os métodos mais apropriados de contracepção. Porém, ainda não existe um consenso acerca dos protocolos padrões e todos os fármacos têm sido utilizados em caráter experimental.

Muitos aspectos devem ser considerados para a escolha do método de controle populacional adequado. A decisão sobre o melhor protocolo deve ser baseada na razão do controle, no grau, na urgência e duração da redução populacional requerida, na dinâmica populacional, na estrutura social, no sistema de acasalamento, no comportamento e endocrinologia reprodutiva da espécie em questão (JEWGENOW et al., 2006). Outro ponto a ser observado na escolha é a taxa aceitável de falha. Múltiplas tecnologias para contracepção são necessária e atualmente poucos produtos demonstram ser suficientemente promissores para serem utilizados (BOWEN, 2008).

2.2. Estratégias reprodutivas

A compreensão das estratégias reprodutivas utilizadas pelas diferentes espécies é importante para que sejam encontrados métodos de manejo populacional apropriados. Existem duas estratégias utilizadas: a estratégia: “r” e a “k” (JEWGENOW et al., 2006).

A estratégia-r é caracterizada pela alta taxa reprodutiva, como no caso dos felinos. O uso do controle da fertilidade é mais efetivo do que o aumento da mortalidade em espécies pertencentes a este grupo. Isto se deve ao fato dessas espécies serem adaptadas à alta mortalidade juvenil, repondo suas perdas pelo aumento da taxa reprodutiva (JEWGENOW et al., 2006).

A estratégia-k é caracterizada por ninhadas pequenas, desenvolvimento juvenil lento e maior longevidade. Para espécies que se enquadram nesta estratégia, como elefantes e girafas, efeitos no crescimento populacional pode ser obtido pela redução da fertilidade ou aumento da mortalidade (JEWGENOW et al., 2006).

O comportamento reprodutivo é um dos fatores determinantes na escolha do procedimento contraceptivo. Em espécies poligâmicas, como os felinos, a contracepção deve ser focada nas fêmeas, pois em machos, só é efetiva, caso 95% dos animais sejam tratados (JEWGENOW et al., 2006). Este fato deve ser considerado em animais de vida livre, pois indivíduos mantidos em cativeiro normalmente são alojados em pares e permanecem com a mesma parceira durante longos períodos, além disso, normalmente os zoológicos e criatórios conservacionistas mantêm a mesma proporção macho/fêmea.

A Instrução Normativa número 175 do IBAMA é a única normativa relacionada ao controle populacional de animais silvestres. Entre várias resoluções, proíbe a reprodução de grandes felinos exóticos (*Panthera spp.*) e regulamenta seu controle populacional, indicando a vasectomia como método contraceptivo para esses animais (IBAMA, 2008).

Este fato é importante já que a necessidade de contracepção existe quando fêmeas co-habitam com indivíduos vasectomizados, devido à manutenção das características sexuais secundárias, libido e comportamento masculino. Caso as fêmeas ciclem normalmente, provavelmente ocorrerá a copula e conseqüente ovulação. A presença contínua do corpo lúteo pode gerar doenças reprodutivas importantes devido à produção de progesterona (ASA, 1999; MCALOOSE et al., 2007). Desta maneira, as fêmeas felinas devem ser submetidas a algum método contraceptivo que impeça a manutenção do ciclo estral e conseqüente ovulação (MUNSON, 2006).

Diversos contraceptivos já foram descritos para felídeos, entre os métodos reversíveis citam-se os andrógenos (ASA & PORTON, 1991; ASA, 1999), progestágenos (ASA & PORTON, 1991; MUNSON et al., 2002), imun contraceptivos (MUNSON, 2006) e análogos do GnRH (MUNSON et al., 2001; BERTSCHINGER et al., 2001). Efeitos colaterais como carcinomas mamários (McALLOOSE et al., 2007), hiperplasia e mineralização endometrial (MUNSON et al., 2002) têm sido observados em decorrência do uso de contraceptivos.

Desta maneira, os contraceptivos ideais devem suprimir a função ovariana sem efeitos esteróide diretamente nos órgãos reprodutivos (MUNSON et al., 2001). Os agonistas do GnRH se enquadram nesta definição e têm sido utilizados com eficácia, segurança e potencial de reversibilidade, tanto para machos quanto para fêmeas (KUTZLER & WOOD, 2006).

2.3. Hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e seus análogos

O GnRH é um hormônio decapeptídeo, liberado de forma pulsátil e que possui meia-vida de apenas 2 a 5 minutos. Pertence ao grupo de neuropeptídios descobertos e isolados inicialmente como fatores de origem hipotalâmica. O GnRH influencia a regulação da síntese e liberação de gonadotrofinas pela pituitária, modulando a gametogênese (SHNEIDER et al., 2006).

Devido a sua alta afinidade para os receptores gonadotróficos, o GnRH é um contraceptivo em potencial, podendo ser utilizado na inibição da atividade reprodutiva pela supressão direta do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal tanto em machos quanto em fêmeas (HERBERT & TRIGG, 2005). Existem três formas de inibição da atividade reprodutiva através do GnRH: imun contracepção (LEVY et al., 2011), antagonistas (STOUT & COLENBRANDER, 2004) e agonistas (MUNSON et al., 2001).

Desde o isolamento e caracterização do GnRH, mais de 3000 análogos foram desenvolvidos, entre agonistas e antagonistas. Os análogos do GnRH são peptídeos similares ao GnRH, mas modificados nos sítios de degradação enzimática, aumentando desta maneira a meia-vida desses compostos (GOBELO, 2007). Todos os análogos do GnRH são susceptíveis à degradação pela peptidase gastrointestinal, sendo requerida assim a sua administração por via parenteral (PADULA, 2005).

Os análogos do GnRH foram inicialmente desenvolvidos para o tratamento de infertilidade, mas paradoxalmente inibiram a reprodução devido à administração pulsátil

não ter sido realizada. Esta descoberta levou a inúmeras indicações incluindo a contracepção e tratamento de várias desordens reprodutivas (FLANAGAN et al., 1997).

A exposição contínua ao GnRH reduz sua secreção, pela regulação dos receptores de GnRH. Este mecanismo tem sido utilizado para obtenção de contracepção reversível (KUTZLER & WOOD, 2006). O tratamento com agonistas do GnRH, inicialmente induz ao aumento das concentrações de LH e FSH, que pode durar vários dias, seguido de um retorno às concentrações basais. A exposição contínua cessa a secreção pulsátil de LH devido à “*down regulation*” dos receptores de GnRH nas células gonadotróficas, levando ao decréscimo na síntese de LH e FSH com conseqüente supressão da função reprodutiva (MUNSON et al., 2001; BERTSCHINGER et al., 2001).

Possivelmente esta dessensibilização dos receptores hipofisários ocorre devido à aceleração da internalização e degradação dos receptores de GnRH, sem que ocorra uma resposta compensatória ou devido ao desacoplamento dos receptores de GnRH ao seu segundo mensageiro intracelular (D’OCCHIO et al., 2000). Teoricamente, outros receptores hormonais presentes nos órgãos reprodutivos podem sofrer dessensibilização devido ao uso contínuo de agonistas do GnRH.

A partir da substituição de dois aminoácidos na cadeia original da molécula do GnRH foram produzidos os chamados superagonistas, que possuem potencia até 200 vezes superior a do GnRH endógeno. Entre os agonistas disponíveis comercialmente estão a buserelina, o leuprolide, o azagly-naferalina e o acetato de deslorelina, cujos nomes comerciais, formulação e rota de administração, dose e potencia relativa estão descritas na Tabela 1 (HERBERT & TRIGG, 2005; GOBELLO, 2007).

O azagly-nafarelina e os acetatos de leuprolide e de deslorelina já foram testados como contraceptivos em gatos domésticos e em algumas espécies de felinos selvagens (PELICAN et. al., 2004; BERTSCHINGER et. al., 2001; BERTSCHINGER et. al., 2008; GUIMARÃES, 2008; RUBION & DRIANCOURT, 2009). Essas substâncias têm sido utilizadas experimentalmente, visto que sua reversibilidade ainda não foi completamente elucidada (MUNSON, 2001; AZA, 2008).

O acetato de deslorelina é um análogo do GnRH de longa duração, inicialmente desenvolvido na Austrália, como indutor da ovulação para éguas. Posteriormente, sua utilização para controle populacional de outras espécies foi estimulada (BERTSCHINGER et al., 2006).

Comercialmente este fármaco está disponível sob a forma de implantes subcutâneos de longa duração, composto por lipídeos e surfactante biológico, liberando cerca de 20µg/24 horas (CARVALHO et al., 2002). Em cães (WIGHT et al., 2001), gatos (MUNSON et al., 2001), e em algumas espécies de felinos selvagens como guepardos (*Acinonyx jubatus*), leões (*Phantera leo*) (BERTSCHINGER et al., 2008), leopardos (*Phantera pardus*) e gato do pé preto (*Felis nigripes*) (BERTSCHINGER et al., 2001), sua eficácia e segurança já foram demonstradas.

TABELA 1: Nomes comerciais, formulação, via de administração, dose e potencia relativa de alguns agonistas do GnRH. Botucatu, 2012.

Agonista	Nome comercial	Potencia	Formulação e rota	Duração (meses)
Azagly-Naferalina	Gonazon [®]	50-100	Implante / subcutâneo	3
Buserelina	Suprefact [®]	15-30	Implante / subcutâneo	3
Acetato de deslorelina	Suprelorin [®]	114-150	Implante / subcutâneo	6-12
Leuprolide	Lupron Depot [®]	15	Microesferas/ intramuscular	1, 3 ou 4

Adaptado de GOBELO, 2007 e HERBERT & TRIGG, 2005

O leuprolide tem sido considerado o análogo do GnRH de escolha para o controle ovariano em mulheres, devido a sua inibição de curta duração do ciclo estral, porém relatos da utilização desse fármaco em felinos são escassos. Sua apresentação é em forma de solução injetável e sua administração por via intramuscular (PELICAN et al., 2006).

O azagly-nafarelina foi desenvolvido inicialmente para indução e sincronização da ovulação em peixes salmonídeos e posteriormente para supressão da função gonadal de cadelas por longo prazo, em forma de implante subcutâneo (EMEA, 2006). Apenas um estudo utilizando este fármaco na contracepção de felinos está disponível na literatura (RUBION & DRIANCOURT, 2009).

2.3.1 Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em felídeos fêmeas

A gata doméstica é fotoperiódica positiva, tendo sua atividade sexual iniciada com o aumento do número de horas luz por dia e a inatividade sexual ocorre quando o

número de horas luz decresce (POPE, 2000). Nas fêmeas de felídeos silvestres, a sazonalidade reprodutiva é também dependente do fotoperíodo (MOREIRA, 2007). Observa-se que essas fêmeas são poliéstrica sazonal, em regiões abaixo e acima dos trópicos (JOHNSTON et al., 2001) e poliéstrica contínua, em regiões próximas à Linha do Equador (SILVA, 2003).

O comportamento sazonal observado na gata e também em outras espécies fotoperiódicas está sob o controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e modulado pela glândula pineal produtora de melatonina. Sinais fotoperiódicos são recebidos pela retina e conduzidos até a glândula pineal, levando à secreção rítmica de melatonina (VERSTEGEN, 1998).

A secreção desse hormônio é proporcional à duração do dia, sendo a maior secreção de melatonina associada à ausência de luz. Com o aumento de luminosidade, há uma inibição da secreção de melatonina, e liberação de GnRH pelo hipotálamo, induzindo a liberação cíclica de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), determinando o crescimento final dos folículos (JOHNSTON et al., 2001).

O FSH é o responsável pelo início do desenvolvimento folicular. Os folículos produzem 17β -estradiol, assim, observa-se no proestro o aumento da concentração de 17β -estradiol circulante. Quando os folículos estão maduros, a secreção desse hormônio aumenta, promovendo as mudanças no comportamento reprodutivo e permitindo a aceitação do macho pela fêmea (CHATDARONG, 2003).

A gata doméstica é caracterizada como espécie ovuladora induzida ou reflexa. O estímulo mecânico do coito estimula a secreção de GnRH (VEHAGE et al., 1976; CUEVA-RÓLON et al., 1994), e este hormônio por sua vez, promove a liberação pulsátil de LH e subsequente ovulação (ROBINSON & SAWYER, 1987). Entretanto, ovulações espontâneas podem acontecer dependendo das condições de alojamento, da proximidade de um macho e, possivelmente, da genética (MATTOS, 2002).

De forma semelhante, ovulações espontâneas foram documentadas em fêmeas de diversas espécies de felídeos selvagens. Geralmente, os aumentos nas concentrações de progestágenos, não induzidos por cópula, são mais frequentes em fêmeas alojadas juntas ou próximas a um macho, ou em respostas individuais específicas a estímulos ainda não identificados de natureza física e/ou psico-social (MOREIRA, 2007).

Se as ovulações ocorrerem, as concentrações de 17β -estradiol decrescem em 2-3 dias e as fêmeas entram na fase do diestro, mas se a ovulação não ocorrer, as concentrações séricas de estrógeno só declinarão em 5-10 dias (VERSTEGEN, 1998). Quando a ovulação não é desencadeada, a gata passa por uma fase de interestro, que compreende o período entre um estro e o proestro seguinte. Esta fase é exclusiva das espécies de ovulação induzida, já a fase de anestro, é caracterizada pelas concentrações basais de progesterona e estradiol séricos (FELDMAN & NELSON, 1996). O interestro e o anestro são as fases do ciclo ideais para o início dos tratamentos contraceptivos, pois minimizam a dose necessária para supressão estral (MUNSON, 2006).

2.3.2 Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em felídeos machos

Assim como nas fêmeas, o GnRH, nos machos, também é liberado em pulsos e atua na hipófise anterior estimulando a liberação de FSH e LH pelas células gonadotróficas. O LH atua de forma indireta, através da secreção da testosterona, enquanto o FSH atua diretamente na espermatogênese (SCHILLO, 2009).

O LH atua nas células de Leydig, regulando a síntese de testosterona que por sua vez realiza um “*feed back*” negativo na liberação de LH. A testosterona é necessária para a espermatogênese e desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, incluindo características comportamentais como a marcação territorial (“*spraying*”), a monta e a agressividade; e físicas, como a presença de espículos penianos em felídeos, e a das jubas nos leões (MUNSON, 2006).

O FSH por sua vez é responsável juntamente com os hormônios andrógenos pelo início e manutenção da espermatogênese, atua nas células de Sertoli induzindo a liberação de inibina, que por sua vez exerce um “*feed back*” negativo na liberação de FSH (SCHILLO, 2009). Desta maneira, o GnRH atua como hormônio modulador da espermatogênese e das características secundárias nos machos.

2.4. Análogos do GnRH na contracepção de felídeos fêmeas

O primeiro relato do uso de implante de acetato de deslorelina em gatas domésticas foi feito por Munson et. al. (2001). Em fêmeas, quando administrados de forma exógena, os agonistas do GnRH sobrepõem o pulso endógeno, inicialmente provocando a foliculogênese e a ovulação, seguida de quiescência ovariana. Os autores utilizaram 6mg/animal e observaram inicialmente a estimulação da liberação do

estradiol, com conseqüente apresentação de sinais de comportamento estral. Isso se deve ao estímulo de liberação do FSH e LH. Posteriormente houve decréscimo do estradiol e as gatas apresentaram quiescência ovariana por 14 meses.

Apesar de ser observada a diminuição nas concentrações séricas de estradiol após tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina, indicando a supressão do FSH em gatas domésticas foi observado em mulheres e vacas que as concentrações séricas de FSH não diminuíram significativamente, indicando uma possível secreção autônoma deste hormônio (SCHEELE et al., 1996; MARQUES FILHO, 2011).

Toydemir et al. (2008) demonstraram que gatas domésticas que receberam implantes de 9,5mg de acetato de deslorelina apresentaram supressão do comportamento estral e secreção de estradiol por 18 meses. Esses resultados demonstraram que implantes subcutâneos de acetato de deslorelina suprimem efetivamente a atividade folicular ovariana em gatas domésticas (MUNSON et al., 2001; TOYDEMIR et al., 2008; TOYDEMIR et al., 2011).

Implantes de acetato de deslorelina, de 3 a 15mg, dependendo do peso corporal, induzem a contracepção por pelo menos um ano em fêmeas de guepardo, leopardo e em leoas (BERTSCHINGER et al., 2001). Leoas que receberam implantes de 9,4mg tiveram a sua atividade reprodutiva suprimida por 31 meses, apresentando após esse período uma retomada do comportamento de estro, porém em apenas uma delas foi demonstrada ovulação após o tratamento contraceptivo. Este é o único relato de ovulação após o uso de acetato de deslorelina como contraceptivo para fêmeas felinas (GUIMARÃES, 2008).

A apresentação de comportamento estral, como observada por Munson et al. (2001) em gatas domésticas, também foi observada após a aplicação do implante em leoas e guepardos fêmea (BERTSCHINGER et al., 2008; GUIMARÃES, 2008). Esse curto período de atividade estral é associado ao pico de estradiol induzido pelo contraceptivo. Conseqüências negativas devido a este fato não foram relatadas (BERTSCHINGER et al., 2008). A aplicação simultânea, em uma leoa, de progestágenos, não foi eficaz em suprimir o comportamento estral (BERTSCHINGER et al., 2001).

A diminuição na agressividade e melhora significativa do aspecto da pelagem de leoas tratadas com acetato de deslorelina foi descrita por Guimarães (2008). O autor atribuiu esta melhora ao fato dos animais economizarem energia, visto que durante longo período não demonstraram comportamento de estro, cópulas ou lutas.

A AZA (2008) recomenda a aplicação de implantes de 4,7mg para contracepção de pelo menos 6 meses e de 9,4mg para 12 meses de contracepção, em felinos selvagens.

A utilização de implante de azagly-nafarelina (Gonazon[®] 20mg) em gatas domésticas foi descrita por Rubion & Driancourt (2009). Após aplicação do contraceptivo os autores observaram inicialmente indução ao estro e ovulação, similar à observada em gatas tratadas com acetato de deslorelina (MUNSON et. al., 2001). Após o período inicial de estimulação ovariana, 100% das gatas apresentaram quiescência ovariana por pelo menos 2,5 anos.

Três anos após o início do tratamento todos os animais foram eutanaziados e o útero e os ovários coletados. Os autores observaram que animais que não haviam recebido o tratamento contraceptivo possuíam ovários maiores e mais pesados que as fêmeas tratadas, 216 ± 63 mg versus 140 ± 80 mg, respectivamente. O diâmetro uterino também apresentou diferença $1,06 \pm 0,54$ cm (grupo não tratado) versus $0,48 \pm 0,24$ cm (grupo tratado). Também foram observadas diferenças entre as fêmeas tratadas, visto que metade delas apresentava atrofia uterina e ovários pequenos e inativos, enquanto a outra metade apresentava útero normal e ovários grandes e com atividade folicular (RUBION & DRIANCOURT, 2009).

Ainda segundo Rubion & Driancourt (2009), o azagly-naferalina promove uma contracepção de longa duração segura e eficaz, porém a reversibilidade é progressiva e assincrônica. Mais estudos são necessários para definir o tempo exato da recuperação da atividade ovariana das fêmeas, bem como a habilidade de manter uma gestação.

O leuprolide foi utilizado em fêmeas de leopardo das neves (*Neofelis nebulosa*) e os resultados indicaram inibição do ciclo estral e depressão da esteroidogênese. Como em felinos existe um efeito dose-dependente, a inibição estral é reversível e a maior dose resulta em fase luteal curta (PELICAN et al., 2004).

Pelican et al. (2006) induziram a ovulação em fêmeas de leopardos nebulosos (*Neofelis nebulosa*) após tratamento com leuprolide (duas injeções de 3,75mg cada), com intervalo de 23 dias entre as aplicações. A resposta observada foi inconsistente e os autores acreditam que o tratamento alterou severamente o ovário, desensibilizando-o ao tratamento com eCG. Este resultado foi surpreendente, visto que esta espécie em particular é conhecida por ser hipersensível à estimulação das gonadotrofinas.

Esse tipo de resposta inconsistente não se restringiu apenas as fêmeas felinas (BERTSCHINGER et al., 2001; MUNSON et al., 2001), sendo observado também em

cadelas (WRIGHT et al., 2001; ROMAGNOLI et al., 2009) e em girafas (*Giraffa camelopardalis*) (PATTON et al., 2006). Quando utilizado em masurpias, foi observado o retorno ao ciclo estral e concepção, com tempo de retorno variando individualmente (EYMANN et al., 2007).

A realização de estudos que visam avaliar, além do retorno do comportamento estral, o retorno da atividade ovariana, ovulação e o aspecto histológico após o tratamento contraceptivo é necessária para elucidar o real potencial de reversibilidade dos agonistas do GnRH.

2.5. Análogos do GnRH na contracepção de felídeos machos

A utilização da contracepção masculina é uma alternativa viável para o controle populacional de espécies felinas mantidas em cativeiro, representando importante papel na preservação da saúde reprodutiva e social das fêmeas (HARRENSTIEN et al., 2004).

Estudos em gatos domésticos machos utilizando agonistas do GnRH como método contraceptivo, são escassos. Apenas um trabalho demonstrou eficácia e segurança do uso de acetato de deslorelina (Suprelorin® 4,7mg/animal) através da avaliação da concentração de testosterona sérica, volume testicular, alteração na ingestão de alimentos, peso corporal e comportamento sexual, antes e durante o tratamento contraceptivo (GOEDRICKE-PESCH et al. 2010).

Goedricke-Pesch et al. (2010) observaram que a concentração plasmática de testosterona aumentou 15,5% dois dias após aplicação do acetato de deslorelina. Posteriormente houve uma redução gradativa mantendo concentrações de 0,1ng/mL por pelo menos seis meses após aplicação do contraceptivo. Também foi observada uma redução de 73,5% do volume testicular após 36 semanas do dia da aplicação do acetato de deslorelina; os autores acreditam que este fato pode significar a supressão da espermatogênese. Contudo, os estudos em gatos domésticos ainda não comprovaram correlação entre o volume testicular e a qualidade seminal (SILVA, 2008).

As espículas penianas e o comportamento sexual, inclusive a marcação territorial através da urina, dos gatos após aplicação de deslorelina é completamente suprimido. Essas modificações são similares às observadas em gatos submetidos à castração cirúrgica, indicando a eficácia da castração hormonal. Quanto às mudanças no peso corporal e ingestão alimentar, apesar de um aumento significativo no apetite dos animais,

não houve diferença no peso corporal antes e durante (2,5 e 7,5 meses após o dia da aplicação do implante) o tratamento contraceptivo (GOEDRICKE-PESCH et. al. 2010).

Apesar dos resultados promissores observados pelos autores, a qualidade seminal não foi observada durante o estudo e 20 dias após aplicação do contraceptivo pelo menos um dos animais ainda era fértil, visto que esse animal foi capaz de fertilizar uma gata resultando em gestação. Assim, estudos são necessários para definir a partir de quanto tempo a eficácia do acetato de deslorelina é obtida.

Apesar dos estudos escassos em gatos domésticos, o tratamento contraceptivo com agonistas do GnRH em felinos silvestres têm sido descritos há pelo menos dez anos.

Segundo Bertschinger et al., (2001), guepardos tratados com implantes de acetato de deslorelina, de 6 ou 12 mg, apresentaram concentrações séricas de testosterona indetectáveis após 4 semanas do início do tratamento até pelo menos 12 meses. Apesar disso, os animais ainda apresentavam alta concentração espermática, que persistiu até pelo menos 12 semanas de tratamento.

Bertschinger et al. (2006) utilizaram implantes de acetato de deslorelina de 4,7; 5,0 e 6,0 mg em 22 guepardos e observaram que quando administrado uma vez ao ano, na dose de 6,0 mg, esse contraceptivo foi capaz de suprimir efetivamente a função testicular de todos os machos por pelo menos um ano. Nas doses de 4,7 e 5 mg, foi observada, em seis machos, a presença de espermatozóides, com motilidade e morfologia alterada, sendo os animais considerados inférteis. Os autores acreditam que essas células espermáticas são produtos remanescentes armazenados no epidídimo após a supressão da espermatogênese.

A redução do volume testicular, entre o primeiro e o segundo ano de tratamento, também foi observada em guepardos. Como o tamanho testicular pode ser utilizado como indicador da atividade dos túbulos seminíferos em outras espécies, os autores sugeriram que esta redução testicular está correlacionada com o declínio da espermatogênese (BERTSCHINGER et al., 2006; BERTSCHINGER et al., 2008).

A supressão efetiva do comportamento sexual e do desenvolvimento dos espículos penianos reflete a eficácia na supressão da síntese da testosterona. Em função dos resultados, o acetato de deslorelina pode ser considerado seguro e viável na supressão da função sexual de guepardos machos, sendo para esta espécie, a dose ótima de 6mg/animal/ano. Como a supressão da fertilidade pode demorar semanas (BERTSCHINGER et al., 2006), caso as fêmeas não estejam sob outro tratamento

contraceptivo, seria indicado a separação das fêmeas e machos até que a supressão espermiática esteja completa.

Em um gato do pé preto (*Felis nigrepes*) que recebeu implante de 3mg de acetato de deslorelina, a diminuição das concentrações séricas de testosterona foi acompanhada da diminuição do volume testicular e produção espermiática, além da regressão das espículas penianas, iniciado já no primeiro mês de tratamento e completada após três meses. Este fato indica que o acetato de deslorelina afeta também as características sexuais secundárias, devido à inatividade temporária das gônadas. Nesse animal, sete meses após o implante do contraceptivo, foi observado o reaparecimento das espículas, porém, até o décimo quinto mês o reaparecimento não estava completo, apesar da produção espermiática, tamanho testicular e testosterona sérica terem retornado aos valores normais (BERTSCHINGER et al., 2001).

Em leões, apesar de inibir a fertilidade e reduzir a agressividade, o tratamento, certamente, resultará na perda da juba, visto que esta é uma característica sexual secundária, dependente da testosterona. É de interesse dos administradores de zoológicos, que os leões não percam sua aparência majestosa, gerada pela presença da juba, e por este motivo evita-se o tratamento com análogos do GnRH (BERTSCHINGER et al., 2006; MUNSON, 2006; BERTSCHINGER et al., 2008).

Pelo menos 35 guepardos machos foram tratados anualmente por até 10 anos sem que fossem observados efeitos colaterais (BERTSCHINGER et al., 2008). Os efeitos colaterais, devido à supressão da testosterona e conseqüente mudança nas características sexuais secundárias e no comportamento sexual, podem ser evitados pelo tratamento com testosterona. Apesar disso, esse tratamento ainda não é justificado para espécies de carnívoros exóticos (JEWGENOW et al., 2006), talvez com exceção apenas dos leões.

Apesar de serem utilizados como contraceptivos reversíveis em felinos (GOEDRICKE-PESCH et al. 2010), o retorno à atividade espermiática e possíveis alterações na histologia testicular não foram elucidadas.

Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do acetato de deslorelina como contraceptivo em felinos domésticos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a eficácia do acetato de deslorelina em suprimir a atividade reprodutiva em gatas domésticas;

Avaliar se a retirada do implante de acetato de deslorelina e posterior aplicação de gonadotrofinas exógenas promovem o retorno à atividade reprodutiva;

Avaliar a taxa de recuperação e viabilidade oocitária após indução de estro e ovulação em gatas domésticas previamente tratadas com acetato de deslorelina;

Avaliar a estrutura histológica dos órgãos reprodutivos de gatas domésticas, previamente submetidas ao tratamento com acetato de deslorelina, após tratamento com gonadotrofinas exógenas;

Avaliar a eficácia do acetato de deslorelina em suprimir a espermatogênese em gatos domésticos;

Avaliar a estrutura histológica testicular e epididimária de gatos domésticos submetidos durante 90 dias ao tratamento com acetato de deslorelina;

Avaliar a recuperação da espermatogênese, 60 dias após término do tratamento com acetato de deslorelina, através de coletas de sêmen e análise histológica, em gatos domésticos.

Capítulo 1:
Uso do acetato de deslorelina na
contracepção de gatas domésticas.

4. Uso do acetato de deslorelina na contracepção de gatas domésticas

Material e Métodos

As condições experimentais obedeceram às normas éticas de utilização de animais em experimentos, adotadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Paulista.

Animais experimentais

Dez gatas adultas, púberes, sem raça definida, com idade de 1 a 3 anos e peso médio de 3kg, foram mantidas no gatil experimental do Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu. Foram mantidas em grupos de cinco animais do mesmo sexo, com acesso a uma área coberta e a um solário durante o dia, sob regime luminoso de 12 horas luz/dia com o mínimo de intensidade de 150 lux, mensurados através de luxímetro. Os animais recebiam ração comercial (Royal Canin Queen 34[®], Descalvado, Brasil) e água *ad libitum*.

Quarentena

Todos os animais permaneceram em quarentena por no mínimo 30 dias, período em que foram diariamente acompanhados clinicamente, desverminados, recebendo uma dose de vacina tríplice e anti-rábica. Caso necessário, os animais eram submetidos à terapia antimicrobiana, antiinflamatória, fluidoterapia e controle de ectoparasitas. Neste período, também foram realizadas ultrassonografias para descarte de animais gestantes ou com eventuais doenças reprodutivas.

Durante a quarentena, as fêmeas foram acompanhadas para determinação das fases do ciclo estral através de citologias vaginais (CV) a cada três dias e observação do comportamento sexual: os sinais de comportamento observados foram: vocalização, patinação de membros posteriores, lordose, lateralização de cauda, tremor e rigidez de corpo e cauda (SILVA, 2003).

Para a realização das CV as fêmeas foram contidas fisicamente e realizada uma limpeza na região da vulva com gaze seca; em seguida, uma escova ginecológica foi introduzida cranialmente ao canal vaginal e rotacionada delicadamente (Figura 1). O material coletado foi transferido para uma lâmina histológica, corado com Panótico

(Panótico rápido LB[®] Laborclin produtos para laboratórios Ltda., Paraná, Brasil) e avaliado em microscópio de luz, utilizando aumento de 200x e/ou 400x. Foram classificadas 100 células de acordo com os critérios apresentados por Johnston et al. (2001).

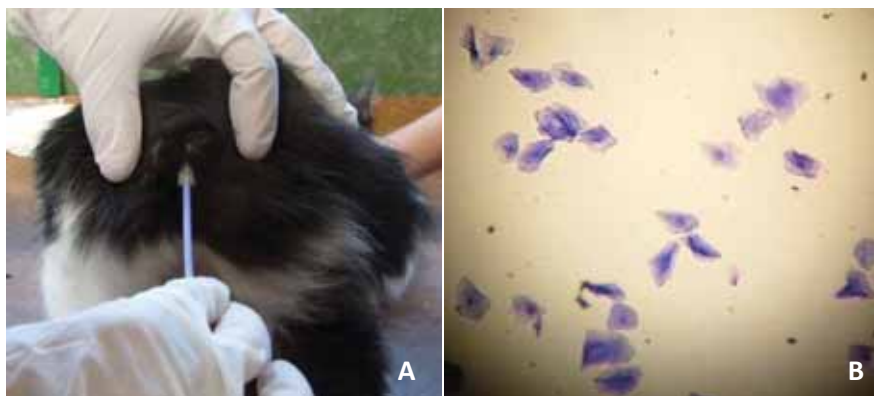


FIGURA 1: **A:** Introdução da escova citológica para realização da citologia vaginal para acompanhamento do ciclo estral. **B:** Lâmina de citologia vaginal, com predomínio de células superficiais, característica de fase de estro. Botucatu, 2012.

Acompanhamento e determinação da fase do ciclo estral e tratamento contraceptivo

Foram realizadas coletas de sangue de todas as fêmeas uma vez por semana três semanas antes do início do tratamento contraceptivo até o dia da ovariossalpingohisterectomia. O sangue foi obtido por punção venosa, centrifugado para separação do plasma, o qual foi transferido para *eppendorfs*, identificado e armazenado em *freezer* (-20°C) até o momento das análises.

Análises hormonais para determinação das concentrações plasmáticas de progesterona em duplicata foram realizadas pela técnica de radioimunoensaio (RIE) no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-campus de Botucatu. A concentração plasmática de progesterona foi realizada através de kit de fase sólida para RIA (Coat-A-Count kit, Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) padronizada para gatos domésticos (SWANSON et al., 1996). O coeficiente de variação intraensaio foi de 6,84% e a sensibilidade foi de 0,0001 ng/mL.

Após o período de quarentena, o ciclo estral continuou sendo acompanhado em todos os animais através de citologias vaginais e observações comportamentais a cada

72 horas. Quando consideradas em fase de interestro/diestro (Tabela 2) as gatas foram submetidas à associação anestésica cloridrato de cetamina (Dopalen[®], Vetbrands do Brasil, Paulínia, Brasil; 15 mg/kg; IM) e xilazina (Xilazin[®], Syntec do Brasil, Cotia, Brasil; 1 mg/kg; IM) e um implante de acetato de deslorelina (Suprelorin[®] Peptech Animal Health Pty Limited, Austrália; 4,7 mg/animal) foi introduzido no tecido subcutâneo da região interescapular.

TABELA 2: Porcentagem de células superficiais observadas na citologia vaginal, concentração de progesterona plasmática e fase do ciclo estral de cada fêmea no momento da aplicação do implante de acetato de deslorelina. Botucatu, 2012.

Animal	Células superficiais (%)	Progesterona (ng/mL)	Fase do ciclo estral
Gata A	8	0,08	Interestro
Gata B	53	24,55	Diestro
Gata C	23	26,82	Diestro
Gata D	9	28,39	Diestro
Gata E	13	0,12	Interestro
Gata F	42	0,22	Interestro
Gata G	8	21,70	Diestro
Gata H	12	20,10	Diestro
Gata I	9	0,03	Interestro
Gata J	52	0,00	Interestro

No 90º dia após a aplicação do implante as fêmeas foram novamente anestesiadas, os implantes foram localizados através de palpação do local de aplicação. Após a localização, foi realizada tricotomia e assepsia local para posterior retirada dos implantes através de incisão da pele.

Indução do estro e ovulação

Dez dias após a retirada do implante o estro e a ovulação foram induzidos através do protocolo: gonadotrofina coriônica equina (eCG) (100 IU; IM) (Novormon[®], Vetrepharm, Canada) e 84 horas após gonadotrofina coriônica humana (hCG) (100 IU; IM) (Vetecor[®], Laboratórios Calier, Spain), ambos aplicados por via intramuscular (VILLAYERDE, 2007).

Recuperação e viabilidade oocitária

Três dias após a indução da ovulação as fêmeas foram submetidas à ovariosalpingohisterectomia (Figura 2). As tubas uterinas e útero foram lavados com PBS (DPBS; Nutricell, São Paulo, SP, Brasil) a 38° C e o líquido recuperado foi observado em lupa estereomicroscópica para identificação e contagem de possíveis oócitos. Os oócitos foram isolados e corados com bisbenzimida (Hoechst 33342) e iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) para avaliação da viabilidade em microscópio de fluorescência Leica® DM LB - filtro azul 535 e 617 nm e foram considerados viáveis aqueles que floresceram em azul. Os corpos lúteos (CL) foram quantificados e para o cálculo da taxa de recuperação oocitária foi utilizada a fórmula: número de oócitos identificados/número de CL x 100.



FIGURA 2: Ovariosalpingohisterectomia realizada em uma gata doméstica previamente submetida a tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina. Botucatu, 2012.

Análise histológica

Para análise de possíveis alterações decorrentes do uso do contraceptivo, os ovários e útero foram avaliados macroscopicamente e amostras desses órgãos fixados em formol a 10%; posteriormente os órgãos foram inclusos em parafina e seções de 5µm cortadas e coradas por hematoxilina-eosina para a realização de exames histológicos, com o auxílio de um microscópio de luz em diferentes aumentos (10x, 20x, 40x e/ou 100x) (BERTSCHINGER *et al.*, 2006).

Análise estatística

Alterações histológicas foram descritas subjetivamente, as concentrações plasmáticas basais foram submetidas a teste de normalidade e posteriormente submetidas ao Teste de Kolmogorov-Smirnov. Os demais resultados estão descritos em forma de média e desvio padrão.

Resultados

No momento da aplicação do implante de acetato de deslorelina cinco fêmeas apresentavam-se em interestro e cinco em diestro (Tabela 2).

Não foram observadas dificuldades na aplicação do acetato de deslorelina (Figura 3) e a sedação previa dos animais permitiu um manuseio seguro, minimizando o desconforto que poderia ser gerado pela agulha utilizada na aplicação do implante (Figura 4). Reações locais, como edema e inflamação decorrentes da aplicação não foram observados, porém uma gata apresentou sinais de piodermatite (Figura 5). Nesta fêmea foi realizada aplicação de antibiótico tópico durante uma semana. Após este período não foram observadas lesões.



FIGURA 3: **A:** Região em destaque: local de aplicação do implante de deslorelina (Suprelorin[®] 4,7mg) nos animais experimentais. **B:** Aplicação do implante de deslorelina (Suprelorin[®] 4,7mg) nos animais experimentais. Botucatu, 2012.



FIGURA 4: Agulha para aplicação subcutânea do implante de deslorelina (Suprelorin[®] 4,7mg) (seta preta). Botucatu, 2012



FIGURA 5: Local da aplicação do contraceptivo da gata **G**, com sinais de piodermatite. Botucatu, 2012

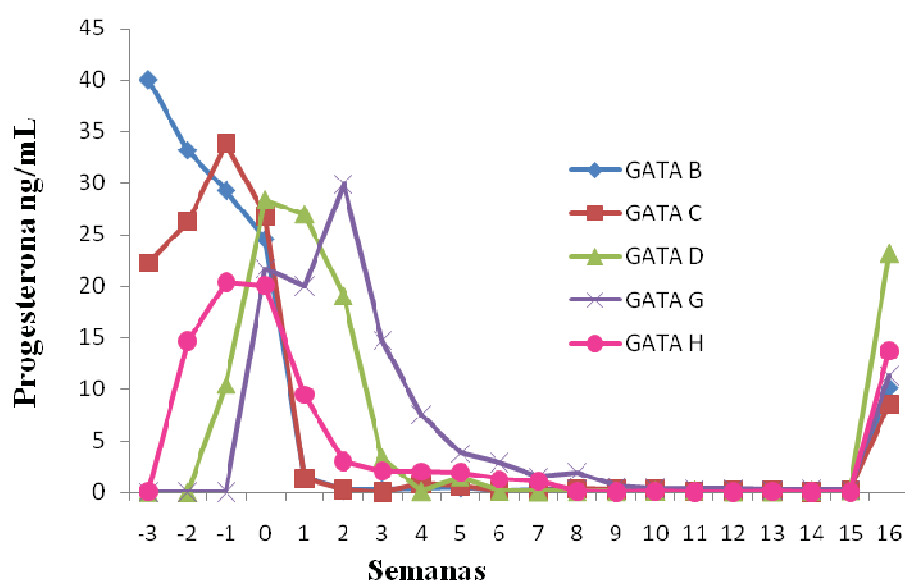


FIGURA 6: Perfil hormonal de progesterona plasmática: 3 semanas antes do tratamento (-3 a -1) e durante o tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (0 a 14) até o dia da ovariectomia (16) de fêmeas que estavam em diestro no início do tratamento contraceptivo. Botucatu, 2012.

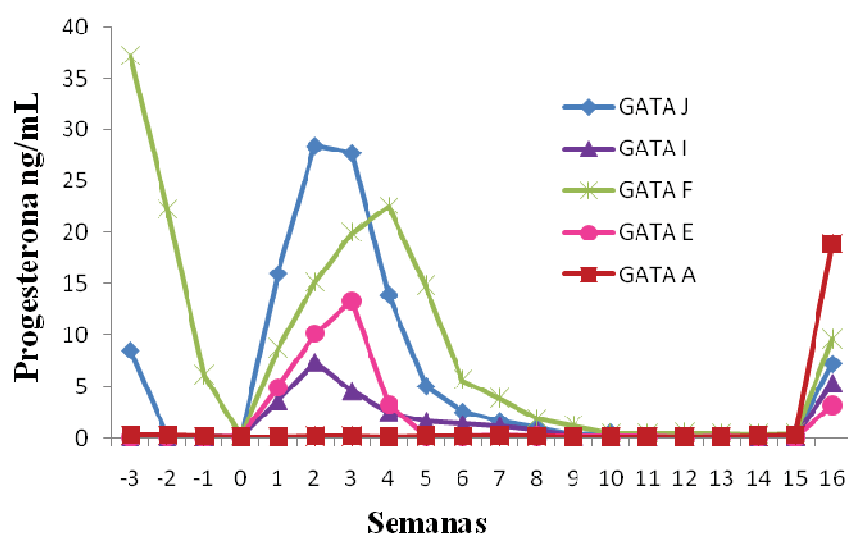


FIGURA 7: Perfil hormonal de progesterona plasmática: 3 semanas antes do tratamento (-3 a -1) e durante o tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (0 a 14) até o dia da ovariectomia (16) de fêmeas que estavam em interestro no início do tratamento contraceptivo. Botucatu, 2012.

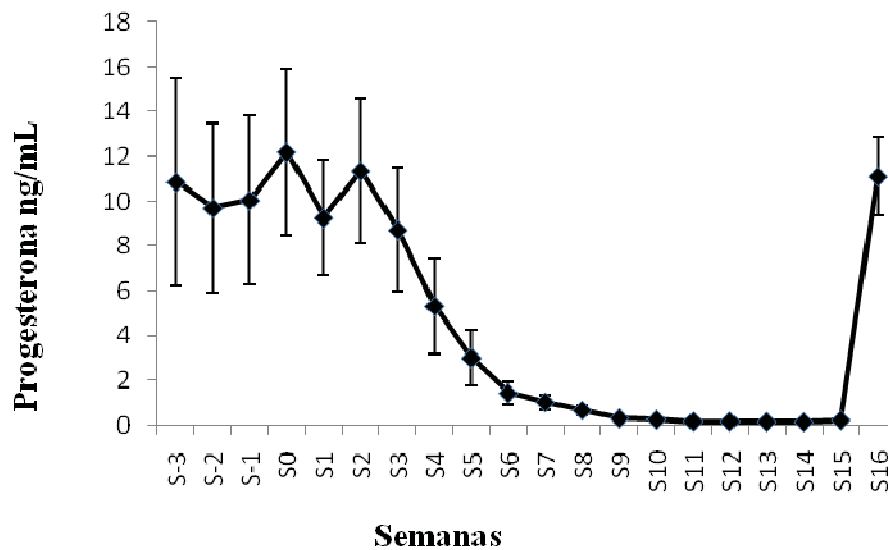


FIGURA 8: Média $\pm$ erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) das 10 fêmeas avaliadas, três semanas (-3, a -1) e durante o tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (0 a 14) até o dia da ovariectomia (16). Botucatu, 2012.

Quatro fêmeas (A, C, F e G) apresentaram CV (Figura 1B) e comportamento característicos de estro $3,75 \pm 2,22$ dias após a aplicação do implante de acetato de deslorelina, durante $3,5 \pm 3,1$ dias.

As fêmeas C e G estavam em diestro no momento da aplicação do contraceptivo (26,82 e 21,7ng/ml respectivamente). Após esse período de estro não foi observado um aumento da concentração plasmática de P4 na gata C (Figura 6) decorrente de eventuais ovulações ocorridas nesse estro, indicando a não ocorrência de CL acessórios. A gata G apresentou um aumento nas concentrações de P4 plasmática após esse período. A gata F ovulou, porém a fêmea A mesmo apresentando sinais de estro não ovulou.

As gatas B e D que estavam em diestro no momento do tratamento não apresentaram sinais de estro após a aplicação dos implantes. Quatro fêmeas (E, F, I, J) que apresentavam-se em interestro no momento da aplicação do contraceptivo (Tabela 2) ovularam após aplicação do acetato de deslorelina (Figura 7).

A fase lútea das fêmeas que estavam em diestro no momento do tratamento e das gatas que ovularam após o implante durou cerca de 6 semanas. Os perfis hormonais de todas as fêmeas, média da concentração de progesterona plasmática três semanas (S -3, -2, -1) antes do início do tratamento (S0) até o dia da ovariectomia (S16), estão descritas na Figura 8.

Nenhuma fêmea ovulou ou apresentou sinais de estro após a primeira semana de tratamento contraceptivo. Após estimulação ovariana inicial gerada pelo tratamento, todas as fêmeas apresentaram CV característica de interestro/diestro durante os 90 dias de tratamento contraceptivo.

A remoção dos implantes de acetato de deslorelina ocorreu sem dificuldades de localização e sem a fragmentação (Figura 9). Dificuldades de cicatrização no local de incisão também não foram observadas.

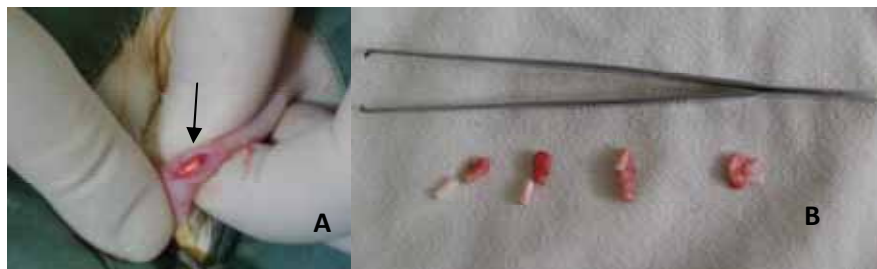


FIGURA 9: **A:** Retirada de um implante (seta preta) de acetato de deslorelina 90 dias após início do tratamento. **B:** Implantes de deslorelina íntegros, retirados após 3 meses de tratamento. Botucatu, 2012.

Todas as gatas responderam positivamente ao protocolo de indução de estro e ovulação apresentando CV e comportamento característicos desta fase do ciclo estral e 100% das fêmeas ovularam, sendo quantificados em média $13,1 \pm 5,5$ CL (Figura 10).



FIGURA 10: CL (seta preta) de uma gata tratada previamente com acetato de deslorelina e após indução do estro e ovulação com eCG e hCG. Botucatu, 2012.

A concentração plasmática média de P4 após ovulação espontânea, após ovulação induzida pelo tratamento contraceptivo e após ovulação induzida pelo tratamento com gonadotrofinas exógenas estão descritas na Tabela 3. A média das concentrações basais de P4 antes e após o tratamento contraceptivo está descrita na Tabela 4.

TABELA 3: Média $\pm$ desvio padrão da concentração plasmática de P4 após ovulação espontânea (antes do tratamento contraceptivo), após ovulação induzida pelo tratamento contraceptivo, após ovulação induzida pelo tratamento com gonadotrofinas exógenas. Botucatu, 2012.

Ovulação	Concentração plasmática P4ng/mL
Espontânea (pré-tratamento)	9,42 $\pm$ 8,75
Induzida por acetato de deslorelina	16,75 $\pm$ 12,84
Induzida por gonadotrofinas exógenas (eCG e hCG)	11,11 $\pm$ 6,11

TABELA 4: Média $\pm$ desvio padrão da concentração plasmática basal de P4 antes e depois do tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina. Botucatu, 2012.

Momento	Concentração plasmática P4	Valor de p
Antes do tratamento contraceptivo	0,10 $\pm$ 0,07 ^a	0,0007
Após tratamento contraceptivo	0,22 $\pm$ 0,21 ^b	

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Foram recuperados em média 8,1 $\pm$ 5,5 oócitos por gata e a taxa de recuperação oocitária média foi de 56,76% $\pm$ 25,42. Todos os oócitos recuperados foram considerados viáveis. Apesar de serem mantidas em gatil sem contato direto com machos, em uma fêmea foram recuperados três embriões (dois de duas células e um de quatro células), além de dois oócitos (Figura 11).

Não foram observados efeitos adversos provenientes do tratamento contraceptivo. Porém uma fêmea apresentou aumento da cadeia mamária esquerda, 20 dias após o implante (Figura 12). Foi realizada uma citologia por agulha fina na região e diagnosticado carcinoma mamário. A mastectomia da cadeia mamária afetada foi realizada. Essa fêmea foi adotada após o termino do estudo e está sendo acompanhada. Até o momento não foi observado o surgimento de outras massas tumorais.

No exame histológico foi observada a presença de folículos primordiais, primários, secundários, terciários, CL (Figura 13) e CL hemorrágicos nos ovários. Alguns animais (gatas **A**, **B**, **F** e **I**) apresentam corpos lúteos atrésicos, CL cavitários preenchidos por eritrócitos e fibrina (gatas **A**, **G** e **J**), ausência de folículos primários e secundários (gata **D**) ou cistos revestidos por epitélio pavimentoso em região medular (gata **F**) (Figura 14).

Nas secções histológicas de útero foi observado endométrio revestido por epitélio cúbico simples (luminal) e colunar simples (glandular), com moderada quantidade de glândulas retas; algumas glândulas exibiram tortuosidade discreta (gata **E**) ou dilatação cística (gatas **D**, **J**) (Figura 15); algumas glândulas estavam preenchidas por neutrófilos degenerados ou apresentavam neutrófilos intra-epiteliais (gata **H**). Com exceção de três fêmeas (gatas **A**, **D**, **E**), as demais exibiam raros linfócitos periglandulares ou intraepiteliais. Na lâmina própria-submucosa havia hemorragia (Figura 16) em graus variados sendo que em uma fêmea (gata **J**) essa hemorragia estendia-se até a transição com o miométrio; também foram observados neutrófilos e eosinófilos (gatas **E** e **H**) e neutrófilos em marginação (gatas **A** e **E**). O miométrio e perimétrio não apresentavam alterações.

Em todas as fêmeas, as secções histológicas de oviduto (Figura 17) estavam revestidas por epitélio pseudo-estratificado colunar intermitentemente ciliado; em duas fêmeas (gatas **E** e **H**) houve marcada palidez citoplasmática. Na lâmina própria-submucosa havia raros linfócitos e plasmócitos, raros focos hemorrágicos (gata **E**), edema marcado (gatas **A** e **H**), raros neutrófilos (gata **H**) e neutrófilos em marginação (gatas **B**, **C**, **E**, **I**, **J**). As camadas muscular e serosa não apresentavam alterações.

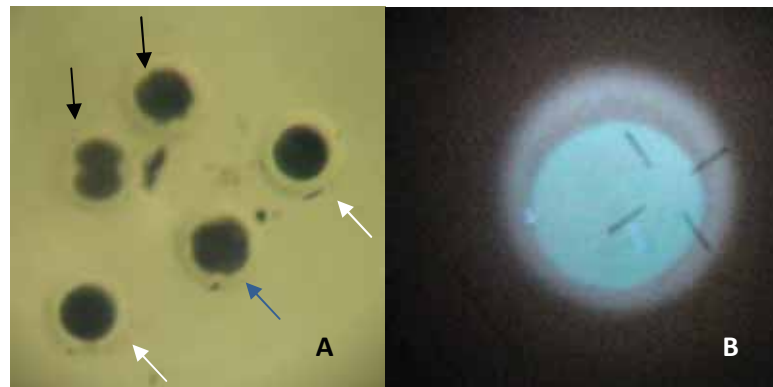


FIGURA 11: **A:** Oócitos (seta branca), embriões de duas células (seta preta) e embrião de quatro células (seta azul) recuperados de uma gata previamente tratada com acetato de deslorelina, após indução de estro e ovulação com eCG e hCG. **B:** Oócito viável corado bisbenzimidazol (Hoechst 33342) e Iodeto de Propídeo (Sigma-Aldrich). Botucatu, 2012.



FIGURA 12: Aumento mamário observado na fêmea G. Botucatu, 2012.

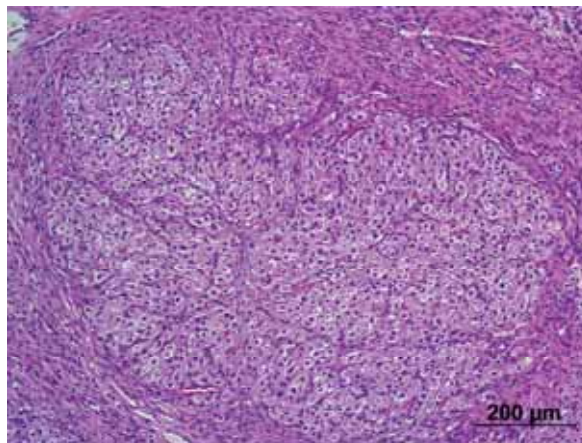


FIGURA 13: Corpo lúteo maduro, após indução de estro e ovulação com gonadotrofinas exógenas em gata doméstica previamente tratada com acetato de deslorelina (aumento de 100x). Botucatu, 2012.



FIGURA 14: Folículo de Graaf (oócito – seta preta) após indução de estro e ovulação com gonadotrofinas exógenas em gata doméstica previamente tratada com acetato de deslorelina (aumento de 50x). Botucatu, 2012.

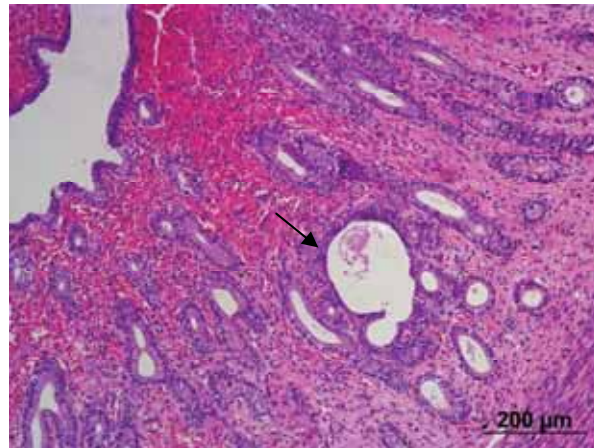


FIGURA 15: Presença de glândula endometrial cística (seta preta) em tuba uterina após indução de estro e ovulação com gonadotrofinas exógenas na gata **J**, previamente tratada com acetato de deslorelina (aumento de 100x). Botucatu, 2012.

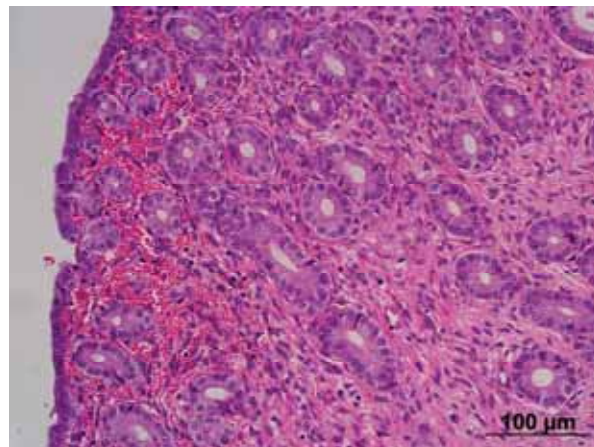


FIGURA 16: Presença de hemorragia entre as glândulas endometriais em tuba uterina após indução de estro e ovulação com gonadotrofinas exógenas em gata doméstica previamente tratada com acetato de deslorelina (aumento de 200x). Botucatu, 2012.

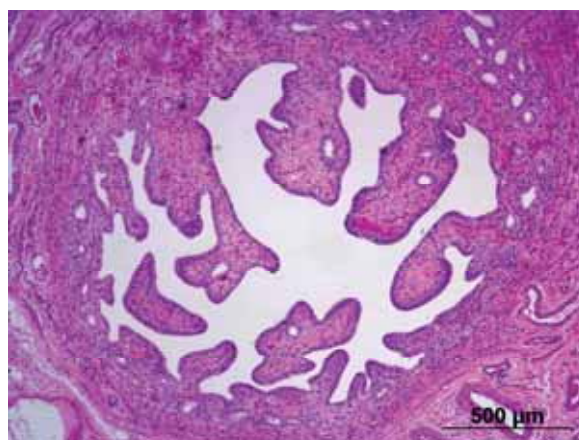


FIGURA 17: Aspecto histológico do oviduto após indução de estro e ovulação com gonadotrofinas exógenas na gata **B**, previamente tratada com acetato de deslorelina (aumento de 50x). Botucatu, 2012.

Discussão

No presente trabalho o acetato de deslorelina suprimiu eficientemente o ciclo estral de gatas domésticas e após 90 dias de tratamento contraceptivo foi observado o retorno induzido da atividade ovariana através da indução do estro e ovulação, permitindo a recuperação de oócitos viáveis.

No momento da aplicação do contraceptivo, 50% das fêmeas estavam em diestro. As gatas domésticas são ovuladoras induzidas, ou seja, necessitam do estímulo mecânico do coito, ou similar ao coito para que a ovulação ocorra (VEHAGE et al., 1976; CUEVA-RÓLON et al., 1994). Porém, existem relatos na literatura de gatas que ovulam espontaneamente. Autores relatam taxas de ovulação espontânea de até 35% (LAWLER et al., 1993), aumentando em fêmeas jovens e que vivem em grupos (GUDERMUTH et al., 1997).

Ackermann et al., (2010), relataram que a estimulação vaginal através da escova citológica no momento da citologia pode ser um fator que predisponha à ovulação espontânea. Provavelmente a estimulação gerada durante os exames de citologia vaginal a cada três dias realizados em nosso trabalho, bem como o estímulo social foram os responsáveis pela alta taxa de ovulação espontânea.

Após a aplicação dos implantes as gatas não exibiram sinais de dor ou desconforto, apesar de reações locais como edema e inflamação já terem sido relatados por 3 a 5 dias após aplicação de implantes de agonistas do GnRH em gatas doméstica (HEBERT & TRIG, 2005; TOYDEMIR et al., 2011). A piodermatite observada em única gata parece estar relacionada à tricotomia e assepsia local e não à aplicação do contraceptivo, lesões similares também foram descritas por Toydemir et al. (2011).

Os implantes foram facilmente palpáveis após 90 dias de tratamento e a remoção foi realizada com facilidade, sem dor ou desconforto. A remoção de implantes de agonistas de GnRH sem dificuldades já foi descrita anteriormente em cadelas (RUBION et al., 2006; PELICAN et al., 2008; WALTER et al., 2011).

Diversos sítios de aplicação dos implantes têm sido descrito em diferentes espécies. Fontaine et al. (2011) aplicou implantes de deslorelina na região pós-umbilical de cadelas, considerando mais fácil a localização e remoção quando comparada à mucosa vestibular. Tanto na região interescapular quanto na pós-umbilical, não foram observadas diferenças na dificuldade de aplicação, localização e remoção, bem como de

liberação do agonista de GnRH (KUTZLER et al., 2009). Desta maneira a região interescapular também pode ser utilizada como sítio de aplicação de implantes, pela facilidade de introdução e remoção.

A estimulação ovariana observada logo após o início do tratamento contraceptivo já era esperado e foi descrito por diversos autores que utilizaram agonistas do GnRH como tratamento contraceptivo em felinas domésticas e selvagens (MUNSON et al., 2001; BERTSCHINGER et al., 2008; TOYDEMIR et al., 2008; ACKERMANN et al., 2011).

Munson et al. (2001) observou estro em 100% das fêmeas após tratamento com acetato de deslorelina. Já em nosso trabalho CV e comportamento característico de estro foram observados em apenas 40% das fêmeas, durante um período de $3,5 \pm 3,1$ dias. Achado similar foi observado por Pelican et al. (2006), cujos leopardos nebulosos fêmea apresentaram estro com duração média de 5,2 dias após aplicação de agonista do GnRH (Leuprolide).

A duração do estro observado em nosso estudo, após o tratamento contraceptivo, é normal para a espécie. Gatas não submetidas a tratamentos hormonais podem apresentar comportamento e CV de estro por $4,4 \pm 1,6$ dias após cópula e durante $7,4 \pm 4,4$ dias caso não ocorra o coito (ROOT et al., 1995). Não foram observados estros persistentes em gatas domésticas após o tratamento com acetato de deslorelina, porém em cadelas, estros persistentes associados a cistos foliculares já foram descritos (ARLT et al., 2011).

Das quatro fêmeas que ovularam (**E, F, I, J**) após tratamento contraceptivo, três não demonstraram sinais de estro. Apesar de altas concentrações plasmáticas de E2 nem todas as fêmeas em estro demonstram sinais característicos de cio, explicando assim a ausência de sinais de estro em algumas fêmeas que ovularam após o tratamento contraceptivo (GRAHAM et al., 2000).

Como as fêmeas foram mantidas em gaiolas sem contato direto com machos não foi observado o comportamento de aceitação da monta. Bertschinger et al., (2001), observaram comportamento estral em leas e guepardos fêmeas um a dois dias após aplicação de implantes de acetato de deslorelina, porém sem cópulas. Guimarães (2008) obteve resultado similar e acredita que o fato das fêmeas não aceitarem a cópula se deve às concentrações de estradiol serem insuficientes para desencadear a receptividade, mas serem suficientes para desencadear a proceptividade.

Em cadelas em anestro, foi observada uma taxa de 100% de ovulação após aplicação de implantes de deslorelina (FONTAINE et al., 2011). Estudos objetivando a prevenção do estro logo após o tratamento com agonistas do GnRH já foram realizados em cadelas utilizando associação de um antagonista do GnRH (aciclina 330 mg/kg) no momento do tratamento com o análogo (acetato de deslorelina 10mg/animal), ainda assim 75% dos animais tratados ovularam (VALIENTE et al., 2009).

A aplicação de agonistas do GnRH durante o diestro tem sido indicada em cadelas a fim de evitar a estimulação inicial gerada pelo tratamento contraceptivo (WRIGHT et al., 2001). A aplicação simultânea, em uma leoa, de progestágenos também não suprimiu o comportamento estral inicial (BERTSCHINGER et al., 2001). Em nosso estudo apenas uma fêmea que recebeu o implante durante o diestro apresentou CV e comportamento característicos de estro. Segundo Windle (1939), gatas em diestro, podem apresentar comportamento de estro e aceitação da monta.

Em um estudo mais recente, Toydemir et al. (2011) associaram acetato de megestrol ao acetato de deslorelina na tentativa de prevenir o estro em gatas domésticas. Apesar de não terem sido observados comportamento de estro e de monta nas fêmeas que receberam esta associação, todas as fêmeas apresentaram aumento nas concentrações séricas de estrógeno.

Como ainda não existem protocolos eficazes para inibição da estimulação ovariana inicial gerada pelo tratamento contraceptivo, é recomendável manter as fêmeas pelo menos 20 dias sem contato direto com machos da mesma espécie.

Em nosso estudo quatro das cinco fêmeas que estavam em diestro no momento da aplicação do contraceptivo apresentaram diminuição da concentração plasmática de P4 após o início do tratamento, porém, o tempo de duração da fase lútea nessas gatas foi normal para a espécie. Segundo Paape et al. (1975) a pseudogestação em gatas pode durar de 30 a 73 dias.

Graham et al. (2000), observou que gatas que foram submetidas a protocolo de indução de estro e ovulação apresentam fase lútea prolongada quando comparada à fase lútea de estro natural: $40,4 \pm 0,8$ versus $33,4 \pm 1,3$ dias. Esses mesmos autores relataram que a concentração de progesterona foi similar em fases lúteas de gatas em estro natural ou induzido, indicando que os CLs são funcionalmente comparáveis.

Não foi possível comparar a concentração plasmática de P4 entre as fêmeas que ovularam espontaneamente antes do tratamento com acetato de deslorelina, entre as que

ovularam após o tratamento com acetato de deslorelina e entre as que ovularam após tratamento com eCG e hCG, visto que não foram coletadas amostras durante todo o período luteal.

Não foram observadas falhas na fase luteal nas fêmeas que ovularam induzidas pelo tratamento com acetato de deslorelina. Em cadelas falhas luteais após o uso deste agonista do GnRH têm sido descritas e são responsáveis por abortos no terço final da gestação nestas espécies. Porém como ainda não foram relatadas gestações em felinos após o uso de contraceptivos a base de agonistas do GnRH e gatas pseudogestantes possuem fase lútea naturalmente mais curta que fêmeas gestantes, não se sabe se isto ocorre em gatas.

Em cadelas tratadas com acetato de deslorelina foi observada diminuição da concentração sérica de progesterona após a metade da fase luteal, e mesmo após aplicação de hCG não foi observada a manutenção do CL, sugerindo que os abortos relatados após o uso de acetato de deslorelina podem ter sido induzidos por uma falha luteal gerada pela utilização deste agonista (WRIGHT et al., 2001).

Fontaine et al. (2011) evitaram falhas luteais em cadelas gestantes que receberam tratamento com acetato de deslorelina através da suplementação com progestágenos, permitindo a manutenção da gestação até o momento do parto. Os autores sugerem que fêmeas gestantes que apresentam concentração plasmática de progesterona inferior a 10ng/mL sejam submetidas à suplementação.

O controle dos CLs nas diversas espécies ainda gera muitas dúvidas. Sabe-se que o LH não é o hormônio primário envolvido na manutenção do CL em gatas domésticas e que provavelmente a prolactina seja a responsável (PELICAN et al., 2008). Assim, estudos que avaliem as gestações após tratamento com agonistas do GnRH são importante para observação dessas possíveis falhas luteais e até mesmo para melhor compreensão da fisiologia do CL nessa espécie.

Apesar da diferença estatística observada entre as concentrações plasmáticas basais de P4 antes e depois do tratamento contraceptivo, os valores obtidos são similares ao descrito por Verhage et al. (1976), que observaram em gatas em interestro concentração plasmática variando entre 0,19 e 0,85ng/mL.

A supressão reprodutiva foi observada em todas as fêmeas após 20 dias do tratamento contraceptivo, indicando que o acetato de deslorelina suprime eficazmente a atividade ovariana e pode ser utilizado como contraceptivo em gatas domésticas. Este

resultado foi similar ao obtido por Munson et al. (2001), Toydemier et al. (2008) e Ackermann et al. (2011).

A utilização de gonadotrofinas exógenas como indutores de estro e ovulação em gatas domésticas e selvagens tem sido descrita com sucesso (PELICAN et al., 2006). Goodrowe et al. (1986) observaram que gatas domésticas submetidas à indução do estro e ovulação possuíam em média $9,4 \pm 0,9$ CL. Esses mesmos autores relatam que fêmeas que ovularam após cópula em estro natural possuíam em média $5,3 \pm 0,5$ CL.

Em nosso estudo a ovulação ocorreu em todas as fêmeas após a retirada do contraceptivo e subsequente tratamento com gonadotrofinas exógenas. O protocolo de indução utilizado gerou uma super-ovulação nas gatas tratadas, e a média de CL quantificados foi maior do que a já descrita na literatura para super-ovulações em gatas domésticas (GOODROWE et al.; 1986).

O aumento no número de ovulações observado em nossos animais pode ter ocorrido devido à supressão da atividade cíclica antes da estimulação por gonadotrofinas exógenas. Este mecanismo tem melhorado o sucesso na reprodução assistida em diversas espécies, inclusive em gatos domésticos. Acredita-se que um ovário quiescente estimulado por gonadotrofinas exógenas tem maior probabilidade de responder a um tratamento de indução de ovulação com número previsível de ovulações (PELICAN et al., 2006).

Apesar de estudos relatarem a utilização de agonistas do GnRH como contraceptivo reversível, poucos demonstram claramente a reversibilidade destes agonistas. Munson et al. (2001) descreveram o retorno da atividade reprodutiva em gatas domésticas como irregular.

Pelican et al. (2006), utilizou, em leopardos nebulosos fêmea (*Neofelis nebulosus*), o acetato de leuprolide, um agonista do GnRH com potencia menor que o acetato de deslorelina e observaram que apenas uma das sete fêmeas responderam positivamente ao tratamento de indução da ovulação. Os autores acreditam que ocorreu uma importante dessensibilização ovariana, provavelmente nos receptores de FSH das células da granulosa, visto que a espécie em questão é particularmente hipersensível ao tratamento com gonadotrofinas exógenas.

Ackermann et al. (2011), utilizaram acetato de deslorelina em duas gatas domésticas durante 60 dias e após este período os implantes foram retirados e o retorno espontâneo do estro foi observado após 42 dias. Os autores acreditam que o retorno da

atividade reprodutiva de forma espontânea pode ter sido dose-dependente. No mesmo experimento outras duas fêmeas também foram submetidas ao tratamento contraceptivo e tiveram seu estro e ovulação induzidos e o número de CL contados. O número de CLs quantificados foi semelhante aos obtidos em nosso experimento indicando que apesar do período de tratamento mais longo (90 dias) não foi observada dessensibilização ovariana ao tratamento com gonadotrofinas exógenas.

Em nosso estudo todos os oócitos foram recuperados das tubas uterinas. Graham et al. (2000) acreditam que a estimulação de gonadotrofinas exógenas pode resultar em ambiente endócrino materno anormal e consequentemente retardar o transporte embrionário ao útero. Isto não pode ser confirmado visto que os oócitos foram recuperados três dias após indução da ovulação e a recuperação uterina só pode ser feita a partir do 5º dia após ovulação (SWANSON et al., 1994).

A taxa de recuperação oocitária foi similar a taxa de recuperação embrionária após uso de gonadotrofinas exógenas descrita por Graham et al. (2000) (52,5%) e Goodrowe et al. (1986) (57,02%), indicando que o tratamento não altera a taxa de recuperação. Pelican et al. (2006) obteve após o tratamento contraceptivo com agonista do GnRH uma taxa de 42,9% de ovulação, similar ao observado em nosso trabalho.

Apesar dos animais experimentais permanecerem durante todo o período de tratamento em um gatil sem contato direto com machos, recuperação embrionária foi observado em uma gata. Acreditamos que isso ocorreu devido à ativação oocitária espontânea. Este fenômeno foi descrito por Grabiec et al. (2007) e Rascado et al. (2010), com taxas de partenogênese variando de 2 a 35,5%.

Este é o primeiro relato de recuperação oocitária e embrionária após tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina em gatas domésticas. Mais estudos devem ser conduzidos a fim de elucidar se a duração do tratamento interfere ou não na viabilidade e na taxa de recuperação oocitária, bem como no potencial de desenvolvimento embrionário destes oócitos.

Nenhum efeito colateral foi atribuído ao uso do acetato de deslorelina como contraceptivo em gatas domésticas (MUNSON et al., 2001; TOYDEMIER et al., 2008; RUBION & DRIANCOURT, 2009). Leas tratadas repetidamente por 10 anos com acetato de deslorelina também não apresentaram efeitos no comportamento social, na saúde e peso corporal (BERTSCHINGER et al., 2001).

Tumores mamários em fêmeas felinas têm sido descritos após uso prolongado de contraceptivos a base de progestágenos (MCALOOSE et al., 2007). Os agonistas do GnRH não possuem ação similar aos progestágenos e não parece haver relação com o surgimento da massa tumoral observada em uma gata após o tratamento com acetato de deslorelina. Um aspecto importante a ser considerado é a falta de histórico da maioria das fêmeas, assim, possivelmente tratamentos anteriores que influenciam o aparecimento de massas tumorais, podem ter sido realizados.

Toydemir et al. (2011) descreveram os ovários e útero de fêmeas tratadas com acetato de deslorelina por 18,5 meses. No ovário destas fêmeas não foram observados CLs ou folículos maduros, confirmando a ausência de atividade ovariana. Os autores descreveram os ovários como sendo similar ao de fêmeas jovens, com presença de folículos primários e primordiais. Diferentemente do que observamos em nosso trabalho, apesar de que o retorno da atividade ovariana foi induzido através do uso de gonadotrofinas exógenas.

A histologia dos ovários foi similar a descrita em fêmeas em fase luteal (CHATDARONG et al., 2005; MONTEIRO et al., 2005). A presença de cistos foliculares observada em algumas gatas já foi descrita anteriormente após o uso de gonadotrofinas para indução da ovulação (GOODROWE & WILDT, 1987).

A histologia uterina de gatas domésticas em diferentes fases do ciclo estral e após tratamento com progestágenos e agonistas do GnRH já foi descrita (CHATDARONG et al., 2005; MONTEIRO et al., 2005; TOYDEMIER et al., 2011). Toydemier et al. (2011) caracterizaram o útero de gatas domésticas após tratamento com acetato de deslorelina como atróficos e com diminuição no número de glândulas endometriais. Em nosso estudo, as características histológicas relacionadas à presença de glândulas endometriais esta de acordo com o descrito para a espécie durante a fase folicular e luteal, essa diferença de resultados pode ter ocorrido pelo tempo de tratamento contraceptivo curto ou devido à estimulação das gonadotrofinas exógenas utilizadas para indução do estro e ovulação.

Em duas fêmeas foi observada a presença de glândulas endometriais císticas. Este achado foi descrito em fêmeas multíparas (MONTEIRO et al., 2005), tratadas previamente com progestágenos (CHATDARONG et al., 2005) e com acetato de deslorelina (TOYDEMIER et al., 2011). Isoladamente, formações glandulares císticas não parecem ter significado clínico, porém, quando em grande número caracterizam a

existência de hiperplasia endometrial cística que é um fator predisponente da piometra (OLIVEIRA, 2007).

Foi observada presença de hemorragia na lamina própria em todos os úteros e em alguns ovidutos (gatas **C**, **E** e **I**). Esse achado não foi descrito em nenhuma das fases do ciclo estral, nem após o tratamento contraceptivo com progestágenos e agonistas do GnRH. Acreditamos que isso possa ter ocorrido devido à estimulação excessiva e consequente aumento da concentração de estrógeno gerada pela indução do estro pelas gonadotrofinas exógenas, visto que em cadelas hemorragia na lamina própria é comum à fase de estro devido ao aumento das concentrações estrogênicas.

Capítulo 2:
Uso do acetato de deslorelina na contracepção de
gatos domésticos

5. Uso do acetato de deslorelina na contracepção de gatos domésticos

Material e Métodos

As condições experimentais obedeceram às normas éticas de utilização de animais em experimentos, adotadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Paulista.

Animais experimentais

Cinco gatos adultos (**A, B, C, D e E**), púberes, sem raça definida, com idade de 2 a 3 anos e peso médio de 4kg, foram mantidos em gaiolas individuais no gatil experimental do Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu (Figura 18), com acesso a uma área coberta e a um solário durante o dia, sob regime luminoso de 12 horas luz/dia com o mínimo de intensidade de 150 lux. Os animais recebiam ração comercial (Royal Canin Queen 34[®]) e água *ad libitum*.



FIGURA 18: Gatil experimental do Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu. Botucatu, 2012.

Quarentena

Todos os animais permaneceram em quarentena por no mínimo 60 dias, período em que foram diariamente acompanhados clinicamente, desverminados, recebendo uma dose de vacina tríplice e anti-rábica. Caso necessário, os animais eram submetidos à terapia antimicrobiana, antiinflamatória, fluidoterapia e controle de ectoparasitas.

Após o período de quarentena estabelecido, foram realizadas duas avaliações andrológicas, com intervalo de um mês entre elas.

Exame andrológico

Para realização dos exames andrológicos os animais foram inicialmente submetidos a jejum alimentar e hídrico por 12 horas. Posteriormente, os animais foram anestesiados através da associação anestésica cloridrato de tiletamina e zolazepam (15 mg/Kg - Zoletil[®], Brasil) associado à cloridrato de tramadol (2 mg/Kg - Sylador[®], Sanofi Synthelabo Ltda[®], Brasil) via IM, e posterior manutenção com anestesia inalatória utilizando isoflurano (Isofurane[®], Critália, Brasil) diluído em oxigênio.

Quando em plano anestésico satisfatório, a genitália externa (testículos, prepúcio e pênis) foi limpa e seca, e então foi procedida aferição do volume testicular com paquímetro (comprimento x largura x altura em cm) (Figura 19A). A fórmula utilizada para obtenção do volume testicular (cm³) foi a descrita por Wildt (1983): $VT=CxL^2x0,524$.

O pênis foi exposto para verificação do aspecto, tamanho (aferição através de paquímetro) e presença ou ausência de espículas penianas, sendo classificadas em grau de 0 (ausência) a 3 (tamanho de aproximadamente 0,75mm) (Figura 19B) (MORAIS et al., 2002).



FIGURA 19: **A:** Aferição do volume testicular, através de paquímetro, durante avaliação andrológica. **B:** Verificação do aspecto e grau de espículas durante avaliação andrológica. Botucatu, 2012.

Para a coleta de sêmen dos animais a eletroejaculação (EEJ) foi o método de coleta escolhido. Para tanto, foi utilizado um eletroejaculador portátil (Eletrojet[®] - Electrovet[®], Brasil), acoplado a uma sonda trans-retal (13 x 1 cm). A sonda,

previamente lubrificada com gel inócuo à base de um polímero carboxivinílico, foi introduzida cerca de 5 a 7 cm no reto dos animais com os eletrodos voltados para o assoalho da ampola retal. Foram aplicados 80 estímulos elétricos divididos em 3 séries (Quadro 1). O ejaculado de cada série de estímulos foi coletado em tubos plásticos de 1,5 mL (WILDT et. al., 1983).

Após cada série de estímulos elétricos o sêmen obtido foi mantido em banho-maria a 38° C para formar um *pool* espermático ao final da cada coleta. Após formação do *pool*, o volume seminal foi aferido através de pipetas graduadas e posteriormente o movimento espermático foi avaliado pelo método de CASA (Computer Assisted Semen Analysis), utilizando o sistema HTR-IVOS-10 (Hamilton Thorn Research – Animal Version 12,0 L, EUA), previamente ajustado para o sêmen de gato (Anexo 1). As variáveis analisadas pelo sistema estão descritas no Quadro 2.

QUADRO 1: Protocolo de estímulos elétricos aplicados para a coleta de sêmen dos animais experimentais. Botucatu, 2012.

Série	Estímulos elétricos
1ª série	2(10x), 3(10x), 4(10x)V
Intervalo 5 minutos	-
2ª série	3(10x), 4(10x), 5(10x)V
Intervalo 5 minutos	-
3ª série	5(10x),6(10x)V

QUADRO 2: As variáveis analisadas pelo sistema HTR-IVOS-10. Botucatu, 2012.

Variável	Sigla
Motilidade total (%)	MT
Motilidade progressiva (%)	MP
Velocidade espermática ao longo da trajetória real (µm/s)	VCL
Velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (µm/s)	VAP
Velocidade espermática ao longo de uma linha reta (µm/s)	VSL
Linearidade (%)	LIN
Índice retilíneo (%)	STR
Deslocamento lateral da cabeça (µm)	ALH
Frequência de batimento flagelar (Hz)	BCF

Para avaliação uma gota de sêmen foi colocada em câmara de Makler (HTMA) aquecida e analisada à temperatura de 38°C. Para cada amostra de sêmen, duas gotas foram avaliadas e a média dos três melhores campos foi anotada.

Para a concentração espermática 2µL de sêmen foi adicionado à solução salina formolizada (9%) (diluição 1:20). Após diluição, uma alíquota de 10 µL foi depositada em cada lado de uma câmara de Neubauer espelhada. Utilizando microscópio de luz e aumento do 40x, foi realizada a contagem do número de espermatozóides em cinco quadrantes de cada lado da câmara. O cálculo da concentração espermática foi realizado através da fórmula: $C = N \times 2,5 \times 10^6$. Sendo C a concentração de espermatozóides por mL e N a média do número total de células espermáticas contadas em cada lado da câmara de Neubauer.

Para a avaliação da integridade de membrana plasmática, foi utilizada uma combinação de duas sondas fluorescentes: Iodeto de Propídio (P-4170, SIGMA) e Diacetato de 6-Carboxifluoresceína (C-0662, SIGMA), de acordo com a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990).

Uma amostra de 10µL de sêmen foi adicionada a 40µL da solução de trabalho (Anexo 1). Após 10 minutos de incubação, uma gota do material foi depositada entre a lâmina e lamínula e analisada em microscópio de epifluorescência (NIKON – Episcopic Fluorescence Attchmente “EFA” HalodenLamp Set) utilizando objetiva de 40x. Foram contadas e classificadas 100 células, sendo classificadas como células com membrana íntegra aquelas emitindo fluorescência de cor verde e células com membrana lesada aquelas emitindo fluorescência de cor vermelha ou cores vermelha e verde.

A avaliação da morfologia espermática uma alíquota de 5 µL foi adicionada a 45 µL de citrato de sódio a 2,9% e à essa mistura 50µL do corante Rosa Bengala/Fast Green foi adicionado. Após 70 segundos à temperatura ambiente, foram realizados esfregaços em lâmina, utilizando de 5 a 10 µL, e secos em temperatura de 37°C (POPE et al., 1991). Para cada amostra de sêmen, 200 células espermáticas foram avaliadas utilizando microscópio de luz em aumento de 1000x e a classificação das anormalidades foi realizada de acordo com Mies Filho (1987).

O acrossoma foi classificado como intacto, quando a região apical da cabeça do espermatozóide foi corada em azul escuro arroxeado, ou lesado, quando esta região se apresentou com coloração rosa claro ou com anormalidade como irregularidades de contorno ou coloração heterogênea.

Análises hormonais

Coletas de sangue de todos os machos foram realizadas uma vez por mês, momentos antes da coleta de sêmen. O sangue foi obtido por punção venosa, centrifugado para separação do plasma, o qual foi transferido para *eppendorfs*, identificado e armazenado em *freezer* (-20°C) até o momento das análises.

Foram realizadas análises hormonais para determinação das concentrações plasmáticas de testosterona em duplicata pela técnica de radioimunoensaio (RIE) no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-campus de Botucatu. A concentração plasmática de testosterona foi realizada através de kit de fase sólida para RIA (Coat-A-Count kit, Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) (LEVY et al., 2004).

Também foram coletadas amostras fecais uma vez por semana de cada animal. Essas amostras foram acondicionadas em freezer (-18°C) e posteriormente foram liofilizados. Após liofilização, as amostras foram submetidas à extração dos metabólitos fecais de testosterona, segundo a metodologia descrita por Graham et al. (2000).

Os líquidos extraídos foram transferidos para microtubos de polipropileno devidamente identificados e armazenados em freezer a -22°C, para serem posteriormente dosados quanto aos metabólitos fecais. Para esta etapa, as amostras foram diluídas em tampão gelatina (Anexo 1) com pH 7,0, na proporção 1/10.

A dosagem de metabólitos fecais de testosterona foi realizada utilizando *kits* comerciais em fase sólida (Coat A – Count Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, Califórnia, USA) e leitura por sistema de radioimunoensaio [Packard Cobra II Auto Gamma (GMI Inc. – Minnesota – USA)], previamente validado para a espécie (BROWN et al., 1996). Os resultados foram transformados de ng/mL para ng/grama de fezes. O coeficiente de variação intraensaio foi de 6,57% e a sensibilidade foi de 0,47 ng/mL.

Tratamento contraceptivo

Após as duas avaliações andrológicas realizadas, os machos foram submetidos ao tratamento contraceptivo a base de acetato de deslorelina (Suprelorin® Peptech Animal Health Pty Limited, Austrália; 4,7 mg/animal) do mesmo modo descrito no Capítulo 1.

Após o início do tratamento três avaliações andrológicas foram realizadas como descritas anteriormente. Estas avaliações foram realizadas com intervalo de 30 dias entre elas. Durante este período os machos continuaram sendo monitorados através de dosagem de testosterona fecal e plasmática, uma vez por semana e uma vez por mês respectivamente.

Para melhor compreensão as avaliações andrológicas foram identificadas através de letra e número (Quadro 3).

QUADRO 3: Avaliações andrológicas realizadas durante o período experimental e suas siglas.

Momento	Avaliação andrológica
30 dias antes do tratamento contraceptivo	M 1
Imediatamente antes do início do tratamento contraceptivo	M 2
30 dias após início do tratamento contraceptivo	M 3
60 dias após início do tratamento contraceptivo	M 4
90 dias após início do tratamento contraceptivo (imediatamente antes da retirada do implante)	M 5
120 após início do tratamento contraceptivo	M 6
150 dias após início do tratamento contraceptivo	M 7

Exame histopatológico

Após 90 dias do início do tratamento contraceptivo, imediatamente após a quinta avaliação andrológica (M5), o implante foi retirado e todos os gatos foram submetidos à orquiectomia unilateral; o testículo retirado foi processado para exame histológico.

Nos sessenta dias subsequentes à orquiectomia unilateral os machos continuaram sendo monitorados como descrito anteriormente, realizando-se duas avaliações andrológicas com intervalo de 30 dias entre elas. Após este período, imediatamente após à ultima avaliação andrológica, o testículo remanescente foi retirado e também encaminhado ao exame histopatológico.

Análise estatística

Os dados obtidos nas avaliações andrológicas foram descritos em forma de média e desvio padrão. Os resultados referentes à histologia testicular foram descritos subjetivamente.

Resultados

Durante todas as avaliações andrológicas realizadas, os animais apresentaram plano anestésico e analgesia adequados para submissão à eletroejaculação. A média e desvio padrão dos resultados obtidos nas sete avaliações andrológicas estão descritas nas tabelas 5, 6 e 7.

TABELA 5: Média e desvio padrão do tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD), volume testicular esquerdo (VTE) e volume testicular total (VTT) observados nos animais **A, B, C, D** e **E**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Avaliação andrológica	Tamanho do pênis (cm)	Espículas (0 a 3)	VTD (cm ³)	VTE (cm ³)	VTT (cm ³)
M 1	1,54±0,1	2,4±0,37	0,96±0,26	0,76±0,26	1,73±0,56
M 2	1,5±0,15	2,8±0,22	1,03±0,22	1,08±0,2	2,11±0,48
M 3	1,46±0,08	1,5±0,44	1,0±0,18	0,9±0,12	1,90±0,29
M 4	1,42±0,07	0,8±0,4	0,8±0,93	0,54±0,11	1,35±0,19
M 5	1,66±0,18	0,6±0,48	0,82±0,15	0,85±0,31	1,67±0,51
M 6	1,66±0,27	1,4±0,8	-	1,13±0,45	-
M 7	1,7±0,14	2,6±0,48	-	0,94±0,32	-

TABELA 6: Média e desvio padrão dos parâmetros seminais relativos à cinética espermática observados nos animais **A, B, C, D** e **E**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Parâmetro seminal	MT (%)	MP (%)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	LIN (%)
M 1	17,2±27,93	15,8±25,19	56,38±71,13	77,98±102,47	2,28±3,20	30,2±37,37
M 2	68,4±15,43	50,4±11,67	119,78±24,96	172,2±29,57	4,7±0,9	69,4±5,11
M 3	43,4±24,06	30,6±16,98	131,7±18,2	205,7±44,09	5,98±1,61	64,8±8,99
M 4	20,25±20,32	11,5±14,11	64,25±39,45	88,35±51,72	4,2±3,49	51,25±30,0
M 5	27,25±24,03	18,25±17,71	71,02±48,41	128,02±80,66	4,5±2,61	42,25±24,57
M 6	64,66±24,58	45,66±20,49	109,76±21,52	180,13±24,5	5,63±1,16	62,66±8,57
M 7	17,33±9,39	15±10,7	143,56±45,88	211,23±35,69	5,53±0,66	66,66±12,47

TABELA 7: Média e desvio padrão da concentração espermática, porcentagem de espermatozóides com morfologia normal (EN), porcentagem de espermatozóides íntegros (IE) e volume seminal observados nos animais **A, B, C, D e E**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Avaliação andrológica	Concentração (sptz/mL) x 10 ⁶	EN (%)	IE (%)	Volume (μL)
M 1	60±52,5	69,5±19,5	68±0	11,2±12,18
M 2	206±207,01	74±9,29	61,8±20,81	22,4±12,11
M 3	90±68,11	71±13,47	54±11,43	14,4±14,88
M 4	456,66±263,98	38±26,69	48,33±14,70	31,8±35,09
M 5	10,66±10,33	67±5,09	1,5±1,5	9,6±11,34
M 6	452±615,87	54,33±20,23	76±6,97	19±6,19
M 7	1,33±1,24	67,33±9,84	60±0	14±8,09

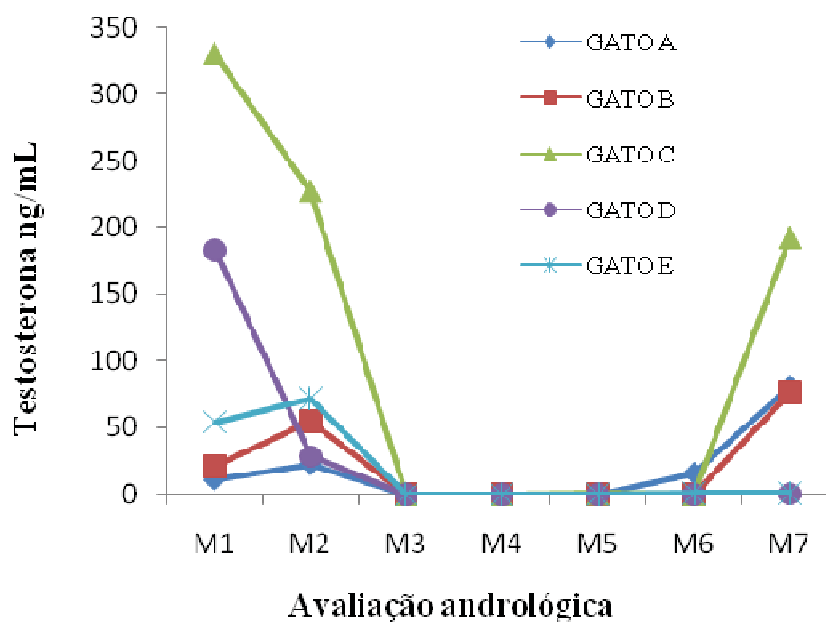


FIGURA 20: Concentração de testosterona plasmática dos gatos **A, B, C, D e E**, obtidos durante as avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

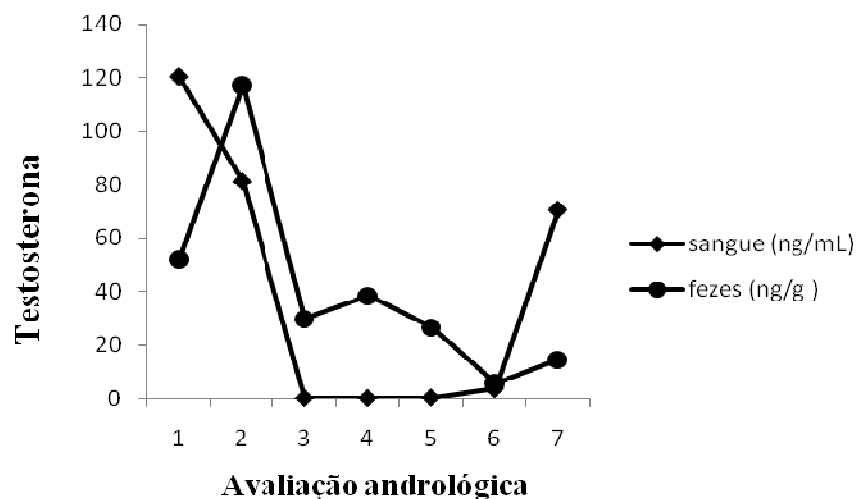


FIGURA 21: Média da concentração de testosterona plasmática e metabólitos fecais de testosterona dos gatos A, B, C, D e E, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

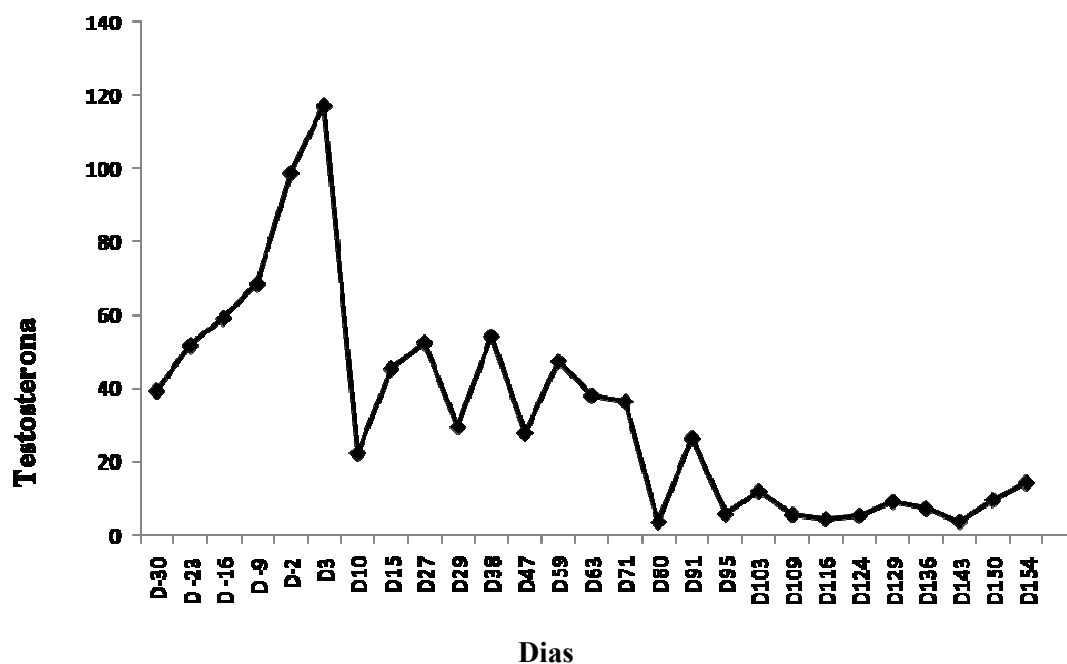


FIGURA 22: Média da concentração de metabólitos fecais de testosterona dos gatos A, B, C, D e E, obtidos antes do tratamento (D -30 a D-2) até o final do período experimental (D3 a D154). Botucatu, 2012.

A média dos volumes testiculares, bem como grau de espículas penianas foram maiores numericamente no M2 quando comparadas a M1 (Tabela 5). A concentração

média de testosterona plasmática foi de 120,19 e 81,79 ng/mL nas avaliações andrológicas 1 e 2, respectivamente (Figura 20).

Todos os gatos ejacularam com presença de células espermáticas no M1 e M2, indicando presença de espermatogênese nesses animais. Houve um aumento na média de todos os parâmetros seminais relativos à cinética espermática no M2. Também foi observado aumento da média do volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais.

Não foram observadas dificuldades na aplicação do acetato de deslorelina e a sedação previa dos animais permitiu um manuseio seguro, minimizando o desconforto que poderia ser gerado pela agulha utilizada na aplicação do implante. Reações locais, como edema e inflamação decorrentes da aplicação não foram observados.

No M3 foi observado diminuição na média de todos os parâmetros avaliados na genitália externa. As concentrações de testosterona plasmática estavam indetectáveis em todos os gatos, sendo considerados 0,0 ng/mL. Apesar de todos os animais terem ejaculado nesta avaliação andrológica, houve uma diminuição na média da MT, MP, LIN, volume seminal, concentração espermática, espermatozóides normais e íntegros.

No M4, tanto a média dos parâmetros da genitália externa quanto dos parâmetros cinéticos avaliados apresentaram média menor que as obtidas em M3. Dos parâmetros seminais apenas a concentração seminal apresentou aumento na média. As concentrações de testosterona plasmática estavam indetectáveis em todos os gatos, sendo considerados 0,0 ng/mL.

Noventa dias após início do tratamento com acetato de deslorelina (M5) dos parâmetros avaliados na genitália externa, apenas a média do grau das espículas penianas diminuiu, em relação às médias observadas anteriormente. Dos parâmetros seminais, a LIN, a concentração espermática, o volume seminal e o percentual de espermatozóides íntegros diminuíram. Apenas em um gato (C) as concentrações de testosterona plasmática foram detectáveis, 0,806 ng/mL e a média foi de 0,16 ng/mL.

A remoção dos implantes de acetato de deslorelina ocorreu sem dificuldades de localização e sem a fragmentação dos implantes. Dificuldades de cicatrização no local de incisão também não foram observadas. A castração unilateral dos gatos também foi realizada sem que complicações fossem observadas.

Os exames histológicos revelaram uma marcada atrofia do epitélio germinativo e diminuição do diâmetro tubular nos testículos retirados. A maioria dos túbulos estava

revestida apenas por uma a duas camadas de espermatogônias e/ou espermátócitos primários, por vezes apresentando células necróticas (Figura 23). O lúmen de alguns túbulos apresentava espermátides ao invés de espermatozóides. Apesar disso, raros túbulos ainda continham epitélio germinativo completo (Figura 24). Foram observados raros linfócitos intersticiais (gato **C**). No lúmen, raras porções do ducto epididimário continham espermatozóides em sua luz (Figura 25). As células de Leydig estavam mais facilmente identificáveis.

Trinta dias após a retirada dos implantes (M6), foi observado um aumento na média de todos os parâmetros avaliados na genitália externa e no sêmen, apesar desse aumento, em dois gatos (**B** e **C**) não havia presença de células espermáticas no ejaculado. Nesta avaliação andrológica apenas dois gatos possuíam concentrações de testosterona plasmática detectáveis, 16,27 ng/mL (gato **A**) e 1,274 ng/mL (gato **E**), gerando uma média de 3,50 ng/mL.

Na sétima avaliação andrológica a média do tamanho do pênis e das espículas penianas aumentou, porém a média do VTE diminuiu. Foi observada uma diminuição na média dos parâmetros de cinética: MT, MP, ALH, bem como do volume seminal, concentração e integridade espermática. Nesta avaliação os gatos **B** e **C** continuavam sem células espermáticas em seus ejaculados. Todos os gatos possuíam concentrações de testosterona plasmática detectáveis, perfazendo uma média de 70,50 ng/mL.

A porcentagem das alterações dos espermatozóides e os valores obtidos em cada avaliação andrológica estão descritos no Anexo 2 (Tabelas 8 a 18).

Nas avaliações histológicas do testículo remanescente de cada gato foi observado que a maioria dos túbulos seminíferos estava revestida por epitélio germinativo completo (Figura 26) e o lúmen possuía maior quantidade de espermatozóides. O lúmen do ducto epididimário apresentava espermatozóides em maior proporção quando comparado com o epidídimo retirado durante o tratamento contraceptivo (Figura 27).

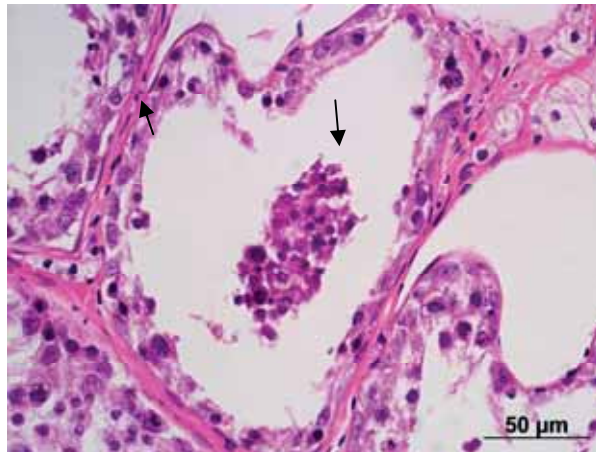


FIGURA 23: Túbulo seminífero atrófico, com células necróticas (seta preta) no gato **C**, 90 dias após início do tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (aumento 400x). Botucatu, 2012.

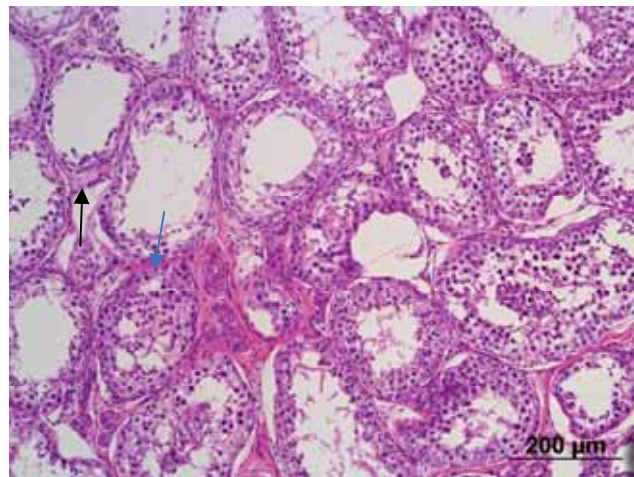


FIGURA 24: Túbulos seminíferos atróficos (seta preta) e com espermatogênese (seta azul) no gato **E**, 90 dias após início do tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (aumento 100x). Botucatu, 2012.

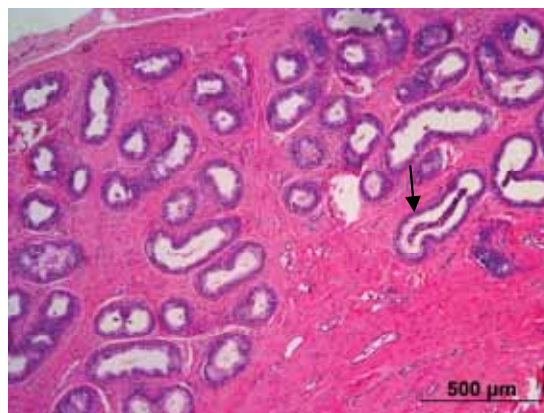


FIGURA 25: Epidídimo com conteúdo no lúmen, gato **C**, 90 dias após início do tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (aumento 400x). Botucatu, 2012.

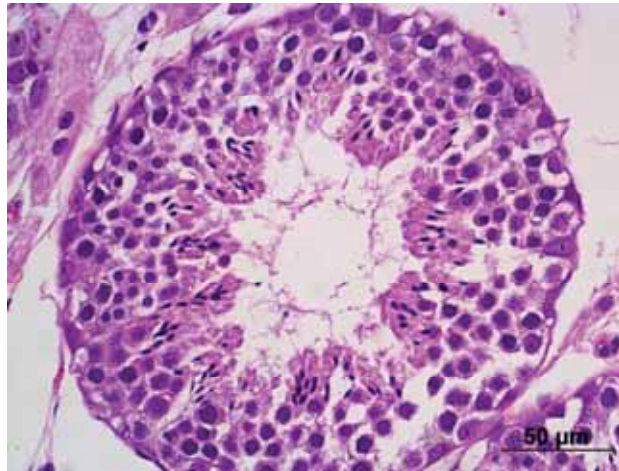


FIGURA 26: Túbulo seminífero com espermatogênese completa no gato **A**, 60 dias após término do tratamento com acetato de deslorelina (aumento 400x). Botucatu, 2012.



FIGURA 27: Lúmen epididimário repleto de conteúdo espermático (seta preta) no gato **E**, 60 dias após término do tratamento com acetato de deslorelina (aumento 100x). Botucatu, 2012.

Discussão

O primeiro relato do uso do acetato de deslorelina em felinos selvagens foi descrito há mais de 10 anos (BERTSCHINGER et al., 2001), porém apenas um trabalho relata o uso deste contraceptivo em machos de gatos domésticos, mas sem que tenha sido avaliada a influência do contraceptivo na qualidade seminal (GOERICKE-PESCH et al., 2010a). Nosso trabalho teve como principal objetivo avaliar a supressão e posterior retorno da espermatogênese após o uso deste agonista.

A eletroejaculação é considerada o método de eleição para a obtenção de sêmen de felinos devido à possibilidade de coleta seminal de animais agressivos, que não respondem bem ao treinamento por vagina artificial ou que possuem problemas de libido (MORATO & BARNABE, 1998). Apesar de ser considerado um procedimento simples, rápido e prático (MORAES et al., 2002) faz-se necessário o uso de anestesia geral para que o procedimento seja realizado.

Analgesia inadequada (CHATDARONG et al., 2006), bem como a contaminação do ejaculado por urina são problemas frequentemente descritos durante a realização deste procedimento. No presente trabalho não foram observados sinais de dor ou desconforto nos animais, indicando que o protocolo anestésico utilizado é eficaz e seguro. O uso da anestesia inalatória associada ao uso de um opióide é o principal responsável por este resultado.

Silva et al., 2011 compararam a segurança e analgesia de quatro protocolos anestésicos para EEJ em gatos domésticos, inclusive o protocolo tiletamina/zolazepam/tramadol, em doses similares às utilizadas em nosso trabalho, porém sem a manutenção com isoflurano. Os autores observaram que dos protocolos testados apenas o que associava a anestesia inalatória com indução anestésica com cetamina, diazepam e manutenção com isoflurano foi capaz de eliminar a dor de forma efetiva, promovendo melhor analgesia, segurança ao procedimento anestésico e à equipe e rápida recuperação, para EEJ em gatos domésticos.

Zambelli et al., (2007) comparou o uso de cetamina e medetomidina isoladamente, como protocolo anestésico para coleta de gatos por EEJ. O uso de medetomidina para EEJ em gatos domésticos apresentou em três dos 24 animais contenção farmacológica inadequada, impedindo a realização do procedimento.

Contaminações por urina no ejaculado também não foram observadas em nosso trabalho, apesar de não ter-se realizado o esvaziamento da bexiga urinária antes das EEJ. Segundo Howard (1993) o uso de anestésicos inalatórios pode relaxar a musculatura ao redor da bexiga, facilitando a contaminação por urina. Porém existem relatos de presença de urina em ejaculados de felinos submetidos à EEJ após protocolo anestésico dissociativo, cetamina e xilazina (SILVA et. al., 2008) e tiletamina e zolazepam (QUEIROZ et. al., 2004).

Acreditamos que o posicionamento da probe no assoalho retal também pode estar envolvido com as eventuais contaminações já relatadas (TEBET, 2004; ZAMBELLI et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Diversos protocolos anestésicos já foram utilizados com sucesso, mas a obtenção de ejaculados com células espermáticas varia de acordo com o protocolo anestésico utilizado. Silva et al., (2008), relataram obtenção de 88,10% de ejaculado com presença de espermatozóides quando utilizaram a associação anestésica cetamina/diazepam/isoflurano. Pires et al., (2010), utilizaram propofol e anestesia epidural com lidocaína como protocolo anestésico para coleta de sêmen por EEJ sem que fossem observadas alterações seminais, porém 2 dos 14 animais submetidos ao protocolo não ejacularam.

Em nosso estudo 100% dos animais ejacularam com presença de células espermáticas nas duas EEJ realizadas antes do início do tratamento contraceptivo. Este é o primeiro relato de 100% de obtenção de células espermáticas através deste método de coleta em gatos domésticos.

A qualidade seminal também parece estar relacionada com o protocolo anestésico utilizado. Em humanos foi observado que a utilização de isoflurano aumentou a motilidade total do sêmen (WANG et al., 2008). Em sêmen epididimário de gatos após a castração com barbitúrico foi observada diminuição da motilidade total quando comparado com isoflurano associado à medetomidina, porém os autores relatam que outros parâmetros seminais não foram afetados. O resultado sugere que a anestesia afeta a motilidade do sêmen fresco, sem afetar os parâmetros relativos à integridade da membrana (JIMÉNEZ et al., 2011).

Zambelli et al. (2007) avaliaram o uso da medetomidina e da cetamina isoladamente como protocolo anestésico para EEJ em gatos domésticos, sem que

fossem observadas diferenças significativas na qualidade seminal entre os protocolos (ZAMBELLI, 2007).

Na primeira avaliação andrológica (M1) realizada em nosso experimento todos os gatos apresentaram presença de espículas penianas, volume testicular e concentrações plasmáticas de testosterona dentro da normalidade para a espécie (SILVA, 2008; GOERICKE-PESCH et al., 2010a).

Ainda na primeira avaliação foi observado que a MT, MP e VSL apresentou valor menor que o já descrito para a espécie (STACHECKI et al., 1993; FILLIERS et al., 2010). É importante ressaltar que a motilidade espermática em três gatos (**B**, **C** e **E**) foi de 0%. Essa ausência de motilidade na primeira avaliação pode ter ocorrido devido ao *status* reprodutivo destes animais, visto que os mesmos permaneceram durante todo o período de quarentena sem que fossem realizadas coletas de sêmen. Assim, estes espermatozoides podem ser remanescentes da última onda de espermática (BERTSCHINGER et al., 2006).

A avaliação da genitália externa em M2 revelou aumento na média dos VT e espículas penianas. As coletas seminais se iniciaram concomitantemente com o verão e apesar dos gatos possuírem produção espermática o ano todo, autores relatam modificações sazonais ao longo do ano, havendo discreto aumento do VT durante este período (BLOTTNER & JEWGENOW, 2007).

Apesar da má qualidade seminal observada durante M1, em M2 todos os ejaculados obtidos possuíam motilidade e todos os parâmetros avaliados no sêmen estavam dentro da normalidade para a espécie (STACHECKI et al., 1993; AXNER & LINDE FORSBERG, 2007; FILLIERS et al., 2010).

Assim como nas fêmeas (MUNSON et al., 2001), após aplicação de um agonista do GnRH, ocorre uma estimulação de síntese e liberação de LH e FSH e posteriormente há a *down-regulation* dos receptores de GnRH na pituitária (BERTSCHINGER et al., 2001; JUNAIDI et al., 2008; GOERISCHE-PESCH et al., 2010).

Cães que receberam implantes de 6 mg de deslorelina apresentaram aumento na concentração sérica de LH após 20 minutos, com concentração máxima 40 minutos após aplicação do contraceptivo, posteriormente as concentrações diminuíram até o valor pré-implante, cinco horas após. A testosterona sérica também aumentou apresentando um pico uma hora após o tratamento (JUNAIDI et al., 2003). Em nosso estudo não foi possível a coleta de sangue para dosagem de testosterona seriada, porém

é possível observar o aumento abrupto da concentração de metabólitos de testosterona na coleta realizada 2 dias após a aplicação do contraceptivo.

Após fase aguda de estimulação e liberação de testosterona há uma supressão deste hormônio. Relata-se que esta supressão ocorre de 17 a 25 dias em cães (TRIGG et al., 2001; JUNAIDI et al., 2007) e 20 dias em gatos domésticos (GOERICKE-PESCH et al., 2010a). Em guepardos machos tratados com acetato de deslorelina a testosterona plasmática estava indetectável 4 semanas após o início do tratamento contraceptivo, permanecendo assim por pelo menos 12 meses (BERTSCHINGER et al., 2001).

Durante as avaliações andrológicas realizadas após o tratamento, a média de testosterona plasmática estava indetectável ou menos que 1ng/mL, porém a média de testosterona fecal apresentou em alguns momentos durante o tratamento valores próximos ao observado antes da aplicação do contraceptivo.

Diversos autores têm descrito a utilização de fezes como substrato para análise de perfis hormonais em diferentes espécies e ambos os sexos (BILLITTI et al., 1998; HIRSCHENHAUSER et al., 2000; ADACHI et al., 2010). Brown et al. (1996) validou esse método de análise para gatos domésticos com sucesso, indicando que a excreção de 91% dos metabólitos de testosterona ocorre entre 22 a 61 horas após liberação. Em nosso trabalho o desafio com GnRH produziu uma resposta consistente e indicativa da validade da técnica, assim como observado por outros autores (HIRSCHENHAUSER et al., 2000; KOTRSCHAL et al., 2000).

Sabe-se que apesar de ambas as técnicas fornecerem resultados reais e de haver paralelismo nas respostas obtidas entre a concentração plasmática e fecal, pode não ser observado correlação entre elas (JOSEPH et al., 1998; HIRSCHENHAUSER et al., 2000). Como a testosterona possui um forte ciclo circadiano a comparação dessas técnicas só poderia ser realizada caso amostras de sangue fossem coletadas em diversos momentos durante o dia (PELLETIER, et al., 2003; JEWGENOW et al., 2006).

Ainda assim, as análises fecais conferem uma amostra mais representativa, visto que é um pool do *status* testicular durante um período de horas e não de um único momento como nas análises plasmáticas e séricas (BROWN et al., 1996), além de ser um método não invasivo, evitando a influência do estresse. Apesar dessas vantagens, os resultados obtidos através deste extrato devem ser interpretados com cautela (PELLETIER, et al., 2003).

Acreditamos que as concentrações de testosterona plasmática estavam indetectáveis no dia das avaliações, mas que durante o tratamento pode ter ocorrido liberação de testosterona, gerando o resultado observado através das mensurações nas fezes. É importante ressaltar que a concentração de testosterona plasmática pode diminuir em gatos expostos a qualquer tipo de procedimento manipulatório que gere stress (CARTER et al., 1984). Além disso, os metabólitos fecais dos hormônios possuem estrutura similar e metabólitos como os do cortisol podem ter sido identificados como sendo metabólitos de testosterona.

Nas três avaliações andrológicas realizadas após o início do tratamento contraceptivo foi observada diminuição gradativa tanto do grau das espículas penianas quanto do VT. Apesar da diminuição da média de espículas penianas observada em nosso trabalho, em apenas dois animais (**B** e **C**) foi observado desaparecimento das espículas penianas.

A presença de espículas penianas está diretamente relacionada com a presença de testosterona e é considerado um bom indicador da eficiência do tratamento (BERTCHINGER et al., 2006). Porém, não existem relatos de quanto tempo é necessário para que ocorra o desaparecimento das espículas após a supressão da testosterona. Goericke-Pesch et al. (2010a), observaram o desaparecimento total das espículas penianas em 10 gatos após 9,4 semanas do início do tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina.

Guepardos tratados com acetato de deslorelina por pelo menos 1 ano possuíam presença de espículas avaliada como pobre ou moderada (BERTSCHINGER et al., 2006). Em um gato do pé preto (*Felis nigripes*), foi observada regressão das espículas penianas no primeiro mês após aplicação do acetato de deslorelina, com regressão total 3 meses após início do tratamento. Neste mesmo animal o reaparecimento das espículas se iniciou 7 meses após início do tratamento e não se completou até pelo menos 8 meses depois, apesar da produção espermática e concentração de testosterona terem se restabelecido.

Houve uma diminuição da média do VTT em 9,96%, 36% e 20%, em relação à M2, nas avaliações reprodutivas M3, M4 e M5, respectivamente. Goericke-Pesch et al. (2010a), observaram a diminuição do VT em 25%, 4 semanas e 60%, 12 semanas após início do tratamento com acetato de deslorelina em gatos domésticos. Resultados similares foram relatados em outras espécies como em guepardos, cães e porcos

(BERTSCHINGER et al., 2006; BERTSCHINGER et al., 2008; GOERICKE-PESCH et al. 2010b).

Apesar de em outras espécies autores considerarem o VT diretamente relacionado com a qualidade seminal (KAUFFOLD et al., 2010; GOERICKE-PESCH et al. 2010ab), em gatos domésticos ainda não comprovaram correlação entre o volume testicular e a qualidade seminal (SILVA, 2008).

Assim como observado na genitália externa, os parâmetros seminais tiveram diminuição em M3 e M4, com posterior aumento em M5, com exceção da concentração espermática e volume seminal, que aumentaram em M4 e da LIN que diminuiu em M5. Nas três avaliações, as médias obtidas estavam com valores fora da normalidade para a espécie, com exceção da concentração seminal em M4 e da porcentagem de espermatozóides normais em M3 e M5.

Em M4 a motilidade seminal foi de 0% nos gatos **B** e **E**. Em M5 também não foi observada motilidade seminal no gato **B** e no gato **E** não havia presença de células espermáticas. No gato **C** a motilidade espermática tanto em M4 quanto em M5 estava inferior a 10%, indicando que nestes três animais houve a supressão da espermatogênese. Acreditamos que as células espermáticas obtidas nestas avaliações são produtos remanescentes da ultima onda espermática.

A redução na motilidade seminal após tratamento com acetato de deslorelina foi descrita em cães. Nessa espécie foi relatado um aumento do percentual de alterações espermáticas, gotas citoplasmáticas e alterações de cauda, porém não foram observadas alterações primárias (Anexo 2 Tabela 11) (JUNAIDI et al., 2009). Em nosso estudo também houve aumento na porcentagem de espermatozóides com morfologia alterada, os defeitos de cauda foram os mais observados. Os defeitos de acrossoma também aumentaram após o tratamento contraceptivo (Anexo 2, Tabela 12) .

Após início do tratamento contraceptivo, o gato **A** só apresentou parâmetros fora da normalidade nas avaliações M3 e M5 e o gato **D** nas avaliações M3 e M4. Mesmo com a concentração de testosterona plasmática indetectável e volume testicular diminuído ao longo do período de tratamento, a presença de espículas penianas e a concentração de testosterona pelas fezes indicam que a espermatogênese nesses gatos podem não ter sido totalmente suprimida.

Segundo Brown et al. (1996), o *status* androgênico nem sempre corresponde à espermatogênese, porém a diminuição da testosterona influencia o volume, a motilidade

e a maturidade seminal, visto que este hormônio é responsável pela secreção prostática e influencia diretamente a espermatogênese (JUNAIDI et al., 2003).

Bertschinger et al. (2006), observaram a presença de células espermáticas em guepardos tratados há mais de 1 ano com acetato de deslorelina. Os autores acreditam que estas células são remanescentes da última onda espermática e ficaram armazenadas no epidídimo. Como os animais que apresentavam sinais secundários de atividade androgênica foram novamente implantados foi realizada nova aplicação do contraceptivo sem que fosse observada presença de espermatozóides nos ejaculados 1 ano depois.

Em nosso trabalho, essas células espermáticas também poderiam ser remanescentes da última onda espermática, visto que ela demora em média 46,8 dias em gatos domésticos (FRANÇA & GODINHO, 2003) e não existem relatos indicando o tempo e número de coletas necessárias para que o epidídimo seja esvaziado completamente de células de uma mesma onda espermática. Além disso, as características histológicas observadas 90 dias após o início do tratamento contraceptivo indicam que pode ter ocorrido uma supressão parcial da espermatogênese.

Não existem relatos da histologia testicular de gatos domésticos após o tratamento com agonistas do GnRH. Porém, nossos resultados quanto à atrofia dos túbulos e quantidade de espermatozóides no epidídimo foram similares ao já descrito para cães. Junaidi et al. (2008) observaram, em cães após 41 dias de tratamento com acetato de deslorelina, 70% de túbulos seminíferos atróficos, porém não observaram a presença de células espermáticas.

Relata-se ainda que poucos espermatozóides foram observados no epidídimo, além de ter sido visto atrofia das células de Leydig, ao contrário do observado em nossos resultados, onde essas células foram facilmente observadas, podendo inclusive serem confundidas com células hipertrofiadas.

Resultados similares aos de cães foram descritos em porcos castrados após 5 meses de tratamento com acetato e deslorelina (KAUFFOLD et al., 2010) e em gatos tratados com antagonistas do GnRH, os autores observaram atrofia tubular com vacuolização das células de Sertoli (LEVY et al., 2004).

Apesar da maioria dos túbulos seminíferos apresentar-se atróficos e com presença de espermátides com aparência necrótica, em outros túbulos, no mesmo animal, todas as células da linhagem espermática podiam ser observadas, indicando

presença de espermatogênese. Levy et al. (2004) observaram resultados similares após aplicação de um antagonista do GnRH.

Existem duas possibilidades para a ocorrência destes resultados; a primeira é que o tempo de tratamento não foi longo o suficiente para que todas as alterações seminais e histológicas fossem observadas, visto que nem todos os animais responderam da mesma maneira ao tratamento. A outra possibilidade é que estes animais não tiveram sua espermatogênese afetada pelo tratamento, sendo considerados não responsivos.

Provavelmente características genéticas são responsáveis pela existência de animais não-responsivos, visto que em alguns casos a repetição do tratamento pode não alterar esta resposta (HEBERT & TRIGG, 2005). Essas possíveis respostas refratárias ainda não foram elucidadas.

Apesar dos agonistas do GnRH causarem supressão da atividade reprodutiva em muitas espécies com sucesso, em masurpiais (HERBERT et al., 2004) e antílopes (PENFOLD et al., 2002) essa resposta não ocorre, e os animais mantêm as concentrações séricas de LH e testosterona similares aos animais não tratados. Em touros apesar da supressão na espermatogênese o LH e a testosterona não foram suprimidos (D'OCCHIO et al., 2000). Kauffold et al. (2010) e Bertschinger et al. (2006) sugerem que uma dose maior do contraceptivo deve ser administrada a fim de evitar essas respostas individuais.

Atualmente a literatura disponível que relata o uso de agonistas do GnRH em felinos não fornece dados a respeito do tempo de retorno da espermatogênese. Em cães previamente tratados com azagly-naferalina foi observado aumento do volume testicular e prostático seis semanas após o término do tratamento contraceptivo, apesar das concentrações de testosterona só atingirem os valores pré-tratamento após 7 semanas (LUDWIG et al., 2009).

Em nosso trabalho, trinta dias após castração unilateral e retirada dos implantes de acetato de deslorelina houve aumento na média do grau de espículas penianas, todos os animais possuíam pelo menos grau 1 durante a avaliação, e do VT do testículo remanescente, atingindo valor maior que o obtido em M1 e M2, antes do início do tratamento contraceptivo.

Esse aumento do VT observado pode estar relacionado ao retorno da atividade espermática devido ao término do tratamento contraceptivo associada a uma hiperplasia

compensatória devido à retirada do outro testículo. Esse tipo de resposta compensatória já foi descrita em equinos (HOAGLAND, et al., 1986).

Houve um aumento das concentrações plasmáticas de testosterona nos gatos **A** e **D**. Enquanto as concentrações de metabólitos da testosterona apresentaram média similar a observada ao longo do tratamento contraceptivo.

Os parâmetros seminais obtidos em M6 estavam dentro da normalidade para a espécie, com exceção da MP e porcentagem de espermatozóides normais. A média de espermatozóides com defeitos de cauda foi similar a observada nas avaliações durante o tratamento contraceptivo. É importante ressaltar que no sêmen dos gatos **B** e **C**, não havia presença de células espermáticas no momento desta avaliação.

Em M7 a média das espículas penianas aumentou, chegando a um valor próximo ao obtido em M2. O volume testicular diminuiu numericamente, porém ainda estava próximo ao obtido em M2. As concentrações de testosterona plasmática retornaram a valores similares ao pré-tratamento e apesar do aumento das concentrações de metabólitos fecais terem aumentado em relação a M6, os valores ficaram mais baixos do que os obtidos antes do tratamento.

Surpreendentemente a média dos parâmetros seminais avaliados diminuiu, com exceção da porcentagem de espermatozóides normais VSL, VCL e LIN. A motilidade total apresentou menor valor em relação a todas as outras coletas. Todos os gatos apresentaram individualmente resultado semelhante e não foram obtidos espermatozóides novamente nos gatos **B** e **C**.

É importante ressaltar que apesar da importância das características espermáticas para a fertilidade ainda não existem estudos que correlacionem os parâmetros avaliados no CASA com a fertilidade *in vitro* e *in vivo* em gatos (VILLAYERDE, 2007).

O retorno à atividade reprodutiva após a retirada do implante não pôde ser observada através da coleta de sêmen até 60 dias após o fim do tratamento contraceptivo.

Inaba et al. (1996) observaram o retorno da espermatogênese 20 semanas depois do tratamento com leuprolide. Porém Ludwig et al. (2009), observaram em cães tratados com azagly-naferalina o retorno dos parâmetros seminais à normalidade apenas 29 a 30 semanas após a retirada do implante. Um animal tornou-se oligospermico e outro azoospermico, devido obstrução no ducto eferente, indicando que o tratamento pode de alguma maneira não ser totalmente reversível em alguns animais.

Assim, os resultados obtidos em nossa última avaliação podem ser resultantes do tratamento contraceptivo ou devido a alterações causadas pela orquiectomia unilateral e que não puderam ser observadas em M6 devido ao tempo do ciclo da espermatogênese.

As análises histológicas realizadas após 60 dias da retirada do implante são de testículos com atividade espermatogênica normal, indicando que a atrofia observada após o tratamento contraceptivo foi revertida e que os animais recuperaram sua espermatogênese.

Conclusões

6. Conclusões

- O acetato de deslorelina suprime a atividade reprodutiva em felinos domésticos;
- Em gatas domésticas a atividade reprodutiva é suprimida após o uso de acetato de deslorelina durando pelo menos 3 meses;
- O retorno da atividade reprodutiva em gatas domésticas tratadas com acetato de deslorelina pode ser induzido através da retirada do implante e uso de gonadotrofinas exógenas
- A recuperação de oócitos viáveis é possível após indução de estro e ovulação em gatas previamente tratadas com acetato de deslorelina;
- O uso de gonadotrofinas exógenas em gatas domésticas previamente tratadas com acetato de deslorelina não altera a estrutura histológica dos órgãos reprodutivos;
- O acetato de deslorelina suprime a espermatogênese em gatos domésticos, porém, variações individuais existem e doses maiores podem ser necessárias para que essa supressão ocorra;
- A estrutura histológica testicular de gatos submetidos ao tratamento com acetato de deslorelina apresenta marcada atrofia dos túbulos seminíferos, porém alguns túbulos podem apresentar toda a linhagem de espermatogênese. É observada diminuição do conteúdo seminal no epidídimo;
- A recuperação da espermatogênese após o termino do tratamento contraceptivo pôde ser observado através da avaliação da histologia testicular, porém não pôde ser observada através da coleta de sêmen.

7. Referência bibliográfica

ACKERMANN, C.L.; DESTRO, F. C. ; VOLPATO, R. ; OBA, E. ; LOPES, M. D. . A citologia vaginal induz a ovulação em gatas domésticas?. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ENDOCRINOLOGIA, Búzios, 2010.

ACKERMANN, C.L.; DESTRO, F.C.; VOLPATO, R.; TREVISOL, E.; SOUSA, N.R.; DERUSSI, A.A.P.; LOPES, M.D. Indução do estro e ovulação em gatas domésticas após o tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (Suprelorin). In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Recife, 2011, p. 262.

ADACHI I.; KUSUDA, S.; NAGAO, E.; TAIRA, Y.; ASANO, M.; TSUBOTA, T.; DOI, O. Fecal steroid metabolites and reproductive monitoring in female Tsushima leopard cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). **Theriogenology**, v. 74, p. 1499-1503, 2010.

ARLT, S.P.; SPANKOWSKY, S.; HEUWIESER. Follicular cysts and prolonged estrus in a female dog after administration of a deslorelin implant. **New Zealand Veterinary Journal**, v.59, p. 87–91, 2011.

ASA, C. S. Contraception. In: FOWLER, M. E. & MILLER, R. E. **Zoo and Wild Animal Medicine**. 4ª Ed. Philadelphia. Saunders Company. p. 316-320, 1999.

ASA, C. S.; PORTON, I. Concerns and prospects for contraception in carnivores. **Anais American Association of Zoo Veterinarians**, p.298 – 303, 1991.

AXNER, E. & LINDE-FORSBERG, C. Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation with Fertility: A Retrospective Study. **Reprod. Dom. Anim.**, 2007.

AZA Wildlife Contraception Center Research Program and Database. Contraception Methods. Disponível em <http://www.stlzoo.org/animals/scienceresearch/contraceptioncenter/>. Acesso em: 29/08/2008

BERTSCHINGER, H. J.; TRIGG, T. E.; FUGATE, A.N.; NOTHLING, J. O.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Contraception of Lionesses, Cheetahs and wild dogs using the GnRH agonist implant Suprelorin®. In: 6TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON

CANINE AND FELINE REPRODUCTION & 6TH BIENNIAL EVSSAR CONGRESS, Viena, Áustria, 2008 p. 41-43.

BERTSCHINGER, H.J.; ASA, C.S.; CALLE, P.P.; LONG, J.A.; BAUMAN, K.; DeMATTEO, K.; TRIGG, T.E.; HUMAN, A. Control of reproduction and sex related behaviour in exotic wild carnivores with the GnRH analogue acetato de deslorelina: preliminary observations. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.57, p. 275-283, 2001.

BERTSCHINGER, H.J.; NOTHLING, J. O.; HUMAN, A.; JAGO, M. Repeated use of the GnRH analogue deslorelin to down-regulate reproduction in male cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **Theriogenology**, v.66, p.1762–1767, 2006.

BERTSHINGER, H.J.; TRIGG, T.E.; JOCHLE, W.; HUMAN, A. Induction of contraception in some African wild carnivores by downregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin. **Reprod. Suppl.**, v. 60, p. 41-52, 2002.

BILLITTI, J.E.; LASLEY, B.L.; WILSON, B.W. Development and Validation of a Fecal Testosterone Biomarker in *Mus musculus* and *Peromyscus maniculatus*. **Biology of Reproduction**, v. 59, p.1023–1028, 1998.

BLOTTNER, S. & JEWGENOW, K. Moderate Seasonality in Testis Function of Domestic Cat. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 42, p. 536–540, 2007.

BOWEN, R.A. Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 139–143, 2008.

BROWN, J.L.; TERIO, K.A.; GRAHAM, L.H. Fecal androgen metabolite analysis for non invasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. **Zoo Biology**, v.34, p. 15-42, 1996.

CARTER, K.K.; CHAKRABORTY, P.K.; BUSH, M.; WILDT, D. Effects of Electroejaculation and Ketamine-HCl on Serum Cortisol, Progesterone, and Testosterone in the Male Cat. **Journal of Andrology**, p. 431-437, 1984.

CARVALHO, N.A.T.; BARUSELLI, P.S.; ZICARELLI, L.; MADUREIRA, E.H.; VISINTI, J.A.; D'OCCHIO, M.J. Control of ovulation with a GnRH agonist after

superstimulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. **Theriogenology**, v. 58, p. 1641-1650, 2002.

CHATDARONG, K. Reproductive physiology of the female cat, with special reference to cervical patency, sperm distribution and hystero-graphy. 2003. 51f. Tese (Doutorado) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

CHATDARONG, K.; PONGLOWHAPAN, S.; MANEE-IN, S.; PONGPHET, K. The use of propofol for electroejaculation in domestic cats. **Theriogenology**, v. 66, p.1615–1617, 2006.

CHATDARONG, K.; RUNGSIPIPAT, A.; AXNER, E.; LINDE-FORSBERG, C. Hystero-graphic appearance and uterine histology at different stages of the reproductive cycle and after progestagen treatment in the domestic cat. **Theriogenology**, v.64, p. 12-29, 2005.

CITES. Apêndices I, II e III. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>> Acesso em 10 de abril de 2010.

COMIZZOLI, P.; PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. In: 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION & 6TH BIENNIAL EVSSAR CONGRESS, Viena, Áustria, 2008.

COOPER, D. W.; LARSEN, E. Immunocontraception of mammalian wildlife: ecological and immunogenetic issues. **Reproduction**, v.132, p. 821-828, 2006.

CUEVA-RÓLON, R.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E.J.; DELGADO-LEZAMA, R.; RAIA, J.G. The cat pudendal nerve: afferent fibers responding to mechanical stimulation of the perineal skin, the vagina or the uterine cervix. **Brain Research.**, v. 29, p. 1-6, 1994.

D’OCCHIO, M.J.; FORDYCE, G.; WHYTE, T.R.; ASPDEN, W.J.; TRIGG, T.E. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. **Anim Reprod Sci**, v. 60, p. 433–442, 2000.

European Medicines Agency Veterinary Medicines (EMA). Relatório europeu de avaliação público. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu>> Acesso em: 22/02/2011.

EYMANN, J.; HERBERT, C.A.; THOMSON, B.P.; TRIGG, T.E.; COOPER D.W.; ECKERY, D.C. Effects of deslorelin implants on reproduction in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 899–909, 2007.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. 785p.

FILLIERS, M.; RIJSSELAERE, T.; BOSSAERT, P.; CAUSMAECKER, V.; DEWULF, J.; POPE, C.E.; SOOM, A.V. Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 °C) on sperm quality. **Theriogenology**, v. 70, p. 1550–1559, 2008.

FLANAGAN, C. A.; MILLAR, R. P.; ILLING, N. Advances in understanding gonadotrophin-releasing hormone receptor structure and ligand interactions. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 113-120, 1997.

FONTAINE, E.; MIRA, F.; VANNIERA, F.; GÉRARDINA, A.; ALBOUY, C.; FONTBONNE, A. Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist. **Theriogenology**, v.76, p. 1561–1566, 2011.

FRANÇA, L.R.; GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1554-1561, 2003.

GIMENEZ, F.; STORNELLI, M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; DORNA, I.V. LA SOTA, R.L.; STORNELLI. Suppression of estrus in cats with melatonin implants. **Theriogenology**, v.72, p.493–499, 2009.

GOBELLO, C. New GnRH analogs in canine reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 100, p. 1-13, 2007.

GOERICKE-PESCH, S.; GEORGIEV, P.; ANTONOV, A.; ALBOUY, M.; WEHREND, A. Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4.7mg deslorelina, Suprelorin[®], regarding suppression of reproductive function in tomcats. **Theriogenology**, v. 75, p.803-810, 2010a.

GOERICKE-PESCH, S.; SPANG, A.; SCHULZL, M.; ZALP, G.O.; BERGMANN, M.; LUDWIG, C.; HOFFMANN, B. Recrudescence of Spermatogenesis in the Dog Following Downregulation Using a Slow Release GnRH Agonist Implant. **Reprod. Dom. Anim. Suppl.**, v. 44, p. 302-308, 2009.

GOERICKE-PESCH, S.; WILHELM, E.; LUDWIG, C.; DESMOULINS, P.O.; DRIANCOURT, M.A.; HOFFMANN, B. Evaluation of the clinical efficacy of Gonazon implants in the treatment of reproductive pathologies, behavioral problems, and suppression of reproductive function in the male dog. **Theriogenology**, v. 73, p.920-926, 2010b.

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

GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; WILDT, D.E. Embryo recovery and quality in the domestic cat: natural versus induced estrus. **Theriogenology**, v. 25, 1986.

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

GRABIEC, A.; MAX, A.; TISCHNER, M. Parthenogenetic activation of domestic cat oocytes using ethanol, calcium ionophore, cycloheximide and a magnetic field. **Theriogenology**, v. 67, p. 795–800, 2007.

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.

GUBERMUTH, D.F.; NEWTON, L.; DAELS, P.; CONCANNON, P. Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and fecal concentrations of progesterone. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.51, p.177-184, 1997.

GUIMARÃES, M.A.B. Monitoração não invasiva da supressão da atividade ovariana cíclica e do comportamento de estro em fêmeas de leão africano (*Phantera leo*), induzidos pelo uso de implantes de GnRH, acetato de deslorelina. 2008. 78p. Tese de livre-docência, Universidade de São Paulo, São Paulo.

HARRENTIEN, L. A.; MUNSON, L.; CHASSY, L. M.; LIU, I. M.; KIRKPATRICK, J. F. Effects of porcine zona pellucida immunocontraceptives in zoo felids. **J. Zoo Wild. Med.**, v.35, p.271–279, 2004.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p.343-352, 1990

HERBERT, C.A & TRIGG, T.E. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. **Animal Reproduction Science**, v. 88, p.141-153, 2005.

HERBERT, C.A.; TRIGG, T.E.; RENFREE, M.B.; SHAW, G.; ECKERY, D.C.; COOPER, D.W. Effects of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Implant on Reproduction in a Male Marsupial, *Macropus eugenii*. **Biology of Reproduction**, v.70, p. 1836–1842, 2004.

HIRSCHENHAUSER, K.; MOSTL, E.; PECZELY, P.; WALLNER, B.; DITTAMI, J.; KOTRSCHAL, K. Seasonal Relationships between Plasma and Fecal Testosterone in Response to GnRH in Domestic Ganders. **General and Comparative Endocrinology**, v.118, p.262–272, 2000.

HOAGLAND, T.A.; OTT, X.M.; DINGER, J.E.; MANNER, X.; WOODY, C.O.; RIESEN, J.W.; DANIELS, W. Effects of unilateral castration on morphologic characteristics of the testis in one-, two-, and three-year-old stallions. **Theriogenology**, v. 26, p. 397-405, 1986.

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

HOWE, L. M. Surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, v. 66, p. 500 – 509, 2006.

IBAMA. Normativa 175. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/cnia/index.php?id_menu=66> Acesso em 16 de outubro de 2008.

INABA, T.; UMEHRA, T.; MORI, J.; TORII, R.; TAMADA, H.; SAWADAL, T. reversible suppression of pituitary-testicular function by a sustained-release formulation of a gnRH agonist (leuprolide acetate) in dogs. **Theriogenology**, v. 46, p. 671-677, 1996.

JEWGENOW, K.; DEHNHARD, M.; HILDEBRANDT, T. B.; GARITZ, F. Contraception for population control in exotic carnivores. **Theriogenology**, v. 66, p. 1525 – 1529, 2006

JEWGENOW, K.; NAIDENKO, S.V.; GOERITZ, F.A.; VARGAS, A.C.; DEHNHARD, M. Monitoring testicular activity of male Eurasian (*Lynx lynx*) and Iberian (*Lynx pardinus*) lynx by fecal testosterone metabolite measurement. **General and Comparative Endocrinology**, v. 149, p. 151–158, 2006.

JIMÉNEZ, E.; PÉREZ-MARÍN, C.C.; MILLÁN, Y.; AGÜERA, E. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. **Anim. Reprod. Sci.**, 2011.

JOHNSTON S.D.; KUTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Canine and feline theriogenology. Saunders, 2001. 591 p.

JUNAIDI, A.; WILLIAMSOM, P.E.; TRIGG, T.E.; CUMMINS, J.M.; MARTIN, G.B. Morphological Study of the Effects of the GnRH Superagonist Deslorelin on the Canine Testis and Prostate Gland. **Reprod. Dom. Anim.**, 2008.

JUNAIDI, A.; WILLIAMSON, P.E.; CUMMINS, J.M.; MARTIN, G.B.; BLACKBERRY, M.A.; TRIGG, T.E. Use of a new delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. **Rep. Fertil. and Develop.**, v. 15, p. 317-322, 2003.

JUNAIDI, A.; WILLIAMSON, P.E.; MARTIN, G.B.; BLACKBERRY, M.A.; CUMMINS, J.M.; TRIGG, T.E. Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, desloreline. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 44, p. 725-734, 2009.

KAUFFOLD, J.; ROHRMANN, H.; BOEHM, J.; WEHREND, A. Effects of long-treatment with the GnRH agonist deslorelin (Suprelorin[®]) on sexual function in boars. **Theriogenology**, v. 74, p.733-740, 2010.

KOTRSCHAL, K.; DITTAMI, J.; HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E.; PECZELY, P. Effects of physiological and social challenges in different seasons on fecal testosterone and corticosterone in male domestic geese (*Anser domesticus*). **Acta Ethol.**; v. 2, p.115–122, 2000.

KUTZLER, M.; LAMB, S.V.; VOLKMA, D. Comparison Between Vestibular and Subcutaneous Insertion of Deslorelin Implants for Oestrus Induction in Bitches. **Theriogenology**, v.44, p. 83-86, 2009.

KUTZLER, M. & WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, v.66, p.514 - 525, 2006.

LAWLER, D.F.; JOHNSTON, S.D.; HEGSTAD, R.L.; KELTNER, D.G.; OWENS, S.F. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.47, p.57-61, 1993.

LAWLER, D.F.; JOHNSTON, S.D.; HEGSTAD, R.L.; KELTNER, D.G.; OWENS, S.F. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 47, p. 57-61, 1993.

LEVY, J.L.; MILLERB, L.A.; CROWFORD, P.C.; RITCHEY, J.W.; ROSSA, M.K.; FAGERSTONE, K.A. GnRH immunocontraception of male cats. **Theriogenology**, v. 62, p. 1116–1130, 2004.

LEVYA, J.K.; FRIARYA, J.A.; MILLERB, L.A.; TUCKERA, S.J.; FAGERSTONE, K.A. Long-term fertility control in female cats with GonaCon[™], a GnRH immunocontraceptive. **Theriogenology**, v. 76, p.1517–1525, 2011.

LOOPER, S.; ANDERSON, G.; SUN, Y.; SHUKLA, A.; LASLEY, B. Efficacy of Levonorgestrel when administered as an irradiated, slow-release injectable matrix for feline contraception. **Zoo Biology**, v. 20, p.407–421, 2001.

LUDWIG, C.; DESMOULINS, P.O.; DRIANCOURT, M.A.; GOERICKE-PESCH, S.; HOFFMANN, B. Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-Agonist Azagly-Nafarelin as a removable implant “Gonazon”; a preclinical Trial. **Theriogenology**, v. 71, p. 1037–1045, 2009.

MARQUES FILHO, W.C. Efeito da administração da deslorelina por 70 dias na forma de implante, na dinâmica folicular, perfil endócrino e expressão de receptores endometriais de estrógeno, progesterona e ocitocina de vacas nelore (*bos taurus indicus*), o restabelecimento da atividade ovariana e o ciclo curto. 2011. 202p. Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MATTOS, M.R.F. Relato de ovulação sem cópula em duas gatas (*Felis catus*). **Ciência Animal**, v.12, p.95-98, 2002.

MCALOOSE, D.; MUNSON, L.; MAYDAN, D. K. Histologic features of mammary carcinomas in zoo felids treated with Melengestrol Acetate (MGA) contraceptives. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 320-326, 2007.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial em cães**. Porto Alegre: Sulina, 1987. 750p.

MONTEIRO, C.M.R.; KOIVISTO, M.B.; SILVA, A.M. Perfil histológico do útero e ovários de gatas submetidas à ovariosalpingohisterectomia. **Ars Veterinaria**, v. 22, p. 236-241, 2006.

MORAIS, R. N.; MUCIOLO, R. G.; GOMES, M. L. F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L. H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. weidii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p. 2027-2041, 2002.

MORATO, R. G.; BARNABE, R. C. Biotécnicas de Reprodução Aplicadas à Preservação de Felídeos Selvagens. **Clinica Veterinária**, v. 12, p. 24-26, 1998.

MOREIRA, N.; MORATO, R. G. Técnicas de Reprodução Assistida em Felídeos Neotropicais. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de Animais Selvagens- Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, 2007, p.1280- 1288.

MUNSON, L. Contraception in felids. **Theriogenology**, v.66, p.126–134, 2006

MUNSON, L.; BAUMAN, J.E.; ASA, C.S.; JÖCHELE, W.; TRIGG, T.E. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 57, p. 269-273, 2001.

MUNSON, L.; GARDNER, I. A.; MANSON, R. J.; CHASSY, L. M.; SEAL, U. S. Endometrial hyperplasia and mineralization in zoo felids treated with Melengestrol Acetate contraceptives. **Veterinary Pathology**., v. 39, p. 419-427, 2002.

NETTLES, V. F. Potencial consequences and problems with wildlife contraceptives. **Reproduction Fertility Development**, v. 9, p. 137-143, 1997.

OLIVEIRA, K.S. Complexo Hiperplasia Endometrial Cística. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 270-272, 2007.

PAAPE, S.R; SUILLE, V.M.; SETO, H.; STABENFELDT, G.U. Luteal Activity in the Pseudopregnant Cat. **Biology of Reproduction**, v.13, p.470-474, 1975.

PADULA, A.M. GnRH analogues-agonists and antagonists. **Animal Reproduction**, v.88, p.115-126, 2005.

PATTON, M.L.; BASHAW, M.J.; CASTILLO, S.M.C., JÖCHLE, W.; LAMBERSKI, N.; RIECHES, R.; BERCOVITCH, F.B. Long-term suppression of fertility in female giraffe using the GnRH agonist deslorelin as a long-acting implant. **Theriogenology** v.66, p.431–438, 2006.

PELICAN K.M.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J. Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, p. 160–175, 2008.

PELICAN, K.M.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. G. GnRH agonist Lupron (leuprolide acetate) pre-treatments prevent ovulation in response to gonadotropin stimulation in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). **Theriogenology** v.66, p.1768–1777, 2006.

PELICAN, K.M.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. G. Short-term inhibition of ovarian activity using the GnRH agonist, Leuprolide Acetate, in the Clouded Leopard. **Theriogenology**, FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, EMBU DAS ARTES, Sao Paulo, Brazil, 2004, p. 127–128.

PELLETIER, F.; BAUMAN, J.; FESTA-BIANCHET, M. Fecal testosterone in bighorn sheep (*Ovis canadensis*): behavioural and endocrine correlates. **Can. J. Zool.**, v. 81, p. 1678–1684, 2003.

PENFOLD, L.M.; BALL, R.; BURDEN, I.; JOCHLE, W.; CITINO, S.B.; MONFORT, S.L.; WIELEBNOWSKI, N. Case Studies in Antelope Aggression Control Using a GnRH Agonist. **Zoo Biology**, v. 21, p.435–448, 2002.

PIRES, M. V. M.; SILVEIRA, A. M. M.; VIEIRA, D. K.; CASTRO, J. L.C.; LIBONATI, J.; FERREIRA, A. M. R. Coleta de semen em felinos domésticos (*Felis catus*) com o protocolo de propofol e anestesia epidural. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v. 09, p. 10 – 13, 2010.

POPE, C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**, v. 53, p. 163-174, 2000.

POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **J. Zoo Wildlife Med.**, v.22, p.87-95, 1991.

QUEIROZ, V. S.; FRANCA, G. D. A.; SANTOS, M.C.F.; CORTOPASSI, S. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Urine contamination during ocelot (*Leopardus pardalis*) electroejaculation: considerations of the inhalant anesthesia. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 5, Embu das Artes, Brasil, 2004, p.279

RASCADO, T.S.; MARTINS L.R.; MINTO, B.W.; LORENA S.E.R.S; LANDIM-ALVARENGA F.C. Parthenogenetic development of domestic cat oocytes treated with

ionomycin, cycloheximide, roscovitine and strontium. **Theriogenology**, v. 74, p. 596-601, 2010.

ROBINSON, B.L.; SAWYER, C.H. Hypothalamic control of ovulation and behavioral estrus in the cat. **Brain Research**, v. 418, p. 41-51, 1987.

ROMAGNOLI, S.; STELLETTA, C.; MILANI, C.; GELLI, D.; FALOMO, M.E.; MOLLO, A. Clinical Use of Deslorelin for the Control of Reproduction in the Bitch. **Reprod. Dom. Anim.**, v.44, Suppl. 2, p.36-39, 2009.

ROOT, M.V., JOHNSTON, S.D. AND OLSON, P.N. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 31, p. 429-433, 1995.

RUBION, S. & DRIANCOURT, M.A. Controlled delivery of a GnRH agonist by a silastic implant (Gonazon) results in long-term contraception in queens. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 44, p. 79-82, 2009.

SCHEELE, F.; HOMPES, P.G.A.; LAMBALK, C.B.; BROELMANS, F.J.; SCHOEMAKER, J. The GnRH challenge test: a quantitative measure of pituitary desensitization during GnRH agonist administration. **Clinical Endocrinology**, v. 44, p. 581-586, 1996.

SCHILLO, K.K. Reproductive Physiology of Mammals: From Farm to Field and Beyond. Delmar, Cengage Learning, 2009. p. 441.

SCHNEIDER, F.; TOMEK, W.; GRÜNDKER, C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: A review. **Theriogenology**, v.66, p.691-709, 2006.

SEAGER, S. W. J.; FOSTER, J. W.; MORTON, W. E. Laparoscopic sterilization of captive female African lions (*Panthera leo*). ANAIS AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1984. p. 186.

SILVA, J. C. R. & ADANIA, C. H. Carnívora – Felidae (Onça, Suçuarana, jaguatirica, gato do mato). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais silvestres – Medicina Veterinária. Roca, São Paulo. p. 2006. p. 505-546.

SILVA, T.F.P. Avaliação andrológica, métodos de coleta e tecnologia do sêmen de gatos domésticos utilizando água de coco em pó (ACP-117[®]). 2008. 183p. Tese, Faculdade de Veterinária/Universidade Estadual do Ceará.

SILVA, T.F.P. Comportamento sexual de gatas domésticas mantidas sem cópula em clima equatorial semi-úmido. 2003. 89p. Dissertação, Faculdade de Veterinária/Universidade Estadual do Ceará.

SILVA, T.F.P.; DIAS, C.G.A.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; BRAGA, A.C.P.; SILVA, L.D.M. Avaliação de segurança e analgesia de protocolos anestésicos para eletroejaculação em gatos domésticos (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira.**, v.12, p. 497-505, 2011.

SILVA, T.F.P.; DIAS, C.G.A.; CARDOSO, J.F.S.; UCHOA, D.C.; BRAGA, A.C.P.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; BRILHANTE, D.F.M.; CARNEIRO, R.D.; TAVERNEZI, L.; QUINTO, H.R.; SILVA, L.D.M. Comparação de quatro protocolos anestésicos para a coleta de sêmen por eletroejaculação em gatos domésticos. **Ciência Animal**, v. 18, p15-23, 2008.

STACHECKI, J.J.; GINSBURG, K.A.; LEACH, R.E.; ARMANT, D. R. Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) of Epididymal Sperm from the Domestic Cat. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 60-65, 1993.

STOUT, T.A.E. & COLENBRANDER, B. Suppressing reproductive activity in horses using GnRH vaccines, antagonists or agonists. **Animal Reproduction Science**, p. 82–83, 2004.

STOUT, T.A.E.; COLENBRANDER, B. Suppressing reproductive activity in horses using GnRH vaccines, antagonists or agonists. **Animal Reproduction Science**, p. 633–643, 2004.

SWANSON, W.F.; GRAHAM, K.; HOROHOV, D.W.; THOMPSON, D.L.; GODKEL, R.A. Ancillary follicle and secondary corpora lutea formation following exogenous gonadotropin treatment in the domestic cat and effect of passive transfer of gonadotropin-neutralizing antisera. **Theriogenology**, v.45, p. 561–72, 1996.

SWANSON, W.F.; ROTH, T.L.; WILDT, D.E. In vivo embryogenesis, embryo migration and embryonic mortality in the domestic cat. **Biol. Reprod.**, v. 51, p. 452-46, 1994.

TEBET, J. M. Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) e o gato doméstico (*Felis catus*). 2004, 115 p. Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

TOYDEMIR, T. S. F.; KILIÇARSLAN, M. R.; OLGAC, V. The effects of GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats. 6TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION & 6TH BIENNIAL EVSSAR CONGRESS, Viena, Áustria, 2008. p. 263-264.

TOYDEMIR, T.S.F.; KILIÇARLAN, M.R.; OLGAC, V. Effects of the GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats. **Theriogenology**, *in press* 2011.

TRIGG, T.E.; WRIGTH, P.J.; ARMOUR, A.F.; WILLIAMSON, P.E.; JUNAIDI, A.; MARTIN, G.B.; DOYLE, A.G.; WALSH, J. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.57, p. 255-261, 2001.

VALIENTE, C.; DIAZ, J.D.; ROSA, D.E.; MATTIOLI, G.; GARCIA ROMERO, G.; GOBELLO, C. Effect of a GnRH antagonist on GnRH agonist–implanted anestrous bitches. **Theriogenology**, v. 72, p. 926–929, 2009.

VERHAGE, H.G.; BEAMER, N.B.; BRENNER, R.M. Plasma Levels of Estradiol and Progesterone in the Cat During Polyestrus, Pregnancy and Pseudopregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 14, p. 579-585, 1976.

VERSTEGEN, J.P. Physiology and endocrinology of reproduction in females cats. *In*: SIMPSON, G.; ENGLAND, G. C. W.; HARVEY, M. Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology. Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association., 1998. p.11-16.

VILLAVERDE, A. I. S. B. Comparação entre dois métodos de inseminação artificial utilizando sêmen congelado em gatos domésticos. 2007, 101 p. Dissertação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

VOLKMANN, D.H.; KUTZLER, M.A.; WHEELER, R.; KREKELER, N.; KLEWITZ, J.; LAMB, S.V. Failure of hCG to support luteal function in bitches after estrus induction using acetato de deslorelina implants. **Theriogenology**, v.66, p. 1502-1506, 2006.

WALTER, B.; OTZDORFF, C.; BRUGGER, N.; BRAUN, J. Estrus induction in Beagle bitches with the GnRH-agonist implant containing 4.7 mg Deslorelin. **Theriogenology**, v. 75, p. 1125–1129, 2011.

WANG, L.J., WANG, X.H., SUN, H.J., XU, B. Effects of inhalation anaesthetics on human sperm motility and vitality in vitro. **Br. J. Anaesth.**, v. 101, p. 883–884, 2008.

WILDT, D. E.; BUSH, M.; HOWARD, J. G., et al. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v.29, n.4, p.1019-1025, 1983.

WINDLE, W.F. Induction of mating and ovulation in the cat with pregnancy urine and serum extracts. **Endocrinology**, v. 25, p. 311-335, 1939.

WRIGHT, P.J.; VERTEGEN, J.P; ONCLIN, K.; JÖCHELE, W.; ARMOUR, A.F.; MARTIN, G.B.; TRIGG, T.E. Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue acetato de deslorelina by progestin. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 57, p. 263-268, 2001.

ZAMBELI, D.; CUNTO, M.; PRATI, F.; MERLO, B. Effects of ketamine or Medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 68, p. 796–803, 2007.

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M.; PRATI, F.; MERLO, B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of eletrocejaculated sperm flow in the domesticcat. **Theriogenology**, v. 68, p. 796-83, 2007.

Anexos

8. ANEXOS 1

QUADRO 4: Valores do setup estabelecido para a avaliação do sêmen do gato doméstico no sistema HTR–IVOS-10. Botucatu, 2012.

Variável		Valor
Frames por segundo		60 Hz
Número de frames		50
Contraste mínimo		30
Mínimo tamanho celular		3 pixel
Default	Tamanho celular	5 pixel
	Intensidade celular	100
Células progressivas	VAP	70 $\mu\text{m/s}$
	STR	80%
Células lentas	VAP – Cutoff	30 $\mu\text{m/s}$
	VSL m – Cutoff	20 $\mu\text{m/s}$

QUADRO 5: Composição das soluções estoque e de trabalho das sondas fluorescentes utilizadas para a avaliação da integridade de membrana plasmática. Botucatu, 2012.

Solução de estoque			Solução de trabalho
Descrição	Composição	Quantidade	Quantidade
1. Solução estoque de fluoresceína	Diacetato de 6-carboxifluoresceína	9,2 mg	20 μL
	DMSO	20 mL	
2. Solução estoque de iodeto de propídeo	Iodeto de propídeo	10 mg	10 μL
	Solução fisiológica	20 mL	
3. Solução de formaldeído	Formalina a 40%	1%	10 μL
	Solução fisiológica	80%	
4. Citrato de sódio 3%	Citrato de sódio	3 g	0,96 mL
	Água destilada	100 mL	

QUADRO 6: Composição do tampão gelatina utilizado na diluição para dosagem de metabólitos fecais de testosterona. Botucatu, 2012.

Composto	Quantidade
NaPO ₄	13,8 g
NaCl	9,0 g
Azida Sódica	1,0 g
Água destilada	1000 mL

9. ANEXOS 2

TABELA 8: Média e desvio padrão da porcentagem (%) de alterações espermáticas, observadas nos animais **A, B, C, D e E**, nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Avaliação	Cauda	Peça intermediária	Cabeça	Gota citoplasmática	Inserção abaxial da cabeça
M 1	16±21,16	5,33±4,04	2±3,46	0	0
M 2	16±9,3	0	3,4±2,88	0,8±1,09	1±1,73
M 3	21,33±14,57	4±1	3,66±5,5	1,33±1,15	0,66±1,15
M 4	46,5±23,67	6,5±4,35	5,5±4,79	0,25±0,5	0,25±0,5
M 5	21, 66±6,65	2,33±2,51	4,33±4,93	4±6,92	0
M 6	24,66±16,77	7,66±6,5	9±7,54	4,33±5,13	0
M 7	28±10,58	0,33±0,57	2±2	2±3,46	0,33±0,57

TABELA 9: Média e desvio padrão da porcentagem (%) de acrossoma espermáticos normais e anormais (ausente, destacado, vesiculado e edemaciado) observadas nos animais **A, B, C, D e E**, nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Avaliação	Normal	Ausente	Destacado	Vesiculado	Edema
M 1	99,66 ± 0,57	0	0	0	0,33±0,57
M 2	90±13,91	8,4±15,51	0,2±0,44	1,6±3,57	0,2±0,44
M 3	79,33±13,57	14,33±13,57	3±1,73	0	0
M 4	88,66±19,46	13±14,73	0,33±0,57	0	0
M 5	96±6,92	4±6,92	0	0	0
M 6	91,66±4,72	8,33±4,72	0	0	0
M 7	99,5±0,7	0,5±0,7	0	0	0

TABELA 10: Tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD) e volume testicular esquerdo (VTE) do Animal **A**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Avaliação andrológica	Pênis (cm)	Espículas (0-3)	VTD (cm ³)	VTE (cm ³)
M 1	1,5	2	0,73	0,35
M 2	1,4	2,5	0,83	0,83
M 3	1,6	2	1,01	0,78
M 4	1,4	1	0,95	0,52
M 5	1,8	1	1,07	1,41
M 6	1,7	2		1,32
M 7	1,9	3		0,89

TABELA 11: Tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD) e volume testicular esquerdo (VTE) do Animal **B**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Avaliação andrológica	Pênis (cm)	Espículas (0-3)	VTD (cm ³)	VTE (cm ³)
M 1	1,4	2,5	0,82	0,82
M 2	1,3	3	0,78	0,88
M 3	1,4	1	0,82	0,88
M 4	1,5	1	0,88	0,73
M 5	1,7	0	0,88	0,88
M 6	1,3	1		0,55
M 7	1,5	3		0,67

TABELA 12: Tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD) e volume testicular esquerdo (VTE) do Animal **C**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Avaliação andrológica	Pênis (cm)	Espículas (0-3)	VTD (cm ³)	VTE (cm ³)
M 1	1,5	2	0,73	0,59
M 2	3	1,49	1,28	1,28
M 3	1,4	1,5	0,88	1,01
M 4	1,3	0	0,73	0,63
M 5	1,3	0	0,59	0,63
M 6	1,4	0		1,15
M 7	1,7	2		0,95

TABELA 13: Tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD) e volume testicular esquerdo (VTE) do Animal **D**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Avaliação andrológica	Pênis (cm)	Espículas (0-3)	VTD (cm ³)	VTE (cm ³)
M 1	1,7	3	1,41	1,01
M 2	1,5	3	1,07	1,01
M 3	1,4	2	1,35	1,07
M 4	1,5	1	0,73	0,4
M 5	1,8	1	0,83	0,83
M 6	1,9	2		1,87
M 7	1,8	3		0,73

TABELA 14: Tamanho do pênis, grau de espículas, volume testicular direito (VTD) e volume testicular esquerdo (VTE) do Animal **E**, obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Avaliação andrológica	Pênis (cm)	Espículas (0-3)	VTD (cm³)	VTE (cm³)
M 1	1,6	2,5	1,15	1,05
M 2	1,5	2,5	1,01	1,41
M 3	1,5	1	0,97	0,77
M 4	1,4	1	0,73	0,46
M 5	1,7	1	0,73	0,5
M 6	2	2		0,78
M 7	1,6	2		1,5

TABELA 15: Parâmetros seminais relativos à cinética espermática, volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais (EN) e íntegros (IE) do Animal A obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Parâmetros seminais	M1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7
MT (%)	72	71	66	28	60	89	17
MP (%)	65	40	54	10	43	67	13
VAP(µm/s)	119,6	84,6	126,2	69,7	127,4	125,9	179,3
VSL(µm/s)	113,9	75,4	119,7	64,4	119,4	111,9	160,3
VCL(µm/s)	136,2	129	149,7	104,2	190,3	151,7	232
ALH (µm)	3,2	4,5	3,5	3,3	5,5	4	4,6
BCF (Hz)	32,2	36,6	30,3	35,4	32,1	28,4	24
STR (%)	95	88	94	90	92	87	85
LIN (%)	84	59	79	61	61	73	70
RAP (%)	68	48	59	11	46	84	17
MEP(%)	4	24	6	17	14	6	0
SCA(%)	22	26	21	25	9	11	0
STAT(%)	6	3	13	47	31	0	83
Volume (µL)	35	25	44	100	32	22	6
Concentração (sptz/mL) x 10 ⁶	112,5	610	190	750	25	1500	3
EN (%)	89	80	81	26	69	81	80
IE (%)	68	71	40	66	3	77	60

TABELA 16: Parâmetros seminais relativos à cinética espermática, volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais (EN) e íntegros (IE) do Animal **B** obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Parâmetros seminais	M1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7
MT (%)	0	80	6	0	0	Sem sptz	Sem sptz
MP (%)	0	58	4	0	0	-	-
VAP(µm/s)	0	158,7	124,6	0	0	-	-
VSL(µm/s)	0	139,2	112,6	0	0	-	-
VCL(µm/s)	0	201	170,5	0	0	-	-
ALH (µm)	0	5,1	5,5	0	0	-	-
BCF (Hz)	0	31,4	34,3	0	0	-	-
STR (%)	0	86	91	0	0	-	-
LIN (%)	0	68	62	0	0	-	-
RAP (%)	0	73	4	0	0	-	-
MEP(%)	0	7	2	0	0	-	-
SCA(%)	0	19	10	0	0	-	-
STAT(%)	0	1	84	0	0	-	-
Volume (µL)	5	20	8	10	2	8	16
Concentração (sptz/mL) x 10 ⁶	-	80	10	110	-	-	-
EN (%)	-	73	80	13	-	-	-
IE (%)	-	52	-	30	-	-	-

TABELA 17: Parâmetros seminais relativos à cinética espermática, volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais (EN) e íntegros (IE) do Animal C obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Parâmetros seminais	M1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7
MT (%)	14	41	36	3	9	sem sptz	sem sptz
MP (%)	14	33	30	1	3	-	-
VAP(µm/s)	190,9	166,4	176,6	107,8	60,9	-	-
VSL(µm/s)	168	154,8	165,5	101	52,9	-	-
VCL(µm/s)	253,7	216,1	255,8	127,6	118,5	-	-
ALH (µm)	8,2	6,4	6,5	9,7	6,3	-	-
BCF (Hz)	35,6	30,9	47,5	27,3	40,3	-	-
STR (%)	88	93	93	87	87	-	-
LIN (%)	67	73	65	69	53	-	-
RAP (%)	14	34	32	1	3	-	-
MEP(%)	0	6	4	2	6	-	-
SCA(%)	7	26	0	51	6	-	-
STAT(%)	79	33	64	46	84	-	-
Volume (µL)	4	18	8	2	6	17	26
Concentração (sptz/mL) x 10 ⁶	7,5	20	50	-	6	-	-
EN (%)	50	65	48	40	60	-	-
IE (%)	Sem	22	-	90	0	-	-

TABELA 18: Parâmetros seminais relativos à cinética espermática, volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais (EN) e íntegros (IE) do Animal **D** obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Parâmetros seminais	M1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7
MT (%)	0	60	73	50	40	74	29
MP (%)	0	52	42	35	27	52	29
VAP(µm/s)	0	112,7	156,2	96,6	126,4	147,5	196,7
VSL(µm/s)	0	107,1	129,5	91,6	111,8	135	189,5
VCL(µm/s)	0	147,7	257,8	121,6	203,3	211,5	240,7
ALH (µm)	0	3,6	8,5	3,8	6,2	6,3	5,9
BCF (Hz)	0	37,1	33,2	35,5	42,8	34	29,7
STR (%)	0	94	80	94	86	89	96
LIN (%)	0	73	51	75	55	63	80
RAP (%)	0	53	62	36	32	59	29
MEP(%)	0	7	11	13	9	15	0
SCA(%)	0	20	24	17	26	19	8
STAT(%)	0	20	3	33	34	8	63
Volume (µL)	2	4	8	22	2	22	18
Concentração (sptz/mL) x 10 ⁶	-	20	150	510	1	290	1
EN (%)	-	62	-	75	72	50	56
IE (%)	-	79	54	49	-	84	-

TABELA 19: Parâmetros seminais relativos à cinética espermática, volume seminal, concentração espermática e porcentagem de espermatozóides normais (EN) e íntegros (IE) do Animal E obtidos nas avaliações andrológicas (M) 1 a 7. Botucatu, 2012.

Parâmetros seminais	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7
MT (%)	0	90	36	0	sem sptz	31	6
MP (%)	0	69	23	0	-	18	3
VAP(µm/s)	0	136,9	149,3	0	-	94,9	97,1
VSL(µm/s)	0	122,4	131,2	0	-	82,4	80,9
VCL(µm/s)	0	167,2	194,7	0	-	177,2	161
ALH (µm)	0	3,9	5,9	0	-	6,6	6,1
BCF (Hz)	0	31,1	29	0	-	39,2	26,3
STR (%)	0	88	86	0	-	87	77
LIN (%)	0	74	67	0	-	52	50
RAP (%)	0	65	56	0	-	67	58
MEP(%)	0	3,4	7,3	0	-	3,9	3,6
SCA(%)	0	85	30	0	-	22	3
STAT(%)	0	5	5	0	-	10	3
Volume (µL)	0	9	19	0	-	25	2
Concentração (sptz/mL) x 10 ⁶	0	1	46	0	-	44	92
EN (%)	10	45	4	25	6	26	4
IE (%)	-	300	50	<1	-	18	-
	-	90	-	-	-	32	66
	-	85	68	-	-	67	-

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para o periódico “**Theriogenology**” em 08 de outubro de 2011.

Normas para publicação disponível em: **<http://ees.elsevier.com/therio/default.asp>**

**Reversibilidade da atividade ovariana após uso de acetato de deslorelina como
contraceptivo em gatas domésticas**

**Ovarian activity reversibility after the use of deslorelin acetate as contraceptive in
domestic queens**

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a reversibilidade da atividade ovariana de gatas domésticas após tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina. Dez gatas adultas e púberes foram utilizadas. O ciclo estral foi avaliado a cada 72 horas em todas as fêmeas através de citologias vaginais (CV) e observação comportamental. Quando as fêmeas apresentaram CV característica de interestro/diestro um implante de acetato de deslorelina (Suprelorin[®], 4,7mg/animal) foi introduzido no tecido subcutâneo da região interescapular. Após a aplicação dos implantes as CV foram realizadas a cada 48 horas e no dia 90 os implantes foram removidos. Dez dias após remoção dos implantes, o estro e a ovulação foram induzidos e três dias após o tratamento hormonal as fêmeas foram submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH). Os ovidutos foram lavados e o líquido obtido foi observado para a identificação e contagem de possíveis oócitos. Os oócitos foram isolados e avaliados quanto à viabilidade. Os corpos lúteos (CL) foram quantificados e a taxa de recuperação oocitária foi calculada. Para mensuração da concentração de progesterona plasmática todas as fêmeas foram submetidas a coletas de sangue três semanas antes do início do tratamento contraceptivo até o dia da OSH, uma vez por semana. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Após aplicação do acetate de deslorelina quatro fêmeas demonstraram CV e comportamento característicos de estro durante $3,5 \pm 3,1$ dias. Após início do tratamento contraceptivo 40% das fêmeas ovularam e a fase luteal durou cerca de 6 semanas. Após 20 dias do Início do tratamento contraceptivo nenhuma fêmea demonstrou sinais de estro. Após a estimulação ovariana inicial, todas as fêmeas apresentaram CV e comportamento de anestro durante os 90 dias de tratamento. A remoção dos implantes ocorreu sem dificuldades. Todas as fêmeas responderam positivamente ao tratamento de indução do estro e ovulação. Foram contados $13,1 \pm 5,5$ CL and $8,1 \pm 5,5$ oócitos em cada gata. A taxa de recuperação oocitária média foi de $56,76\% \pm 25,42$ e todos os oócitos estavam viáveis. Através destes resultados nós concluímos que o acetato de deslorelina pode ser utilizado como contraceptivo reversível em gatas domésticas, visto que foi possível a indução do estro e ovulação, nesta espécie.

1 **Introdução**

2 O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é um decapeptídeo pertence ao
3 grupo de neuropeptídeos descobertos e isolados inicialmente como fatores de origem
4 hipotalâmica. O GnRH influencia a reprodução pela regulação da síntese e liberação de
5 gonadotrofinas pela pituitária, que por sua vez modulam a esteroidogênese e
6 gametogênese [1].

7 A exposição contínua ao GnRH reduz sua secreção, pela regulação dos receptores
8 de GnRH. Este mecanismo tem sido utilizado para obtenção de contracepção reversível
9 [2]. Em fêmeas, quando administrados exogenamente, os agonistas do GnRH
10 sobrepõem o pulso endógeno, inicialmente provocando a foliculogênese e a ovulação,
11 seguida de quiescência ovariana [3]. A utilização de análogos do GnRH como
12 contraceptivos para fêmeas de felídeos já foram descritas: acetato de leuprolide [4,5] ,
13 acetato de deslorelina [3] e Azagly-naferalina [6].

14 Munson et al. [3] fez o primeiro relato do uso de implante de acetato de
15 deslorelina em gatas domésticas neste estudo as fêmeas permaneceram em anestro por
16 até 14 meses. Os autores consideraram o retorno ao ciclo estral assíncronico. Ackermann
17 et al. [7] observaram o retorno ao ciclo estral 42 dias após a retirada do implante, em
18 gatas tratadas durante 60 dias com acetato de deslorelina.

19 Pelican et al., [5] (2006) induziram a ovulação em fêmeas de leopardo nebuloso
20 (*Neofelis nebulosa*) após tratamento com leuprolide e apenas uma das sete fêmeas
21 responderam ao tratamento, ovulando e desenvolvendo, posteriormente, uma fase luteal
22 normal. Após luteólise, essas fêmeas apresentaram quiescência ovariana. Os autores
23 consideraram esta resposta inconsistente. Segundo os autores, o tratamento alterou
24 severamente o ovário e desensibilizando-o ao tratamento de eCG. Nesta espécie, o
25 resultado encontrado é surpreendente, visto que esta espécie em particular é conhecida
26 por ser hipersensível à estimulação das gonadotrofinas.

27 Esse tipo de resposta inconsistente não se restringe apenas as fêmeas felinas [3,
28 8]. Resultados similares foram observados em outras espécies como cadelas [9, 10] e
29 em girafas (*Giraffa camelopardalis*) [11]. Quando utilizado em masurpiaís (*Trichosurus*
30 *vulpecula*), foi observado o retorno ao ciclo estral e concepção, com tempo de retorno
31 variando individualmente [12].

32 Ackermann et al. [7] relataram a primeira indução de estro e ovulação em gatas
33 domésticas após 60 dias de tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina. Os

autores demonstraram que nessas fêmeas não ocorreu dessensibilização ovariana, apesar da eficácia do tratamento contraceptivo. Desta maneira se faz necessária a realização de mais estudos que visem avaliar o retorno da atividade ovariana e ovulação após tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a reversibilidade da atividade ovariana após tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina em gatas domésticas.

Material and Métodos

Animais

Dez gatas adultas e púberes foram mantidas na FMVZ UNESP campus de Botucatu em um gatil experimental sob regime luminoso de 12 horas luz/dia com o mínimo de intensidade de 150 lux. Os animais recebiam ração comercial (Royal Canin Queen 34[®]) e água *ad libitum*.

Acompanhamento e determinação da fase do ciclo estral e tratamento contraceptivo

O ciclo estral foi avaliado através de citologias vaginais (CV) e observações comportamentais a cada 72 horas. Para CV, as fêmeas foram contidas fisicamente, a vulva foi limpa com gaze seca e após limpeza uma escova citológica foi introduzida cranialmente ao canal vaginal e rotacionada delicadamente. O material coletado foi transferido para uma lâmina histológica, corado com panótico rápido (Panotico rápido LB[®] Laborclin produtos para laboratórios Ltda, Paraná, Brazil) e avaliado em microscópio de luz (aumento de 200x ou 400x). Cem células foram contadas e classificadas de acordo com critério descrito por Johnston et al. [13].

Tratamento contraceptivo

Quando consideradas em fase de interestro/diestro (< 70% de células superficiais e concentração de P4 plasmática < 1ng/mL) (Tabela 2) as gatas foram submetidas à associação anestésica Cetamina (Dopalen[®], Vetbrands do Brasil, Paulínia, Brazil; 15 mg/kg; IM) e xilazina (Xilazin[®], Syntec do Brasil, Cotia, Brazil; 1 mg/kg; IM) e um implante de acetato de deslorelina (Suprelorin[®] Peptech Animal Health Pty Limited, Australia; 4,7 mg/animal) foi introduzido no tecido subcutâneo da região interescapular.

Após aplicação do implante foram realizadas CV a cada 48 horas. No 90º dia após a aplicação do implante as fêmeas foram novamente anestesiadas, os implantes foram localizados através de palpação do local de aplicação. Após a localização, foi realizada tricotomia local e assepsia local para posterior retirada dos implantes através de incisão da pele.

Indução do estro e ovulação

Dez dias após a retirada do implante o estro e a ovulação foram induzidos através do protocolo eCG (100 IU; IM) (Novormon[®], Vetrepfarm, Canada) e 84 horas após hCG (100 IU; IM) (Vetecor[®], Laboratorios Calier, Spain), ambos aplicados por via intramuscular [14].

Recuperação e viabilidade oocitária

Três dias após a indução da ovulação as fêmeas foram submetidas à ovariossalpingohisterectomia. As tubas uterinas foram lavadas com PBS (DPBS; Nutricell, São Paulo, SP, Brazil) a 38º C e o líquido recuperado foi observado em lupa estereomicroscópica para identificação e contagem de possíveis oócitos. Os oócitos foram isolados e corados com bisbenzimida (Hoechst 33342) e iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) para avaliação da viabilidade em microscópio de fluorescência Leica[®] DM LB - filtro azul 535 e 617 nm e foram considerados viáveis aqueles que floresceram em azul. Os corpos lúteos (CL) foram quantificados e para o cálculo da taxa de recuperação oocitária foi utilizada a fórmula: número de oócitos identificados/número de CL x 100.

Coleta de sangue e análises hormonais

Foram realizadas coletas de sangue de todas as fêmeas uma vez por semana três semanas antes do início do tratamento contraceptivo até o dia da ovariossalpingohisterectomia. O sangue foi obtido por punção venosa, centrifugado para separação do plasma, o qual foi transferido para *eppendorfs*, identificado e armazenado em *freezer* (-20ºC) até o momento das análises.

Análises hormonais para determinação da concentração de progesterona plasmática em duplicata foram realizadas pela técnica de radioimunoensaio (RIE) no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal e

Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-campus de Botucatu. A concentração plasmática de progesterona foi realizada através de kit de fase sólida para RIA (Coat-A-Count kit, Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) padronizada para gatos domésticos [15]. O coeficiente de variação intraensaio foi de 6,84% e a sensibilidade foi de 0,0001 ng/mL.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

Resultados

Tratamento contraceptivo

No momento da aplicação do implante de acetato de deslorelina 5 fêmeas estavam em interestro e 5 estavam em diestro.

Não foram observadas dificuldades na aplicação do acetato de deslorelina e a sedação previa dos animais permitiu um manuseio seguro, minimizando o desconforto que poderia ser gerado pela agulha utilizada na aplicação do implante. Reações locais, como edema e inflamação decorrentes da aplicação não foram observados, porém uma gata apresentou sinais de piodermatite. Nesta fêmea foi realizada aplicação de antibiótico tópico durante uma semana. Após este período não foram observadas lesões.

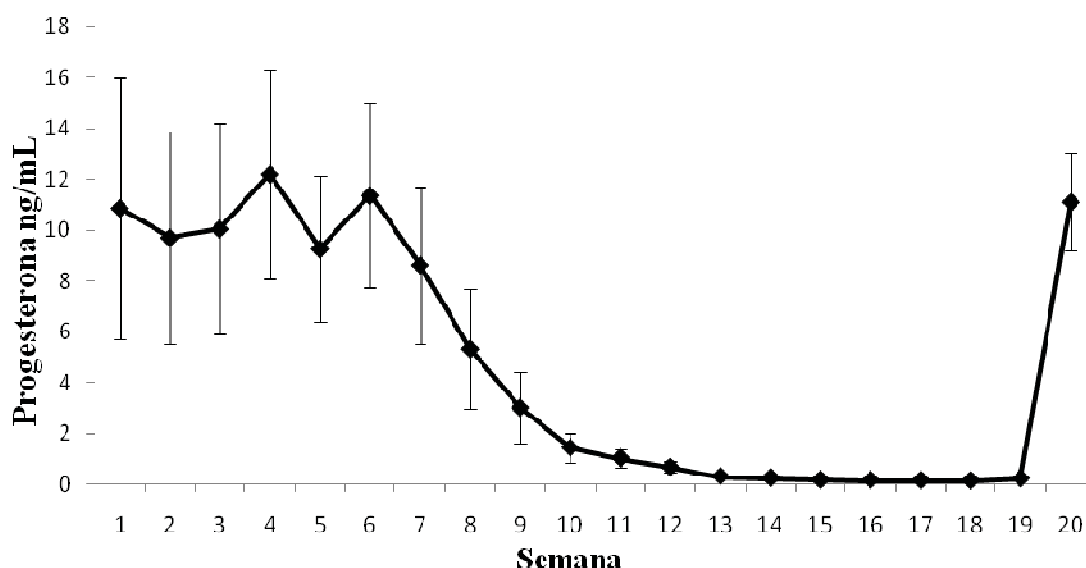


FIGURA 1: Média $\pm$ erro padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) das 10 fêmeas avaliadas, três semanas (-3, a -1) e durante o tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina (0 a 14) até o dia da ovarisalpingohisterectomia (16). Botucatu, 2012.

Quatro fêmeas (A, C, F e G) apresentaram CV (Figura 2) e comportamento característicos de estro $3,75 \pm 2,22$ dias após a aplicação do implante de acetato de deslorelina, durante em média $3,5 \pm 3,1$ dias.

As fêmeas C e G estavam em diestro no momento da aplicação do contraceptivo ($26,82$ e $21,7\text{ng/ml}$ respectivamente). Durante o período de estro não foi observado um aumento da concentração plasmática de P4 decorrente de eventuais ovulações ocorridas nesse estro, indicando a não ocorrência de CL acessórios. A gata F ovulou, porém a fêmea A mesmo apresentando sinais de estro não ovulou.

As gatas B e D que estavam em diestro no momento do tratamento não apresentaram sinais de estro após a aplicação dos implantes. Quatro fêmeas (E, F, I, J) que apresentavam-se em interestro no momento da aplicação de contraceptivo ovularam após aplicação do acetato de deslorelina.

A fase lútea das fêmeas que estavam em diestro no momento da implantação e das gatas que ovularam após o implante durou cerca de 6 semanas. Os perfis hormonais de todas as fêmeas, média da concentração de progesterona plasmática três semanas (S - 3, -2, -1) antes do início do tratamento (S0) até o dia da ovariosalpingohisterectomia (S 16), estão descritas na Figura 1.

Nenhuma fêmea ovulou ou apresentou sinais de estro após a primeira semana de tratamento contraceptivo. Após estimulação ovariana inicial gerada pelo tratamento, todas as fêmeas apresentaram CV característica interestro/diestro durante os 90 dias de tratamento contraceptivo.

Remoção dos implantes e indução do estro e ovulação

A remoção dos implantes de acetato de deslorelina ocorreu sem dificuldades de localização e sem a fragmentação dos implantes. Dificuldades de cicatrização no local de incisão também não foram observadas.

Todas as gatas responderam positivamente ao protocolo de indução de estro e ovulação apresentando CV e comportamento característicos desta fase do ciclo estral e 100% das fêmeas ovularam, sendo contados em média $13,1 \pm 5,5$ CL.

Recuperação e viabilidade oocitária

Foram recuperados em média $8,1 \pm 5,5$ oócitos por gata e a taxa de recuperação oocitária média foi de $56,76\% \pm 25,42$. Todos os oócitos recuperados foram

considerados viáveis. Apesar de serem mantidas em gatil sem contato direto com machos, em uma fêmea foram recuperados três embriões (dois de duas células e um de quatro células), além de dois oócitos (Figura 2).

Não foram observados efeitos adversos provenientes do tratamento contraceptivo.

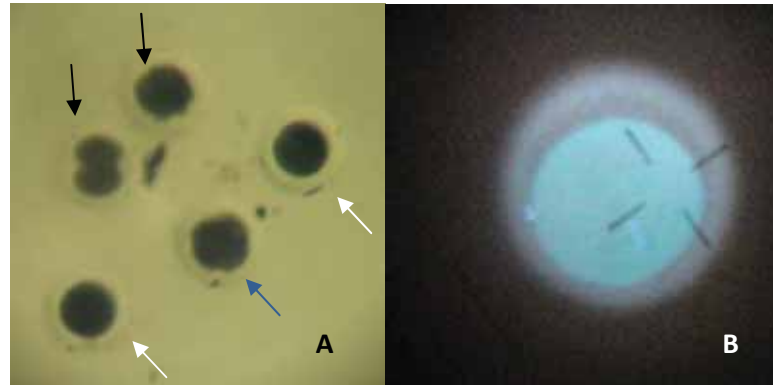


FIGURA 2: **A:** Oócitos (seta branca), embriões de duas células (seta preta) e embrião de quatro células (seta azul) recuperados de uma gata previamente tratada com acetato de deslorelina, após indução de estro e ovulação com eCG e hCG. **B:** Oócito viável corado bisbenzimidazole (Hoechst 33342) e Iodeto de Propídeo (Sigma-Aldrich). Botucatu, 2012.

Discussão

Nesse estudo o acetato de deslorelina suprimiu o ciclo estral de gatas domésticas eficientemente e a atividade ovariana foi revertida após 90 dias de tratamento através da indução do estro e ovulação permitindo a recuperação de oócitos viáveis.

A estimulação ovariana inicial era esperada e já foi descrita em diferentes espécies de felinos por vários autores [3, 8, 16]. Munson et al. [3] observou estro resultante da estimulação inicial do tratamento com agonistas do GnRH em 100% das gatas domésticas. Em nosso estudo apenas 4 fêmeas apresentaram sinais de estro e destas apenas 1 ovulou. Paradoxalmente 3 fêmeas que não demonstraram sinais de estro também ovularam.

Duas fêmeas que receberam o implante durante o diestro apresentaram CV e comportamento característico de estro. Esse crescimento follicular durante a fase lútea pode ocorrer e gatas domésticas [17].

Apesar de falhas luteais terem sido relatadas em cadelas após tratamento com acetato de deslorelina [18], não foram observadas falhas luteais em nossos animais experimentais após o uso do agonista do GnRH. Porém, mais estudos são necessários

para elucidar se falhas luteais durante a gestação podem ocorrer em gatas domésticas previamente submetidas a este tratamento contraceptivo.

Todas as fêmeas permaneceram em quiescência reprodutiva após a estimulação ovariana inicial. Este resultado é similar ao observado por outros autores [3, 16].

Ackermann et al. [7] após induzirem estro e ovulação em gatas domésticas tratadas por 60 dias com acetato de deslorelina, obtiveram média de CL similar ao obtido em nosso trabalho, indicando que apesar do maior período de exposição ao tratamento contraceptivo não ocorreu dessensibilização ovariana.

Diferente do resultado obtido por Pelican et al. [5] após uso de acetato de luprolide, um agonista do GnRH com potencia menor que o acetato de deslorelina, em leopardos nebulosos. Nesse estudo foi observada importante dessensibilização ovariana ao uso de gonadotrofinas exógenas.

A recuperação embrionária foi observada em uma fêmea, apesar de não haver contato direto com machos. Acreditamos que isso ocorreu devido a ativação oocitária espontânea. Esse fenômeno já foi descrito por Grabiec et al. [19] e Rascado et al. [20], com taxas variando de 2 a 35,5%.

Esse é o primeiro relato de recuperação e viabilidade oocitária após tratamento contraceptivo com acetato de deslorelina em gatas domésticas. Mais estudos são necessários para que seja elucidado se a duração do tratamento pode interferir na viabilidade e taxa de recuperação oocitária bem avaliar o potencial embriogênico desses oócitos.

Conclusão

O acetato de deslorelina pode ser utilizado como contraceptivo reversível em gatas domésticas, visto que foi possível induzir o estro e a ovulação com sucesso nessa espécie após tratamento contraceptivo.

Agradecimentos

Professora Eunice Oba pelas dosagens hormonais. Suporte financeiro: FAPESP.

Referências

[1] Schneider F, Tomek W, Gründker C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: A review. *Theriogenology* 2006; 66:691-709.

- 1 [2] Kutzler M & Wood A. Non-surgical methods of contraception and sterilization.
2 Theriogenology 2006; 66:514-25.
- 3 [3] Munson L, Bauman JE, Asa CS, Jöchele W, Trigg TE. Efficacy of the GnRH
4 analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. J Rep Fert Suppl 2001;
5 57:269-73.
- 6 [4] Pelican KM, Wildt DE, Howard JG. Short-term inhibition of ovarian activity using
7 the GnRH agonist, Leuprolide Acetate, in the Clouded Leopard. Fifth international
8 symposium on canine and feline reproduction, Embu das Artes, São Paulo, Brazil,
9 2004; 127-8.
- 10 [5] Pelican KM, Wildt DE, Howard JG. GnRH agonist Lupron (leuprolide acetate) pre-
11 treatments prevent ovulation in response to gonadotropin stimulation in the clouded
12 leopard (*Neofelis nebulosa*). Theriogenology 2006; 66:1768-77.
- 13 [6] Rubion S & Driancourt MA. Controlled delivery of a GnRH agonist by a silastic
14 implant (Gonazon) results in long-term contraception in queens. Reprod Dom Anim
15 Suppl 2, 2009; 79-82.
- 16 [7] Ackermann CL, Destro FC, Volpato R, Trevisol E, Sousa NR, Derussi AAP, Lopes
17 MD. Indução do estro e ovulação em gatas domésticas após o tratamento contraceptivo
18 com acetato de deslorelina (Suprelorin). In: XIX Congresso Brasileiro de Reprodução
19 Animal, Recife 2011; 262.
- 20 [8] Bertschinger HJ, Trigg TE, Fugate AN, Nothling JO, Guimarães MABV.
21 Contraception of Lionesses, Cheetahs and wild dogs using the GnRH agonist implant
22 Suprelorin[®]. 6TH International symposium on canine and feline reproduction & 6th
23 biannual EVSSAR congress, Viena, Áustria, 2008; 41-3.
- 24 [9] Wrigth PJ, Vertegen JP, Onclin K, Jöchele W, Armour AF, Martin GB, Trigg TE.
25 Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue acetato de
26 deslorelina by progestin. J Reprod Fert Suppl 2001; 57:263-8.
- 27 [10] Romagnoli S, Stelletta C, Milani C, Gelli D, Falomo ME, Mollo A. Clinical Use of
28 Deslorelin for the Control of Reproduction in the Bitch. Reprod Dom Anim Supp.,
29 2009; 44:36-9.
- 30 [11] Patton ML, Bashaw MJ, Castillo SMC, Jöchle W, Lamberski N, Rieches R,
31 Bercovitch FB. Long-term suppression of fertility in female giraffe using the GnRH
32 agonist deslorelin as a long-acting implant. Theriogenology 2006; 66:431-8.

- 1 [12] Eymann J, Herbert CA, Thomson BP, Trigg TE, Cooper DW, Eckery DC. Effects
2 of deslorelin implants on reproduction in the common brushtail possum (*Trichosurus*
3 *vulpecula*). Reprod Fert Dev 2007; 19:899–09.
- 4 [13] Johnston SD, Kutritz MVR, Olson PNS. Canine and feline theriogenology.
5 Saunders, 2001. 591.
- 6 [14] Villaverde AISB, Melo CM, Martin I, Ferreira T H, Papa FO, Taconeli CA, Lopes
7 MD. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using
8 frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). Anim Reprod Sci, 2009; 114:434-
9 42.
- 10 [15] Swanson WF, Graham K, Horohov D.W, Thompson DL, Godkel RA. Ancillary
11 follicle and secondary corpora lutea formation following exogenous gonadotropin
12 treatment in the domestic cat and effect of passive transfer of gonadotropin-neutralizing
13 antisera. Theriogenology 1996; 45:561–72.
- 14 [16] Toydemir TSF, Kiliçarslan MR, Olgaç V. The effects of GnRH analogue deslorelin
15 implants on reproduction in female domestic cats. 6TH International symposium on
16 canine and feline reproduction & 6th biannual EVSSAR congress, Viena, Áustria, 2008;
17 263-4.
- 18 [17] Kustritz MVR. Clinical management of pregnancy in cats. Theriogenology 2006;
19 66:145–50.
- 20 [18] Volkmann DH, Kutzler MA, Wheeler R, Krekeler N , Klewitz J, Lamb SV.
21 Failure of hCG to support luteal function in bitches after estrus induction using
22 deslorelin implants. Theriogenology 2006; 66:1502-6.
- 23 [19] Grabiec A, Max A, Tischner M. Parthenogenetic activation of domestic cat oocytes
24 using ethanol, calcium ionophore, cycloheximide and a magnetic field. Theriogenology
25 2007; 67:795–800.
- 26 [20] Rascado TS, Rigatto Martins L, Watanabe Minto B, de Sá Lorena SER, Cruz
27 Landim-Alvarenga F. Parthenogenetic development of domestic at oocytes treated with
28 ionomycin, cycloheximide, roscovitine and strontium. Theriogenology 2010; 74:596-
29 601.