



## Reprodução *ex situ* de felinos silvestres e seus desafios

*Challenges of ex situ reproduction in wild cats*

**Regina Celia Rodrigues da Paz**

Laboratório de Pesquisa em Animais de Zoológico/UFMT

### Resumo

A reprodução *ex situ* de felinos silvestres assegura a sobrevivência das espécies ameaçadas por meio do estabelecimento e manutenção de populações viáveis em cativeiro. O conhecimento da biologia reprodutiva básica é essencial para o desenvolvimento de planos de manejo reprodutivo (PMRs) eficientes, seja pela reprodução natural ou pela aplicação de técnicas de reprodução assistida (TRAs). Os PMRs visam garantir a representatividade das espécies quanto à variabilidade genética e demográfica baseada nos *studbooks*. Entretanto, o pareamento de animais selecionados pelos PMRs deve levar em conta, além de fatores genéticos e demográficos, fatores comportamentais e o fenótipo dos animais, uma vez que pode haver consequências negativas caso descendentes de gerações futuras sejam reintroduzidos na natureza. As TRAs estão cada vez mais sendo desenvolvidas para auxiliar na manutenção de populações geneticamente viáveis *ex situ* que possam contribuir geneticamente com populações *in situ*. A criopreservação de sêmen e a inseminação artificial (IA) são as TRAs utilizadas atualmente pelos PMR nacionais e internacionais, no entanto, são muitos os desafios para que as populações cativas se reproduzam de maneira adequada visando a manutenção de uma população viável que possa contribuir com populações de vida livre no futuro.

**Palavras-chave:** felídeos, manejo reprodutivo, registro genealógico, inseminação artificial, criopreservação de sêmen.

### Abstract

*Reproductive management plans are essential to ensure that imperiled populations maintain adequate genetic and demographic variability and remain representative of the species as a whole. Basic reproductive biology knowledge is essential for the development of efficient reproductive management plans (PMPs), either through natural breeding or through assisted reproductive techniques (ARTs). The PMPs aim to ensure the representativeness of the species in terms of genetic and demographic variability based on studbooks. However, the specific animal pairings should be maintaining adequate genetic, behavioral and the phenotype of the animals, ensuring proper reintroduction of animals into the wild. ARTs have been explored as a means to enhance the conservation of endangered species, focused on maintaining genetic diversity through enhanced animal propagation. Semen cryopreservation and artificial insemination (AI) are used by national and international PMRs, however, there are many challenges for captive populations reproduction in order to maintain a viable population that can contribute for free-living populations in the future.*

**Keywords:** *felids, reproductive management, genealogical record, artificial insemination, semen cryopreservation.*

### Introdução

O primeiro desafio para o desenvolvimento de programas reprodutivos em felinos selvagens *ex situ* é o número reduzido de animais. Os zoológicos e mantenedores de animais silvestres, em sua maioria, possuem poucos animais da mesma espécie, sendo muitas vezes animais do mesmo sexo ou com certo grau de parentesco, o que dificulta uma reprodução efetiva visando a manutenção das populações.

Nesse sentido, surgem os planos de manejo que visam garantir a representatividade das espécies quanto à variabilidade genética e demográfica, integrando zoológicos e mantenedores que possuem a mesma espécie em seu plantel. Os planos de manejo baseiam-se nos *studbooks*, que são os livros de registro da árvore genealógica das espécies e compreendem todos os animais vivos e mortos que descendem de um grupo de ancestrais selvagens (fundadores) nascidos na natureza.

<sup>1</sup>Correspondência: reginacrpaz@gmail.com

Recebido: 20 de abril de 2023

Aceito: 24 de abril de 2023



Dentre os planos de manejo reprodutivo *ex situ* internacionais podemos citar o Plano de Sobrevivência das Espécies (AZA/SSP) que recomendam a formação de pares reprodutores e transferências necessárias com o objetivo de manter populações geneticamente viáveis; e o Plano Global de Manejo das Espécies (AZA/WAZA) que promove a colaboração no manejo de espécies a nível mundial, possibilitando a combinação efetiva de várias populações, dando sustentabilidade ao manejo de populações *ex situ* a longo prazo.

Dentre os programas nacionais podemos citar o acordo de cooperação técnica entre Associação de Zoológicos e Aquários do Brasil (AZAB), Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e Ministério do Meio Ambiente (MMA) para o estabelecimento do manejo *ex situ* de populações de 25 espécies ameaçadas da fauna brasileira, sendo uma delas a onça-pintada (BRASIL, 2018).

O conhecimento da biologia reprodutiva básica seria o segundo desafio para implementação do manejo reprodutivo das espécies, seja pela reprodução natural ou pela aplicação de técnicas de reprodução assistida (TRAs). Apesar de pertencerem ao mesmo grupo e frequentemente serem comparados ao gato doméstico, que é utilizado como modelo experimental para felinos selvagens, existem particularidades a cada espécie que devem ser estudadas e compreendidas para que os planos de manejo reprodutivo sejam bem sucedidos.

A aplicação das TRAs em felídeos selvagens avançam a cada dia, porém também são um desafio a ser enfrentado uma vez que a aplicação efetiva de técnicas como fertilização *in vitro* (FIV), transferência de embriões (TE) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) nos planos de manejo reprodutivo, visando a manutenção das espécies *ex situ*, são inexistentes. As únicas TRAs utilizadas atualmente pelos planos de manejo reprodutivo são a criopreservação de sêmen e a inseminação artificial (IA) que serão discutidas a seguir. No entanto, mesmo que as IAs sejam utilizadas com sucesso em algumas espécies, ainda necessitam de conhecimento e adaptação das metodologias para que todas as espécies possam ser beneficiadas com sua inclusão nos planos de manejo reprodutivo.

### **Colheita, avaliação e criopreservação de sêmen**

A colheita de sêmen em felinos selvagens pode ser realizada pela eletroejaculação (Howard, 1993) ou pela colheita farmacológica por cateter uretral (Luerds et al., 2012). Em animais que vieram à óbito pode ser realizada a colheita epididimária, com a recuperação de células espermáticas do epidídimo pela lavagem - *flushing* (Iranpour; Valojerdi, 2013) compressão - *squeezing* (Bento et al, 2019) ou fatiamento - *slicing* (Lengwinat; Blotner, 1994).

A avaliação imediata dos espermatozoides é realizada pela porcentagem de espermatozoides móveis (motilidade %) e pela qualidade do movimento (vigor 0-5) em microscópio óptico (x400) (CBRA 2013). Uma alternativa à essa avaliação subjetiva é a análise computadorizada da movimentação dos espermatozoides (*Computer Assisted Sperm Analysis – CASA*) (Amann et al. 2014).

A avaliação da morfologia espermática pode ser feita por meio de preparado úmido após fixação, sob microscopia de contraste de fase em 1000x (CBRA 2013). A integridade da membrana plasmática pode ser avaliada por meio da coloração eosina-nigrosina (Campbell et al., 1956) e a integridade de acrossoma pela coloração Rosa bengala/Fast Green (Pope et al., 1991).

Para criopreservação de sêmen em felinos, o meio mais utilizado é o TRIS - gema, juntamente com o glicerol como crioprotetor (Luvoni et al., 2003, Erdmann et al., 2020). No entanto, a gema de ovo apresenta como desvantagem a variação em sua composição e maior possibilidade de contaminação bacteriana, além da dificuldade na obtenção de licenças para exportação, o que tem levado a sua substituição por meios alternativos como a lecitina de soja (Vick et al., 2011. Vansandt et al., 2019).

As técnicas tradicionais de criopreservação têm sido utilizadas, no entanto, a vitrificação de espermatozoides de felinos silvestres tem sido desenvolvida por ser uma alternativa simples e prática que permite a criopreservação do espermatozoide, sem a necessidade da curva de resfriamento, o que facilita o processo de congelamento de sêmen na própria instituição (O'Brien et al., 2019).

Em termos qualitativos e quantitativos o sêmen de felinos é inferior quando comparado ao de outras espécies, e apesar dos protocolos de criopreservação avançarem a cada dia, o uso de sêmen congelado em IAs bem sucedidas ainda é um desafio.

### **Indução da atividade ovariana**

A gonadotropina de escolha para induzir o crescimento folicular em felídeos selvagens tem sido a Gonadotropina Coriônica equina (eCG), devido à longa meia-vida na circulação (24-48h), produzindo boa



resposta ovariana com uma única aplicação, enquanto o Hormônio Folículo Estimulante suíno (pFSH) apresenta meia vida curta (~2h), tendo a desvantagem de requerer múltiplas aplicações para produzir uma boa resposta ovariana. (Paz et al., 2005).

Para indução da ovulação a Gonadotropina Coriônica humana (hCG) e o Hormônio Luteinizante suíno (pLH) tem sido usados após a administração de eCG, no entanto, a associação eCG/pLH tem se mostrado mais eficiente por determinar ovulação consistente e alto sucesso de prenhez, sem formação excessiva de folículos secundários e corpos lúteos típicos do tratamento com eCG/hCG (Conforti et al., 2013).

O tratamento prévio com progestina oral foi utilizado com sucesso na inseminação artificial em tempo fixo (IATF), resultando em prenhez em gatas domésticas (Conforti et al., 2013), tigres (*Panthera tigris*) e jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) (Lambo et al., 2014). Em felinos neotropicais, um estudo em gatos-do-mato-do-sul (*Leopardus guttulus*) (Micheletti et al., 2015) confirmou a capacidade do altrenogest em suprimir a atividade folicular ovariana da mesma forma que os resultados observados em gatas domésticas tratadas com a mesma progestina oral (Stewart et al., 2012).

Estes achados indicam que a quiescência ovariana alcançada pela exposição a progestina sintética, antes do tratamento com as gonadotropinas, pode promover um recrutamento e crescimento mais eficiente de oócitos de alta qualidade e reduzir a atresia de folículos antrais, atribuindo um maior número de folículos receptivos às gonadotropinas (Peluso, 2006; Pelican et al., 2010).

### Inseminação Artificial (IA)

Em felídeos, os cornos uterinos podem ser facilmente acessados e avaliados quanto à espessura, consistência e coloração. Os ovários também são facilmente acessados e podem ser avaliados quanto à contagem e caracterização de folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos pós-ovulatórios. Nesse sentido, a inseminação artificial por laparoscopia pode ser realizada pela deposição de sêmen no interior do corno uterino (IA-IU) ou deposição do sêmen na tuba uterina (IA-IT).

Seguindo os protocolos de estimulação ovariana, as fêmeas devem ser inseminadas no período de 24 a 48 horas após a administração de hCG ou pLH, ou seja, após o processo de ovulação. Em ambas as técnicas, a deposição do sêmen deve ser correspondente ao ovário que possui corpo lúteo pós-ovulatório.

Atualmente o sistema *Tele Pack* (Karls Storz, Alemanhã) tem sido utilizado por facilitar o transporte do equipamento para trabalhos a campo, já que integra em um único equipamento o monitor *full-HD*, a fonte de luz, o controle de câmera e o sistema de arquivamento de vídeo/imagem por USB.

Para a IA inicialmente é realizada a avaliação do corno uterino e contagem de folículos e corpus lúteos, após introdução do endoscópio rígido. Uma pinça de apreensão (*grasping forceps*) é então inserida para auxiliar na elevação do corno uterino próximo a parede abdominal para o depósito do sêmen na IA-IU ou para auxiliar na abertura da fimbria para que o sêmen seja depositado no óstio da tuba uterina na IA-IT.

O local de depósito de sêmen em IAs em felinos pode ser determinante para seu sucesso, uma vez que o sêmen desses animais é inferior quando comparado a outras espécies. Nesse sentido, a desvantagem da IA-IU, seria a necessidade de grande número de espermatozoides viáveis para obtenção de bons resultados. Assim, a IA-IT tem se mostrado a técnica de eleição para felinos por apresentar resultados satisfatórios, mesmo quando há baixo número de espermatozoides viáveis, mostrando-se superior à outras técnicas de IA ao produzir prenhez e filhotes em várias espécies de felinos selvagens (Lambo et al., 2014; Swanson, 2018).

### Referências

- Amann RP, Waberski D.** Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, v.8, p.5-17, 2014.
- AZA/SSP.** Species Survival Plan [Internet]. [cited 2023 April 19]. Available from: <https://www.aza.org/species-survival-plan-programs>
- AZA/WAZA.** Global species management [Internet]. [cited 2023 April 19]. Available from: <https://www.aza.org/global-species-management-plans>
- Bento HJ, Vieira RLA, Iglesias GA, Kuczarski 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.
- BRASIL.** Acordo de cooperação técnica processo nº 020070.003869/2018-45, de 05 de junho de 2018. Diário Oficial da União, Edição: 106; Seção: 3; Página: 108, Brasília, DF.



- Campbell RC, Dott HM, Glover TD.** Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J Agr Sci*, v.48, n.1, p.1-15, 1956.
- CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3rd ed. Henry JPN, Jobim MIM, editors. Belo Horizonte; 2013. 104 p.
- Comercio EA, Monachesi NE, Loza ME, Gambarotta M, Wanke MM.** Hypo-osmotic test in cat spermatozoa. *Androl.*, v.45, p.310-4, 2013.
- 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.
- Erdmann RH, Blank MH, Ribeiro RN, José de Oliveira M, Cubas ZS, Pradice J, Goularte KL, Moreira, N.** Cryopreservation of margay (*Leopardus wiedii*) spermatozoa: Effects of different extenders and frozen protocols. *Theriogenology*, v.43, p.27-34, 2020.
- Howard JG, Bush M, Wildt DE.** Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow D., editor. *Current therapy in theriogenology II*. Philadelphia; 1986, p.1047-53.
- Iranpour F, Valojerdi M.** The epididymal sperm viability, motility and DNA integrity in dead mice maintained at 4-6°C. *Iran J Reprod Med*, v.11, p.195-200, 2013.
- 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, 2014.
- Lengwinat T, Blottner S.** In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci.*, v.35, p.291-301, 1994.
- Lueders I, Luther I, Scheepers G, van der Horst G.** Improved semen collection method for wild felids: Urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). *Theriogenology*, v.78, p.696-701, 2012.
- Luvoni GC, Kalchschmidt E, Leoni S, Ruggiero C.** Conservation of feline semen Part I: Cooling and freezing protocols. *J Feline Med Surg*, v.5, p.203-8, 2003.
- Micheletti T, Brown JL, Walker SL, Cubas ZC, Furtado PV, Putman SB, Moraes W, Oliveira MJ, Oliveira CA, Moreira N.** The use of altrenogest to avoid hyperestrogenism after eCG-hCG ovulation induction in southern tigrina (*Leopardus guttulus*). *Theriogenology*, v.84, n.4, p.575-582, 2015.
- O'Brien E, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Bóveda P, Martínez-Fresneda L, López-Sebastian A, Martínez-Nevado E, Guerra R, Fernandez ML, Vega RS, Guillamon FG, Santiago-Moreno JS.** Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. *Theriogenology*, v.129, p.160-7, 2019.
- 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.247-60, 2005.
- Pelican, K.M., Spindler RE, Pukazhenth BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG.** Progestin exposure before gonadotropin stimulation improves embryo development after in vitro fertilization in the domestic cat. *Biol Reprod*, v.83, p.558-67, 2010.
- Peluso JJ.** Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. *Biol Reprod*, v.75, p.2-8, 2006.
- Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL.** Simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wildl Med* v.22, p.87-95, 1991.
- Swanson WF, Newsom J, Lyons LA, Grahn RA, Bateman HL.** Ovarian down-regulation with oral progestin for fixed-time laparoscopic oviductal artificial insemination with freshly collected and frozen-thawed spermatozoa in domestic cats. *Reprod Fertil Dev*, v.26, p.143, 2014.
- Swanson WF.** Practical application of laparoscopic oviductal artificial insemination for the propagation of domestic cats and wild felids. *Reprod Fertil Dev*, v.31, p.27, 2018.
- Stewart RA, Pelican KM, Crosier AE, Pukazhenth BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard, JG.** Oral progestin priming increases ovarian sensitivity to gonadotropin stimulation and improves luteal function in the cat. *Biol Reprod*, v.87, p.1-11, 2012.
- Vansandt LM, Moresco A, González R, Miller A, Newsom J, Iwaniuk ME, Herrick JR, Swanson WF.** 102 Sperm cryopreservation with a soy lecithin-based medium in black-footed cats (*Felis nigripes*) and sand cats (*Felis margarita*). *Reprod Fertil Dev*, v.31, p.177, 2019.
- Vick MM, Bateman HL, Swanson WF.** Improved cryopreservation of domestic cat spermatozoa in a soy lecithin - based extender. *Reprod Fertil Dev*, v.23, p.153, 2011.