



Colheita de sêmen e inseminação artificial em onças-pintadas (*Panthera onca*)

Semen collection and artificial insemination in jaguars (Panthera onca)

Regina Celia Rodrigues da Paz¹, Lindsey Marie Vansandt², William Frederick Swanson²,
Cristina Adania Harumi³

¹Laboratório de Pesquisa em Animais de Zoológico/Universidade Federal de Mato Grosso, ²Center for Conservation and Research of Endangered Wildlife, Cincinnati Zoo and Botanical Garden, ³Centro para Conservação de Felinos Neotropicais, Associação Mata Ciliar

Resumo

A onça-pintada encontra-se classificada como “quase ameaçada” na lista vermelha de animais ameaçados da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), com tendência ao declínio na América Latina, o que pode afetar o fluxo gênico elevando o risco de endogamia. Técnicas de reprodução assistida (TRAs) como colheita de sêmen e inseminação artificial (IA), são ferramentas que podem se tornar essenciais a manutenção da diversidade genética desses animais. A colheita de sêmen pode ser realizada por eletroejaculação (EEJ) ou colheita farmacológica (CF), sendo que podem ser aplicadas individualmente ou associadas, embora EEJ tenha se mostrado mais eficiente em inseminação artificial (IA) com sêmen a fresco. Para realização de IA a utilização de progestina oral (altrenogest), seguida da aplicação de gonadotropinas exógenas (Gonadotropina Coriônica equina-eCG e Hormônio Luteinizante suíno-pLH), tem se mostrado eficiente, promovendo ovulações consistentes. IA intratubárica (IA-IT) mostrou-se eficiente, tendo a vantagem de utilizar sêmen com baixo número de espermatozoides. O sucesso alcançado com o nascimento do primeiro filhote de *Panthera onca* utilizando TRAs se deve a vários fatores, dentre eles, a utilização de um novo protocolo hormonal ajustado à espécie; e a utilização da IA-IT, que possibilitou a utilização de sêmen com reduzido número de espermatozoides viáveis por inseminação.

Palavras-chave: felídeos, indução ejaculatória, indução da atividade ovariana, laparoscopia, inseminação artificial intratubárica.

Abstract

The jaguar is classified as "near threatened" according International Union for Conservation of Nature red list, with a decreasing trend in the population of Latin America, increasing the risk of inbreeding. Assisted reproduction techniques (ARTs), such as semen collection and artificial insemination (AI), are tools that can become essential to maintain the genetic diversity of jaguars. Semen collection can be performed by electroejaculation (EEJ) or pharmacological collection (PC); and can be applied individually or associated, however EEJ was more efficient for artificial insemination (AI) with fresh semen. To perform Artificial Insemination (AI), oral progestin (altrenogest) followed exogenous gonadotropins (Gonadotropin Chorionic equine-eCG e Hormone Luteinizing porcine-pLH) application was efficient, promoting consistent ovulations. Similarly, laparoscopic oviductal insemination (IA-IT) was efficient, with the advantage to use low viable spermatozoa number by insemination. The success of jaguar cub birth using ARTs is due to several factors, among than, a new hormonal protocol adjusted to the species; and the use of IA-IT, which allowed the reduction in the number of sperm by insemination.

Keywords: felids, ejaculatory induction, ovarian stimulation, video-laparoscopy, oviductal artificial insemination.

Introdução

Devido a fragmentação e/ou perda de seu habitat a população de onças-pintadas tem diminuído substancialmente ao longo de sua área de distribuição. Atualmente encontra-se classificada globalmente como “quase ameaçada”, segundo a lista vermelha de animais ameaçados da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), com tendência ao declínio na América Latina

¹Correspondência: reginacrpaz@gmail.com

Recebido: 20 de abril de 2023

Aceito: 24 de abril de 2023



(Quigley et al., 2017). As populações selvagens mais robustas são encontradas na Amazônia e no Pantanal, no entanto, até as onças-pintadas destas áreas podem ser afetadas pelo fluxo gênico restrito, aumentando o risco de ocorrência de endogamia determinando a redução da variabilidade genética.

Zoológicos brasileiros mantêm onças-pintadas, que podem ser nascidas na natureza, sendo potenciais fundadores genéticos, valiosos como população reserva; ou nascidas em cativeiro, com origem conhecida ou não. No entanto, mesmo animais nascidos em cativeiro sem origem conhecida são valiosos, uma vez que são recurso de pesquisa para expansão do nosso conhecimento científico sobre a espécie. Assim, as populações cativas podem se beneficiar com o desenvolvimento de técnicas reprodutivas artificiais (TRAs) a partir de programas de manejo reprodutivo, visando a estabilidade genética e demográfica das populações.

Da mesma maneira, o desenvolvimento das TRAs poderá ser útil para propagação de onças-pintadas em vida-livre e para manutenção do fluxo gênico entre animais de cativeiro e vida-livre. TRAs como a colheita de sêmen e a inseminação artificial (IA), são ferramentas que podem se tornar essenciais a manutenção da diversidade genética de onças-pintadas em um futuro próximo.

Colheita de sêmen

A eletroejaculação foi utilizada como técnica de colheita de sêmen em onças-pintadas na década de 1990 (Morato et al., 1998), e desde então passou a ser a técnica mais utilizada para a colheita de sêmen nesses animais (Morato et al., 2000; Paz et al., 2000; Silva et al., 2019 a;b).

Mais recentemente a colheita farmacológica de sêmen por cateter uretral passou a ser aplicada em onças-pintadas. A colheita farmacológica de sêmen baseia-se no fato dos agentes α -adrenérgicos atuarem em α -adrenoreceptores determinando a contração dos vasos deferentes (MacDonald et al., 1980), o que pode determinar uma alta concentração de espermatozoides liberados na uretra, após a administração de fármacos como a detomidina, medetomidina e dexmedetomidina, tornando possível a colheita de sêmen por sonda uretral.

Utilizando-se a associação medetomidina (0,08-0,1mg/kg) e cetamina (5mg/kg), com sonda uretral semi-flexível sem janela lateral para gatos (Tom cat - 1,0 mm x 130 mm) foi possível a colheita farmacológica de sêmen em onças. Massagens da próstata via transretal estimulando a glândula auxiliaram na liberação dos espermatozoides na uretra e conseqüentemente no aumento do volume do ejaculado. O sêmen coletado apresentou bons resultados quanto as avaliações realizadas (Araújo et al., 2017).

Também foi possível a colheita farmacológica de sêmen em onças-pintadas utilizando-se a associação de fármacos detomidina (0,04-0,08mg/kg) e cetamina (5-8mg/kg), com sonda uretral (5Fr - 1,6 mm x 500 mm) após 20 minutos da administração dos fármacos (Vansandt et al., 2017).

Por ser uma técnica simples e rápida também pode ser utilizada em associação à eletroejaculação, como alternativa para otimizar a colheita de sêmen em espécies selvagens com interesse reprodutivo. Desta forma, realiza-se primeiramente a sondagem do animal e após a retirada do cateter aplica-se a série padrão de eletrochoques. Isto promove um “esgotamento” do sêmen no animal em um único evento anestésico, obtendo-se assim, um volume maior de sêmen e otimizando material essencial para aplicação das TRAs. Esse “esgotamento” também é positivo quando aplicado em animais de vida livre, onde há impossibilidade de capturas sistematizadas para obtenção deste material (Paz, 2020).

No entanto, comparando-se a técnica de colheita farmacológica por cateterismo uretral associada a eletroejaculação em onças-pintadas, a eletroejaculação se mostrou mais eficiente para realização de inseminação artificial em tempo fixo com sêmen a fresco por apresentar resultados superiores quanto a motilidade, vigor e número de espermatozoides móveis totais (Paz, 2022).

Indução da atividade ovariana

Os protocolos de indução da atividade ovariana em felinos requerem injeções intramusculares de gonadotropinas exógenas; Gonadotropina Coriônica equina (eCG) ou Hormônio Foliculo Estimulante suíno (pFSH) para induzir o crescimento folicular e Gonadotropina Coriônica humana (hCG) ou Hormônio Luteinizante suíno (pLH) para induzir a ovulação (Paz et al., 2005).

O protocolo usando eCG e pLH produziu ovulação consistente e alto sucesso de prenhez em gatas domésticas, sem a formação excessiva de folículos secundários ou corpos lúteos (CL), típicos do protocolo eCG/hCG (Conforti et al., 2013). O mesmo protocolo (eCG/pLH) foi eficaz ao determinar gestações em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e tigres (*Panthera tigris*) (Lambo et al., 2014).

Da mesma maneira o tratamento prévio com progesterina oral para suprimir a atividade ovariana,



antes da administração das gonadotropinas exógenas, permitiu a IATF com alto sucesso de prenhez em gatas domésticas (Stewart et al., 2012; Swanson et al., 2014) e resultou em prenhez em várias espécies de felinos selvagens (Swanson, 2018).

A resposta ovariana de onças-pintadas tratadas com o protocolo de supressão ovariana utilizando progestina oral (altrenogest), seguido da aplicação de gonadotropinas exógenas (eCG-pLH), após ajuste de doses e intervalos, foi eficiente promovendo ovulações consistentes. Embora ainda haja necessidade de estudos adicionais sobre protocolos utilizando altrenogest em onças-pintadas, em especial a dosagem utilizada, foi observado que sua utilização pode reduzir a atividade folicular ovariana endógena durante sua administração e prevenir ou até mesmo reduzir a hiperestimulação ovariana após o tratamento eCG-pLH, o que resultaria em concentrações de estrógeno próximos a um perfil mais natural comparado ao não uso da progestina oral (Vansandt et al., 2019).

Sendo assim, maior taxa ovulatória foi observada em onças-pintadas que receberam progestina oral antes do tratamento com gonadotropinas exógenas, avaliada pela videolaparoscopia, indicando que o uso de progestina oral mostra grande potencial para melhorar os protocolos de IA em felinos selvagens (Paz, 2022).

Inseminação artificial

Um fator importante para o sucesso da IA em felinos é o local de depósito do sêmen. Inseminações artificiais usando laparoscopia com depósito de sêmen no corno uterino (IA-IU) foram utilizadas com sucesso em felinos neotropicais: jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (Swanson et al., 1996) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) (Moraes et al., 1997) resultando em gestação. No entanto, a mesma técnica foi aplicada em onça pintada (*Panthera onca*), porém sem sucesso (Jiménez et al., 1999).

Mais recentemente a IA com depósito de sêmen na tuba uterina (IA-IT) demonstrou resultados superiores a IA-IU em gatos domésticos (Swanson, 2012; Conforti et al., 2013). A aplicação dessa nova metodologia resultou em gestações em felinos como jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (Lambo et al., 2014); gato-do-deserto (*Felis margarita*), gato-de-pallas (*Otocolobus manul*), gato-pescador (*Prionailurus viverrinus*) e leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*) (Swanson, 2018).

Técnicas laparoscópicas de inseminação artificial intrauterina (IA-IU) usadas em felídeos requerem grande número de espermatozoides para que se tenha sucesso. No entanto, a inseminação artificial intratubárica (IA-IT) em gatos domésticos, utilizando baixa quantidade de espermatozoides, mostrou-se superior a IA-IU para a produção de gestações (Conforti et al., 2013). Além disso, IA-IT com sêmen congelado produziu fetos e gestações semelhantes a gestação com sêmen não-congelado em gatos domésticos (Swanson, 2012).

Utilizando-se a técnica de IA-IT foi possível a prenhez de uma tigresa (*Panthera tigris*) (Lambo et al., 2014) e de uma onça-pintada (Vansandt et al., 2019), tornando-a a técnica de eleição para grandes felinos, uma vez que a qualidade do sêmen nesses animais, de maneira geral, é inferior à de outras espécies.

O sucesso da IA-IT demonstra que uma abordagem similar poderá ser aplicada com sucesso para a propagação de grandes felinos em cativeiro e vida livre. Acreditamos que em um futuro próximo a utilização de sêmen congelado em IA-IT permitirá realizar o manejo da diversidade genética de populações em cativeiro e vida livre.

Referências

- Araujo GR, Paula TAR, Deco-Souza T, Morato RG, Bergo LCF, Silva LC, 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, 2017.
- Conforti VA, Bateman HL, Schook MW, Newsom J, Lyons LA, Grahn RA, Deddens JA, Swanson,WF.** Laparoscopic oviductal artificial insemination improves pregnancy success in exogenous gonadotropin-treated domestic cats as a model for endangered felids. *Biol Reprod*, v.89, p.1-9, 2013.
- Jiminez GT, Zuge RM, Paz RCR, Lopez J, Crudeli GA.** Sincronización de celo e inseminación artificial por vídeo-laparoscopia en yaguareté (*Panthera onca*) en cautiverio. *Comunic Cientif Tecnol*, v.4, p.67-70, 1999.
- 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, p.116, (abstract), 2014.
- Macdonald A, Mcgrath JC.** The distribution of adrenoreceptors and other drug receptors between the two



ends of the rat vas deferens as revealed by selective agonists and antagonists. *Brit J Pharmacol*, v.71, p.445–458, 1980.

Moraes W, Morais R, Moreira N, Lacerda O, Gomes MLF, Mucciolo RG, Swanson WF. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). In: American Association of Zoo Veterinarians Congress, Proceedings... 1997. p. 334-335 Abstract.

Morato RG, Guimarães MABV, Nunes ALV, Carciofi AC, Ferreira F, Barnabe VH, Barnabe RC. Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). *Brazil J Vet Anim Sci*, v.35, n.4, p.178–181, 1998.

Morato RG, Crichton EG, Paz RCR, Zuge RM, Moura CA, Nunes ALV, Teixeira RH, Porto-filho L, Guimarães MABV, Correa SHR, Barnabe RC, Armstrong DL, Loskutoff NM. Ovarian stimulation and successful in vitro fertilization in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*, v. 53, p.339, 2000.

Paz RCR. Aplicação de técnicas de reprodução assistida visando a conservação da onça-pintada (*Panthera onca*). Tese (Livre Docência), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, 2022.

Paz RCR. Novas tecnologias para colheita de sêmen em felinos In: Teófilo TS, Torres MAO, Miranda MVFG (Org.). Invest Cient e Técn Medic Vet [recurso eletrônico: e-book], Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.

Paz RCR, Swanson WF, Dias EA, Adania CH, Barnabe VH, Barnabe RC. Ovarian and immunological responses to alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Zoo Biol*, v.24, p.247-260, 2005.

Paz RCR, Züge RM, Barnabe VH, Morato RG, Felipe PAN, Barnabe RC. Capacidade de penetração de semen congelado de onça pintada (*Panthera onca*) em oócitos heterólogos. *Brazil. J Vet Res Anim Scien*, v.37, n.6, p.462-466, 2000.

Quigley H, Foster R, Petracca L, Payan E, Salom R, Harmsen B. 2017. *Panthera onca* (errata version published in 2018). The IUCN Red List of Threatened Species 2017. Acesso 11 abril 2023. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T15953A50658693.en>

Silva HV, Nunes TGP, Ribeiro LR, Freitas LA, Oliveira MF, Assis-Neto AC, Silva, AR, Silva LDM. Morphology, morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*) sperm. *Anim Reprod Sci*, v.203, p.84-93, 2019.a

Silva HV, Silva AR, Silva LDM, Comizzoli P. Semen cryopreservation and banking for the conservation of Neotropical carnivores. *Biopreserv Biobank*, v.17, n.2, p.183-188, 2019.b

Stewart RA, Pelican KM, Crosier AE, Pukazhenthil BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard, JG. Oral progesterin priming increases ovarian sensitivity to gonadotropin stimulation and improves luteal function in the cat. *Biol Reprod*, v.87, p.1-11, 2012.

Swanson, W.F., Howard J.G., Roth T., Brown J.L., Alvarado T., Burton M, Starnes D, Wildt DE. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *J Reprod Fertil*, v. 106, p. 87- 94, 1996.

Swanson WF. Laparoscopic oviductal embryo transfer and artificial insemination in felids: Challenges, strategies and successes. *Reprod Dom Anim*, v.47, n.6, p.136-140, 2012.

Swanson WF, Newsom J, Lyons LA, Grahn RA, Bateman HL. Ovarian down-regulation with oral progesterone for fixed-time laparoscopic oviductal artificial insemination with freshly-collected and frozen-thawed semen in domestic cats. *Reprod Fertil Dev*, v.26, p.143-58, 2014.

Swanson WF. Practical application of laparoscopic oviductal artificial insemination for the propagation of domestic cats and wild felids. *Reprod Fertil Dev*, v.31, n.1, p.27, 2018.

Vansandt LM, Adania CH, Yanai PR, Kunze PE, Iwaniuk ME, Swanson WF. Improving and Simplifying Semen Banking in the Brazilian Jaguar (*Panthera onca*). In: 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. Washington DC. Flash talk and poster presentation. 2017.

Vansandt LM, Adania CH, Yanai PR, Paulino JS, Paz RCR, Bateman HL, Swanson WF. 2019. Ovarian Synchronization, Ovulation Induction, and Successful Artificial Insemination in the Jaguar (*Panthera Onca*). In: 51st Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians. St. Louis, Missouri. Poster presentation.