



Atualidades da reprodução de onças pintadas (*Panthera onca*)

*Updates in jaguars (*Panthera onca*) reproduction*

Thyara de Deco-Souza^{1,2*}, Pedro Nacib Jorge-Neto^{1,3}, Thaiz de Deco Souza², Cristiane Schilbach Pizzutto¹, Maitê Cardoso Coelho da Silva^{1,2}, Gediendson Ribeiro de Araújo^{1,2}

¹ Instituto Reprocon, Campo Grande, MS, Brasil

² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

³ Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

*Thyara Deco-Souza, Av. Sen. Filinto Müller, 2443 - Pioneiros, Campo Grande - MS, 79070-900, (67) 99698-3907

Resumo

As tecnologias de reprodução assistida permitem o transporte e a troca de material genético, tornando-se um pilar complementar essencial em programas de conservação. Infelizmente, a dificuldade de acessar grande número de animais em condições fisiológicas adequadas limita o avanço dessas tecnologias. A colheita farmacológica de sêmen em onças-pintadas é eficaz para obter uma quantidade suficiente de espermatozoides. No entanto, os resultados da inseminação artificial (IA) e das operações de fertilização in vitro são afetados pela baixa qualidade do sêmen, pelas dificuldades no acesso às fêmeas e pela limitada capacidade de congelamento das células. A estimulação hormonal com eCG e hCG pode ser utilizada para colher oócitos em onças-pintadas; no entanto, a proximidade com machos influencia a resposta ovariana aos hormônios exógenos. Portanto, o padrão de estímulo de ovulação não copulatória deve ser considerado nos protocolos de IA e colheita laparoscópica de oócitos nesta espécie. As células somáticas podem ser uma alternativa para biobancos, pois são mais fáceis de colher e transportar, podendo ser obtidas de qualquer idade, sexo ou origem do animal, incluindo amostras post-mortem.

Palavras-chave: reprodução assistida; biobanco; fibroblastos; Conservação Única.

Abstract

Assisted reproductive technologies allow the transport and exchange of genetic material, becoming an essential complementary pillar in conservation programs. Unfortunately, the difficulty in accessing a large number of animals in proper physiological conditions limits the progress of these technologies. Pharmacological semen collection in jaguars is effective in obtaining a sufficient amount of sperm. However, the results of artificial insemination (AI) and in vitro fertilization procedures are affected by the low quality of the semen, difficulties in accessing females, and the limited ability to freeze cells. Hormonal stimulation with eCG and hCG can be used to collect oocytes in jaguars; however, the proximity to males influences the ovarian response to exogenous hormones. Therefore, the non-copulatory ovulation stimulation pattern should be considered in AI protocols and laparoscopic oocyte collection for this species. Somatic cells could be an alternative for biobanks, as they are easier to collect and transport, and can be obtained from any age, sex, or origin of the animal, including post-mortem samples.

Key-words: assisted reproduction; biobank; fibroblasts; One Conservation.

Introdução

A onça-pintada (*Panthera onca*) é a maior espécie de felídeo das Américas e o único representante do gênero *Panthera* neste continente. Trata-se de um predador oportunista que habita uma variedade de biomas, desde florestas tropicais até as florestas decíduas secas. No Brasil, seu status de conservação varia de acordo com o bioma sendo: "Criticamente Ameaçada" na Mata Atlântica e na Caatinga, "Em Perigo" no Cerrado e "Vulnerável" no Pantanal e na Amazônia (ICMBio/MMA 2018) e embora não sejam classificadas em subespécies, existem diferenças genéticas e fenotípicas entre biomas que devem ser consideradas ao examinar o acasalamento *ex situ*.

A redução no número de indivíduos e a fragmentação de habitats podem afetar negativamente a diversidade genética das populações de onças-pintadas, comprometendo sua conservação. A baixa diversidade genética está ligada a problemas reprodutivos, como diminuição do tamanho dos testículos,

¹Correspondência: *thyara.araujo@ufms.br

Recebido: 13 de abril de 2025

Aceito: 30 de abril de 2025

aumento de espermatozoides anormais e maior vulnerabilidade a doenças virais em outras espécies de felinos (O'Brien et al. 1985; Wildt et al. 1987; Packer et al. 1991; Munson et al. 1996). Para garantir a viabilidade genética, é essencial conectar recursos genéticos tanto em ambientes cativos quanto selvagens. Tecnologias reprodutivas assistidas (ART) podem facilitar a troca genética entre diferentes populações e superar desafios na translocação de animais, aumentando o fluxo gênico e recuperando material genético, mesmo após a morte de um indivíduo.

É essencial reforçar que populações cativas e selvagens não podem ser manejadas de forma independente. Para manter a viabilidade das populações *in situ*, são essenciais a conservação e a expansão dos habitats naturais, assim como a mitigação de conflitos entre humanos e vida selvagem. Em circunstâncias extremas, essas medidas podem não ser suficientes para garantir o aumento genético necessário em tempo hábil (Deco-Souza et al. 2021). Por outro lado, a manutenção de animais em cativeiro é extremamente custosa, especialmente ao considerar a variação genética ou fenotípica entre diferentes regiões geográficas dentro de uma espécie. Sendo assim, o intercâmbio entre as populações *in situ* e *ex situ*, é fundamental para a saúde genética de ambas.

A aplicação dessas tecnologias a animais de vida livre é especialmente desafiadora devido as diferentes condições de campo, que variam de áreas preservadas com acesso à energia elétrica a áreas remotas sem acesso à energia ou qualquer estrutura laboratorial básica. Isso requer a adaptação de protocolos projetados para animais cativos para que possam ser usados em ambientes *in situ* (Araujo et al. 2020). No entanto, dificuldades em acessar locais de coleta e a necessidade de aparelho de processamento especializado exigem adaptações dos métodos disponíveis *ex situ* (Deco-Souza et al. 2021). Neste caso, a portabilidade e autonomia dos equipamentos e a estabilidade dos crioprotetores, aliadas a um método prático e seguro de colheita de sêmen, são cruciais para viabilizar a criopreservação bem-sucedida de germoplasma em animais de vida livre. A combinação de manutenção de animais em cativeiro com acesso a material genético de animais de vida livre representa uma estratégia mais abrangente para o reforço genético de espécies ameaçadas (Deco-Souza et al. 2021) e alinha-se com o conceito de conservação integrada de Conservação Única (Pizzutto et al. 2021).

Fisiologia e comportamento reprodutivo

A investigação abrangente sobre a fisiologia e o comportamento reprodutivo em onças-pintadas permanece limitada na literatura científica. Embora dados existentes suportem a presença de um ciclo poliestrico em onças-pintadas (Wildt et al. 1979; Leuchtenberger et al. 2009; Barnes et al. 2016; Jorge-Neto et al. 2018), os aspectos de sazonalidade e os mecanismos subjacentes de ovulação merecem discussão adicional.

A maioria dos estudos documentou consistentemente o ciclo estral, tanto comportamental quanto hormonal, como ocorrendo ao longo de todas as estações (Wildt et al. 1979; Barnes et al. 2016; Viau et al. 2020), consequentemente classificando a onça-pintada como poliestrica não sazonal. Gonzalez et al. (Gonzalez et al. 2017) relataram casos de anestro e redução da concentração de estradiol em três fêmeas em um ambiente *ex situ* entre outubro e dezembro de 2010, coincidindo com a estação chuvosa. No entanto, o estudo do ciclo estral abrangeu apenas um único ano, impedindo conclusões definitivas sobre a recorrência desses padrões em anos subsequentes.

As onças-pintadas fêmeas atingem a maturidade sexual por volta dos 22 meses de idade, com o primeiro nascimento ocorrendo por volta dos 25 meses (Viau et al. 2020; Fragoso et al. 2023). O ciclo estral é variável, durando entre 30 a 39 dias, e a duração do estro varia de 6 a 10 dias (Jorge-Neto et al. 2018; Viau et al. 2020). Em onças-pintadas de vida livre, o intervalo entre partos bem-sucedidos, onde pelo menos um filhote atingiu a independência e se dispersou da mãe, é de 17 a 27 meses (Carrillo et al. 2009; Fragoso et al. 2023). Em ninhadas malsucedidas, onde nenhum filhote sobreviveu para alcançar a independência da mãe, o intervalo entre partos é de 6 a 15 meses (Fragoso et al. 2023).

O comportamento estral, que indica a receptividade da fêmea à cópula, é caracterizado por hiporexia, rolamento, vocalização pré-copulatória e postura de lordose. Além disso, inchaço e descarga vulvar são observados (Barnes et al. 2016; Jorge-Neto et al. 2018). Notavelmente, o estro hormonal pode não coincidir precisamente com os padrões comportamentais e pode ter uma duração ligeiramente mais curta (Barnes et al. 2016). O comportamento copulatório das onças-pintadas assemelha-se ao de outros felídeos e foi descrito por Jorge-Neto et al. (Jorge-Neto et al. 2018). As fêmeas exibem comportamento receptivo através de vocalizações, aproximando-se e girando em direção ao macho, apresentando a região anogenital e adotando a posição de lordose. A vocalização do macho durante a cópula indica ejaculação bem-sucedida. Além disso, a vocalização feminina aumentou quando a penetração ocorreu durante a

cópula. As fêmeas também assumiram decúbito lateral dorsal após rolamento apenas quando a penetração peniana ocorreu durante a cópula. Portanto, a vocalização masculina ao lado da vocalização feminina, balanço e rolamento são sinais de penetração peniana durante a cópula. Os autores mencionam múltiplas cópulas durante o estro, mas não especificam quantas cópulas podem ocorrer em um único dia. Visto que as onças-pintadas são ovuladoras induzidas, várias cópulas podem ser necessárias para fornecer estímulo adequado para múltiplas ovulações (Wildt et al. 2010). Este comportamento de acasalamento múltiplo poderia também servir como uma estratégia masculina para garantir a exclusividade com a fêmea durante o estro.

Inicialmente, pensava-se que as onças-pintadas tinham a ovulação induzida somente por cópula (Wildt et al. 1979). No entanto, estudos subsequentes sobre onças-pintadas (Barnes et al. 2016; Gonzalez et al. 2017) revelaram concentrações elevadas de níveis de progesterona fecal mesmo na ausência de cópula ou tratamento hormonal exógeno, levando os pesquisadores a considerarem uma forma de "ovulação espontânea". Em ambos os casos, as fêmeas estavam perto dos machos. A ovulação sem cópula também foi observada em onças-pintadas mantidas em proximidade com machos após estimulação com eCG. Notavelmente, este fenômeno não foi observado em fêmeas estimuladas com eCG em instalações sem onças-pintadas machos, sugerindo que estímulos sensoriais também podem induzir a ovulação (Jorge-Neto et al. 2020b). Embora se saiba que a ovulação possa ser induzida administrando eCG a gatos domésticos no cio (Wildt et al. 1978; Swanson et al. 1997), este não foi o caso no estudo (Jorge-Neto et al. 2020b), já que as fêmeas isoladas receberam o mesmo tratamento e não ovularam, apesar de apresentarem crescimento folicular. Barnes et al. (Barnes et al. 2016) também relataram ocorrência semelhante em uma fêmea tratada com gonadotropina, classificando-a como espontânea. Considerando que a ovulação requer algum tipo de estimulação, seja sensorial, física ou hormonal, é apropriado classificar as onças-pintadas como ovuladoras induzidas, porém a estimulação vaginal física não é a única causa dessa resposta. À luz dessas descobertas, o termo "ovulação espontânea" pode não ser uma descrição precisa; e "Ovulação induzida por estímulos não copulatórios" pode ser um termo mais preciso.

Após a ovulação, os felídeos podem passar por gravidez ou fase lútea não gravídica, dependendo se a fertilização ocorreu. Ambos os períodos são caracterizados por níveis elevados de progesterona; contudo, na fase lútea não gravídica, os níveis de progesterona diminuem geralmente dentro de 30 dias, embora um período de até 67 dias tenha sido observado (Barnes et al. 2016; Gonzalez et al. 2017). O período de gestação da onça-pintada é entre 98 e 111 dias (Sadleir 1966; Barnes et al. 2016; Araujo et al. 2022; Luczinski et al. 2023), portanto, um diagnóstico gestacional baseado na análise hormonal poderia ser confirmado no terço final da gestação (Sadleir 1966; Lamberski 2014; Barnes et al. 2016).

Para os machos, poucos ou nenhum espiculas penianas são encontrados nas onças-pintadas sexualmente maduras. Apesar da produção de sêmen de alta qualidade, Araujo et al. (Araujo et al. 2018) observaram que onças-pintadas maduras, tanto em ambientes *ex situ* quanto *in situ*, possuíam poucos ou nenhuma espícula.

Tecnologias de Análise e Criopreservação de Sêmen

As primeiras colheitas de sêmen em onças-pintadas foram relatadas durante as décadas de 1960 e 1970, utilizando eletroejaculação (EE) em animais fisicamente contidos (Carvalho 1968; Mies Filho et al. 1974). O uso de EE sob anestesia começou com a administração de tiletamina e zolazepam (10 mg/kg, IM) em onças-pintadas cativas e selvagens (Morato et al. 1998, 2001; Paz et al. 2000). Embora a EE seja uma técnica viável para a colheita de sêmen de felídeos, ela tem sido gradualmente substituída nos últimos anos pela colheita farmacológica ou cateterização uretral (Zambelli e Cunto 2022). A EE está associada a um aumento do risco de contaminação por urina e estimulação excessiva das glândulas acessórias, resultando em amostras diluídas (Tabela 1).

A cateterização uretral após a indução farmacológica (UC) envolve o uso de medicamentos que estimulam a liberação de espermatozoides na uretra, seguida ou não por ereção e ejaculação. Os agonistas α_2 -adrenorreceptores (α_2A), como medetomidina e dexmedetomidina, estão entre os fármacos mais comumente usados em felídeos (Zambelli et al. 2008; Lueders et al. 2012; Araujo et al. 2018). Este método depende da estimulação dos α_2 -adrenorreceptores no trato urogenital (Virtanen et al. 1988; Madson et al. 2008), logo o sucesso da colheita de sêmen está diretamente correlacionado à especificidade de ligação dos receptores $\alpha_1:\alpha_2$ do α_2A . Especificamente, dexmedetomidina e medetomidina têm uma razão de seletividade de 1620:1 ($\alpha_1:\alpha_2$), enquanto xilazina e detomidina são consideravelmente menos seletivas (razões de $\alpha_1:\alpha_2$ de 260:1 e 160:1, respectivamente) (Virtanen et al. 1988; Pawson 2008; Dugdale et al. 2020). Consequentemente, medetomidina e dexmedetomidina são preferidas em relação a detomidina e

xilazina para UC em felídeos devido à razão de seletividade $\alpha_1:\alpha_2$ 6,2 vezes maior (Swanson et al. 2017; Silva et al. 2021). Além disso, existe um efeito de dose-resposta na qualidade do sêmen, exigindo doses superiores às clínicas (20–80 µg/kg) para a colheita farmacológica de sêmen (Cunto et al. 2015).

Em onças-pintadas, estabelecemos um protocolo de UC que consiste na administração de 0,1 mg/kg de medetomidina e 5 mg/kg de cetamina em combinação (Araujo et al. 2018, 2020, 2021; Jorge-Neto et al. 2020c, 2023a; Araújo et al. 2021). A contaminação por urina pode ocorrer no caso de posicionamento inadequado da UC, uma vez que a cateterização deve ser realizada para se alcançar a próstata, e não a bexiga urinária, sendo rara durante o procedimento. Apesar de não ter sido relatada em outras espécies de felinos (Zambelli et al. 2008; Lueders et al. 2012; Cunto et al. 2015), em nossa experiência a contaminação por urina ocorreu em uma única vez quando em animal de vida livre.

Devido à menor estimulação das glândulas acessórias, a UC resulta em volume reduzido, com pouco plasma seminal, que é acompanhado por aumento da concentração de espermatozoides. Isso resulta em uma técnica comparável à EE em termos de quantidade total de espermatozoides colhidos, com a vantagem de contornar os problemas associados à EE (Zambelli et al. 2008).

Esse protocolo também oferece o benefício de reverter os efeitos do α_2A após todos os procedimentos, garantindo um intervalo mínimo de 40 minutos devido à meia-vida da cetamina (Luczinski et al. 2020) (35 minutos quando administrado intramuscularmente em gatos domésticos (Waterman 1983)). Esta reversão é realizada usando um antagonista α -adrenérgico, seja atipamezole (0,25 mg/kg; im) ou iioimbina (0,2 mg/kg; im).

Os espermatozoides são altamente sensíveis a flutuações de temperatura; portanto, é essencial manter o controle preciso da temperatura durante o manuseio para evitar choque térmico. Em onças-pintadas cativas submetidas à UC, apesar da temperatura da superfície testicular ser aproximadamente sete graus mais baixa que a temperatura corporal (medida com um termômetro esofágico; $30,0 \pm 1,6$ °C vs. $37,4 \pm 1,2$ °C, respectivamente), a temperatura do sêmen imediatamente após sair da uretra variou entre 27,3 e 28,7 °C (Jorge-Neto et al. 2023a).

O uso de Análise de Sêmen Assistida por Computador (CASA) para avaliar amostras seminais pode melhorar a padronização entre estudos e instituições. No entanto, é necessário configurar os parâmetros do sistema para cada espécie ou grupo de espécies com morfometria espermática semelhante. Uma concentração de aproximadamente 20×10^6 espermatozoides por mL, que corresponde a cerca de 80 células por campo de análise no CASA, deve ser alcançada para uma avaliação adequada da amostra. A configuração para avaliar sêmen de onças-pintadas no CASA foi estabelecida e é aplicável a todas as avaliações de software (Jorge-Neto et al. 2020a). Para esse propósito, as amostras de sêmen foram analisadas por um técnico certificado da IMV Technologies usando o software Animal Breeders II (versão 1.13.7; Hamilton Thorne, EUA). A detecção das células (reconhecimento de cabeça e cauda) foi feita através da ferramenta "Live Configuration". Para obter o resultado mais preciso, os parâmetros para cinemática e morfologia foram ajustados por análises repetidas usando diferentes ajustes de configuração (Araújo et al. 2023).

Utilizando microscopia eletrônica de varredura e transmissão, as análises morfológicas revelaram que o espermatozoide de onça-pintada possui uma cabeça levemente oval, medindo $3,6 \pm 0,03$ µm de largura e $4,9 \pm 0,02$ µm de comprimento. A peça intermediária possui um comprimento de $9,7 \pm 0,3$ µm, enquanto o comprimento total da cauda se estende até $54,5 \pm 0,1$ µm. Consequentemente, o comprimento total da célula espermática mede $59,5 \pm 0,1$ µm (Silva et al. 2019). O capitulum está localizado na região média da extremidade basal da cabeça, onde o centríolo proximal está anexado. A cauda contém o axonema, acompanhado por um conjunto de nove fibras externas densas rodeadas por um anel mitocondrial (Silva et al. 2019).

A morfologia espermática em onças-pintadas foi avaliada em todos os artigos publicados; contudo, nenhum estudo vinculou infertilidade a anomalias espermáticas. Um efeito positivo da suplementação nutricional na qualidade seminal foi observado em onças-pintadas cativas, com uma redução significativa nos defeitos menores; entretanto, a fertilidade não foi avaliada (da Paz et al. 2006). Em outro estudo, uma onça-pintada oligospermica (9×10^6 espermatozoides totais colhidos por UC), conhecida por ser infértil (com histórico de múltiplos acasalamentos com diferentes fêmeas), apresentou 45% de espermatozoides normais, uma proporção maior do que a encontrada em animais com fertilidade comprovada no mesmo estudo (Jorge-Neto et al. 2023a). Curiosamente, os animais com fertilidade comprovada ($n=4$) tinham altas proporções de pseudogota (37 a 56%), enquanto a onça-pintada infértil tinha apenas 6%.

A criopreservação é uma técnica útil para salvaguardar e preservar a diversidade genética de uma população, uma vez que permite o armazenamento de espermatozoides indefinidamente. Diversos fatores



Tabela 1: Análise seminal em onças-pintadas cativas e selvagens, usando diferentes métodos de colheita.

Animais (n)	Método de Colheita	Origem	Volume (mL)	Concentração (x10 ⁶ spz/mL)	Total Spz (x10 ⁶)	Mot Total (%)	Mot Prog (%)	Normal Spz (%)	Referências
10 (43 am)	EE	Cativo	7.4 ± 3.7	6.2 ± 3.0	-	62.2 ± 11.0	-	46.7 ± 5.8	(Morato et al. 1998)
3	EE	Cativo	11.0 ± 8.7	10.4 ± 13.0	-	76.7 ± 11.5	-	31.7 ± 9.6	(Paz et al. 2000)
6 (7 am)	EE	Wild	4.1 ± 0.7	35.0 ± 21.3	152.0 ± 88.0	73.0 ± 6.1	-	73.5 ± 3.9	(Morato et al. 2001)
8 (47 am)	EE	Cativo	8.3 ± 0.7	8.0 ± 1.7	59.3 ± 12.8	64.0 ± 2.4	-	50.0 ± 1.1	(Morato et al. 2001)
5 (10 am)	EE	Cativo	6.6 ± 1.9	6.3 ± 2.4	-	57.0 ± 4.5	-	60.8 ± 3.1	(Morato et al. 2004)
8 (40 am)	EE	Cativo	5.3 ± 0.6	13.8 ± 4.2	-	56.9 ± 3.6	-	-	(da Paz et al. 2006)
9	EE	Cativo	7.0 ± 0.6	1.6 ± 0.6	-	70 ± 3.3	-	27.6 ± 0.6	(da Paz et al. 2007)
2	EE	Cativo	2.0	5.7 ± 1.1	-	-	80	80.0 ± 2.8	(Gonzalez et al. 2017)
5	UC	Cativo	0.3	2,091.4	316.6	-	73.0	60.7 ± 6.8	(Araujo et al. 2018)
5	UC	Wild	0.4	3,315.00	1,280.8	-	81.0	51.0 ± 22.8	(Araujo et al. 2018)
5 (10 am)	EE	Cativo	6.3 ± 0.9	142 ± 25.7	-	93.0 ± 1.5	-	76.0 ± 3.5	(Silva et al. 2019)
5	UC	Cativo	0.1 ± 0.05	2,344.0 ± 1,613.0	207.0 ± 104.0	55.3 ± 22.6*	36.2 ± 18.0*	21.8	(Jorge-Neto et al. 2023a)

(am) – amostras. EE – Eletroejaculação. UC - Cateterização uretral. Mot Prog – Motilidade Progressiva.

*Motilidade total e progressiva usando o sistema CASA. Fonte: (Deco-Souza et al. 2024)



Tabela 2. Criopreservação de sêmen de onça-pintada.

Animais (n)	Diluyente	Crioprotetor	Conc Spz (x10 ⁶ spz/mL)	Mot Tot Fresco (%)	Mot Tot Pós-Desc (%)	Referência
9	Tris-gema	Glicerol 4%	NI	70.0±3.3*	26.7 ± 4.4*	(da Paz et al. 2007)
6	Tris-gema	Glicerol 6%	50 x 10 ⁶	73.0 ± 14.0*	31.0 ± 19.0	(Araujo et al. 2020)
5 (8 amostras)	Tris-gema	Glicerol 6%	NI	>90.0*	46.0 ± 7.7	(Silva et al. 2020)
	ACP-117c-gema	Glicerol 6%	NI	>90.0*	20.9 ± 5.4	
4	Tris-gema	Glicerol 6%	NI	95.0 ± 0*	21.5 ± 6.3	(Santos et al. 2022)
	ACP-117c-gema	Glicerol 6%	NI	95.0 ± 0*	9.0 ± 5.2	
5	Tris-LDL	Glicerol 6.4%	100 x 10 ⁶	55.3 ± 22.6	4.3 ± 2.5	(Jorge-Neto et al. 2023a)
5	Tris-LDL	DMSO 6.4%	100 x 10 ⁶	55.3 ± 22.6	5.3 ± 2.5	
5	Tris-LDL	Metanol 6.4%	100 x 10 ⁶	55.3 ± 22.6	0.5 ± 0.6	

Conc Spz – Concentração espermática/ Mot Tot – Motilidade Total. Pós-Desc – Pós-Descongelação. NI – não informado. LDL - Lipoproteínas de baixa densidade. ACP-117c - Meio à base de água de coco em pó.

*Avaliação subjetiva Fonte: (Deco-Souza et al. 2024)

influenciam a qualidade dos espermatozoides descongelados. Encontrar o diluidor apropriado, bem como as taxas de resfriamento, congelamento e descongelamento, são etapas fundamentais no desenvolvimento de um protocolo específico. O diluidor à base de TRIS-gema de ovo é o meio mais frequentemente usado para Criopreservar sêmen de onça-pintada, com concentrações de glicerol normalmente variando de 4 a 6,4% (Tabela 1). Dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol são superiores ao metanol como crioprotetores para a criopreservação do sêmen de onça-pintada usando um diluidor baseado em LDL (Jorge-Neto et al. 2023a).

Meio à base de água de coco em pó (ACP-117c) também foi avaliado nesta espécie. Contudo, o meio à base de TRIS demonstrou superioridade, mantendo sua recomendação para uso em onças-pintadas (Silva et al. 2020; Santos et al. 2022). A gema de ovo é um componente comum em diluidores de criopreservação de sêmen porque protege a membrana espermática. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são os constituintes da gema de ovo responsáveis pela proteção do espermatozoide, estabilizando a membrana espermática, substituindo os fosfolípidios da membrana espermática, ou se ligando às proteínas do plasma seminal responsáveis pelo efluxo de colesterol e fosfolípidios (Bergeron e Manjunath 2006). No entanto, sua instabilidade e restrições de exportação destacam a necessidade de investigar opções alternativas, como lecitina de soja e lipoproteínas de baixa densidade, que já foram usadas em outros carnívoros (Bencharif et al. 2008; Lambo et al. 2012; Swanson et al. 2017; Vansandt et al. 2021; González et al. 2023). Além disso, com base em nossa experiência, a gema de ovo deve ser substituída se a criopreservação do sêmen de animais de vida livre for considerada, pois não atende aos requisitos logísticos do trabalho de campo.

Tecnologias de Reprodução em Fêmeas

Diversos protocolos têm sido utilizados para aumentar a atividade ovariana em onças-pintadas durante procedimentos de inseminação artificial (IA) e colheita laparoscópica de oócitos (LOPU). Tradicionalmente, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) têm sido usadas para promover o crescimento folicular e a maturação dos oócitos. Foi demonstrado que a estimulação vaginal física durante o estro comportamental induziu a ovulação em duas onças-pintadas treinadas (Barnes et al. 2016). O hormônio folículo-estimulante (FSH; 50 UI em quatro aplicações) e o hormônio luteinizante (LH; 25 UI) produziram, em média, 15,2 complexos cumulus-oócito (COC) por fêmea (Morato et al.). Uma única onça-pintada estimulada com 600 UI de eCG e 300 UI de hCG produziu nove oócitos (Barnes et al. 2016), enquanto uma média de $16,0 \pm 8,9$ oócitos foram produzidos a partir de dosagens mais altas de 800 UI de eCG e 500 UI de hCG (Jorge-Neto et al. 2023b). Quando as fêmeas foram tratadas com eCG+hCG, $16,0 \pm 8,9$ oócitos maturados in vivo foram recuperados, enquanto quando tratadas apenas com eCG, $11,4 \pm 8,7$ oócitos foram obtidos ($P > 0,05$). A estimulação com hCG resultou em 68,7% (55 de 80) de oócitos viáveis colhidos com cumulus expandido, enquanto todos os 80 oócitos colhidos de fêmeas não tratadas com hCG foram classificados como imaturos e viáveis (Jorge-Neto et al. 2023b).

Em onças-pintadas cujo desenvolvimento folicular foi estimulado por eCG e eCG/hCG, corpos hemorrágicos (CH) foram observados em fêmeas alojadas ou próximas a machos. A presença de CH foi notada durante LOPU realizada no terceiro e quinto dias após a injeção de eCG em ambos os grupos de tratamento. No entanto, CH não foi observado em fêmeas afastadas dos machos. A ovulação mais precoce observada em fêmeas mantidas próximas a machos sugere que eles influenciam a resposta ovariana ao protocolo hormonal. Como a LOPU foi conduzida simultaneamente em ambos os grupos, não foi possível determinar quando a ovulação ocorreria em fêmeas mantidas longe dos machos.

A LOPU se destaca como a técnica mais confiável e eficiente para obter oócitos de alta qualidade de grandes felinos, que podem ser usados para produção de embriões in vitro (PIVE) e transferência nuclear de células somáticas (SCNT) (Baldassarre et al. 2017; Jorge Neto et al. 2018; Jorge-Neto et al. 2023b). A punção folicular é realizada com laparoscopia, o que também permite a observação de estruturas difíceis de visualizar por ultrassom (Jorge-Neto et al. 2023b).

A LOPU foi aplicada com sucesso a onças-pintadas, resultando na recuperação de 10 complexos cumulus-oócito (COC) de Grau I e 54 de Grau II (Jorge-Neto et al. 2023b). Cinco onças-pintadas foram acasaladas com machos em diferentes intervalos após a colheita de oócitos (Jorge-Neto et al. 2023a, 2023b), e todas ficaram grávidas e produziram descendentes com sucesso, demonstrando que a LOPU não prejudica a fertilidade das fêmeas.

Até o momento, a maturação in vitro (MIV) eficaz de oócitos de onça-pintada não foi alcançada. Em uma tentativa de MIV, Jorge-Neto (Jorge Neto 2019) cultivou oócitos de onça-pintada obtidos por LOPU em gotas de 50µL de meio de maturação sob óleo mineral (20 oócitos por gota) por 24 horas a 38,5°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ em ar. O meio de maturação era TCM199

suplementado com bLH (0,02 U/mL), bFSH (0,02 U/mL), 17 β -estradiol (1 μ g/mL), piruvato de sódio (0,2 mM), gentamicina (0,05 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS). Os oócitos maturados in vitro (n = 29) passaram por fertilização in vitro (FIV) e foram comparados com oócitos maturados in vivo (n = 32), sendo que 53% de clivagem foi obtida apenas com oócitos maturados in vivo (nenhum dos oócitos maturados in vitro clivou). Os 17 presumíveis zigotos foram colocados em cultura in vitro, mas a cultura foi interrompida no segundo dia devido à contaminação do sêmen com fungos e bactérias.

A inseminação artificial envolve a deposição de espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea. Os locais de deposição incluem a vagina, o útero, ou oviduto. Após vários ajustes no protocolo hormonal, um filhote de onça-pintada nasceu após IA no oviduto/corno uterino. O protocolo consistiu em progestina oral por 45-48 dias, seguido por um período de retirada de sete dias antes da administração de eCG. Hormônio luteinizante suíno (pLH) foi administrado 90–92 horas após eCG, e sêmen fresco foi usado para IA 43 a 48 horas depois (Vansandt et al. 2019).

Cultivo de Tecidos

Devido à necessidade de dispositivos e pessoal altamente especializados, a colheita de gametas como fonte de germoplasma está limitada a grupos específicos de pesquisa e conservação. Embora a clonagem ainda requer investimentos significativos em pesquisa de felinos, a colheita de fragmentos de tecido para cultivo celular (por exemplo, células somáticas, espermatogônias e folículos primordiais) é um procedimento simples que não demanda equipamentos especializados e pode ser prontamente realizado por veterinários de campo de qualquer especialidade. Esta estratégia amplia as possibilidades de armazenamento de germoplasma e tem inspirado pesquisadores a aprimorar técnicas de colheita, cultivo e criopreservação de tecidos com aplicações potenciais em procedimentos de clonagem e cultivo de tecido gonadal. Estudos sobre cultura de tecidos para produção de células semelhantes a fibroblastos em onças-pintadas têm gerado resultados positivos, entretanto, o cultivo de tecido gonadal na espécie ainda não foi estudado.

Tanto os fragmentos de tecido cartilaginoso frescos quanto os criopreservados da pele da orelha da onça-pintada podem ser cultivados (Mestre-Citrinovitz et al. 2016; Praxedes et al. 2019). Métodos de preservação de tecidos, como congelamento lento e vitrificação, têm sido utilizados; no entanto, a vitrificação em superfície sólida foi mais eficaz por ser mais acessível, rápida e portátil (Praxedes et al. 2019). A vitrificação é realizada imergindo o tecido em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 1,5M de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,25M de sacarose e 10% de soro fetal bovino (FBS) (Praxedes et al. 2019).

Para garantir a preservação adequada, a pele da orelha deve ser removida de forma asséptica após a raspagem e limpa com etanol a 70% e clorexidina. O transporte deve ser a 4°C. As amostras podem ser enviadas ao laboratório em DMEM suplementado com 2% de solução antibiótica-antimicótica (Ab-Am) e 10% de FBS por três a oito horas (Praxedes et al. 2019). O transporte de amostras em DMEM suplementado com 15% de FBS e 5% de solução Ab-Am por até 24 horas levou ao crescimento de células viáveis semelhantes a fibroblastos (Polizelle 2023). Os fragmentos recuperados devem ser novamente raspados e enxaguados na solução de transporte assim que chegarem ao laboratório. Fragmentos (9 a 25mm³) de tecido cartilaginoso podem ser cultivados em placas de 6 poços com 1 mL de DMEM (suplementado com 10% de FBS e 2% de solução antibiótica-antimicótica) a 38,5°C e 5% de CO₂ (Praxedes et al. 2019). Quando a confluência alcança 70 a 80%, as células tipo fibroblastos são tripsinizadas (Trippsina EDTA C 0,25%) e subcultivadas (Praxedes et al. 2019; Polizelle 2023).

As células tipo fibroblastos precisam ser armazenadas adequadamente após o cultivo. Embora o congelamento lento tenha sido o método preferido por muito tempo para a criopreservação de células semelhantes a fibroblastos de onça-pintada, ele requer um ultracongelador e espaço adicional de armazenamento para criotubos. O armazenamento em palhetas sob uma curva de congelamento rápido é um substituto prático que mantém a viabilidade celular após o descongelamento (Polizelle 2023).

Superar os obstáculos para recuperar germoplasma após a morte dos animais por desastres naturais ou outros acidentes permitiria a preservação de seu material genético valioso. Como resultado, seria possível restaurar a genética de animais que foram prejudicados por desastres naturais ou acidentes automobilísticos. Isso pode ser alcançado por meio da criopreservação de tecido gonadal (testicular e ovariano) e de células somáticas para cultivo futuro. Recentemente, nosso grupo de pesquisa conseguiu cultivar amostras de pele da orelha, tanto frescas quanto criopreservadas, de três onças-pintadas mortas em acidentes automobilísticos mesmo após mais de 24 horas pós morte. Fragmentos criopreservados foram



transplantados em camundongos imunodeficientes, o que aumentou a eficiência do cultivo e retornou a qualidade celular a níveis comparáveis ao tecido fresco (Polizelle 2023). Esses achados demonstram a viabilidade do cultivo de células de animais envolvidos em acidentes e o potencial do xenotransplante quando a integridade do tecido é desconhecida.

Conclusão

Avanços consideráveis foram realizados no desenvolvimento de tecnologias que facilitam as tecnologias reprodutivas assistidas (ART) em onças-pintadas. No entanto, elas ainda não foram usadas como ferramenta de conservação, pois ainda são consideradas como pesquisa. Ambientes *ex situ* se mostraram configurações convenientes para colheita de dados e são uma fonte essencial de conhecimento. No entanto, as técnicas estabelecidas em cativeiro podem não ser tão eficazes quando aplicadas a fêmeas de vida livre devido às mudanças nos padrões reprodutivos resultantes do ambiente *ex situ*. Portanto, garantir a manifestação de suas condições fisiológicas inerentes depende de um manejo adequado de bem-estar e nutrição sob cuidados humanos.

Agradecimentos

Os autores agradecem às seguintes instituições e pessoas: aos pesquisadores e equipe de apoio do Instituto Reprocon, Instituto Onça-Pintada, NEX-No Extinction, IMV Technologies, Reprodex Laboratórios e Bio Reprodução Animal. 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 realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (Processo: 403623/2021-9) e pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do MS (Processo: 83/024.003/2023). O presente trabalho foi financiado em parte pelo Instituto Reprocon.

Referências

- Araujo GR de, Deco-Souza T de, Bergo LCF, Silva LC da, Morato RG, Jorge-Neto PN, et al. Field friendly method for wild feline semen cryopreservation. *J Threat Taxa*. 26 de abril de 2020;12(5):15557–64.
- Araujo GR, Deco-Souza T, Morato RG, Crawshaw PG, Silva LC, Jorge-Neto PN, et al. Use of foot snares to capture large felids. Ellison A, organizador. *Methods Ecol Evol*. v.12(2), p.322–7, 2021.
- Araujo GR, Moraes-Ferreira AF, Luczinski TC, Csermak-Junior AC, Deco-Souza T, Pizzutto CS, et al. Ultrasound pregnancy diagnosis in a free-living jaguar (*Panthera onca*) with subsequent birth: First case report. *Anim Reprod.*, v.19(1):Abstracts ISABR 2020/2021, 2022.
- Araújo GRD, Jorge-Neto PN, Csermak-Jr AC, Pizzutto CS, Luczinski TC, Deco-Souza TD. Avanços na andrologia de grandes felinos neotropicais. *Rev Bras Reprodução Anim*, v.45(4), p.219–28, 2021.
- Araújo GRD, Jorge-Neto PN, Salmão-Júnior JA, Silva MCCD, Zanella R, Csermak-Júnior AC, et al. Pharmacological semen collection in giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*): A feasible option for captive and free-living animals. *Theriogenology Wild.*, v.2, p.100030, 2023.
- Araujo GRD, Paula TARD, Deco-Souza TD, Morato RG, Bergo LCF, Silva LCD, et al. 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
- Baldassarre H, Requena LA, Carelli JB, Salomão Júnior JA, Rodrigues MG, Ferreira SAP, et al. Laparoscopic ovum pick-up is a safe procedure for the collection of oocytes for preservation efforts in pumas (*Puma concolor*). *Anim Reprod.*, v.14(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.
- Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, et al. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology.*, v.70(9), p.1478–88, 2008.
- Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev.*, v.73(10), p/1338–44, 2006.
- Carrillo E, Saenz J, Fuller T. Interbirth interval of a free-ranging jaguar. *Mamm Biol.*, v.74(4), p.319–20, 2009.
- Carvalho CT. Sêmen em grandes felinos. *Rev Med Vet.*, v.2, p.195–201, 1968.



- Cunto M, Keuster DG, Bini C, Cartolano C, Pietra M, Zambelli D.** Influence of different protocols of urethral catheterization after pharmacological induction (Ur.Ca.P.I.) on semen quality in the domestic cat. *Reprod Domest Anim.*, v. 50(6), p.999–1002, 2015.
- Deco-Souza TD, Pizzutto CS, Souza LSB, Jorge-Neto PN, Csermak-Jr AC, Araújo GRD.** Desafios para a reprodução assistida em animais de vida livre. *Rev Bras Reprodução Anim.*, v.45(4), p.253–8, 2021.
- Deco-Souza T, Araújo GR, Pizzutto CS, Requena LA, Jorge-Neto PN.** In situ and ex situ jaguar (*Panthera onca*) reproduction: What do we have so far? *Theriogenology Wild*, v.4, p.100070, 2024.
- Dugdale A, Beaumont G, Bradbrook C, Gurney M.** Veterinary Anaesthesia: Principles to Practice [Internet]. 2º ed. Wiley-Blackwell; 2020. Disponível em: <https://www.wiley.com/WileyCDA/Section/id-832156.html>
- Fragoso CE, Rampim LE, Quigley H, Buhrke Haberfeld M, Ayala Espíndola W, Cabral Araújo V, et al.** Unveiling demographic and mating strategies of *Panthera onca* in the Pantanal, Brazil. Cherry M, organizador. *J Mammal.*, v.104(2), p.239–51, 2023.
- González R, Miller A, Vansandt LM, Swanson WF.** Characterization of basal seminal traits and semen cryopreservation in Canada lynx (*Lynx canadensis*). *Theriogenology Wild.*, v.2, p.100026, 2023.
- Gonzalez SJ, Howard JG, Brown J, Grajales H, Pinzón J, Monsalve H, et al.** Reproductive analysis of male and female captive jaguars (*Panthera onca*) in a Colombian zoological park. *Theriogenology.*, v.89, p.192–200, 2017.
- ICMBio/MMA. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. 1º ed. Vol. Volume II – Mamíferos. Brasília (DF); 2018.
- Jorge Neto P, Alecho Requena L, Schilbach Pizzutto C, Baldassarre H.** Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU): from animal production to conservation. *Spermova.*, v.8(1), p.61–7, 2018.
- Jorge Neto PN.** Biotecnologias reprodutivas aplicadas à produção de embriões in vitro de onça-parda (*Puma concolor*) e onças-pintadas (*Panthera onca*) [Internet] [Mestrado em Reprodução Animal]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-26092019-103937/>, 2019.
- Jorge-Neto PN, Araújo GR, Silva MCC, Salomão-Jr JA, Csermak-Jr AC, Pizzutto CS, et al.** Description of the CASA system configuration setup for jaguar (*Panthera onca*). *Anim Reprod Sci.*, v.220, p.40–1, 2020a.
- Jorge-Neto PN, Luczinski TC, de Araújo GR, Requena LA, de Jesus RS, Souza LSB, et al.** Cryopreservation of jaguar (*Panthera onca*) sperm cells using different cryoprotectants and different thawing temperatures. *Anim Reprod.*, v.20(1), p.1–15, 2023a.
- Jorge-Neto PN, Luczinski TC, Araújo GRD, Salomão Júnior JA, Traldi ADS, Santos JAMD, et al.** Can jaguar (*Panthera onca*) ovulate without copulation? *Theriogenology.*, v.147, p.57–61, 2020b.
- Jorge-Neto PN, Pizzutto CS, Araújo GR de, Deco-Souza TD, Silva LC da, Salomão Jr. JA, et al.** Copulatory behavior of the Jaguar *Panthera onca* (Mammalia: Carnivora: Felidae). *J Threat Taxa.*, v.10(15), p.12933–9, 2018.
- Jorge-Neto PN, Requena LA, De Araújo GR, Traldi ADS, Luczinski TC, De Deco-Souza T, et al.** Efficient recovery of in vivo mature and immature oocytes from jaguars (*Panthera onca*) and pumas (*Puma concolor*) by Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU). *Theriogenology Wild.*, v.3, p.100042, 2023b.
- Jorge-Neto PN, Silva MCC da, Csermak-Júnior AC, Salmão-Júnior JA, Araújo GR de, Oliveira G de, et al.** Cryptorchidism in free-living jaguar (*Panthera onca*): first case report. *Anim Reprod.*, v.17(4), p.e20200555, 2020c.
- Lamberski N.** Chapter 47: Felidae. In: M Fowler, E Miller (Eds), Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine. 8º ed Saunders; 2014.
- Lambo C, Grahn R, Lyons L, Bateman H, Newsom J, Swanson W.** 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.
- Leuchtenberger C, Crawshaw P, Mourão G, Lehn CR.** Courtship behavior by jaguars in the Pantanal of Mato Grosso do Sul. *Nat Conserv.*, v.7(1), p.218–22, 2009.
- Luczinski TC, Araújo GR de, Silveira MF, Kirnew MD, Navarrete RA, Salomão-Jr JA, et al.** Medetomidine may cause heart murmur in Cougars and Jaguars: case report. *J Threat Taxa.*, v.12(14), p.17000–2, 2020.
- Luczinski TC, Jorge-Neto PN, Ribeiro RM, De Jesus RS, Pizzutto CS, De Deco-Souza T, et al.** One Conservation concept in practice. *Theriogenology Wild.*, p.2, p.100024, 2023.
- 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(3),



p.696–701, 2012.

Madson J, Page S, Church DB. Small Animal Clinical Pharmacology [Internet]. St Louis: Elsevier; 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702028588X50015>

Mestre-Citrinovitz AC, Sestelo AJ, Ceballos MB, Barañao JL, Saragüeta P. Isolation of primary fibroblast culture from wildlife: The *Panthera onca* case to preserve a South American endangered species. *Curr Protoc Mol Biol.*, v.10, p.1–14, 2016.

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 RG, Conforti VA, Azevedo FC, Jacomo ATA, Silveira L, Sana D, et al. Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction.*, v.122(5), p.745–51, 2001.

Morato RG, Crichton E, Paz RCR, Züge RM, Moura AA, Nunes ALV, et al. Superovulação, recuperação de oócitos e fecundação in vitro em onça pintada (*Panthera onca*). *Rev Bras Reprod Anim.*, v.26(4), p.317–24, 2002.

Morato RG, Guimarães MA de BV, Nunes ALV, Carciofi AC, Ferreira F, Barnabe VH, et al. Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). *Braz J Vet Res Anim Sci.*, v.35, p.178–81, 1998.

Munson L, Brown JL, Bush M, Packer C, Janssen D, Reiziss SM, et al. Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of the Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *Reproduction.*, v.108(1), p.11–5, 1996.

O'Brien SJ, Roelke ME, Marker L, Newman A, Winkler CA, Meltzer D, et al. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science.*, v.227(4693), p.1428–34, 1985.

Packer C, Pusey AE, Rowley H, Gilbert DA, Martenson J, O'Brien SJ. Case study of a population bottleneck: lions of the Ngorongoro crater. *Conserv Biol.*, v.5(2), p.219–30, 1991.

Pawson P. Sedatives. In: Small Animal Clinical Pharmacology. Elsevier; 2008. p. 113–25.

da Paz RCR, Morato RG, Carciofi AC, Guimarães m. ABV, Pessuti E, Ferraz Santos E, et al. Influence of nutrition on the quality of semen in Jaguars in Brazilian zoos. *Int Zoo Yearb.*, v.40, p.351–9, 2006.

da Paz RCR, Züge RM, Barnabe VH. Frozen jaguar (*Panthera onca*) sperm capacitation and ability to penetrate zona free hamster oocytes. *Braz J Vet Res Anim Sci.*, v.44(5), 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. *Braz J Vet Res Anim Sci.*, v.37(6), p.462–6, 2000.

Pizzutto CS, Colbachini H, Jorge-Neto PN. One Conservation: the integrated view of biodiversity conservation. *Anim Reprod.*, v.18(2), p.e20210024, 2021.

Polizelle SR. Otimização dos protocolos de criopreservação celular e xenotransplante de cartilagem auricular para conservação [Dissertação de mestrado]. [Campo Grande]: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2023.

Praxedes ÉA, Oliveira LRMD, Silva MB, Borges AA, Santos MVDO, Silva HVR, et al. Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin – An alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). *Cryobiology.*, v.88, p.15–22, 2019.

Sadleir RMFS. Notes on reproduction in the larger felidae. *Int Zoo Yearb.*, v.6(1), p.184–7, 1966.

Santos MVDO, Silva HVR, Bezerra LGP, Oliveira LRMD, Oliveira MFD, Alves ND, et al. Heterologous in vitro fertilization and embryo production for assessment of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) frozen-thawed semen in different extenders. *Anim Reprod.*, v.19(1), p.e20210093, 2022.

Silva HVR, Nunes TGP, Brito BF, Campos LB, Silva AM da AR, Silva AM da AR, et al. Influence of different extenders on morphological and functional parameters of frozen-thawed spermatozoa of jaguar (*Panthera onca*). *Cryobiology.*, v.92, p.53–61, 2020.

Silva HVR, Nunes TGP, Ribeiro LR, Freitas LA de, de Oliveira MF, Assis Neto AC de, et al. Morphology, morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*) sperm. *Anim Reprod Sci.*, v.203, p.84–93, 2019.

Silva MCCD, Ullony KM, Araújo GRD, Jorge-Neto PN, Albuquerque VB, Caramalac SM, et al. Can detomidine replace medetomidine for pharmacological semen collection in domestic cats? *Anim Reprod.*, v.18(2), p.e20210017, 2021.

Swanson W, Bateman H, Vansandt L. Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reprod Domest Anim.*, v.52(S2), p.255–60, 2017.

Swanson WF, Wolfe BA, Brown JL, Martin-Jimenez T, Riviere JE, Roth TL, et al. Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in



combination in the domestic cat. *Biol Reprod.*, v.57(2), p.295–302, 1997.

Vansandt LM, Adania CH, Yanai PR, Paulino JS, Paz RCR, Bateman HL, et al. Ovarian Synchronization, Ovulation Induction, and Successful Artificial Insemination in the Jaguar (*Panthera onca*). Em St. Louis, Missouri; 2019. Disponível em: <https://www.vin.com/doc/?id=9948217>

Vansandt LM, Bateman HL, Miller AG, Herrick JR, Moresco A, González R, et al. Cross-species efficacy of a chemically-defined, soy lecithin-based cryomedium for semen banking in imperiled wild felids. *Theriogenology.*, v.159, p.108–15, 2021.

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(1), p.coaa052, 2020.

Virtanen R, Savola JM, Saano V, Nyman L. Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an α_2 -adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol.*, v.150(1–2), p.9–14, 1988.

Waterman AE. Influence of premedication with xylazine on the distribution and metabolism of intramuscularly administered ketamine in cats. *Res Vet Sci.*, v.35(3), p.285–90, 1983.

Wildt DE, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AE, Brown JL, et al. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature.*, v.329(6137), p.328–31, 1987.

Wildt DE, Kinney GM, Seager SW. Gonadotropin induced reproductive cyclicity in the domestic cat. *Lab Anim Sci.*, v.28(3), p.301–7, 1978.

Wildt DE, Platz CC, Chakraborty PK, Seager SWJ. Oestrous and ovarian activity in a female jaguar (*Panthera onca*). *Reproduction.*, v.56(2), p.555–8, 1979.

Wildt DE, Swanson WF, Brown JL, Silwia A, Vargas A. Felids *ex situ* for managed programmes, research, and species recovery. Em: In: MacDonald, DW & A Loveridge (eds) *Biology and Conservation of Wild Felids*. Oxford: Oxford University Press. 2010. p. 217-235.

Zambelli D, Cunto M. Artificial Insemination in Queens in the Clinical Practice Setting: Protocols and challenges. *J Feline Med Surg.*, v.24(9), p.871–80, 2022.

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(4), p.485–90, 2008.
