



## Avanços na andrologia de grandes felinos neotropicais

*Advances in neotropical big cats andrology*

Gediendson Ribeiro de Araújo<sup>1,3,4\*</sup>, Pedro Nacib Jorge-Neto<sup>1,2</sup>, Antonio Carlos Csermak-Jr<sup>1</sup>,  
Cristiane Schilbach Pizzutto<sup>1,2</sup>, Thiago Cavalheri Luczinski<sup>1,2,5</sup>, Thyara de Deco-Souza<sup>1,3</sup>)

<sup>1</sup>Instituto Reprocon, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,  
Campo Grande, MS, Brasil

<sup>4</sup>Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>5</sup>Instituto NEX – No Extinction, Corumbá de Goiás, GO, Brasil

Av. Sen. Filinto Müller, 2443 - Pioneiros, 79074-460, Campo Grande - MS, Brasil

### Resumo

O desenvolvimento de tecnologias reprodutivas e conhecimentos sobre a andrologia de grandes felinos caminham a pequenos passos, com avanços na última década. Estudos sobre o comportamento de onças-pintadas (*Panthera onca*) revelam as sequências de comportamentos sócio-sexuais e levantam a possibilidade de a ovulação poder ocorrer por estímulos sensoriais, e não somente pela estimulação mecânica durante a cópula. Um grande avanço na andrologia dos felinos foi o desenvolvimento da colheita farmacológica com  $\alpha 2$ -agonistas, que já se mostrou eficiente também nos grandes felinos neotropicais. Este foi um verdadeiro divisor de águas para a criopreservação de sêmen, especialmente em animais de vida livre. Pouco se avançou, no entanto, no meio de criopreservação, ainda hoje os meios indicados são à base de TRIS-gema-glicerol, porém a gema não é estável suficiente para uso em animais de vida livre, sendo necessária avaliação de substitutivos como as lipoproteínas de baixa densidade e lecitina de soja. O aprimoramento de reprodução assistida nos felinos neotropicais é pungente, em especial a onça-pintada visto que em alguns biomas a espécie está criticamente em perigo.

**Palavras-chave:** colheita farmacológica, criopreservação de sêmen, *Puma concolor*, *Panthera onca*

### Abstract

*The development of reproductive technologies and knowledge about the andrology of big cats are taking small steps, with advances in the last decade. Studies on the sexual behavior of jaguars (Panthera onca) reveal the sequences of sexual behaviors and raise the possibility that ovulation may occur through sensory stimuli and not only through mechanical stimulation during copulation. A significant advance in feline andrology was the development of pharmacological semen collection with  $\alpha 2$ -agonists, which has proved efficient in neotropical big cats. It was disruptive for semen cryopreservation, especially in free-living animals. Little progress has been made; however, in the cryopreservation environment, even today, the indicated means are based on TRIS-yolk-glycerol. However, the yolk is not stable enough for use in free-living animals, requiring the evaluation of substitutes such as low-density lipoproteins and soy lecithin. The improvement of assisted reproduction in neotropical felines is poignant, especially the jaguar, since in some biomes, the species is critically endangered.*

**Keywords:** pharmacological collection, semen cryopreservation, *Puma concolor*, *Panthera onca*

### Introdução

Os carnívoros desempenham um papel fundamental no equilíbrio dos ecossistemas onde ocorrem, porém devido a fatores como a caça, a redução e a fragmentação do habitat, essas espécies estão sendo incluídas nas principais listas de animais ameaçados de extinção. No Brasil, a onça-pintada (*Panthera onca*) e a onça-parda (*Puma concolor*) estão listadas no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBio, 2018). A conservação desses felinos depende da redução de sua vulnerabilidade por meio de ações de conservação *in situ* (promovendo a proteção de seus habitats e



diminuindo a remoção de indivíduos da natureza) e *ex situ* (promovendo programas de educação ambiental e reprodução assistida). Essas ações estão definidas no Plano de Ação Nacional para a conservação da onça-pintada (PAN Onça Pintada, Portaria MMA nº 132, de 14 de dezembro de 2010) e o da onça-parda (PAN Onça Parda, Portaria MMA nº 76, de 27 de junho de 2014) elaborado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) em parceria com pesquisadores especialistas na área.

Outro ponto crítico para a conservação dos felinos brasileiros, recomendado nos PANs e no conceito de Conservação Única (Pizzutto et al., 2021), é o desenvolvimento de programas de reprodução assistida. As tecnologias de reprodução assistida, como criopreservação de gametas, inseminação artificial e fertilização *in vitro*, permitem a permuta de material genético entre as populações de vida livre ou entre animais de vida livre e sob cuidados humanos (Pizzutto et al., 2021). Além disso, reduzem o risco de transmissão de doenças infecciosas e o estresse causado pelo transporte de indivíduos (Wildt, 1990). Desta forma, a consolidação de programas de reprodução assistida tem papel fundamental na conservação de espécies, ajudando a manutenção de uma população geneticamente viável.

No entanto, a dificuldade no desenvolvimento dessas tecnologias reprodutivas fica claramente demonstrada quando avaliamos os artigos publicados em revistas científicas sobre o tema. No caso das onças-pardas os dados são ainda mais limitados, com apenas um trabalho de criopreservação desenvolvido com esses animais no Brasil, todos mantidos em ambiente *ex situ* (Deco-Souza et al., 2013).

Dessa forma, o presente manuscrito tem como objetivo compilar os principais avanços na andrologia dos grandes felinos neotropicais: a onça-pintada e onça-parda.

### **Avaliação andrológica em onças-pintadas e onças-pardas**

As primeiras pesquisas relacionadas à andrologia dos grandes felinos silvestres tiveram início na década de 60 (Carvalho, 1968) e até o presente momento, menos de quarenta artigos foram publicados abordando estudos de avaliação espermática, criopreservação e espermatogênese em onças-pintadas, sendo que apenas três realizaram colheita de sêmen em onças-pintadas de vida livre (Araujo et al., 2018; Jorge-Neto et al., 2020c; Morato et al., 2001). Isto exemplifica quão escassas são as informações a respeito da fisiologia, comportamento e estabelecimento de tecnologias de reprodução assistida nessas espécies. No Brasil, o Instituto Reprocon vem desenvolvendo pesquisas com reprodução assistida de onças-pintadas de vida livre, realizando captura científica para a colheita e congelamento de sêmen.

### **Avaliação do sistema reprodutivo**

A avaliação do sistema reprodutivo em animais silvestres é uma etapa inicial crucial na avaliação andrológica e consiste em exames do pênis e testículos. No pênis, a presença de espículas penianas é avaliada e, por serem andrógeno-dependente, sempre foram utilizadas como indicativo de maturidade sexual. Além disso, desempenha um papel importante durante a cópula devido à estimulação de mecanorreceptores (somatossensoriais) presentes na vagina (Christiansen, 1988). No entanto, temos observado tanto em onças-pintadas *ex situ* e quanto *in situ* a ausência ou escassez de espículas penianas em animais adultos, mesmo havendo a produção de sêmen com boa qualidade. Assim, possivelmente a ausência ou escassez das espículas penianas não inviabiliza a reprodução, pois a ovulação na onça-pintada pode ser desencadeada por estímulos sensoriais (Jorge-Neto et al., 2020b) e pelo comportamento copulatório de múltiplas cópulas (Jorge-Neto et al., 2018).

Nos testículos, a consistência, simetria e presença de lesões são avaliadas e a biometria testicular é realizada. O tamanho dos testículos pode informar sobre presença de processos inflamatórios agudos ou crônicos e a produção espermática dos animais (Amann and Schanbacher, 1983). Recentemente Jorge-Neto et al. (2020b) publicaram o primeiro relato de onça-pintada com criptorquidismo, um distúrbio reprodutivo definido como a ausência de um ou ambos os testículos dentro do escroto, que pode estar na cavidade abdominal ou no espaço subcutâneo da região inguinal e tem causas multifatoriais, como componentes genéticos epigenéticos e ambientais (Amann and Veeramachaneni, 2006). Já o monorquidismo, definido pela ausência de um testículo, é raro em gatos domésticos e nunca foi relatado em felinos selvagens. Por esse motivo, felídeos que apresentam apenas um testículo escrotal podem ser considerados criptorquídicos até prova em contrário (Griffin et al., 2020). Essa alteração foi encontrada apenas em um macho de vida-livre monitorado por colar de GPS e capturado em duas ocasiões distintas. Embora o volume de sêmen recuperado tenha sido consistente com machos de vida livre, a concentração e quantidade de espermatozoides foram menores. Na ocasião da segunda captura, a concentração

espermática foi muito baixa, porém o macho esteve interagindo com uma fêmea também monitorada nas três horas antes e por quatro dias após a captura. Não se sabe ainda se o criptorquidismo neste macho foi causado por alta consanguinidade, uma vez que ainda está aguardando os resultados do estudo genético, porém a consanguinidade que populações isoladas de onças-pintadas enfrentam nos biomas caatinga (Morato et al., 2014) e mata atlântica (Paviolo et al., 2016) faz-se preocupante.

Em onças-pardas, o criptorquidismo já foi reportado com alta incidência na subespécie panteras-da-Flórida (*Puma concolor coryi*) (Barone et al., 1994; Mansfield & Land, 2002) e é evidência fenotípica da depressão por endogamia (Huffmeyer et al., 2021), que é a redução da sobrevivência e da fertilidade da prole de indivíduos aparentados (Charlesworth & Willis, 2009). Embora Mansfield & Land (2002) relatem que os machos criptorquídicos de panteras-da-Flórida possam ter boa qualidade seminal e alcançar o mesmo sucesso reprodutivo que os machos normais, Huffmeyer et al. (2021) encontraram alta teratospermia em espermatozoides colhidos do epidídimo de animais mortos, porém os defeitos de maior incidência podem estar relacionados à forma de colheita e não à consanguinidade.

Os relatos de patologias reprodutivas que podem ser transmitidas ao longo das gerações aumentam ainda mais a preocupação a respeito da conservação dessas espécies. Testículos que permanecem na cavidade abdominal tendem a evoluir para neoplásicos, colocando em risco a sobrevivência do espécime (Hayes et al., 1985). Pensando neste problema em uma escala populacional, há potencial impacto da incidência de criptorquidismo sobre a estabilidade populacional.

### Avaliação testicular por ultrassonografia

A ultrassonografia é um exame de diagnóstico por imagem, uma técnica não invasiva e amplamente utilizado na medicina veterinária, porém, a aplicação na avaliação testicular de animais silvestres é algo novo e tem sido realizado em onças-pardas e pintadas pelo Instituto Reprocon, utilizando equipamentos e software desenvolvidos para a pecuária.

O Instituto Reprocon está adaptando o uso do software Ecotext (Humeco, Espanha), desenvolvido para animais de produção e capaz de avaliar o parênquima testicular por vídeo-análise macro e microscópica das imagens ultrassonográficas e classificar os machos de acordo com sua capacidade reprodutiva, para animais silvestres. São realizadas tomadas utilizando o equipamento Exapad Mini (IMV Technologies) equipado com a sonda linear retal (7,5 MHz, Modelo LR760, IMV Technologies). O software mensura seis parâmetros, sendo três em resolução normal e três a nível microscópico, ampliando a imagem em cerca de 1,4x (Fig.1), permitindo uma análise qualitativa e não apenas quantitativa dos testículos, e repetibilidade entre técnicos.

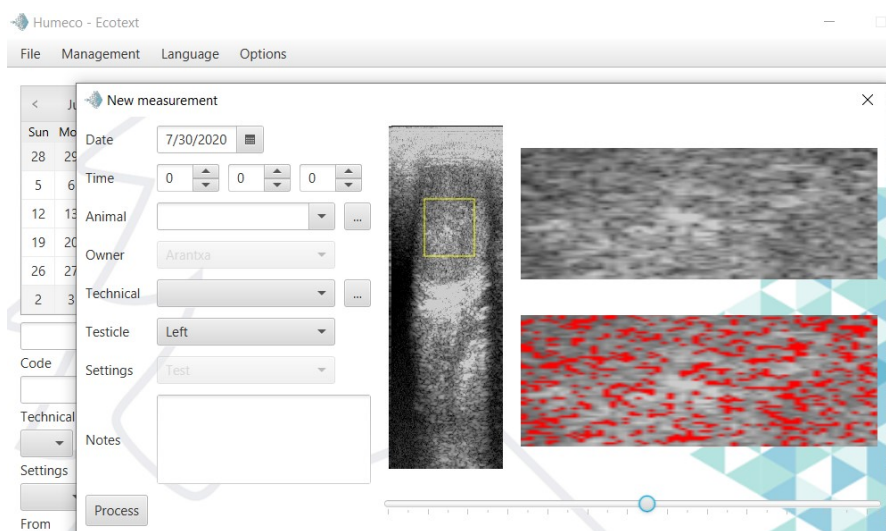


Figura 1. Tela do software Ecotext avaliando testículo de onça-pintada. Fonte: Dra. Arantxa Echegaray/Humeco.

### Espermatogênese

Para o desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida é fundamental estabelecer os padrões fisiológicos da espécie através do conhecimento da morfologia testicular e do processo de espermatogênese (Costa et al., 2008; Leite et al., 2006). O primeiro trabalho abordando aspectos da morfologia testicular da onça-pintada foi publicado por Azevedo et al. (2006), em que verificaram que a massa testicular correspondia a 0,034 % do peso dos animais avaliados (índice gonadossomático), muito semelhante ao observado na onça-parda (0,03 %; Guião Leite, 2002). Além disso, esses autores observaram que o diâmetro médio dos túbulos seminíferos em onça-pintada era de 257µm, e a espessura média do epitélio seminífero, de aproximadamente 90µm. Em seguida, Costa et al. (2008) caracterizaram oito estágios da espermatogênese da onça-pintada de acordo com o sistema de morfologia tubular e o desenvolvimento de acrosomos e verificaram uma produção diária de  $16,9 \pm 1,2 \times 10^6$  espermatozoides por grama de testículo.

### Colheita e avaliação de sêmen

A primeira etapa do desenvolvimento de biotecnologia reprodutiva é compreendida pela colheita e análise de sêmen (Barnabe et al., 2002), mas a obtenção de amostras representativas é a primeira barreira encontrada porque as técnicas usadas rotineiramente em animais domésticos podem não ser aplicáveis aos felídeos selvagens (Jorge Neto et al., 2019), como o uso de vagina artificial.

Os métodos já utilizados em onças-pardas e pintadas foram a eletroejaculação (EJ) e a colheita farmacológica por cateterização uretral para animais vivos, e a colheita do epidídimo *post mortem* ou pós-castração. A EJ foi o método de escolha para a colheita de sêmen felino, resultando em uma amostra de maior volume e menor concentração e pode ter contaminação urinária e bacteriana (Zambelli et al., 2008). A colheita farmacológica de sêmen por cateterismo uretral com agonista  $\alpha 2$ -adrenérgico ( $\alpha 2A$ ) se tornou um método divisor de águas para a obtenção de sêmen de felinos, resultando em uma amostra de menor volume e maior concentração (Araujo et al., 2018; Silva et al., 2021; Zambelli et al., 2008).

As primeiras colheitas de sêmen em onças-pintadas foram realizadas com o uso de eletroejaculador em animais contidos fisicamente nos zoológicos de São Paulo e de Porto Alegre (Carvalho, 1968; Mies Filho et al., 1974). Porém, o uso de eletroejaculador sem anestesia para a colheita de sêmen é considerado um procedimento doloroso (Palmer, 2005) e conseqüentemente promove experiências mentais negativas e ferindo o modelo de cinco domínios para avaliação e monitoramento do bem-estar animal (Mellor et al., 2020). A EJ efetuada com animais sob anestesia é segura e atende os critérios de bem-estar animal (Silva et al., 2004). Já a eficácia da técnica pode ser afetada pelo tipo de corrente elétrica, pela sonda e pela taxa de estimulação, que pode ser contínua ou em série, dependendo da espécie (Merilan et al., 1982).

A EJ sob anestesia iniciou-se com a utilização de associação de tiletamina com zolazepam em onças-pintadas (10 mg/kg, im; Azevedo et al., 2008; Costa et al., 2008; Morato et al., 1998) e em onças-pardas (1,5 mg/kg, im; Silva et al., 2014). Jorge-Neto reporta o insucesso na recuperação de sêmen de onças-pardas jovens (em torno de 20 meses de idade) e um macho de onça-pintada adulto com o uso deste protocolo, e todos posteriormente colhidos com sucesso com a utilização de medetomidina.

Visando aumentar a eficiência da técnica de EJ, iniciou-se protocolo anestésico com o uso de sedativos agonistas dos receptores  $\alpha 2A$ , que promovem o relaxamento dos vasos deferentes e dos músculos uretrais, resultando na liberação do ejaculado na uretra (Virtanen et al., 1988). A combinação de  $\alpha 2A$  (xilazina e dexmedetomidina) associado à cetamina foi usada com sucesso para colher sêmen de onças-pintadas (Gonzalez et al., 2017; Silva et al., 2019) e onças-pardas (Araujo et al., 2020b; Deco-Souza et al., 2013). Para evitar a contaminação do sêmen com urina, a vesícula urinária é esvaziada com um cateter uretral e lavada com solução salina 0,9% antes da EJ (Araujo et al., 2020a; Deco-Souza et al., 2010).

Ainda que a EJ sob anestesia seja uma técnica aceita e habitualmente utilizada, não é certo que o procedimento de EJ cause dor, mas há desconforto causado pelos estímulos elétricos (Silvatti et al., 2020), além de frequentemente resultar em amostras contaminadas com urina. O  $\alpha 2A$  leva à contração do músculo liso dos canais deferentes em felídeos, promovendo a liberação de sêmen na uretra. Isso permite a recuperação do sêmen por cateterismo uretral, sem contaminação da urina (Zambelli et al., 2008). Desta forma e em substituição à EJ, tem havido implementação bem-sucedida do uso de um  $\alpha 2A$  para colheita farmacológica de sêmen através da cateterização uretral (Araujo et al., 2018; Araujo et al., 2020b; Jorge-Neto et al., 2020c; Jorge Neto, 2019; Jorge Neto et al., 2019), resultando em um maior número de espermatozoides colhidos por ejaculado, sem afetar a qualidade do sêmen.



É possível a recuperação de sêmen epididimário de animais *post mortem*. Entre as diferentes técnicas para obtenção de espermatozoides do epidídimo foram utilizadas a técnica de *flushing*, que consiste na lavagem do epidídimo com meio tampão (ex. Easibuffer B, IMV Technologies) ou diluente de sêmen em onças-pardas e pintadas (Carelli et al., 2017; Gonzalez et al., 2017); pela técnica de *slicing*, em que o epidídimo é fatiado em uma placa de Petri contendo meio para sêmen (Cucho et al., 2016); ou por *squeezing*, que com o auxílio de uma pinça é realizada a compressão do epidídimo em sentido ao ducto deferente (Bento et al., 2019) em onças-pardas.

### **Análise seminal por sistema computadorizado (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis)**

A avaliação de amostras seminais por sistemas computadorizados teoricamente permite a avaliação padronizada dos parâmetros espermáticos entre diferentes estudos e instituições. No entanto, para isso faz-se necessário o desenvolvimento de uma configuração padrão para cada espécie estudada, ou grupo de espécies que possuam morfometria espermática similar. Ainda, é fundamental a descrição do procedimento de preparo das amostras e da câmera de análise para permitir a repetibilidade e a comparação entre os experimentos.

A configuração para a CASA foi pela primeira vez padronizado por Jorge-Neto et al. (2020a) para onças-pintadas, sendo tal configuração eficiente também para onças-pardas. A CASA pode ser realizada com a diluição de uma alíquota do ejaculado em solução tampão (EasiBuffer B; IMV Technologies) ou diluente de sêmen (OptiXcell; IMV Technologies). O fator de diluição a ser utilizado deve almejar a concentração espermática de  $\sim 20 \times 10^6$  espermatozoides por mL, que resultará em uma quantidade aproximada de 80 células – número considerado ideal – por campo de análise no CASA. Em seguida, 3 $\mu$ L do sêmen diluído devem ser carregados em uma câmera de análise modelo LEJA (4 poços, 20 $\mu$ m, IMV Technologies) e analisada em sistema de análise computadorizado da movimentação espermática. Para definir a configuração em onças-pintadas, Jorge-Neto et al. (2020a) usaram o sistema IVOS II pelo software Animal Breeders II (Hamilton Thorne) (Tabela 1).

### **Criopreservação de sêmen em onças**

O meio TRIS-gema-glicerol é o mais usado na criopreservação dos grandes felinos, com concentrações de glicerol que variam de 4 a 7,5% (Tabela 2). A única alternativa testada até o momento para criopreservação de sêmen de onças-pintadas foi um meio à base de água de coco em pó (ACP-117c), no entanto o meio TRIS se mostrou superior, mantendo sua recomendação para a espécie (Silva et al., 2020).

A gema de ovo é o componente base de muito meios de criopreservação de sêmen por conferir proteção à membrana espermática. Apesar de todos os trabalhos nos grandes felinos neotropicais terem usado a gema de ovo, sua instabilidade e limitação para exportações justificam a necessidade de investigar alternativas que vem sendo usadas em outras espécies, como a lecitina de soja e as lipoproteínas de baixa densidade (Bencharif et al., 2008; Lambo et al., 2012). Em se tratando da criopreservação de sêmen em animais de vida livre, a substituição da gema de ovo é fundamental, pois pela nossa experiência ela não se adequa às necessidades logísticas para os trabalhos a campo. Além do mais em algumas espécies as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) tem se mostrado superiores à gema de ovo na congelabilidade espermática (Silva, 2020). Sabe-se também que a toxicidade do crioprotetor varia entre as espécies, logo mesmo que em diversas espécies de felinos o glicerol seja o de escolha, faz-se necessário investigar se em onças-pardas e onças-pintadas ele é realmente a melhor alternativa. Para exemplificar, dentro os canídeos, lobos-guará toleram melhor o DMSO enquanto o lobo vermelho tem melhores resultados com o glicerol (Franklin et al., 2018; Lueders et al., 2013).

Os poucos trabalhos com criopreservação de sêmen nos grandes felinos neotropicais (aproximadamente sete – Tabela 2) nos alerta para a necessidade de mais esforços nesta linha de pesquisa, investigações sobre substitutos à gema de ovo e o crioprotetor que melhor se adequa a cada espécie são fundamentais para melhorar a qualidade do sêmen descongelado, possibilitando seu uso para as diversas tecnologias reprodutivas disponíveis.



Tabela 1. Configuração para análise computadorizada de espermatozoides de onças-pintadas

Setup	Nome	Configurações
Analysis limits	Min motility Percent	0
	Min progressive Percent	0
	Min total Count	200
Calibration	Objective	1:Zeiss 10x NH 160nm
	Objective Magnification X	1.21
	Objective Magnification Y	1.21
Camera	Exposure (Ms)	4
	Gain	300
	Integrate Enabled	FALSE
	Integrate Time (Ms)	500
Cell Detection	Elongation Max (%)	100
	Elongation Min (%)	1
	Enable Advanced Tail Detection	FALSE
	Head Brightness Min	190
	Head size Max ( $\mu\text{m}^2$ )	85
	Head size min ( $\mu\text{m}^2$ )	4
	Static Tail Filter	TRUE
	Tail Brightness Min	96
Chamber	Tail Min Brightness Auto Offset	8
	Tail Min Brightness Mode	AUTO FIRST FRAME
	Capillary Correction	1.3
Chamber	Chamber Depth ( $\mu\text{m}$ )	20
	Chamber type	CAPILLARY
	Contains Auto illum Calibration	FALSE
Illumination	Histogram Smooth Width	0
	Illumination Primary	LED – Red
	Max Photometer	70
	Min Photometer	60
Kinematics	Cell Travel Max ( $\mu\text{m}$ )	15
	Enable Motile Static Collision Avoidance	FALSE
	Motile cells require a tail	FALSE
	Motile require Tails Max VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	0
	Progressive STR (%)	80
	Progressive VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	45
	Slow VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	20
	Slow VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	5
	Static Algorithm	Length
	Static VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	4
Static VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	1	
Morph	Static Width Multiplier	0.5
	DMR Confidence (%)	20
	DMR Droplet to tail end Max ( $\mu\text{m}$ )	4
	DMR Tail Length Max ( $\mu\text{m}$ )	15
	Droplet Confidence (%)	30
	Droplet Distal Distance Min ( $\mu\text{m}$ )	4
	Droplet Proximal Head Length ( $\mu\text{m}$ )	6.5
	Min Tail Length ( $\mu\text{m}$ )	4
	Morph Normal Minimum Percentage	0
	Tail Bend Angle Averaging Length ( $\mu\text{m}$ )	5
	Tail Bending Angle Rate Min ( $^\circ/\mu\text{m}$ )	20
	Tail Bent Confidence (%)	60
	Tail Coiled Angle Min ( $^\circ$ )	180
Tail Coiled Confidence (%)	80	
Tail Confidence (%)	75	
Stage	Stage Temp	37
Viadent	Viadent Fluo Sperm	NON VIABLE
Video Capture	Frame Capture Speed (Hz)	60
	Frame count	30

Fonte: (Jorge-Neto et al., 2020a)

Tabela 2. Meios usados para a criopreservação de sêmen de onças-pintadas (*Panthera onca*) e onças-pardas (*Puma concolor*).

Espécie	Meio	Concentração espermática	Referência
<i>P. onca</i>	TRIS gema (20%) glicerol (6%)	50 x 10 <sup>6</sup> spz/mL	(Araujo et al., 2020a)
<i>P. onca</i>	TRIS gema (20%) glicerol (4%)	NC	(Paz et al., 2000)
<i>P. onca</i>	TRIS gema (20%) glicerol (4%)	NC	(da Paz et al., 2007)
<i>P. onca</i>	ACP-117c, gema (20%) glicerol (6%)	NC	(Silva et al., 2020)
<i>P. onca</i>	TRIS gema (20%) glicerol (6%)	NC	
<i>P. onca</i>	11% lactose, 4% glicerol, 20% gema	NC	(Swanson et al., 1996)
<i>P. concolor</i>	TRIS gema (20%) glicerol (5%)	NC	(Deco-souza et al., 2013)
<i>P. concolor</i>	TRIS gema (20%) glicerol (7,5%)	NC	
<i>P. concolor</i>	TRIS gema (20%) glicerol (6%)	50 x 10 <sup>6</sup> spz/mL	(Araujo et al., 2020b)

NC – não consta no artigo

ACP-117c – água de coco em pó

### Considerações finais

Apesar dos avanços na andrologia dos grandes felinos neotropicais, mais informações a respeito da sua fisiologia reprodutiva assim como o refinamento da colheita farmacológica e criopreservação de sêmen são necessários. Além disso, informações estruturais, fisiológicas e metabólicas do espermatozoide são extremamente escassas e pouco exploradas, sendo de grande importância para o aprimoramento das tecnologias reprodutivas. A colheita farmacológica mostra-se como um importante divisor de águas para a colheita de sêmen em animais de vida livre, porém ainda sim há de se aprimorar as doses mínimas necessárias para obter o efeito desejado, priorizando a segurança anestésica. No que se refere à criopreservação de sêmen o desafio se refere a aprimorar meios sem gema de ovo, visto que a mesma não é estável suficiente para trabalhar com animais e vida livre além disso, a baixa qualidade e congelabilidade do sêmen dessas espécies demanda o refinamento dos crioprotetores a fim de se descongelar amostras mais viáveis possíveis. O aprimoramento de técnicas como a FIV e a ICSI devem caminhar em paralelo à melhora dos protocolos de criopreservação, objetivando aproveitar as amostras de qualidade inferior.

### Referências

- Amann RP, Schanbacher BD.** Physiology of male reproduction. *J Anim Sci*, n.57, p.380–403, 1983 [https://doi.org/10.2527/animal\\_sci1983.57](https://doi.org/10.2527/animal_sci1983.57).
- Amann RP, Veeramachaneni DNR. Cryptorchidism and associated problems in animals. *Anim Reprod*, n.3, p.108–20, 2006.
- Araujo GR de, Deco-Souza T de, Bergo LCF, Silva LC da, Morato RG, Jorge-Neto PN, Silva MCC da, Macedo GG, Paula TAR de.** Field friendly method for wild feline semen cryopreservation. *J Threat Taxa*, n.12, p.15557–64, 2020. <https://doi.org/10.11609/jott.5744.12.5.15557-15564>.
- Araujo GR de, Paula TAR de, Deco-Souza T de, Morato RG, Bergo LCF, Silva LC da, Costa DS, Braud C.** Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. *Anim Reprod Sci*, v.195, p.1–7, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.019>.
- Araujo GR, Paula TAR, Deco-Souza T, Morato RG, Bergo LCF, Silva LC, Jorge-Neto PN, Sampaio BFB.** Colheita farmacológica de sêmen de onças-pardas (*Puma concolor*: Mammalia: Carnivora: Felidae). *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*, v.72, p.437–42, 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11030>.
- Azevedo MHF de, Paula TAR de, Matta SL pinto da, Fonseca CC, Neves MTD das.** Testicular morphometry and the seminiferous tubule in adult jaguars (*Panthera onca*). *Rev Ceres*, v.53, p.374–81, 2006.
- Azevedo MHF, Paula TAR, Balarini MK, Matta SLP, Peixoto JV, Guião Leite FL, Rossi Jr. JL, da Costa EP.** Organization and quantification of the elements in the intertubular space in the adult jaguar testis (*Panthera onca*, LINNAEUS, 1758). *Micron*, v.39, p.1166–70, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.05.005>.
- Barnabe RC, Guimarães MA de BV, Oliveira CA de, Barnabe AH.** Analysis of some normal



- parameters of the spermiogram of captive capuchin monkeys (*Cebus apella* Linnaeus, 1758). *Brazilian J Vet Res Anim Sci*, v.39, p.331–3, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962002000600010>.
- Barone MA, Roelke ME, Howard J, Brown JL, Anderson AE, Wildt DE.** Reproductive characteristics of male Florida panthers: comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American zoos. *J Mammal*, v.75, p.150–62, 1994. <https://doi.org/10.2307/1382247>.
- Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Larrat M, Tainturier D.** The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, v.70, p.1478–88, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.095>.
- Bento HJ, Vieira RLA, Iglesias GA, Kuczumarski AH, Dias SMND, Paz RCR.** Coleta e avaliação de espermatozoides epididimários obtidos pela técnica de squeezing em Puma concolor de vida livre. *Nat Online*, v.17, p.82–8, 2019.
- Carelli JB, Jorge Neto PN, Requena LA, Rodrigues MG, Salomão Júnior JA, Ferreira SAP, Pizzutto CS, Baldassarre H.** In vitro fertilization of puma (*Puma concolor*) from vitrified oocytes and semen collected from epididymis of dead donor: Case report. *Rev Bras Reprodução Anim*, v.41, p.364, 2017.
- Carvalho CT.** Sêmen em grandes felinos. *Rev Med Vet (Bogota)*, v.2, p.195–201, 1968.
- Charlesworth D, Willis JH.** The genetics of inbreeding depression. *Nat Rev Genet*, v.10, p.783–96, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrg2664>.
- Christiansen IJ.** Reprodução no cão e no gato. São Paulo: Manole; 1988.
- Costa GMJ, Chiarini-Garcia H, Morato RG, Alvarenga RLLS, França LR.** Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*, v.70, p.1136–46, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.035>.
- Cucho H, Alarcón V, Ordóñez C, Ampuero E, Meza A, Soler C.** Puma (*Puma concolor*) epididymal sperm morphometry assessed by the ISAS ® v1 CASA-Morph system. *Asian J Androl*, v.18, p.879–81, 2016. <https://doi.org/Acabei>.
- Deco-souza T de, Paula TAR de, Costa DS, Costa EP, Barros JBG de, Araújo GR de.** Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). *Pesqui Veterinária Bras*, v.33, p.512–6, 2013.
- Deco-Souza T, Paula TAR, Costa DS, Araújo GR, Garay R de M, Vasconcelos GSC, Csermak-Júnior AC, Silva LC da, Barros JBG.** Coleta e avaliação de sêmen de pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos mantidos em cativeiro. *Rev Bras Reprodução Anim*, v.34, p.252–9, 2010.
- Franklin AD, Waddell WT, Goodrowe KL.** Red wolf (*Canis rufus*) sperm quality and quantity is affected by semen collection method, extender components, and post-thaw holding temperature. *Theriogenology*, v. 116, p. 41–8, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.05.007>.
- Gonzalez SJ, Howard JG, Brown J, Grajales H, Pinzón J, Monsalve H, Moreno MA, Jimenez Escobar C.** Reproductive analysis of male and female captive jaguars (*Panthera onca*) in a Colombian zoological park. *Theriogenology*, v.89, p.192–200, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.049>.
- Griffin B, White S, Kustritz MVR.** Disorders of Sexual Development and Common Reproductive Pathologies. In: White S (Ed). High-Quality, High-Volume Spay Neuter Other Shelter Surgeries, Hoboken, NJ, USA: Wiley-Blackwell, p.27–51, 2020
- Guião Leite FL.** Análise morfológica do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (*Puma concolor*, Wozencraft,1993). Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- Hayes HM, Wilson GP, Pendergrass TW, Cox VS.** Canine cryptorchism and subsequent testicular neoplasia: Case-control study with epidemiologic update. *Teratology*, v.32, p.51–6, 1985. <https://doi.org/10.1002/tera.1420320108>.
- Huffmeyer AA, Sikich JA, Vickers TW, Riley SPD, Wayne RK.** First reproductive signs of inbreeding depression in Southern California male mountain lions (*Puma concolor*). *Theriogenology*, v.177, p.157–164, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.10.016>.
- ICMBio. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos. vol. II. Brasília, DF: ICMBio/MMA; 2018.
- Jorge-Neto PN, Araújo GR, Silva MCC, Salomão-Jr JA, Csermak-Jr AC, Pizzutto CS, Deco-Souza T, Camus AD.** Description of the CASA system configuration setup for jaguar (*Panthera onca*). *Anim Reprod Sci*, n. 220, p. 40–1, 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106436>.
- Jorge-Neto PN, Luczinski TC, Araújo GR de, Salomão Júnior JA, Traldi A de S, Santos JAM dos, Requena LA, Gianni MCM, Deco-Souza T de, Pizzutto CS, Baldassarre H.** Can jaguar (*Panthera*





- onca*) ovulate without copulation? *Theriogenology*, v.147, p.57–61, 2020b. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.026>.
- Jorge-Neto PN, Pizzutto CS, Araújo GR de, Deco-Souza T de, Silva LC da, Salomão Jr. JA, Baldassare H.** Copulatory behavior of the Jaguar *Panthera onca* (Mammalia: Carnivora: Felidae). *J Threat Taxa*, v. 10, v. 15, p. 12933–9, 2018. <https://doi.org/10.11609/jott.4218.10.15.12933-12939>.
- Jorge-Neto PN, Silva MCC da, Csermak-Júnior AC, Salmão-Júnior JA, Araújo GR de, Oliveira G de, Leuzinger L, Pizzutto CS, Deco-Souza T de.** Cryptorchidism in free-living jaguar (*Panthera onca*): first case report. *Anim Reprod*, n. 17, p.4, 2020c. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0555>.
- Jorge Neto PN.** *Bioteecnologias reprodutivas aplicadas à produção de embriões in vitro de onça-parda (Puma concolor) e onças-pintadas (Panthera onca)*. 2019. 82f. (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. <https://doi.org/10.11606/D.10.2019.tde-26092019-103937>.
- Jorge Neto PN, Araujo GR, Deco-souza T de, Bittencourt RF, Csermak Jr AC, Pizzutto CS, Silva MCC da, Salomão Jr JA, Madrigal-Valverde M, Curvelo VP, Gomes MC, Paula TAR de.** Pharmacological semen collection of Brazilian wild felids. *Rev. Bras. Reprodução Anim*, v.43, p.704, 2019..
- Lambo CA, Grahn RA, Lyons LA, Bateman HL, Newsom J, Swanson WF.** Comparative Fertility of Freshly Collected vs Frozen-Thawed Semen with Laparoscopic Oviductal Artificial Insemination in Domestic Cats. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.284–8, 2012. <https://doi.org/10.1111/rda.12038>.
- Leite FLG, De Paula TAR, Da Matta SLP, Fonseca CC, Das Neves MTD, De Barros JBG.** Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Anim Reprod Sci*, n.91, p.307–16, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.003>.
- Lueders I, Luther I, Müller K, Scheepers G, Tordiffe A, Horst G.** Semen collection via urethral catheter in exotic feline and canine species: A simple alternative to electroejaculation. *proceedings Int. Conf. Dis. Zoo and Wild Anim.*, Vienna: 2013, p.161. Resumo.
- Mansfield KG, Land ED.** Cryptorchidism in Florida panthers: prevalence, features, and influence of genetic restoration. *J Wildl Dis*, v. 38, p. 693–8, 2002. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.4.693>.
- Mellor DJ, Beausoleil NJ, Littlewood KE, McLean AN, McGreevy PD, Jones B, Wilkins C.** The 2020 Five Domains Model: Including Human–Animal Interactions in Assessments of Animal Welfare. *Animals*, v. 10, p. 1870, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10101870>.
- Merilan CP, Read BW, Boever WJ.** Semen collection procedures for captive wild animals. *Int Zoo Yearb*, v. 22, p. 241–4, 1982. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.1982.tb02041.x>.
- Mies Filho A, Telechea NL, Bohrer JL, Wallawer WP.** Produção espermática de *Panthera onca*. *Arq Da Fac Veterinária - UFRGS*, v.2, p.55–65, 1974.
- Morato R, Guimarães MADB, Nunes ALV, Carciofi AC, Ferreira F, Barnabe VH, Barnabe RC.** Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). *Brazilian J*, v.35, p.178–81, 1998. <https://doi.org/10.1590/S1413-95961998000400007>.
- Morato RG, Conforti VA, Azevedo FC, Jacomo ATA, Silveira L, Sana D, Nunes AL V, Guimarães MAB V, Barnabe RC.** Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction*, v.122, p.745–51, 2001. <https://doi.org/10.1530/reprod/122.5.745>.
- Morato RG, Ferraz KMPMDB, de Paula RC, Campos CB De.** Identification of Priority Conservation Areas and Potential Corridors for Jaguars in the Caatinga Biome, Brazil. *PLoS One*, v.9, p.e92950, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092950>.
- Palmer CW.** Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology*, v. 64, p. 469–79, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.032>.
- Paviolo A, De Angelo C, Ferraz KMPMB, Morato RG, Martinez Pardo J, Srbek-Araujo AC et al.** A biodiversity hotspot losing its top predator: The challenge of jaguar conservation in the Atlantic Forest of South America. *Sci Rep*, v. 6, p. 37147, 2016 <https://doi.org/10.1038/srep37147>.
- da Paz RCR, Züge RM, Barnabe VH.** Frozen jaguar (*Panthera onca*) sperm capacitation and ability to penetrate zona free hamster oocytes. *Brazilian J Vet Res Anim S*, v.44, p.337–44, 2007.
- Paz RCR da, Züge RM, Barnabe VH, Morato RG, Felipe PAN, Barnabe RC.** Avaliação da capacidade de penetração de sêmen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos. *Brazilian J Vet Res Anim Sc*, v. 37, p. 462–6, 2000. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962000000600008>.
- Pizzutto CS, Colbachini H, Jorge-Neto PN.** One Conservation: the integrated view of biodiversity conservation. *Anim Reprod*, v. 18, p. e20210024, 2021. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0024>.
- Silva AR, Morato RG, Silva LDM.** The potential for gamete recovery from non-domestic canids and



- felids. *Anim Reprod Sci*, v. 80, p. 159–75, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.10.001>.
- Silva HVR, Mota Filho AC, Freitas LA de, Pinto J, Freire LMP, Silva LDM da.** Avaliação seminal de onça-parda (*Puma concolor*). *Acta Vet Bras*, v.8, p.33–4, 2014. <https://doi.org/10.21708/avb.2014.8.0.3963>.
- Silva HVR, Nunes TGP, Brito BF, Campos LB, Silva AM da, Silva AR, Comizzoli P, Silva LDM da.** Influence of different extenders on morphological and functional parameters of frozen-thawed spermatozoa of jaguar (*Panthera onca*). *Cryobiology*, v.92, p.53–61, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.195>.
- Silva HVR, Nunes TGP, Ribeiro LR, Freitas LA de, de Oliveira MF, Assis Neto AC de, Silva AR, Silva LDM da.** Morphology, morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*) sperm. *Anim Reprod Sc*, v.203, p.84–93, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.011>.
- Silva MCC.** Desenvolvimento de técnicas de coleta e criopreservação de sêmen de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) aplicáveis para uso a campo. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2020.
- Silva MCC da, Ullony KM, Araújo GR de, Jorge-Neto PN, Albuquerque VB, Caramalac SM, Oliveira AR de, Zanella R, Marques MG, Luczinski TC, Frazilio F de O, Silva EV da C e, Deco-Souza T de.** Can detomidine replace medetomidine for pharmacological semen collection in domestic cats? *Anim Reprod*, p.18, 2021.
- Silvatti B, Granato TM, Jorge-Neto PN, Luppi MMCP, Reisfeld LC, Henrique PC, Padilha FLA, Leite RF, Losano JD de A, Kawai GKV, Nichi M, Pizzutto CS.** Sperm evaluation and morphological description of male genitalia of meerkats (*Suricata suricatta*). *Anim Reprod Sci*, v.221, p.106585, 2020 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106585>.
- Swanson WF, Roth TL, Blumer E, Citino SB, Kenny D, Wildt DE.** Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Panthera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology*, v.45, p.241, 1996. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)84714-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)84714-5).
- Virtanen R, Savola J-M, Saano V, Nyman L.** Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an  $\alpha 2$ -adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol* 1988, v.150, p.9–14, 1998. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90744-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90744-3).
- Wildt DE.** Potencial applications of IVF technology for species conservation. In: Bavister B.D., E. R, J. C, editors. *Fertil. Mamm.*, Newton: Norwell, p.349–64, 1990.
- Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo B.** Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.69, p.485–90, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.019>.
-