



O que já sabemos sobre a reprodução de fêmeas de grandes felídeos?

What do we already know about the reproduction of big cats' females?

Pedro Nacib Jorge-Neto^{1,2*}, Anneliese de Souza Traldi^{1,2}, Letícia Alecho Requena¹, Thyara de Deco-Souza^{1,3} (<https://orcid.org/0000-0002-5157-3605>), Antonio Carlos Csermak-Jr¹, Cristiane Schilbach Pizzutto^{1,2}, Gediendson Ribeiro de Araújo^{1,3,4}, Thiago Cavalheri Luczinski^{1,2,5}, Hernan Baldassarre^{1,6}

¹Instituto Reprocon, Campo Grande, MS, Brasil

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

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

⁴Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

⁵Instituto NEX – No Extinction, Corumbá de Goiás, GO, Brasil

⁶McGill University, Montreal, Canadá

*R Vitoriano dos Anjos, 1081, 13041-317, Campinas, SP, Brazil

Resumo

Os grandes felídeos são predadores de topo de cadeia com um papel essencial nos ecossistemas globais. O conceito de Conservação Única propõe a reprodução artificial como uma das ferramentas para reduzir a vulnerabilidade dessas espécies. Este manuscrito teve como objetivo avaliar o que há de novo na reprodução de grandes felídeos na última década. O conhecimento da fisiologia e do comportamento reprodutivo é o primeiro passo para o desenvolvimento de tecnologias reprodutivas em animais selvagens. Nos grandes felídeos, o comportamento copulatório é de fundamental importância, pois necessitam de mecanismos de indução da ovulação, que podem ser mecânicos, sensoriais ou via administração de hormônio luteinizante. O sucesso no cuidado neonatal representa o sucesso da tecnologia reprodutiva em fêmeas. Na última década, o sucesso da inseminação artificial foi relatado apenas em tigres-siberianos e leopardos da Anatólia, e a inseminação de onças-pintadas é foco de pesquisa do Instituto Reprocon, trocando material genético entre ambientes *in situ* e *ex situ* por meio de inseminação artificial. Para obter oócitos viáveis de alta qualidade, a técnica de escolha é a colheita de oócitos por laparoscopia. A produção de embriões *in vitro* enfrenta desafios para a maturação eficiente de oócitos e sua vitrificação eficiente. As técnicas reprodutivas precisam de estudos aprofundados em grandes felídeos para atingir a repetibilidade necessária para uma aplicação eficiente na conservação.

Palavras-chave: embrião, oócito, *in vitro*, inseminação artificial, *Panthera*.

Abstract

*Big cats are apex predators with an essential role in global ecosystems. The One Conservation concept proposes artificial reproduction as one of the tools to reduce the vulnerability of these species. This manuscript aimed to assess what is new in big cat reproduction in the last decade. Knowledge of reproductive physiology and behavior is the first step towards developing reproductive technologies in wild animals. In big cats, copulatory behavior is of fundamental importance because they need ovulation induction mechanisms, which can be mechanical, sensory, or via the administration of the luteinizing hormone. The success in neonatal care represents the success of reproductive technology in females. In the last decade, successful artificial insemination was only reported in Siberian tigers and Anatolian leopards. Jaguar artificial insemination focuses on research at the Reprocon Institute, exchanging genetic material between *in situ* and *ex situ* environments thru artificial insemination. The technique of choice is laparoscopic ovum pick-up to obtain high-quality viable oocytes. The production of *in vitro* embryos faces challenges for the efficient maturation of oocytes and their efficient vitrification. Reproductive technologies need in-depth studies in big cats to achieve the repeatability necessary for efficient application in conservation.*

Keywords: embryo, oocyte, fibroblast, *in vitro*, artificial insemination, *Panthera*.

¹Correspondência: pepovet@usp.br

Recebido: 21 de outubro de 2021

Aceito: 23 de novembro de 2021



Introdução

Desempenhando papéis essenciais em ecossistemas globais ajudando a regular o ambiente em que habitam, os grandes felídeos são predadores de topo de cadeia compostos por tigres (*Panthera tigris*), leões (*Panthera leo*), onças-pintadas (*Panthera onca*), leopardos (*Panthera pardus*), onças-pardas (*Puma concolor*), chitas (*Acinonyx jubatus*) e leopardos-das-neves (*Panthera uncia*). Essas sete espécies são subdivididas em 30 subespécies, e todas vêm sofrendo pressões antrópicas significativas, diminuindo as populações de vida livre e resultando em diferentes níveis de ameaça quanto ao risco de extinção.

A conservação dessas espécies e subespécies depende de ações para reduzir sua vulnerabilidade, onde o conceito de Conservação Única (Pizzutto *et al.*, 2021) propõe a reprodução artificial (RA) como estratégia viável. O desenvolvimento dessas técnicas seria fundamental para permitir seu uso para reconstruir o equilíbrio em número de animais (Baldassarre *et al.*, 2015) e permitir a troca de material genético entre populações *in situ* e *ex situ*. A RA requer a formação de bancos de germoplasma (bio-bancos), que podem garantir a preservação de espécies raras e ameaçadas de extinção no futuro (Comizzoli, 2017). O uso futuro desse material genético permite a reprodução direcionada e, consequentemente, reduz incompatibilidades genéticas e disseminação de doenças (Pizzutto *et al.*, 2021).

Para que a aplicação dessas técnicas seja bem-sucedida, é necessário um conhecimento sólido da fisiologia reprodutiva e do comportamento reprodutivo das espécies. As informações sobre a fisiologia ovariana, por exemplo, são um fator chave no desenvolvimento de protocolos e procedimentos eficazes de estimulação ovariana, como fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (TE). Portanto, pesquisas básicas sobre o conhecimento do comportamento copulatório e o aprimoramento dos protocolos de indução da atividade ovariana, colheita de oócitos e FIV são necessárias para permitir a implantação de programas de reprodução assistida, contribuindo assim para o revigoramento genético de espécies em áreas em que estão criticamente ameaçadas.

Assim, este manuscrito tem como objetivo atualizar o que há de novo na reprodução de felídeos na última década, com ênfase em onça-pintada e onça-parda, visto que são as duas espécies de grandes felídeos pertencentes à fauna brasileira.

Conhecimentos básicos

Para iniciar o desenvolvimento das biotécnicas reprodutivas, é necessário desvendar a fisiologia reprodutiva e o comportamento copulador da espécie. Os grandes felídeos, em geral, possuem características comuns que permitem extrapolação de achados entre espécies.

Na última década, estudos sobre comportamento reprodutivo puderam ser realizados com maior facilidade utilizando técnicas de videomonitoramento e coleiras equipadas com GPS. Comparado ao ambiente *ex situ*, o estudo de animais *in situ* requer recursos financeiros e humanos mais significativos, mas as coleiras GPS geram padrões de comportamento que podem contribuir para esse entendimento.

Na última década, estudos em populações *in situ* de grandes felídeos foram realizados com leopardo-das-neves avaliando o momento da reprodução e a idade de dispersão das crias (Johansson *et al.*, 2021), em leões-asiáticos o acasalamento multi-machos como estratégia das leoas ante ao infanticídio (Chakrabarti and Jhala, 2019) e em leopardo-persa o comportamento copulatório precoce de macho subadulto (Arasteh *et al.*, 2020). Estudos foram realizados em ambiente *ex situ* em leopardos da Anatólia sobre o comportamento de fêmea gestante e nos primeiros partos (Ertuev and Semenov, 2019), em tigres-siberianos foi avaliada a poliandria e a heteropatridade (Liu *et al.*, 2013), em tigres (siberiano, malaio e de Sumatra) sobre os fatores que influenciam o sucesso reprodutivo, a ciclicidade ovariana e a sobrevivência dos filhotes (Saunders *et al.*, 2014), em leões sobre métodos contraceptivos (Braga *et al.*, 2020) e avaliação do ciclo estral por citologia vaginal (Callealta *et al.*, 2020), e em leopardos-indianos o comportamento reprodutivo (Allwin *et al.*, 2016).

Em onças-pardas, Lagos *et al.* (2020) reportaram a cópula entre fêmeas, um comportamento relacionado à dominância e hierarquia entre animais do mesmo sexo; e Benson *et al.* (2012) reportaram cio (manifestação comportamental de estro) por outras razões que não a reprodução (pseudocio), sugerindo que onças-pardas associam com machos enquanto amamentam filhotes para manter relações amigáveis e evitar o infanticídio. Ambos os comportamentos foram visualizados também em onças-pintadas por pesquisadores do Reprocon (dados não publicados). Já em onças-pintadas, Jędrzejewski *et*



al. (2021) verificaram o efeito do sexo, idade e estado reprodutivo em padrões diários de atividade, onde fêmeas em ciclando são mais ativas que fêmeas em fases não-reprodutivas; Jorge-Neto *et al.* (2020b) avaliaram a interação durante o estro entre uma fêmea e um macho criptorquídico unilateral monitorados por colar de GPS, onde padrões de telemetria não demonstram sucesso reprodutivo no período avaliado.

O comportamento copulatório da onça-pintada foi descrito de forma qualitativa a partir dos primeiros sinais de proceptividade da fêmea até a finalização da cópula por Jorge-Neto *et al.* (2018), onde quase metade dos eventos de monta na espécie pode ocorrer sem penetração peniana e, nesses casos, acredita-se que a ejaculação não ocorra. Ainda, durante o estro da fêmea, diversas cópulas ocorrem, auxiliando a ocorrência de ovulações múltiplas e garantindo um número suficiente de cópulas com ejaculação, permitindo que um número adequado de espermatozoides seja depositado na vagina.

Em relação ao ciclo estral em onças-pintadas, a maturidade sexual ocorre em torno de 22 meses de vida, o ciclo estral possui duração média (\pm erro padrão da média) de $38,3 \pm 2,5$ dias (Viau *et al.*, 2020), a duração média (\pm desvio-padrão) do estro é de $6,5 \pm 0,3$ dias e a duração da gestação de uma fêmea avaliada foi de 98,0 dias (Barnes *et al.*, 2016).

Por décadas acreditou-se que a estimulação peniana na mucosa vaginal durante a cópula era a forma de indução da ovulação em grandes felídeos. No entanto, em estudos recentes envolvendo indivíduos mantidos sob cuidados humanos, Gonzalez *et al.* (2017) relataram atividade lútea em fêmeas não gestantes colocadas em compartimentos individuais sem contato visual com machos, sugerindo que a ovulação espontânea possa ocorrer ocasionalmente. Apesar da ausência de contato visual, as fêmeas estavam próximas suficientes para ouvir a vocalização e sentir o cheiro dos machos. Curiosamente, por meio da análise hormonal de esteroides fecais, Barnes *et al.* (2016) relataram ovulação espontânea em fêmeas alojadas com machos e nenhuma ocorrência de ovulação espontânea em fêmeas mantidas sem machos. Após comparar a ovulação em fêmeas divididas em três grupos: com o contato físico, sem o contato físico mas próximo aos machos, e isolada, Jorge-Neto *et al.* (2020a) elucidaram que a ovulação pode ocorrer por estímulos sensoriais, não apenas de forma espontânea. Esses resultados abrem um novo caminho a respeito dos estímulos sensoriais que podem induzir a ovulação em felídeos, extinguindo a ideia de que somente o estímulo mecânico da cópula teria esta função e trazendo à luz a possibilidade de estímulos auditivos, olfativos e até mesmo pela ação de feromônios atuando neste mecanismo fisiológico.

Estimulação da atividade ovariana

O grande diferencial de um protocolo de estimulação hormonal em felídeos selvagens, seja para a inseminação artificial, ou para as demais biotécnicas reprodutivas, envolve a administração dos hormônios através de dardos disparados por uma zarabatana ou rifle, e não na manipulação direta do animal. Isso envolve possíveis erros em dosagens, uma vez que parte do produto pode ser inoculado intramuscular e parte subcutâneo, parte se perder entre subcutâneo e pele ou mesmo por perdas no espaço-morto entre a seringa e a agulha do dardo (Rosenfield *et al.*, 2021). Ainda assim, é a única maneira possível de trabalhar tanto *ex situ*, quanto *in situ*, na tentativa de otimizar a formação de banco de germoplasma e multiplicar os animais de nossos diferentes biomas, através das biotécnicas reprodutivas disponíveis no momento.

Inseminação Artificial (IA)

Na última década, muito pouco foi relatado em relação à inseminação artificial em grandes felídeos. O sucesso da técnica consiste no depósito eficiente do sêmen no útero da fêmea, até os cuidados neonatais, e incluindo o posterior nascimento dos filhotes e o êxito no seu desenvolvimento e desmame. Assim, o sucesso da inseminação artificial apenas foi relatado em tigres-siberianos pela técnica intratubária (Lambo *et al.*, 2014) e pela inseminação não cirúrgica em leopardo da Anatólia (Lüders *et al.*, 2015) e leões-africanos (Callealta *et al.*, 2019). O único caso que se tem de relato de nascimento de onça-pintada – e noticiado pela mídia, o filhote não veio à termo, morrendo pouco após o nascimento (Andrade, 2019).

Atualmente o Reprocon, nosso grupo de pesquisa em preservação de felídeos selvagens, está desenvolvendo um protocolo de inseminação artificial laparoscópica em onças-pintadas que envolve o uso de um progestágeno, prostaglandina e eCG. O trabalho está sendo realizado no Instituto Onça-Pintada e consiste na troca de material genético entre espécimes *in situ* e *ex situ*. Para isso, o projeto tem



autorização do Sisbio para captura de animais de vida livre e manutenção temporária em ambiente *ex situ*. O sêmen, quando colhido de machos de vida livre, é usado em fêmeas *ex situ* e, quando colhido de machos em ambiente *ex situ*, é usado em fêmeas *in situ* (dados não publicados). O êxito neste projeto abrirá uma importante expectativa para a oxigenação genética de populações de vida livre isoladas e também para a população mantida sob cuidados humanos.

Aspiração Folicular por Laparoscopia (LOPU)

A LOPU é a técnica mais confiável e eficiente para obter oócitos de alta qualidade de grandes felídeos para uso na produção *in vitro* de embriões (PIVE) e na transferência nuclear de células somáticas (SCNT) (Baldassarre *et al.*, 2017; Jorge Neto *et al.*, 2018). A técnica realizada sob anestesia geral inalatória é minimamente invasiva e apresenta repetibilidade e confiabilidade, permitindo a observação das estruturas presentes nos ovários e a punção dos folículos através da observação laparoscópica, além de uma rápida recuperação da fêmea após o procedimento e, em geral, sem complicações cirúrgicas (Jorge Neto *et al.*, 2018).

Na última década, a LOPU foi utilizada eficientemente para obtenção de oócitos em chitas (Crosier *et al.*, 2020, 2017), em onças-pardas (Baldassarre *et al.*, 2015, 2017; Jorge Neto *et al.*, 2018) e em onças-pintadas (Jorge-Neto *et al.*, 2020a; Jorge Neto *et al.*, 2018), sendo os procedimentos realizados pelo Reprocon nas duas última espécies.

A LOPU é segura e eficiente, resultando oócitos em altos números (>20/onça) e qualidade (>80% viáveis), podendo ser repetida na mesma fêmea várias vezes sem causar sequelas com impacto negativo em sua vida reprodutiva (Jorge Neto *et al.*, 2018). Avaliação de procedimentos de LOPU sequenciais em duas onças-pardas demonstraram que não houve sequelas pelo procedimento (como aderências e cicatrizes ovarianas), não afetando assim a capacidade do animal em responder ao tratamento hormonal e obter oócitos viáveis em procedimentos subsequentes (Baldassarre *et al.*, 2017). Os mesmos pesquisadores também relatam que um terceiro animal submetido à LOPU foi, posteriormente, reintroduzido na natureza equipado com um colar de GPS, e abatido por caçadores ilegais. Através do monitoramento, o cadáver foi recuperado, e no exame necroscópico foram encontrados dois fetos, reforçando que a LOPU é um procedimento seguro e não impacta negativamente na fertilidade do animal. Em onças-pintadas, o grupo de pesquisa Reprocon realizou dois procedimentos de LOPU nas mesmas fêmeas (n = 6) e os resultados corroboram Baldassarre *et al.* (2017), não ocorrendo sequelas relacionadas ao primeiro procedimento. Ainda, quatro das seis fêmeas que foram pareadas com machos, todas gestaram e pariram com sucesso.

Maturação de oócitos *in vivo* vs *in vitro*

Independente da biotécnica que venha a ser utilizada na preservação do germoplasma feminino das onças-pardas e pintadas, além da melhoria dos protocolos de estimulação hormonal para maturação de oócitos *in vivo* ou *in vitro* e da técnica de LOPU, é fundamental a testagem e desenvolvimento de meios de maturação (MIV), capacitação espermática, fertilização (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), bem como criopreservação de oócitos e embriões.

A qualidade e a quantidade de oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* de onças-pardas e de onças-pintadas foram comparadas por Jorge Neto (2019). Dezoito procedimentos foram realizados em 12 onças-pintadas e 13 procedimentos em 11 onças-pardas, que receberam uma dose de eCG 110 horas antes da LOPU. Para a maturação *in vivo*, parte das fêmeas também recebeu aplicação de hCG 25 horas antes da LOPU. Ambas, pardas e pintadas, responderam à estimulação hormonal, com destaque para as onças-pardas, nas quais foram obtidos 204 oócitos expandidos de 205 aspirados (99,5%) de fêmeas tratadas com hCG e 211 oócitos de animais não tratados, submetidos à MIV. Nas onças-pintadas; 68,75% dos ovócitos de fêmeas tratadas com hCG estavam expandidos e passíveis de FIV, demonstrando a eficácia do protocolo hormonal. Ao comparar as duas espécies (onça-parda vs. onça-pintada), a quantidade total de oócitos viáveis aspirados ($35,08 \pm 5,72$ vs. $14,09 \pm 5,98$) diferiu estatisticamente (one-way ANOVA e t-Test, $P < 0,05$), porém em ambas o protocolo foi eficiente.

A maturação *in vivo* de oócitos pode aumentar a conversão de oócitos em embriões em comparação com a maturação *in vitro*. No entanto, quando maturado *in vivo*, o tempo entre a LOPU e a FIV é reduzido, tornando muitas vezes impossível o transporte de oócitos de locais mais remotos ao



laboratório. Novas pesquisas devem trazer soluções para aumentar a eficiência da maturação *in vitro* e desenvolver procedimentos e equipamentos que permitam a fertilização *in vitro* em locais remotos, permitindo o uso de oócitos maturados *in vivo*.

Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE)

Oócitos de onças-pardas (n=2) e onças-pintadas (n=3) colhidos por LOPU foram submetidos à PIVE (Jorge Neto, 2019), das quais uma onça-parda e duas onças-pintadas receberam hCG visando a maturação oocitária *in vivo*, e as demais sem estimulação por hCG, visando maturação *in vitro*. Foi utilizado sêmen de um macho de cada espécie, obtido por colheita farmacológica por cateterismo uretral (Araujo *et al.*, 2018), diluído e resfriado com OptiXcell (IMV Technologies, França), e os oócitos foram inseminados em gotas de FIV. Após 18 horas, aproximadamente, os prováveis zigotos foram transferidos para cultivo em meio mSOF sob óleo, por seis dias quando, hipoteticamente, atingiriam o estágio de blastocisto. Independente do tipo de maturação, *in vivo* ou *in vitro*, não houve clivagem dos oócitos das duas onças-pardas, enquanto nas onças-pintadas 53,1% dos oócitos maturados *in vivo* clivaram vs 0% dos maturados *in vitro*. No entanto, contaminação fúngica e bacteriana oriunda do sêmen contaminou o cultivo dos embriões, cessando as clivagens.

A ICSI foi realizada pela primeira vez em leões-africanos por Fernandez-Gonzalez *et al.* (2015), que comparou dois meios de maturação em oócitos de quatro leões e sêmen colhido do epidídimo de um leão, eutanasiados. De 68 oócitos colocados em MIV, 25 (36,8%) foram submetidos à ICSI 32 a 34h após a colocação no meio de maturação. A clivagem foi avaliada 30h após a ICSI, resultando em 11 (44%) zigotos presumíveis e em 4 (16%) blastocistos. Felídeos possuem alta taxa de formas espermáticas anormais ou teratospermia (Pukazhenthil *et al.*, 2001) e, usualmente, com baixa congelabilidade, especialmente em animais sob cuidado humano (G. Araujo *et al.*, 2020; Araujo *et al.*, 2018; Deco-Souza *et al.*, 2013). A ICSI possibilita o aproveitamento de amostras de sêmen de baixa qualidade que não são viáveis para IA e PIVE, sendo uma ferramenta crucial no desenvolvimento de técnicas reprodutivas nessas espécies.

Em chitas, Crosier *et al.* (2020) relataram o nascimento de dois filhotes oriundos de PIVE. Três doadoras foram estimuladas com eCG, e a maturação *in vivo* dos oócitos foi estimulada com a aplicação de LH. Um total de 48 oócitos foram recuperados por LOPU e a FIV foi realizada com um *pool* de sêmen de três machos diferentes resfriado a 4° C por 2,5h. Os embriões de duas e quatro células foram inovulados em três receptoras, resultando no nascimento de um casal.

Vitrificação de oócitos

A eficiência da vitrificação foi avaliada por Jorge Neto (2019) em oócitos de três onças-pardas, dos quais 42 maturados *in vivo* sob estímulo de hCG e 55 maturados *in vitro*. A qualidade dos oócitos reaquecidos ocorreu com a estabilização em meio FIV a 38,5°C em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ em ar por duas a quatro horas, sendo avaliada a integridade, cor e homogeneidade do citoplasma e da zona pelúcida.

A avaliação foi realizada em dois momentos distintos (Carelli *et al.*, 2017). No primeiro um total de 41 oócitos (21 maturados *in vivo* e 20 maturados *in vitro*) foram reaquecidos e a FIV foi realizada com sêmen colhido do epidídimo de um doador *post mortem*. Na segunda ocasião, 40 oócitos (14 maturados *in vivo* e 26 maturados *in vitro*) foram reaquecidos e realizada a FIV com sêmen fresco colhido por cateterização uretral (G. R. Araujo *et al.*, 2020), mantido por duas horas a 24°C. Em ambas as ocasiões, os presumíveis zigotos foram transferidos para o cultivo *in vitro* aproximadamente 21 horas após a FIV. Porém, os oócitos maturados *in vitro* degeneraram pós-aquecimento – sendo visualizado pós-FIV, o que leva a supor que não houve maturação *in vitro*, ou que a solução de vitrificação utilizada não é adequada a oócitos maturados no meio MIV utilizado.

Em leões-africanos, Zahmel *et al.* (2021) colheram oócitos por fatiamento de ovários de leões eutanasiados. Foram recuperados 119 oócitos, dos quais 60 foram para maturação *in vitro* (MIV), 59 foram vitrificados e, após o aquecimento, seguiram para MIV. Tanto os oócitos imaturos vitrificados quanto os frescos responderam à maturação *in vitro* com resultados semelhantes. Todos os oócitos foram submetidos à injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), mas os embriões derivados de oócitos vitrificados não progrediram além do estágio de clivagem.



Os resultados com vitrificação de oócitos imaturos em leoa, somados aos pôr nós obtidos em onça-parda, demonstram que mais soluções e métodos de vitrificação deverão ser testados para que possa ser viabilizado o aproveitamento de ovários de animais mortos em acidentes, pela caça indiscriminada ou eutanasiados, para posterior MIV. A viabilização da vitrificação permitirá que oócitos sejam criopreservados e armazenados em biobancos (Zahmel *et al.*, 2021), para que possam ser usados no futuro, visando o conceito de conservação única (Pizzutto *et al.*, 2021).

Conclusões

Biotécnicas reprodutivas aplicadas às fêmeas de grandes felídeos ainda necessitam de estudos aprofundados, principalmente em áreas básicas como perfis hormonais, por exemplo. A falta de repetitividade das técnicas aplicadas demonstra claramente esta necessidade. Somam-se à relativa pouca informação sobre a fisiologia e comportamento reprodutivo destas fêmeas, as diferenças entre dados coletados de animais *ex situ* e *in situ*. O ambiente *ex situ* se mostra como um local mais fácil para obtenção de dados, e desta forma como uma fonte importante de informações, vistos que muitos destes plantéis são considerados populações de segurança para a conservação. Contudo, a situação cativa pode ser responsável por alterações de padrões reprodutivos, fato que pode diminuir a eficiência de técnicas desenvolvidas *ex situ* quando utilizadas em fêmeas de vida livre.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Novagen Genética, IMV Technologies, Reprodux Laboratórios, In Vitro Clonagem e Bio Reprodução Animal pelo apoio nos procedimentos. Ao NEX-No Extinction, Mantenedor de Fauna Peter Crawshaw, NEX Santa Rosa, CRAS-Campo Grande - MS, Zoo de Limeira, Zoo de Guarulhos, Zoo de Brasília e Instituto Onça-Pintada pelo acesso aos animais. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. O presente trabalho foi financiado em parte pelo Instituto Reprocon.

Referências

- Allwin B, Kalignan P, Pradeep Nag B, Gopikrishnan D, Gokarn NS. The reproductive behavior of Indian leopards (*Panthera pardus fusca*). *J Vet Sci Technol*, v.7, n.5, p.279–282, 2016. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000358>.
- Andrade C. Vídeo mostra processo que gerou primeiro filhote de onça-pintada por inseminação artificial no Brasil. G1 Sorocaba e Jundiá 2019.
- Arasteh B, Rahmati S, Baradarani K, Moqanaki EM. Observation of early mating behaviour in a sub-adult Leopard (*Panthera pardus*) in Iran. *Zool Middle East*, v.66, n.3, p.279–282, 2020. <https://doi.org/10.1080/09397140.2020.1781369>.
- Araujo G, Deco-Souza T, Bergo LCF, Silva LC, Morato RG, Jorge-Neto PN, Silva MCC da, Macedo GG, Paula TAR de. Field friendly method for wild feline semen cryopreservation. *J Threat Taxa*, v.12, n.5, p.15557–15564, 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, n. Aug 2017, 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, n.2, p.437–442, 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11030>.
- Baldassarre H, Carelli JB, Requena LA, Rodrigues MG, Ferreira S, Salomão J, Jorge Neto PN. Efficient recovery of oocytes from “onça-parda” (*Puma concolor*) by laparoscopic ovum pick-up of gonadotropin-stimulated females. *Anim Reprod*, v.12, n.3, p.717, 2015.
- Baldassarre H, Requena LA, Carelli JB, Salomão Júnior JA, Rodrigues MG, Ferreira SAP, Traldi A de S, Jorge Neto PN. Laparoscopic ovum pick-up is a safe procedure for the collection of oocytes for



- preservation efforts in pumas (*Puma concolor*). *Anim Reprod*, v.14, n.3, p.780, 2017.
- Barnes SA, Andrew Teare J, Staaden S, Metrione L, Penfold LM.** Characterization and manipulation of reproductive cycles in the jaguar (*Panthera onca*). *Gen Comp Endocrinol*, v.225, p.95–103, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.012>.
- Benson JF, Lotz MA, Land ED, Onorato DP.** Evolutionary and practical implications of pseudo-estrus behavior in Florida panthers (*Puma concolor coryi*). *Southeast Nat*, v.11, n.1, p.149–154, 2012. <https://doi.org/10.1656/058.011.0116>.
- Braga DP de AF, Pizzutto CS, Rosenfield DA, Furtado PV, Oliveira CA, Corrêa SHR, Jorge-Neto PN, Guimarães MA de BV.** Suppression of ovarian activity in a captive African lion *Panthera leo* after deslorelin treatment. *J Threat Taxa*, v.12, n.11, p.16469–16477, 2020. <https://doi.org/10.11609/jott.5803.12.11.16469-16477>.
- Callealta I, Ganswindt A, Lueders I.** Reproductive cycle stage assessment using vaginal cytology evaluation in African lions (*Panthera leo*). *Anim Reprod Sci*, v.213, n. December 2019, p.106260, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106260>.
- Callealta I, Ganswindt A, Malan M, Lueders I.** Non-surgical artificial insemination using a GnRH analogue for ovulation induction during natural oestrus in African lions (*Panthera leo*). *Theriogenology*, v. 139, p. 28–35, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.07.022>.
- 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, n.1, p. 364, 2017.
- Chakrabarti S, Jhala Y V.** Battle of the sexes: a multi-male mating strategy helps lionesses win the gender war of fitness. *Behav Ecol*, v.30, n.4, p.1050–1061. <https://doi.org/10.1093/beheco/arz048>.
- Comizzoli P.** Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. *Anim Reprod*, v.14, n.1, p.30–33, 2017. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR889>.
- Crosier AE, Comizzoli P, Koester DC, Wildt DE.** Circumventing the natural, frequent oestrogen waves of the female cheetah (*Acinonyx jubatus*) using oral progestin (Altrenogest). *Reprod Fertil Dev*, v.29, n.8, p.486, 2017. <https://doi.org/10.1071/RD16007>.
- Crosier AE, Lamy J, Bapodra P, Rapp S, Maly M, Junge R, Haefele H, Ahistus J, Santiestevan J, Comizzoli P.** First birth of cheetah cubs from in vitro fertilization and embryo transfer. *Animals*, v.10, n. 10, p. 1811, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10101811>.
- Deco-Souza T de, Paula TAR de, Costa DS, Costa EP da, Barros JBG de, Araujo GR de, Carreta-Jr M.** Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). *Pesqui Veterinária Bras*, v.33, n.4, p.512–516, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000400015>.
- Ertuev MM, Semenov UA.** Some behavior features of a female *Panthera pardus tulliana* during pregnancy and at first parturitions. *Biodiversitas J Biol Divers*, v.20, n.5, p.1333–1338, 2019. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200523>.
- Fernandez-Gonzalez L, Hribal R, Stagegaard J, Zahmel J, Jewgenow K.** Production of lion (*Panthera leo*) blastocysts after invitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, v. 83, n. 6, p. 995–999, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.037>.
- 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>.
- Jędrzejewski W, Vivas I, Abarca M, Lampo M, Morales LG, Gamarra G, Schmidt K, Hoogsteijn R, Carreño R, Puerto MF, Viloría AL, Breitenmoser C, Breitenmoser U.** Effect of sex, age, and reproductive status on daily activity levels and activity patterns in jaguars (*Panthera onca*). *Mammal Res*, v.66, n.4, p.531–539, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13364-021-00589-0>.
- Johansson Ö, Ausilio G, Low M, Lkhagvajav P, Weckworth B, Sharma K.** The timing of breeding and independence for snow leopard females and their cubs. *Mamm Biol*, v.101, n.2, p.173–180, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42991-020-00073-3>.
- 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, 2020a.



<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, n.15, p.12933–12939, 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*, v. 17, n. 4, 2020b. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0555>.

Jorge Neto P, Alecho Requena L, Schilbach Pizzutto C, Baldassarre H. Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU): from animal production to conservation. *Spermova*, v.8, n.1, p.61–67, 2018. <https://doi.org/10.18548/asp/0006.07>.

Jorge Neto PN. Biotecnologias reprodutivas aplicadas à produção de embriões in vitro de onça-parda (*Puma concolor*) e onças-pintadas (*Panthera onca*). Universidade de São Paulo, 2019. <https://doi.org/10.11606/D.10.2019.tde-26092019-103937>.

Lagos N, Dünner C, Hogan J, Elbroch LM. Female–female mounting in pumas. *J Ethol*, v.38, n.3, p. 373–376, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10164-020-00658-y>.

Lambo CA, Bateman HL, Swanson WF. Application of laparoscopic oviductal artificial insemination for conservation management of brazilian ocelots and amur tigers. *Reprod Fertil Dev*, v.26, n.1, p.116, 2014. <https://doi.org/10.1071/RDv26n1Ab3>.

Liu D, Ma Y, Li H, Xu Y, Zhang Y, Dahmer T, Bai S, Wang J. Simultaneous polyandry and heteropaternality in tiger (*Panthera tigris altaica*): Implications for conservation of genetic diversity in captive populations of felids. *Chinese Sci Bull*, v.58, n.18, p.2230–2236, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11434-013-5722-5>.

Lüders I, Ludwig C, Weber H. None-surgical artificial insemination in felids: Asiatic golden cat (*Catopuma temmincki*) and Persian leopard (*Panthera pardus saxicolor*). In: Szentiks CA, Schumann A, editors. *Proc. Int. Conf. Dis. Zoo Wild Anim.* 2015, Berlin: Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (IZW); p.59–62, 2015.

Pizzutto CS, Colbachini H, Jorge-Neto PN. One Conservation: the integrated view of biodiversity conservation. *Anim Reprod*, v.18, n.2, p.e20210024, 2021. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0024>.

Pukazhenthil B, Wildt DE, Howard JG. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J Reprod Fertil*, v.57, p.423–433, 2001.

Rosenfield DA, Acosta A, Tavares DT, Pizzutto CS. Potential remote drug delivery failures due to temperature-dependent viscosity and drug-loss of aqueous and emulsion-based fluids. *J Threat Taxa*, v. 13, n.2, p.17639–17645, 2021. <https://doi.org/10.11609/jott.5745.13.2.17639-17645>.

Saunders SP, Harris T, Traylor-Holzer K, Beck KG. Factors influencing breeding success, ovarian cyclicity, and cub survival in zoo-managed tigers (*Panthera tigris*). *Anim Reprod Sci*, v. 144, n. 1–2, p. 38–47, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.006>.

Viau P, Rodini DC, Sobral G, Martins GS, Morato RG, de Oliveira CA. Puberty and oestral cycle length in captive female jaguars *Panthera onca*. *Conserv Physiol*, v.8, n.1, p.1–10, 2020. <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa052>.

Zahmel J, Jänsch S, Jewgenow K, Sandgreen D-M, Skalborg Simonsen K, Colombo M. Maturation and fertilization of African lion (*Panthera leo*) oocytes after vitrification. *Cryobiology*, v.98, n. Feb 2021, p.146–151, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.011>.
