

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM ONÇAS PINTADAS DE CATIVEIRO

(*Semen cryopreservation i n captive jaguars*)

Herlon Victor Rodrigues SILVA^{1*}; Brenna de Sousa BARBOSA²

¹Centro Universitário Maurício de Nassau. Av. Aguanambi, 251. José Bonifácio, Fortaleza/CE. CEP: 60.055-400; ²Universidade Estadual do Ceará.

*E-mail: herlonvrs@hotmail.com

RESUMO

A onça-pintada é um dos principais animais da fauna brasileira e dentre todos os felinos, a onça-pintada (*Panthera onca*) somente é menor que o leão (*Panthera leo*) e o tigre (*Panthera tigris*), logo sendo classificada como o maior felino de todo o continente americano. Apesar de todo o reconhecimento e importância, a espécie vem sofrendo significativa redução no número de indivíduos. Já há bastante tempo essa espécie vem mantendo seu status de conservação como espécie vulnerável, segundo o Ministério do Meio Ambiente, e próximo de ameaçada, segundo classificação da Lista Vermelha da IUCN. As principais causas que levam à diminuição da população desta espécie estão ligadas à redução no número de suas presas naturais como cervos, queixadas e catetos, e principalmente devido à expansão de áreas urbanas, destruição dos habitats naturais, atropelamentos em rodovias e caça ilegal. Tais fatores capazes de reduzir a população desses animais vem se agravando constantemente devido principalmente as políticas públicas ineficazes para a proteção de espécies ameaçadas. Na contramão desta situação, pesquisadores trabalham visando o desenvolvimento de estratégias com o intuito de proteger a espécie. A estratégia de conservação de maior destaque e de resultado mais rápido a curto prazo são as biotécnicas reprodutivas, uma vez que tais técnicas são capazes de aumentar o número de indivíduos em um curto espaço de tempo. Nas biotécnicas reprodutivas, destaca-se a criopreservação (congelamento) de sêmen, técnica na qual se permite armazenar amostras sob temperaturas extremamente negativas, por um longo período de tempo e também deslocar o material para quaisquer localidades.

Palavras-chave: Conservação, congelamento de sêmen, biotécnica reprodutiva.

ABSTRACT

The jaguar is one of the main important animals of the Brazilian fauna and among all felines, the jaguar (*Panthera onca*) is only smaller than the lion (*Panthera leo*) and the tiger (*Panthera tigris*), soon being classified as the largest cat from all over the American continent. Despite all the recognition and importance, the species has undergone a significant reduction in the number of individuals. This species has been maintaining its conservation status as a vulnerable species for a long time, according to the Brazilian Ministry of the Environment, and close to threatened, according to the classification of the IUCN Red List. The main causes that lead to a decrease in the population of this species are related to the reduction in the number of natural prey such as deer, peccary and collared peccary, and mainly due to the expansion of urban areas, destruction of natural habitats, being hit by roads and illegal hunting. Such factors capable of reducing the population of these animals have been constantly worsening due mainly to ineffective public policies for the protection of endangered species. Against this background, researchers are working to develop strategies to protect the species. The conservation strategy of greater prominence and of quicker result in the short term is the reproductive biotechniques, since such techniques are able to increase the number of individuals in a short period of time. In reproductive biotechniques, semen cryopreservation (freezing) stands out, a technique in which samples can be stored under extremely negative temperatures for a long period of time and the material can also be moved to any location.

Keywords: Conservation, semen freezing, reproductive biotechnology.

INTRODUÇÃO

A onça-pintada (*Panthera onca*) é o maior felino do continente americano, podendo chegar a 135 kg. Esta espécie é dotada de grande força muscular, sendo a potência de sua mordida considerada a maior dentre os felinos de todo o mundo (HUNTER, 2015). As presas

naturais da onça-pintada consistem de várias espécies selvagens como catetos, capivaras, queixadas, veados e tatus. Porém, quando o número destes indivíduos diminui, geralmente por alterações ambientais provocadas pelo homem, as onças podem vir a se alimentar de animais domésticos e por esse motivo são perseguidas. No Brasil ela já praticamente desapareceu da maior parte das regiões nordeste, sudeste e sul (CUYCKENS *et al.*, 2017). O país ainda não possui uma política nacional de manejo adequada para lidar com o problema de predação às criações domésticas. Ademais, o baixo investimento dos órgãos ambientais em profissionais treinados e falhas nos sistemas de registro de ocorrências têm impedido que ações eficazes sejam tomadas. Produtores rurais acabam “resolvendo” os problemas por seus próprios meios, ocasionando a morte desnecessária de predadores (LEITE-PITMAN *et al.*, 2002).

Com todos os fatores que predisõem a redução da população de onças-pintadas, fazem com que hoje seu status de conservação seja considerado pela IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza) e pelo IBAMA como espécie vulnerável (DE LA TORRE *et al.*, 2017).

Na busca de metodologias de conservação desta espécie, uma das mais eficazes estratégias está no advento do uso da reprodução, no qual, esta pode ser otimizada com técnicas de reprodução assistida (TAR) para superar os problemas listados acima. Essas abordagens foram amplamente promovidas nas últimas décadas para melhorar o manejo da reprodução e sustentar pequenas populações de espécies ameaçadas de extinção (HOLT e LLOYD, 2009). Técnicas como criopreservação, inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização *in vitro*, têm sido desenvolvidas e aprimoradas (COMIZZOLI *et al.*, 2000; WILDT *et al.*, 2010). Além disso, previamente é importante conhecer como funciona os mecanismos fisiológicos reprodutivos de cada espécie para então propor a melhor forma de desenvolvimento da biotécnica reprodutiva (SILVA *et al.*, 2019a). Isso inclui avaliações hormonais não invasivas, mecanismos ovulatórios, sazonalidade, descrição anatômica dos órgãos copulatórios e caracterização dos gametas (COMIZZOLI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2019a).

Os zoológicos e criadouros funcionam como a principal fonte de coleta das amostras e dados desses animais já que é possível utilizar de maneira mais dinâmica os recursos genéticos, além de uma rápida coleta de informações que podem incrementar no desenvolvimento das biotécnicas reprodutivas, no qual possam futuramente ser aplicadas nestas mesmas espécies, porém em seu habitat natural (COMIZZOLI, 2015; SILVA, 2019).

Uma das melhores táticas para a conservação de material genético é o uso da criobiologia, no qual é possível preservar amostras biológicas por tempo indeterminado, como também viabilizar a formação dos criobancos (SILVA *et al.*, 2019b). Pela criopreservação é possível a conservação de embriões, tecidos somáticos e germoplasmas (COMIZZOLI, 2015). Até agora, a maioria dos esforços tem se concentrado em bancos de gametas masculinos porque há mais experiência na coleta de sêmen em diferentes espécies e as células espermáticas são mais resistentes a temperaturas de congelamento do que outras células, como os oócitos. No entanto, muitas etapas são necessárias durante o delicado processo de criopreservação, incluindo a separação do plasma seminal, diluição, exposição a crioprotetor, refrigeração, congelamento e descongelamento (SILVA *et al.*, 2019c). O objetivo do artigo é revisar o estado da arte na criopreservação de sêmen de onças pintadas e discutir o desenvolvimento de bancos sistemáticos para a conservação dessa espécie.

COLETA DE SÊMEN E MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS

A metodologia aplicada para a coleta seminal é o pilar para uma criopreservação de sucesso. Em carnívoros, a obtenção dos espermatozoides inclui diversos métodos, como a manipulação, a eletroejaculação e a cateterização uretral por indução farmacológica (CATARDO *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2019).

Dentre os métodos citados, o predito para coleta em carnívoros selvagens, e também o mais descrito para as onças-pintadas até o presente momento é a eletro-ejaculação (JOHNSON, 2018; SILVA *et al.*, 2019b). A eletro-ejaculação consiste na aplicação de uma série de pulsos elétricos alternados, a partir de uma sonda introduzida no reto do animal, posicionada próxima a próstata, que desencadeiam a ejaculação. Esta técnica é realizada sob anestesia, o que confere segurança à equipe e o animal (WILDT *et al.*, 1983). De modo geral, os protocolos de eletroejaculação para espécie onça-pintada envolve um conjunto total de 80 estímulos elétricos, entre 4 a 6 volts, divididos em três séries (PAZ *et al.*, 2007; GONZALES *et al.*, 2016). Outro protocolo sugerido consiste no emprego de três séries de estímulos crescentes, sendo a primeira de 5 volts, 6volts e 7volts, a segunda com 6 a 8 volts e por fim, 8 e 9 volts; em cada série, um tempo de duração de dois segundos é estipulado para aplicação das voltagens distintas e, uma pausa de cinco minutos é dada entre uma série e outra (SILVA *et al.*, 2019a, 2020).

Em relação a anestesia realizada no procedimento de eletroejaculação, a combinação de dexmedetomidina e cetamina fornece tempo de decúbito suficiente para a realização dos procedimentos de coleta; além disso, não interfere nos parâmetros seminais (SILVA *et al.*, 2020).

O principal impedimento à eletro-ejaculação é a facilidade de contaminação da amostra de sêmen com urina. Para minimizar a contaminação, aconselha-se a cateterização do animal com um cateter uretral antes do procedimento, para remoção de todo o conteúdo da bexiga (SILVA *et al.*, 2020). É também recomendado a realização da lavagem do sêmen por centrifugação a 300g por 10 minutos, usando meios apropriados para evitar redução da qualidade seminal (SILVA *et al.*, 2019c).

Recentemente, a coleta de sêmen por cateterismo uretral através da indução farmacológica tem sido proposta para as onças-pintadas (ARAUJO *et al.*, 2018; 2020; NETO *et al.*, 2019). Essa metodologia foi desenvolvida por Araujo (2016) e permitiu a obtenção de amostras com cerca de 77% de espermatozoides móveis com vigor médio de 3,75. Para que seja realizado o cateterismo uretral, é requerido a aplicação de um alfa-adrenérgico, droga agonista que estimula a ereção e a liberação dos espermatozoides na uretra; a medetomidina é a mais amplamente utilizada nos protocolos. Após 20-40 minutos da aplicação desse anestésico, um cateter urinário, com dimensões de 1mm de diâmetro e 130mm de comprimento, é introduzido na uretra até atingir a porção prostática do ducto, porém sem alcançar a bexiga; posteriormente, o cateter é removido a fim de recolher o sêmen. O cateter também pode ser acoplado a uma seringa visando gerar uma pressão negativa e assim, facilitar a coleta (MOREIRA, 2017; ARAUJO *et al.*, 2018).

Outra possibilidade de obtenção de material é a recuperação dos espermatozoides epididimários, através da lavagem ou do fatiamento da estrutura epidídimo (KOCHAN *et al.*, 2019). Esta é uma estratégia importantes para a obtenção dos gametas de animais que morreram,

especialmente em zoológicos e parques, ou aqueles mortos em acidentes rodoviários, que é uma das principais razões para mortes de espécies selvagens na América (JEWGENOW *et al.*, 1997).

MANUSEIO INICIAL DO SÊMEN

A manipulação do sêmen coletado começa com o processo de diluição desse material biológico em extensores apropriados. A escolha de um bom extensor é fundamental para a manutenção da funcionalidade e morfologia espermática. Ademais, é primícia para bons resultados na criopreservação. A composição do extensor deve contemplar substâncias crioprotetoras, antibióticos, entre outros aditivos (MARTINS e JUSTINO, 2015). Dentre os extensores, o TRIS-base (Tris-hidroximetil-aminometano) acrescido de gema de ovo, nas concentrações de 10 a 20%, é optado para a espécie onça-pintada (SILVA *et al.*, 2017; 2020; ARAUJO *et al.*, 2020). A adição desse extensor geralmente é dada em duas fases, onde a primeira parte da diluição é realizada a 37 °C (ou a temperatura ambiente) e o mesmo não apresenta em sua composição crioprotetor penetrante; já o segundo momento da diluição ocorre durante a curva de refrigeração (SILVA *et al.*, 2019c).

A água de coco em pó específica para felinos (ACP-117c) também tem sido proposta como alternativa promissora a conservação dos espermatozoides de onças-pintadas (SILVA *et al.*, 2020). Esta foi anteriormente testada em espermatozoides epididimários de gato doméstico, onde mostrou resultados interessantes durante a refrigeração dos gametas (BARBOSA *et al.*, 2020). Nas onças-pintadas, o uso do ACP-177c, acrescido de 20% de gema de ovo, apresentou resultados acima de 90% de motilidade total pós-diluição e 75% durante a refrigeração a 5°C da amostra espermática. Ademais, esse extensor promoveu a manutenção das características cinéticas pós-descongelamento, sendo próximas as amostras submetidas ao TRIS (SILVA *et al.*, 2020).

Outro extensor utilizado é o a base de lactose (PAZ *et al.*, 2007). Esse componente dissacarídeo atua essencialmente como crioprotetor externo, elevando a pressão osmótica extracelular e conseqüentemente, desidratando a célula e reduzindo a formação de cristais de gelo intracelular no gameta (SILVA e GUERA, 2011). Meios de cultivo comercial também são utilizados para a diluição seminal na espécie, tal como o Ham-F10 (Nutricell Nutrientes Celulares®) (GONZALES *et al.*, 2016).

Quanto aos crioprotetores adicionados nos extensores, o glicerol é majoritariamente empregado, nas concentrações finais de 6% e 4% (PAZ *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2020). O glicerol é um crioprotetor intracelular que penetra a célula por transporte passivo e substitui parcialmente o seu conteúdo de água e eletrólitos, impedindo a formação dos cristais de gelo; ademais, esse interage com componentes da membrana plasmática da cabeça espermática, glicoproteínas e fosfolipídios, reduzindo a sua fluidez (DI DOMENICO *et al.*, 2015; SIEME *et al.*, 2016). O emprego de outros crioprotetores na conservação dos gametas de onças pintadas não foi documentado até o presente momento.

Outro componente essencial do extensor é o antibiótico; este viabiliza a utilização do sêmen diluído na biotécnica de criopreservação associado a inseminação artificial e/ou fertilização *in vitro*, uma vez que é sabido que o este pode carregar alguns contaminante

(MOUTINHO *et al.*, 2011). Paz *et al.* (1990) descreveram a presença de *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Escherichia coli* e *Corynebacterium sp* no sêmen das onças-pintadas. Assim, recomenda-se a adição de penicilina e estreptomicina, em concentrações de 1000 IU/mL e 1000 mg/mL, respectivamente (SILVA *et al.*, 2019c).

Por fim, o uso de outras substâncias aditivas não é recorrente nas biotécnicas que envolve a manipulação do sêmen dos felinos selvagens. Em estudo recente, foi proposta a adição de Pasta Equex STM, a 0,5%, no meio crioprotetor, sendo observado média de motilidade total 28,60% pós-descongelção (ARAUJO *et al.*, 2020). A pasta Equex STM associada a extensor TRIS-gema confere efeito positivo sobre a integridade do acrossoma, impedindo ou reduzindo mudanças semelhantes a capacitação, através da dispersão das lipoproteínas da gema, tornando-as mais disponíveis no meio e conseqüentemente, aumentado o seu efeito crioprotetor sob as membranas biológicas (SOUZA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2019).

PROTOSCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

Os protocolos de criopreservação baseiam-se nas etapas: de resfriamento da amostra espermática, onde a temperatura é gradualmente reduzida; seguida da desidratação celular pela interação dos gametas com os crioprotetores penetrantes; da congelação pela submissão do material a vapores de nitrogênio líquido (-196 °C); e da descongelção, com a retomada dos espermatozoides a temperatura ambiente para posterior utilização (MARTINS e JUSTINO, 2015).

A diluição do sêmen está diretamente ligada ao resfriamento, uma vez que o extensor contendo a gema de ovo irá estabilizar as membranas biológicas dos gametas e assim, reduzir o choque térmico (SILVA e GUERRA, 2011). Nos protocolos aplicados a conservação do sêmen de onças-pintadas, as amostras são comumente mantidas a 5 °C (dita temperatura de equilíbrio) por períodos entre 60 minutos (PAZ *et al.*, 2007) ou 90 minutos (ARAUJO *et al.*, 2020). E o abaixamento a temperatura equilíbrio é dado por curva resfriamento lenta de - 0,53 °C/min, visto a sensibilidade dos espermatozoides a mudanças bruscas (BONAURA *et al.*, 2013; ARAUJO *et al.*, 2020). O resfriamento é conduzido em recipientes de vidro ou plástico contendo a amostra de sêmen, imersos em uma garrafa com água e gelo reciclável para a condução/controle da temperatura, semelhante a um refrigerador sendo que manual (ARAUJO *et al.*, 2020).

Em outro estudo na espécie propõem uma redução inicial de 38 para 15 °C, com curva de resfriamento de 0,4 °C/min, mantendo as amostras estabilizadas nessa temperatura por 40 minutos e só posteriormente, a submissão para 5 °C por 30 minutos, ocorrendo a adição do crioprotetor penetrante e direcionamento para a congelação em rampa de nitrogênio. Esse protocolo é rotineiramente adotado em carnívoros selvagens e mostrou média de motilidade total pós-descongelção de 36,9% (SILVA *et al.*, 2019c, 2020).

Quanto a etapa da congelação, os protocolos usualmente realizam o envase dos espermatozoides resfriados em palhetas plásticas de 0,25mL e as direcionam a vapores de nitrogênio por 20 minutos, finalizando com o mergulho em nitrogênio líquido e armazenamento

em botijões criogênicos (PAZ *et al.*, 2007). Outros tempos são propostos na literatura como 5 minutos (SILVA *et al.*, 2020) e 15 minutos (ARAUJO *et al.*, 2020).

O método de descongelamento envolve a submissão da amostra a 38-37 °C por 60 segundos; esse protocolo é amplamente utilizado nos carnívoros (SILVA *et al.*, 2020). Ultra temperaturas de descongelamento já foram testadas em outros felinos selvagens (TEBET, 2004), porém não são documentadas em onças-pintadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preservação da onça pintada está diretamente atrelada ao desenvolvimento de políticas públicas que tenham efetividade real para manutenção dessa espécie em seu habitat, por meio da preservação do ecossistema a qual está inserida. Porém para otimizar o processo de preservação, as biotécnicas reprodutivas surgem como principal metodologia. Dentre as biotécnicas, a criopreservação de sêmen é a de maior aplicabilidade devido a sua facilidade operacional principalmente quando utilizamos indivíduos mantidos em cativeiro. Esta biotecnologia poderá ajudar na formação de futuros bancos de germoplasma para a onça pintada, contornando um dos principais problemas em espécies ameaçadas de extinção, que é a consanguinidade. O uso rotineiro dessas amostras na reprodução assistida de indivíduos em cativeiro e principalmente em vida livre contribuirão de maneira fundamental para a estabilização da espécie, e se possível ocorrendo a proteção de seus habitats, então será possível evitar o desaparecimento desta espécie.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, G.R. Coleta farmacológica e criopreservação de sêmen de grandes felinos, mantidos em cativeiro e capturados em vida livre com o uso de armadilhas de laço. 2016. 93p. (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2016.
- ARAUJO, G.R.; PAULA, T.A.R.; DECO-SOUZA, T.; MORATO, R.G.; BERGO, L.C.F.; SILVA, L.C.; COSTA, D.S.; BRAUD C. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. *Animal Reproduction Science*, v.195, n.1, p.1-7, 2018.
- ARAUJO, G.R.; DE DECO-SOUZA, T.; BERGO, L.C.F.; DA SILVA, L.C.; MORATO, R.G.; JORGE-NETO, P.N.; SILVA, M.C.C.; MACEDO, G.G; DE PAULA, T.A.R. Field friendly method for wild feline semen cryopreservation. *Journal of Threatened Taxa*, v.12, n.5, p.15557-15564, 2020.
- BARBOSA, B.S.; IZZO, R.G.; PRAXEDES, E.A.; FERNANDES, D.P.; SANTOS, F.A. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários: Perspectivas e aplicações na espécie felina doméstica. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v.13, n.2, p.284-292, 2019.
- BARBOSA, B.S.; IZZO, R.G.; SILVA, H.V.R.; NUNES, T.G.P.; BRITO, B.F.; SILVA, T.F.P.; SILVA, L.D.M. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from domestic cat using

powdered coconut water (ACP-117c) and TRIS extenders. *Cryobiology*, v.92, n.1, p.103-108, 2020.

BONAURA, M.C.; JURADO, S.B.; NÚÑEZ-FAVRE, R.D.L.A.; PRADERIO, R.; TITTARELLI, C.M.; STORNELLI, M.A. Alteraciones Ultramicroscópicas Observadas en Espermatozoides Felinos (*Felis catus*) Congelados-Descongelados/ultramicroscopic Changes Observed in Sperm Cats (*Felis catus*) Frozen-thawed. *Revista Ciencias Morfológicas*, v.15, n.2, p.25-33, 2013.

CATARDO, F.A.; SCOLARI, S.; MÁS-ROSA, S. Técnicas reprodutivas, criopreservação espermática e coleta de sêmen em felinos selvagens visando à conservação – Revisão Bibliográfica. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.10, n.30, p.1-11, 2018.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development*, v.40, n.5, p.493-504, 2000.

COMIZZOLI, P.; SONGSASEN, N.; HAGEDORN, M.; WILDT, D.E. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. *Theriogenology*, v.78, n.8, p.1666–1681, 2012.

COMIZZOLI, P. Biotechnologies for wildlife fertility preservation. *Animal Frontiers*, v.5, n.1, p.73-78, 2015.

CUYCKENS, G. A. E.; PEROVIC, P. G.; HERRÁN, M. Living on the edge: regional distribution and retracting range of the jaguar (*Panthera onca*). *Animal Biodiversity and Conservation*, v.40, n.1, p.71–86, 2017.

DE LA TORRE, J.A.; GONZÁLEZ-MAYA, J.F.; ZARZA, H.; CEBALLOS, G.; MEDELLÍN, R. A. The jaguar's spots are darker than they appear: assessing the global conservation status of the jaguar *Panthera onca*. *Oryx*, v.52, n.2, p.300–315, 2017.

DI DOMENICO, D.; PEDROSO, E.M.S.R.; TEIXEIRA, P.P.M. Diferenças da célula espermática suína e crioprotetores: Revisão. *Nucleus Animalium*, v.7, n.1, p.1-5, 2015.

GONZALEZ, S.J.; HOWARD, J.G.; BROWN, J.; GRAJALES, H.; PINZÓN, J.; MONSALVE, H.; MONSALVE, H.; MORENO, M.A.; ESCOBAR, C.J. Reproductive analysis of male and female captive jaguars (*Panthera onca*) in a Colombian zoological park. *Theriogenology*, v.89, n.1, p.192-200, 2017.

HOLT, W.V.; LLOYD, R.E. Artificial insemination for the propagation of CANDÉS: The reality! *Theriogenology*, v.71, n.1, p.228–235, 2009.

HUNTER, L. *Wild cats of World*. Bloosbury Natural History. 1ª ed., Bloomsbury Publishing, London, 2015. 240p.

JEWGENOW, K.; BLOTTNER, S.; LENGWINAT, T.; MEYER, H.H. New methods for gamete rescue from gonads of nondomestic felids. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, v.51, n.1, p.33-39, 1997.

JOHNSON, A.K. Assisted reproduction in the male cat. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v.48, n.4, p.511-521, 2018.

KOCHAN, J.; NIŻAŃSKI, W.; MOREIRA, N.; CUBAS, Z.S.; NOWAK, A.; PROCHOWSKA, S.; PARTYKA, A.; MLODAWSKA, W.; SKOTNICKI, J. ARTs in wild felid conservation programmes in Poland and in the world. *Journal of veterinary research*, v.63, n.3, p.457-464, 2019.

LEITE-PITMAN, M.R.P.; OLIVEIRA, T.G.; PAULA, R.C.; INDRUSIAK, C. Manual de identificação, prevenção e controle de predação por carnívoros. 1ª ed., IBAMAB, Brasília, Brasil, p.83, 2002.

MARTINS, M.I.M.; JUSTINO, R.C. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.39, n.1, p.129-135, 2015.

MOREIRA, N. Exame andrológico e criopreservação de sêmen em felídeos selvagens. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.41, n.1, p.312-315, 2017.

MOUTINHO, E.D.P.M.; LEÃO, K.M.; DA SILVA, R.P.; DO CARMO SILVA, N.; RODRIGUES, M.C.; DA SILVA, M.A.P. Efeito de diferentes antibióticos na composição do diluente, sobre a viabilidade do sêmen suíno refrigerado. *PUBVET*, v.5, n.19, p.1118-1123, 2011.

NETO, P.N.J.; ARAUJO, G.R.; BITTENCOURT, R.F.; CSERMAK, J.R.A.C.; PIZZUTTO, C.S. Pharmacological semen collection of Brazilian wild felids. In: *Revista Brasileira de Reprodução Animal. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*. p.704, 2019.

PAZ, R.C.R.; GUIDO, M.C.; COSTA, E.O.; ZÜGE, R.M.; MORATO, R.G.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; BARNABE, R.C. Microbiota Prepuccial de onças pintadas (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro. In: *Anais do Congresso Brasileiro para Conservação de Felinos Neotropicais, Jundiaí, São Paulo, Brasil, 1999*.

PAZ, R.C.R.; ZÜGE, R.M.; BARNABE, V.H. Frozen jaguar (*Panthera onca*) sperm capacitation and ability to penetrate zona free hamster oocytes. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.44, n.5, p.337-344, 2007.

RIBEIRO, R.; ALMEIDA, A.R.; MARTINEZ, A. Métodos de coleta de sêmen em felídeos. *Enciclopédia Biosfera*, v.16, n.29, p.1-15, 2019.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W.F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal reproduction science*, v.169, p.2/5, 2016.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.4, p.370-384, 2011.

SILVA, H.V.R.; NUNES, T.G.P.; RIBEIRO, L.R.; FREITAS, L.A.; OLIVEIRA, M. F.; ASSIS NETO, A.C.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Morphology, morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*) sperm. *Animal Reproduction Science*, v.203, n.1, p.84-93, 2019a.

SILVA, H.V.R. Biotécnicas reprodutivas em carnívoros neotropicais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.42, n.3-4, p.141-145, 2019b.

SILVA, H.V.R.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M.; COMIZZOLI, P. Semen Cryopreservation and Banking for the Conservation of Neotropical Carnivores. *Biopreservation and Biobanking*, v.17, n.2, p.183-188, 2019c.

SILVA, H.V.R.; NUNES, T.G.P.; BRITO, B.F.; CAMPOS, L.B.; SILVA, A.M.; SILVA, A.R.; COMIZZOLI, P.; SILVA, L.D.M. Influence of different extenders on morphological and functional parameters of frozen-thawed spermatozoa of jaguar (*Panthera onca*). *Cryobiology*, v.92, n.1, p.53-61, 2020.

SOUZA, A.L.P.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R. Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.38, n.2, p.98-102, 2014.

TEBET, J.M. Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*-Schreber, 1775), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*-Linnaeus, 1758) e o gato doméstico (*Felis catus*). 2004. 116p. (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária e Ciência Animal). Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP, 2004.

WILDT, D.E.; BUSH, M.; HOWARD, J.G.; O'BRIEN, S.J.; MELTZER, D.; VAN DYK, A.; EBEDES, H.; BRAND, D.J. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biology Reproduction*, v.29, n.4, p.1019–1025, 1983.

WILDT, D.E.; COMIZZOLI, P.; PUKAZHENTHI, B.; SONGSASEN, N. Lessons from biodiversity the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v.77, n.5, p.397-409, 2010.